(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 537 527**

(51) Int. CI.:

C07K 14/495 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2006 E 12171205 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2497780**

(54) Título: **Compuestos relacionados con el TDF y análogos de los mismos**

(30) Prioridad:

20.09.2005 US 719014 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.06.2015

(73) Titular/es:

THRASOS INNOVATION, INC. (100.0%)
7171 Fredrick-Banting Street, Suite 1230
Saint-Laurent, QC H4S 1Z9, CA

(72) Inventor/es:

CARLSON, WILLIAM D.;
KECK, PETER C.;
SWORIN, MICHAEL y
BOSUKONDA, DATTATREYMURTY

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

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

Compuestos relacionados con el TDF y análogos de los mismos

Campo de la invención

La presente invención se relaciona, en general, con análogos del factor de diferenciación tisular (TDF). Más concretamente, la invención se relaciona con métodos basados en la estructura y con composiciones útiles en la identificación, el diseño y la producción de moléculas que actúan como moduladores funcionales de los receptores de tipo TDF.

Antecedentes de la invención

La diferenciación celular es la característica central de la morfogénesis de los tejidos, que se inicia durante la embriogénesis y continúa en diversos grados a lo largo de la vida de un organismo en los mecanismos de reparación y regeneración de los tejidos adultos. El grado de morfogénesis en el tejido adulto varía entre los diferentes tejidos y está relacionado, entre otras cosas, con el grado de renovación celular en un tejido dado.

Los sucesos celulares y moleculares, que gobiernan el estímulo para la diferenciación de las células, es un área de investigación intensiva. En los campos médico y veterinario, se anticipa que el descubrimiento del factor o factores que controlan la diferenciación celular y la morfogénesis de los tejidos producirá un significativo avance sobre la capacidad para reparar y regenerar tejidos y órganos de un sujeto enfermos, lesionados o dañados. Como áreas particularmente útiles para la terapéutica humana y veterinaria, se incluyen la cirugía reconstructiva, el tratamiento de enfermedades degenerativas de los tejidos, incluyendo, por ejemplo, la artritis, el enfisema, la osteoporosis, la cardiomiopatía, la cirrosis, las enfermedades degenerativas de los nervios, las enfermedades inflamatorias y el cáncer, y en la protección y/o regeneración de tejidos, órganos y miembros. Los términos "morfogenético" y "morfogénico" son con frecuencia utilizados indistintamente.

Se han aislado una serie de diferentes factores en los últimos años que parecen tener un papel en la diferenciación celular. Recientemente, se ha identificado una subfamilia distinta de la "superfamilia" de polipéptidos estructuralmente relacionados a los que se hace referencia en la técnica como la "superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta, TGF-β) de polipéptidos" como morfógenos de tejidos.

Los miembros de esta "subfamilia" distinta de polipéptidos morfogénicos tisulares comparten una homología substancial de secuencia de aminoácidos en sus dominios C-terminales morfogenéticamente activos, incluyendo un esqueleto conservado de seis o siete cisteínas, y comparten la actividad *in vivo* de inducción de morfogénesis específica de tejidos en una variedad de órganos y tejidos. Los polipéptidos aparentemente contactan e interaccionan con células progenitoras, *v.g.*, uniéndose a moléculas adecuadas de la superficie celular, predisponiendo o de algún otro modo estimulando a las células para que proliferen y se diferencien en un ambiente morfogenéticamente permisivo. Estudios recientes sobre la unión a receptores de la superficie celular de diversos miembros de la superfamilia polipeptídica TGF-beta sugieren que los péptidos median su actividad por interacción con dos receptores diferentes, a los que se hace referencia como receptores de Tipo I y de Tipo II. Los receptores de Tipo I o Tipo II son ambos serina/treonina kinasas y comparten estructuras similares: un dominio intracelular que consiste esencialmente en la kinasa, una secuencia hidrofóbica corta extendida suficiente para abarcar la membrana una vez, y un dominio extracelular caracterizado por una elevada concentración de cisteínas conservadas.

Los polipéptidos morfogénicos son capaces de inducir la cascada del desarrollo de sucesos celulares y moleculares que culminan en la formación de nuevo tejido específico de órgano, incluyendo cualquier vascularización, formación de tejido conectivo e innervación nerviosa que requiera el tejido natural. Se ha visto que los polipéptidos inducen morfogénesis del cartílago y del hueso, así como de los tejidos periodontales, de la dentina, del hígado, del corazón, del riñón y del tejido neural, incluyendo el tejido retiniano.

Estos polipéptidos morfogénicos de tejidos están reconocidos en la técnica como una subfamilia distinta de polipéptidos diferentes de otros miembros de la superfamilia TGF-beta, en cuanto a que comparten un alto grado de identidad de secuencia en el dominio C-terminal y a que los polipéptidos morfogénicos de tejidos son capaces de inducir por sí mismos la cascada completa de sucesos que dan lugar a la formación de tejido funcional, en lugar de simplemente inducir la formación de tejido fibrótico (cicatricial). Específicamente, los miembros de la familia de los polipéptidos morfogénicos son capaces de todo lo siguiente en un ambiente morfogenéticamente permisivo: estimulación de la proliferación celular y de la diferenciación celular y soporte del crecimiento y del mantenimiento de las células diferenciadas. Los polipéptidos morfogénicos pueden actuar también como factores endocrinos, paracrinos o autocrinos.

Como resultado de sus actividades biológicas, se ha dedicado un significativo esfuerzo al desarrollo de una terapéutica basada en morfógenos para el tratamiento de tejido de mamíferos lesionado o enfermo, incluyendo, por ejemplo, composiciones terapéuticas para inducir la curación regenerativa de defectos óseos, tales como fracturas, así como composiciones terapéuticas para conservar o restaurar las propiedades metabólicas sanas en el tejido

enfermo, *v.g.*, tejido óseo osteopénico.

WO03106656 describe análogos del factor de diferenciación tisular (TDF). Más concretamente, se describen métodos basados en la estructura y composiciones útiles en el diseño, la identificación y la producción de moléculas que actúan como moduladores funcionales de los receptores de tipo TDF, así como métodos de detección, prevención y tratamiento de trastornos asociados al TDF.

WO03106972 describe análogos del factor de diferenciación tisular (TDF). Más concretamente, se describen métodos basados en la estructura y composiciones útiles en el diseño, la identificación y la producción de moléculas que actúan como moduladores funcionales de los receptores de tipo TDF, así como métodos de detección, prevención y tratamiento de trastornos asociados al TDF.

Resumen de la invención

La presente invención se relaciona con composiciones que tienen propiedades similares a los polipéptidos de la superfamilia TGF-beta y con métodos para el tratamiento profiláctico y terapéutico de un sujeto que tiene estados de enfermedad caracterizados por niveles aberrantes de polipéptidos de tipo TGF-beta. Más en particular, las composiciones y los métodos tienen propiedades de tipo proteína morfogenética ósea y son útiles en el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas a la misma. En un aspecto, la invención incluye un compuesto polipeptídico relacionado con el factor de diferenciación tisular (TDFRP) que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEC. Nº ID.: 333. Se describen polinucleótidos codificantes del polipéptido de la SEC. Nº ID.: 333. También se incluyen variantes del polipéptido en las que cada residuo de cisteína está substituido con un aminoácido que tiene una cadena lateral que contiene un resto de hidroxilo, tiol, amina, ácido carboxílico o ácido sulfónico que puede ser usado para ciclar el compuesto. En una realización, el compuesto TDFRP modula la transducción de señal a través de una membrana de una célula que expresa un receptor del factor de diferenciación tisular (un TDFR), tal como, aunque sin limitación, un receptor de la superfamilia TGF-beta. Se describe una molécula de ácido nucleico aislada codificante del compuesto TDFRP. El ácido nucleico aislado puede ser un vector, y el vector puede incluir eventualmente una secuencia promotora que puede estar operativamente unida al ácido nucleico, donde el promotor provoca la expresión de la molécula de ácido nucleico. El promotor puede ser inducible. El vector puede ser transformado en una célula, tal como una célula procariótica o eucariótica, preferiblemente una célula de mamíferos o más preferiblemente una célula humana. El vector puede ser un vector vírico capaz de infectar una célula de un sujeto y de provocar la expresión de un polipéptido de las SEC. Nº ID.: 1-347 en un animal infectado con el virus.

En otro aspecto, la invención incluye una composición farmacéutica que tiene un compuesto TDFRP con un soporte farmacéuticamente aceptable.

Se describe un anticuerpo para un compuesto TDFRP o un fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un compuesto TDFRP. El anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como, aunque sin limitación, un fragmento Fab, (Fab)2, Fv o Fc. El anticuerpo o su fragmento puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo o su fragmento puede ser un anticuerpo humanizado. Se describe un anticuerpo o fragmento de anticuerpo inmunoespecífico para la SEC. Nº ID.: 333 o al menos 6 residuos de aminoácidos contiguos de la SEC. Nº ID.: 333, con o sin un soporte farmacéuticamente aceptable. En aún otra realización, la invención incluye una composición farmacéutica que tiene una secuencia polipeptídica de la SEC. Nº ID.: 333, con un soporte farmacéuticamente aceptable.

Se describe un método para preparar un compuesto TDFRP, consistiendo el método en las etapas de cultivo de una célula que contiene un ácido nucleico codificante de la SEC. Nº ID.: 333 en condiciones que permiten la expresión del compuesto TDFRP; y recuperación del compuesto TDFRP expresado.

Se describe un método para determinar la presencia o la cantidad del compuesto TDFRP en una muestra, consistiendo el método en las etapas de obtención de la muestra, contacto de la muestra con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para la SEC. Nº ID.: 333 que se une inmunoespecíficamente al compuesto TDFRP y determinación de la presencia o cantidad del anticuerpo unido al compuesto TDFRP, determinando así la presencia o cantidad del compuesto TDFRP en la muestra.

Se describe un método para determinar la presencia o la cantidad de la molécula de ácido nucleico codificante de la SEC. Nº ID.: 333 en una muestra, consistiendo el método en las etapas de obtención de la muestra, contacto de la muestra con una sonda de ácido nucleico que se hibrida con la molécula de ácido nucleico y determinación de la presencia o cantidad de la sonda hibridada con la molécula de ácido nucleico, determinando así la presencia o la cantidad de la molécula de ácido nucleico en la muestra.

Se describe un método de identificación de un compuesto candidato que se una a la SEC. Nº ID.: 333, consistiendo el método en las etapas de contacto del compuesto con el compuesto TDFRP y determinación de si el compuesto candidato se une al compuesto TDFRP.

En un aspecto, la invención incluye un compuesto que comprende la SEC. Nº ID.: 333 para uso en un método de tratamiento o prevención de un trastorno asociado al factor de diferenciación tisular. En una realización, el trastorno asociado al factor de diferenciación tisular es seleccionado entre el grupo consistente en una enfermedad degenerativa tisular y la regeneración tisular. En otra realización, la enfermedad degenerativa tisular es una enfermedad renal, una enfermedad cardíaca, una lesión cerebral traumática, un accidente cerebrovascular, aterosclerosis, artritis, enfisema, osteoporosis, una cardiomiopatía, cirrosis, una enfermedad degenerativa de los nervios, enfermedad de Holt-Oram, una enfermedad congénita, una enfermedad pulmonar, una enfermedad ocular, nefropatía diabética, una enfermedad ósea degenerativa, una enfermedad periodontal, una enfermedad renal crónica, diabetes, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad inmune, una enfermedad esquelética, una enfermedad reproductiva, una enfermedad hematopoyética o cáncer. En otra realización, la regeneración tisular incluye la regeneración del tejido del músculo (particularmente del músculo cardíaco), dendrítico, del nervio, del riñón, del cerebro, del hueso, de la piel, del pulmón, del músculo, del ovario, de los testículos, del corazón, del bazo, del cartílago, del nervio, periodontal, de la dentina, del hígado, vascular, conectivo, linfático, hematopoyético o renal. Se describe un método de tratamiento o prevención de un trastorno asociado al factor de diferenciación tisular mediante administración a un sujeto en el que se desea dicho tratamiento o prevención de un ácido nucleico codificante de la SEC. Nº ID.: 333 en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el trastorno asociado al factor de diferenciación tisular en el sujeto. Se describe un método de tratamiento o prevención de un trastorno asociado al factor de diferenciación tisular mediante administración a un explante o cultivo *ex vivo* de un compuesto TDFRP en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el trastorno asociado al factor de diferenciación tisular. En una realización, el sujeto es un sujeto humano. En otra realización, el sujeto es un sujeto animal.

Se describe un kit que tiene, en uno o más envases, una composición farmacéutica de TDFRP que comprende la SEC. Nº ID.: 333 e instrucciones para usar sus contenidos.

En aún otro aspecto, la invención incluye un método para determinar la presencia de, o la predisposición a, una enfermedad asociada a niveles alterados del receptor del factor de diferenciación tisular en un primer sujeto, consistiendo el método en las etapas de obtención de una muestra de ensayo de un primer sujeto, contacto de la muestra de ensayo del primer sujeto con un compuesto de TDFRP de la SEC. Nº ID.: 333, detección del nivel de complejo compuesto/receptor de factor de diferenciación tisular, cuantificación del nivel de expresión del receptor del factor de diferenciación tisular en la muestra del primer sujeto y comparación de la cantidad del receptor del factor de diferenciación tisular en la muestra de la etapa (a) con la cantidad del receptor del factor de diferenciación tisular presente en una muestra de control de un segundo sujeto del que se sabe que no padece, o no está predispuesto a, la enfermedad, donde una alteración en el nivel de expresión del receptor del factor de diferenciación tisular en el primer sujeto en comparación con la muestra de control indica la presencia de, o predisposición a, la enfermedad.

Se describe un método de tratamiento de un estado patológico en un sujeto, consistiendo el método en administrar al sujeto un compuesto en una cantidad suficiente para aliviar el estado patológico, donde el compuesto es un compuesto que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 90% a un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos que incluye la SEC. Nº ID.: 333.

Se describe un método de tratamiento de un estado patológico en un sujeto, consistiendo el método en administrar al sujeto un anticuerpo o fragmento del mismo inmunoespecífico para la SEC. Nº ID.: 333 o al menos 6 aminoácidos contiguos de la misma, en una cantidad suficiente para aliviar el estado patológico. Se describe un método de tratamiento de un trastorno asociado al factor de diferenciación tisular en un sujeto, incluyendo el método la administración al sujeto de al menos un compuesto de la SEC. Nº ID.: 333 que modula la expresión o la actividad de un compuesto TDFRP. En aún otra realización, el trastorno asociado al factor de diferenciación tisular es seleccionado entre el grupo consistente en enfermedad renal, lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular, aterosclerosis, artritis, enfisema, osteoporosis, cardiomiopatía, cirrosis, enfermedad degenerativa de los nervios, enfermedad de Holt-Oram, enfermedad congénita, enfermedad pulmonar, enfermedad ocular, nefropatía diabética, enfermedad ósea degenerativa, enfermedad renal, enfermedad periodontal, enfermedad renal crónica, diabetes, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, enfermedad inflamatoria, enfermedad inmune, enfermedad esquelética, enfermedad reproductiva, enfermedad hematopoyética o cáncer. En aún otra realización, la invención incluye un compuesto para uso en el tratamiento de un trastorno asociado al factor de diferenciación tisular, donde el compuesto es la SEC. Nº ID.: 333. En aún otra realización, la invención incluye el uso de un compuesto para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado al factor de diferenciación tisular, donde el compuesto es la SEC. Nº ID.: 333.

Se describe un método de identificación de un compuesto candidato que se una a un compuesto TDFRP, consistiendo el método en las etapas de obtención de un compuesto candidato, contacto del compuesto candidato con el compuesto TDFRP de SEC. Nº ID.: 333 en condiciones en las que se forme un complejo entre el compuesto de ensayo y el compuesto TDFRP, incubación del complejo en condiciones en las que se formen cocristales de la forma compleja, determinación de los coordinados atómicos estructurales del complejo por difracción de rayos x y modelización de la estructura del complejo para determinar la unión del compuesto candidato al compuesto TDFRP. Se describe una preparación cristalina de un compuesto candidato y un compuesto TDFRP. El complejo puede no cristalizarse, pero se somete el complejo a espectroscopia magnética nuclear o espectroscopia de masas para

determinar la unión del complejo.

Se describe un sujeto no humano transgénico, por ejemplo, aunque sin limitación, un ratón, que tiene genómicamente integrado en células objeto no humanas un ácido nucleico codificante de la SEC. Nº ID.: 333, que tiene un primer segmento de secuencia que es una región reguladora y un segundo segmento de secuencia que es una secuencia polinucleotídica codificante de un compuesto TDFRP, donde el primer segmento de secuencia está operativamente unido al segundo segmento de secuencia. El primer segmento puede ser un elemento o elementos de expresión regulable, que se someten a regulación específica de células o de tejidos. Se describen tejidos o células derivados o cultivados a partir del sujeto transgénico no humano.

En otro aspecto, la invención proporciona un dispositivo médico implantable revestido que, cuando se implanta en un sujeto, previene o trata un trastorno en el sujeto. El revestimiento del dispositivo médico implantable puede contener la secuencia de aminoácidos de la SEC. Nº ID.: 333, o polinucleótidos codificantes de la SEC. Nº ID.: 333, y sus variantes, análogos, homólogos o fragmentos.

Se describe un método de producción de un dispositivo adecuado para implantación en un sujeto mediante obtención de un dispositivo médico implantable y revestimiento del dispositivo médico. El revestimiento del dispositivo implantable puede contener una secuencia de aminoácidos de la SEC. Nº ID.: 333, o polinucleótidos codificantes de la SEC. Nº ID.: 333, y sus variantes, análogos, homólogos o fragmentos.

Se describe un método de utilización de un dispositivo para prevenir o tratar un trastorno en un sujeto. El método incluye la identificación de un sujeto con un trastorno, la obtención después de un dispositivo médico implantable que además tenga un revestimiento compuesto por una secuencia de aminoácidos de la SEC. Nº ID.: 333, o polinucleótidos codificantes de la SEC. Nº ID.: 333, y sus variantes, análogos, homólogos o fragmentos, y la implantación del dispositivo en un sujeto. El dispositivo puede ser implantado en un sujeto con un trastorno del sistema cardiovascular.

Se describen métodos de tratamiento o prevención de un trastorno o enfermedad asociada al factor de diferenciación tisular, consistiendo el método en administrar a un sujeto en el que se desea dicho tratamiento o prevención al menos un compuesto TDFRP en combinación con uno o más agentes terapéuticos en cantidades suficientes para tratar o prevenir el trastorno o enfermedad asociada al factor de diferenciación tisular en el sujeto. Por ejemplo, dichos agentes terapéuticos incluyen miméticos de pequeña molécula para los receptores de TDF, agonistas de TDF, antagonistas de TDF, proteínas morfogenéticas óseas, inhibidores de la ACE, agentes antineoplásicos, antibióticos, vacunas, agentes inmunosupresores, agentes antihipertensores y mediadores de la ruta de señalización hedgehog.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1
El compuesto TDFRP se une diferencialmente a los receptores de Tipo I. El compuesto TDFRP (SEC Nº ID.: 45) se une selectivamente al receptor ALK-3 de Tipo I BMP cuando se compara con el receptor ALK-6 de Tipo I BMP.

FIG. 2
Fosforilación de Smad 1, 5 por compuestos TDFRP en células endoteliales vasculares. Los compuestos TDFRP (SEC. Nº ID.: 16, 24, 33, 43, 45, 209, 229) actúan como agonistas de la ruta de señalización BMP y dan lugar a la fosforilación y activación del Smad 1, 5 intracelular cuando se añaden a células endoteliales vasculares en cultivo.

FIG. 3
Fosforilación de Smad 1/5 en células de cáncer de próstata humano LNCaP por los compuestos TDFRP. Los compuestos TDFRP actúan como agonistas de BMP y dan lugar a la fosforilación y activación de Smad1 y Smad5 cuando se añaden a células de cáncer de próstata LNCaP cultivadas (compuesto agonista de TDFRP: SEC. Nº ID.: 45. Se usó la SEC. Nº ID.: 16 como control negativo).

FIG. 4
Esquema del modelo de lesión renal crónica en ratón por obstrucción urinaria unilateral (OUU). Se ligó un uréter el Día 0 (D0) y los ratones recibieron uno de los siguientes tratamientos: vehículo (control), BMP-7 por administración intraperitoneal (*ip*) (control positivo) o TDFRP por administración *ip*, intravenosa (*iv*) u oral (*po*). Los ratones fueron sacrificados el Día 5 (D5) o el Día 7 (D7) y se evaluaron los riñones en cuanto a patología de la enfermedad.

FIG. 5
Reversión de la lesión renal crónica por obstrucción ureteral unilateral (OUU) por el compuesto TDFRP o BMP-7 en un modelo en ratón a 7 días. A: Sección de riñón de un animal OUU tratado con vehículo (control), B: Sección de riñón de un animal OUU que recibió administración intraperitoneal (*ip*) de BMP-7 (300 ug/kg/48 horas), C: Sección de riñón de un animal OUU que recibió administración oral de compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) (5 mg/kg/24 horas), D: Sección de riñón de un animal OUU que recibió administración intravenosa (*iv*) de compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) (5 mg/kg/24 horas). Todos los animales fueron sacrificados el Día 7 (véase el protocolo en la FIG

4) y se tiñeron las secciones de riñón con hematoxilina y eosina. Obsérvese que la administración del compuesto TDFRP atenuaba significativamente la progresión de la enfermedad por fibrosis tubulointersticial en animales OUU.

FIG. 6
Reversión de la lesión renal crónica en un modelo murino de 5 días de ratones con obstrucción ureteral unilateral (OUU) usando compuestos TDFRP o BMP-7. A: Sección de riñón de animal OUU tratado con vehículo (control), B: Sección de riñón de animal OUU que recibió intraperitonealmente *(ip)* administración de BMP-7 (300 ug/kg/48 horas), C: Sección de riñón de animal OUU que recibió administración oral de compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) (5 mg/kg/24 horas), D. Sección de riñón de animal OUU que recibió compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) administrado intravenosamente *(iv)* (50 mg/kg/24 horas). Todos los animales fueron sacrificados el Día 5 (véase el protocolo en la FIG. 4) y se tiñeron las secciones de riñón con hematoxilina y eosina. Obsérvese que la administración de compuesto TDFRP daba lugar a una progresión atenuada de la enfermedad de fibrosis tubulointersticial en animales OUU.

FIG. 7
Cuantificación del daño tubular en ratones con lesión renal crónica por obstrucción ureteral unilateral (OUU) de 5 días. Porcentaje de degradación tubular renal en riñones obstruidos OUU durante 5 días de ratones tratados con o sin compuesto TDFRP (véase el protocolo en la FIG 4). El compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) atenuaba la severidad del daño tubular causado por OUU cuando se administraba oral, intraperitoneal (*ip*) o intravenosamente (*iv*).

FIG. 8
Reversión de la fibrosis intersticial por compuestos TDFRP en un modelo de ratón CD1 de nefropatía diabética inducida por estreptozotocina (STZ). A. Esquema del protocolo experimental con STZ. Se inyectó a ratones con estreptozotocina el Día 0 (D0) para inducir diabetes y lesión renal y se les sacrificó a los 6 meses (6M). Se administró vehículo o BMP-7 (control positivo) desde D0 hasta los 6 meses (6M). Se administró TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) oral o intraperitonealmente desde el mes 5 (5M) hasta 6M durante un total de 30 días.; B: Sección de riñón de animal STZ tratado con vehículo que muestra fibrosis intersticial significativa; C: Sección de riñón de animal STZ que recibió administración *ip* de compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) (5mg/kg/24h). La administración del compuesto TDFRP revirtió eficazmente la fibrosis intersticial renal en animales STZ.

FIG. 9
Atenuación de la progresión de la fibrosis renal por compuesto TDFRP en el modelo murino de insuficiencia renal crónica, nefritis por suero nefrotóxico (NNT). A: Protocolo experimental del modelo NNT. Se administró suero nefrotóxico intravenosamente el Día 0 (D0) y se sacrificó a los animales o bien a las 6 semanas o bien a las 9 semanas. Se usaron dos regímenes de fármacos diferentes: tratamiento desde las semanas 1-6 o desde las semanas 6-9. B: Sección de riñón de animal STZ tratado con vehículo 6-9 semanas, C: Sección de riñón de animal que recibió administración oral de compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) (5mg/kg/24h) desde las semanas 6-9. Obsérvese que el compuesto TDFRP atenuaba significativamente la progresión de la fibrosis renal en animales STZ.

FIG. 10
Glomeruloesclerosis en animales en el modelo de nefritis por suero nefrotóxico (NNT). Se valoró la glomeruloesclerosis en animales NNT tratados con vehículo que no recibieron tratamiento con compuestos TDFRP o en animales NNT que fueron tratados con un compuesto TDFRP 6 semanas después de usar suero nefrotóxico para inducir enfermedad renal (véase el protocolo en la FIG X). Se administró suero nefrotóxico el Día 0 y los animales NNT desarrollaron enfermedad renal progresiva. Se evaluó la glomeruloesclerosis en animales NNT que recibieron tratamiento oral con un compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) a 5 mg/kg/24h desde las semanas 6-9 y se comparó con los animales NNT no tratados a las 6 semanas. El tratamiento con el compuesto TDFRP atenuaba la severidad de la glomeruloesclerosis en animales NNT.

FIG. 11
Atrofia tubular en animales en el modelo de nefritis por suero nefrotóxico (NNT). Se valoró la cantidad de atrofia tubular en animales NNT tratados con vehículo que no recibieron tratamiento o que recibieron tratamiento con un compuesto TDFRP. Se administró suero nefrotóxico el Día 0 y los animales NNT desarrollaron enfermedad renal progresiva. Se evaluó la atrofia tubular en animales NNT que recibieron tratamiento oral con un compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) (5 mg/kg/24h) desde las semanas 6-9 y se comparó con los animales NNT no tratados a las 6 semanas. El tratamiento con el compuesto TDFRP atenuaba la severidad de la atrofia tubular en animales NNT.

FIG. 12
Deposición de matriz en animales en el modelo de nefritis por suero nefrotóxico (NNT). Se valoró la cantidad de deposición de matriz en animales NNT tratados con vehículo que no recibieron tratamiento o que recibieron tratamiento con un compuesto TDFRP, 6 semanas después de administrar suero nefrotóxico para inducir enfermedad renal. Se administró suero nefrotóxico el Día 0 y los animales tratados con NNT desarrollaron enfermedad renal progresiva. Se evaluó la deposición de matriz en animales NNT que recibieron tratamiento oral con un compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) a 5 mg/kg/24 h desde las semanas 6-9 y se comparó con los animales NNT no tratados a las 6 semanas. El tratamiento con el compuesto TDFRP atenuaba la cantidad de deposición de

matriz en animales NNT.

FIG. 13
Influencia de los compuestos TDFRP (SEC. Nº ID.: 16, 33, 45, 217, 221) sobre la diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales derivadas de membrana sinovial, que da lugar a una mayor deposición de matriz extracelular, como se determina por tinción con Azul Alciano. Los compuestos TDFRP, SEC. Nº ID.: 16, 33, 45, 217 y 221 corresponden a los Compuestos E, A, C, B y D, respectivamente.

FIG. 14
Demostración *in vitro* de las actividades de los compuestos TDFRP en células Human Kidney 2 (HK-2, fuente: ATCC). + indica actividades antiinflamatoria, antiapoptótica y/o antifibrótica, que son el resultado de la activación de las rutas de señalización de TGF-b/BMP.

FIG. 15
Actividades de unión de los compuestos TDFRP para los dominios extracelulares de los receptores de BMP. + indica la unión de los compuestos TDFRP a receptores de BMP específicos.

FIG. 16
Actividades de los compuestos TDFRP en cardiomiocitos cultivados usando ensayos de actividad. + indica actividades antiinflamatorias, antiapoptóticas y/o antifibróticas que son el resultado de la activación de las rutas de señalización de TGF-b/BMP.

FIG. 17
El compuesto TDFRP inhibe la apoptosis inducida por cisplatina en células HK-2: A) Células normales - sin cisplatina, B) células con cisplatina 10 uM, C) células con cisplatina 10 uM y compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) 500 uM administrado profilácticamente, D) células con cisplatina 10 uM y compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) 500 uM administrado terapéuticamente.

FIG. 18
Fosforilación de Smad1, activación y translocación en el núcleo de células HK-2 en respuesta al compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45): A) Sin compuesto, B) compuesto 1,3 uM, C) compuesto 33 uM. Se detecta Smad 1, 5, 8 usando un anticuerpo específico anti-fosfoSmad.

FIG. 19
Esquema del modelo de oclusión de la aorta descendente anterior izquierda (DAI) para la lesión miocárdica. La imagen representa una sección transversal a través del corazón de ratas que muestra que el tratamiento con TDFRP o BMP previene la lesión isquémica. Se ocluyeron las arterias descendentes anteriores izquierdas durante 20 minutos para inducir isquemia. Al retirar la ligadura, el flujo de sangre hacia el corazón causa lesión por reperfusión y apoptosis. Después de siete días, se tiñó el corazón con colorante Azul de Evans para diferenciar el área no afectada perfundida de la región ocluida (área de riesgo). Se usaron cuatro dosis de TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) en los animales tratados (preoclusión, y 24, 48 y 72 h posoclusión). A) arteria coronaria descendente anterior izquierda ligada para crear isquemia, B) áreas de infarto (AI), C) la región perfundida no afectada. Teñido de azul en el momento del sacrificio, D) luz ventricular, E) límites regionales aproximados, F) la región afectada (isquémica) (RA) Donde la lesión por reperfusión da lugar a apoptosis.

FIG. 20
A) El compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) reduce la razón área necrótica a área de riesgo (AI/RA) en el modelo de oclusión DAI de infarto de miocardio. B) el compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) reduce el grado de inflamación cardíaca en el modelo de oclusión DAI de infarto de miocardio.

FIG. 21
Modelo de cisplatina en rata de lesión renal aguda. El compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) reduce el nivel inducido por cisplatina de creatinina en suero. Se correlacionan las elevaciones en la creatinina sérica con la nefrotoxicidad de la cisplatina.: A) ratas tratadas solamente con cisplatina; ratas tratadas con cisplatina más compuesto TDFRP a niveles de dosis: B) 0,28 mg/kg pc, C) 2,8 mg/kg pc y D) 28 mg/kg pc; ratas tratadas con cisplatina más BMP-7 a E) 30 ug/kg pc y F) 200 ug/kg pc. Las flechas abiertas indican los tiempos de dosificación profiláctica (-2 horas) y terapéutica; la flecha llena indica la dosificación de la cisplatina en el tiempo cero. TDFRP y BMP-7 dan lugar a picos de niveles de creatinina en suero menores en respuesta al tratamiento con cisplatina. TDFRP a la dosis más alta utilizada da lugar a valores de creatinina en suero más próximos a los niveles basales.

FIG. 22
Secciones de riñón teñidas con hematoxilina y eosina de ratas tratadas con cisplatina : A) rata tratada únicamente con cisplatina, B) rata tratada con cisplatina y un compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) a 2,8 mg/kg pc. La estructura de los túbulos del riñón de la rata tratada con cisplatina mejora gracias al tratamiento con el compuesto TDFRP.

FIG. 23
Cuantificación de la mejora por TDFRP y BMP-7 de la morfología tubular renal en animales del modelo de lesión renal aguda por cisplatina en rata. Se midieron los parámetros de atrofia tubular, necrosis y dilatación en ratas tratadas con una dosis de cisplatina que provoca daño tubular severo a los riñones. Los animales fueron puntuados en cuanto a la cantidad de restos celulares y materiales que se acumulan en los túbulos como resultado de la lesión. TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) mejoraba la morfología y la estructura de los túbulos renales.

FIG. 24
Los compuestos TDFRP no interfieren con la actividad antitumoral de la cisplatina. El TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) no altera la apoptosis/necrosis inducida por el tratamiento con cisplatina a diferentes concentraciones en células de cáncer de vejiga (5637).

FIG. 25
Secciones de riñón de ratas con lesión renal aguda. Se tiñen secciones de tejido con anticuerpo anti-ICAM-1 o con un marcador específico de macrófagos en ratas que recibieron A) cisplatina únicamente o B) una rata que recibió cisplatina y compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45). El compuesto TDFRP da lugar a menos material positivo a ICAM y menos macrófagos acumulados en los riñones.

FIG. 26
Tinción diferencial de secciones de riñón de ratas tratadas con cisplatina para examinar el efecto de los compuestos TDFRP en la modulación del antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA): A) secciones teñidas con anticuerpo anti-actina de músculo liso de, B) una rata que recibió únicamente cisplatina y una rata que recibió cisplatina y compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45). Se observan las células proliferantes en los animales tratados con cisplatina que recibieron el compuesto TDFRP.

FIG. 27
La coadministración de compuesto TDFRP con BMP-6 da lugar a una actividad sinérgica. Un compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) actúa como agonista de BMP y causa fosforilación y activación de Smad 1, 5, 8 cuando se añade a células de cáncer de próstata humanas LNCaP (véase el panel B). BMP-6 provoca fosforilación y activación de Smad 1, 5, 8 en células de cáncer de próstata humanas LNCaP (véanse los paneles A, B, C). La coadministración de un compuesto TDFRP y BMP-6 da lugar a una actividad potenciada o sinérgica, detectada por fosforilación de Smad 1, 5, 8 (véanse los paneles B y C). Los Western blots utilizaron anticuerpo fosfoSmad 1, 5, 8 para detectar Smad fosforiladas. Se usó E-cadherina como control de carga de muestra para el Western blot.

FIG. 28
Inhibición por los compuestos TDFRP de la proliferación de células cancerosas LNCaP. BMP-6 y un compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) inhibían la proliferación de células de cáncer de próstata (LNCaP y PC-3) cultivadas *in vitro*, tal como se detectó por la incorporación de timidina tritiada (una medida de proliferación celular).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

"Superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) de polipéptidos", tal como se usa aquí, se refiere a una superfamilia de factores polipeptídicos con funciones pleiotrópicas que está compuesta por muchas citoquinas multifuncionales y que incluye, aunque sin limitación, TGF-β, activinas, inhibinas, hormona antimülleriana (AMH), substancia inhibidora mülleriana (MIS), proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y miostatina. Las isoformas altamente similares de TGF-β TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3 inhiben potentemente la proliferación celular de muchos tipos de células, incluyendo las de origen epitelial. La mayoría de las células mesenquimales, sin embargo, son estimuladas en su crecimiento por TGF-β. Además, los TGF-β inducen potentemente la síntesis de la matriz extracelular y la expresión de integrinas, y modulan las respuestas inmunes. Las BMP, también conocidas como proteínas osteogénicas (OP), son potentes inductores de la formación de hueso y cartílago y desempeñan importantes funciones de desarrollo en la inducción del mesodermo ventral, la diferenciación del tejido neural y la organogénesis. También se sabe que las activinas, denominadas tras su identificación inicial como activadores de la secreción de hormona estimulante del folículo (FSH) por la glándula pituitaria, promueven la eritropoyesis, median en la inducción del mesodermo dorsal y contribuyen a la supervivencia de las células nerviosas. Varios factores de crecimiento pertenecientes a la superfamilia TGF-β tienen importantes papeles en los patrones embrionarios y la homeostasis de los tejidos. Su inapropiado funcionamiento ha sido implicado en varias situaciones patológicas, como la fibrosis, la artritis reumatoide y la carcinogénesis. El término factor de diferenciación tisular (TDF), tal como se usa aquí, incluye, aunque sin limitación, todos los miembros de la superfamilia TGF-beta de polipéptidos. Los polipéptidos de la superfamilia TGF-beta pueden ser antagonistas o agonistas de los receptores de la superfamilia TGF-beta.

"Receptores de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta)", tal como se usa aquí, se refiere a receptores polipeptídicos que median en los efectos pleiotrópicos de los polipéptidos de la superfamilia del

factor de crecimiento transformante-β (TGF-β), así como sus fragmentos, análogos y homólogos. Dichos receptores pueden incluir, aunque sin limitación, distintas combinaciones de receptores de serina/treonina kinasa de Tipo I y Tipo II. El término receptor del factor de diferenciación tisular (TDF), tal como se usa aquí, incluye, aunque sin limitación, todos los miembros de la superfamilia de receptores TGF-beta.

"Aminoácido aromático", tal como se usa aquí, se refiere a un aminoácido hidrofóbico que tiene una cadena lateral que contiene al menos un anillo que tiene un sistema de electrones conjugado (grupo aromático). El grupo aromático puede estar además substituido con grupos substituyentes tales como alquilo, alquenilo, alquinilo, hidroxilo, sulfanilo, nitro y amino, así como otros. Como ejemplos de aminoácidos aromáticos genéticamente codificados, se incluyen fenilalanina, tirosina y triptófano. Como aminoácidos aromáticos no genéticamente codificados comúnmente encontrados, se incluyen fenilglicina, 2-naftilalanina, beta-2-tienilalanina, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolino-3-carboxílico, 4-clorofenilalanina, 2-fluorofenilalanina, 3-fluorofenilalanina y 4-fluorofenilalanina.

"Aminoácido alifático", tal como se usa aquí, se refiere a un aminoácido apolar que tiene una cadena lateral hidrocarbonada lineal, ramificada o cíclica saturada o insaturada. Como ejemplos de aminoácidos alifáticos genéticamente codificados, se incluyen alanina, leucina, valina e isoleucina. Como ejemplos de aminoácidos alifáticos no codificados, se incluye la norleucina (Nle).

"Aminoácido ácido", tal como se usa aquí, se refiere a un aminoácido hidrofilico que tiene un valor de pK de cadena lateral inferior a 7. Los aminoácidos ácidos típicamente tienen cadenas laterales de carga negativa a pH fisiológico debido a la pérdida de un ion hidrógeno. Como ejemplos de aminoácidos ácidos genéticamente codificados, se incluyen ácido aspártico (aspartato) y ácido glutámico (glutamato).

"Aminoácido básico", tal como se usa aquí, se refiere a un aminoácido hidrofílico que tiene un valor de pK de cadena lateral superior a 7. Los aminoácidos básicos típicamente tienen cadenas laterales de carga positiva a pH fisiológico debido a asociación con un ion hidronio. Como ejemplos de aminoácidos básicos genéticamente codificados, se incluyen arginina, lisina e histidina. Como ejemplos de aminoácidos básicos no genéticamente codificados, se incluyen los aminoácidos no cíclicos ornitina, ácido 2,3-diaminopropiónico, ácido 2,4-diaminobutírico y homoarginina.

"Aminoácido polar", tal como se usa aquí, se refiere a un aminoácido hidrofílico que tiene una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, pero que tiene un enlace en el que el par de electrones que comparten en común dos átomos es mantenido más estrechamente por uno de los átomos. Como ejemplos de aminoácidos polares genéticamente codificados, se incluyen asparragina y glutamina. Como ejemplos de aminoácidos polares no genéticamente codificados, se incluyen citrulina, N-acetillisina y sulfóxido de metionina.

Como apreciarán quienes tienen conocimientos en la técnica, las clasificaciones anteriores no son absolutas - varios aminoácidos exhiben más de una propiedad característica y pueden, por lo tanto, ser incluidos en más de una categoría. Por ejemplo, la tirosina tiene tanto un anillo aromático como un grupo hidroxilo polar. Así, la tirosina tiene propiedades dobles y puede ser incluida en las categorías tanto aromática como polar.

"Polipéptido" tal como se usa aquí, se refiere a un péptido natural o sintético que contiene dos o más aminoácidos unidos típicamente a través del grupo carboxi de un aminoácido y el grupo amino de otro aminoácido. Como apreciarán quienes tienen conocimientos en la técnica, la definición anterior no es absoluta y los polipéptidos o péptidos pueden incluir otros ejemplos en los que uno o más enlaces de amida podrían estar reemplazados por otros enlaces, por ejemplo enlaces de amida isoestéricos.

Un "sujeto", tal como se usa aquí, es preferiblemente un sujeto, tal como un humano, pero puede ser también un animal, *v.g.*, animales domésticos (*v.g.*, perros, gatos y similares), animales de granja *(v.g.*, vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) y animales de laboratorio (*v.g.*, ratas, ratones, cobayas y similares).

Una "cantidad efectiva" de un compuesto, tal como se usa aquí, es una cantidad suficiente para conseguir un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, por ejemplo, una cantidad que dé lugar a la prevención de, o a una disminución en los síntomas asociados a, una enfermedad que esté bajo tratamiento, *v.g.*, las enfermedades asociadas a los polipéptidos de la superfamilia TGF-beta enumeradas anteriormente. La cantidad de compuesto administrada al sujeto dependerá del tipo y la severidad de la enfermedad y de las características del individuo, tales como la salud general, la edad, el sexo, el peso corporal y la tolerancia a fármacos. También dependerá del grado, severidad y tipo de la enfermedad. El experto en la técnica podrá determinar las dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y de otros factores. Típicamente, una cantidad efectiva de los compuestos de la presente invención suficiente para conseguir un efecto terapéutico o profiláctico varía de aproximadamente 0,000001 mg por kilogramo de peso corporal al día a aproximadamente 10,000 mg por kilogramo de peso corporal al día. Preferiblemente, los rangos de dosificación son de aproximadamente 0,0001 mg por kilogramo de peso corporal al día a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal al día. Los compuestos de la presente invención pueden también ser administrados en combinación entre sí, o con uno o más compuestos terapéuticos adicionales.

Un polipéptido "aislado" o "purificado" o porción biológicamente activa del mismo está substancialmente libre de material celular o de otros polipéptidos contaminantes procedentes de la fuente de células o tejidos de la que se

deriva el polipéptido relacionado con el factor de diferenciación tisular, o substancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se sintetiza químicamente.

"Substancialmente libre de material celular", tal como se usa aquí, incluye preparaciones de polipéptido relacionado con el factor de diferenciación tisular en donde se separa el polipéptido de los componentes celulares de las células de las cuales se aísla o en las cuales se produce recombinantemente. En una realización, la expresión "substancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de polipéptidos relacionados con el factor de diferenciación tisular que tienen menos de aproximadamente un 30% (en peso seco) de polipéptidos no relacionados con el factor de diferenciación tisular (a los que también se hace aquí referencia como un "polipéptido contaminante"), más preferiblemente menos de aproximadamente un 20% de polipéptidos no relacionados con el factor de diferenciación tisular, aún más preferiblemente menos de aproximadamente un 10% de polipéptidos no relacionados con el factor de diferenciación tisular, y más preferiblemente menos de aproximadamente un 5% de polipéptidos no relacionados con el factor de diferenciación tisular. Cuando el polipéptido relacionado con el factor de diferenciación tisular o porción biológicamente activa del mismo es producido recombinantemente, está también preferiblemente substancialmente libre de medio de cultivo, es decir, que el medio de cultivo representa menos de aproximadamente un 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente un 10% y más preferiblemente menos de aproximadamente un 5% del volumen de la preparación de polipéptidos relacionados con el factor de diferenciación tisular.

La expresión "substancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos", tal como se usa aquí, incluye preparaciones de polipéptidos relacionados con el factor de diferenciación tisular en las que el polipéptido está separado de precursores químicos u otros compuestos químicos que están implicados en la síntesis del polipéptido. En una realización, la expresión "substancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos" incluye preparaciones de polipéptidos relacionados con el factor de diferenciación tisular que tienen menos de aproximadamente un 30% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos químicos no relacionados con el factor de diferenciación tisular, más preferiblemente menos de aproximadamente un 20% de precursores químicos o compuestos químicos no relacionados con el factor de diferenciación tisular, aún más preferiblemente menos de aproximadamente un 10% de precursores químicos o compuestos químicos no relacionados con el factor de diferenciación tisular y más preferiblemente menos de aproximadamente un 5% de precursores químicos o compuestos químicos no relacionados con el factor de diferenciación tisular.

El término "variante", tal como se usa aquí, se refiere a un compuesto que difiere del compuesto de la presente invención, pero que conserva sus propiedades esenciales. Un ejemplo no limitativo de éste es un compuesto polinucleotídico o polipeptídico que tiene substituciones conservadoras con respecto al compuesto de referencia, normalmente conocidas como variantes degeneradas. Otro ejemplo no limitativo de una variante es un compuesto que es estructuralmente diferente, pero que conserva el mismo dominio activo de los compuestos de la presente invención. Como variantes, se incluyen extensiones N-terminales o C-terminales, aminoácidos rematados, modificaciones de grupos funcionales de cadena lateral de aminoácidos reactivos, *v.g.*, ramificación a partir de residuos de lisina, pegilación y/o truncaciones de un compuesto polipeptídico. En general, las variantes son globalmente muy similares, y en muchas regiones idénticas a los compuestos de la presente invención. Por consiguiente, las variantes pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, en las regiones no codificantes o en ambas.

El término "análogo" tal como se usa aquí, se refiere a una composición que difiere del compuesto de la presente invención, pero que conserva sus propiedades esenciales. Un ejemplo no limitativo de éste es un polipéptido o péptido o fragmento de péptido que incluye aminoácidos no naturales, peptidomiméticos, aminoácidos inusuales o isósteros de enlaces de amida.

Una "molécula pequeña", tal como se usa aquí, se refiere a una composición que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 5 kDa y más preferiblemente inferior a aproximadamente 2 kDa. Las moléculas pequeñas pueden ser, *v.g.*, ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, glicopéptidos, peptidomiméticos, carbohidratos, lípidos, lipopolisacáridos, combinaciones de éstos u otras moléculas orgánicas o inorgánicas.

Los términos "isquemia" o "episodio isquémico", tal como se usan aquí, significan cualquier circunstancia que dé lugar a un aporte deficiente de sangre u oxígeno a un tejido. Así, un episodio isquémico en el sistema nervioso central se produce como resultado de una insuficiencia o interrupción en el suministro de sangre u oxígeno a cualquier lugar del encéfalo, tal como, aunque sin limitación, un lugar del cerebro, del cerebelo o del tronco encefálico. La médula espinal, que también es parte del sistema nervioso central, es igualmente susceptible a la isquemia resultante de una disminución en el flujo de sangre o por falta de oxígeno. Un episodio isquémico puede estar causado por una constricción u obstrucción de un vaso sanguíneo, como sucede en el caso de un trombo o un émbolo. De manera alternativa, el episodio isquémico puede producirse como resultado de cualquier forma de función cardíaca comprometida, incluyendo una parada cardíaca, como se ha descrito anteriormente. Cuando la deficiencia es suficientemente severa y prolongada, puede dar lugar a alteración de la función fisiológica, a la muerte posterior de neuronas y a necrosis (infarto) de las áreas afectadas. El grado y el tipo de anormalidad neurológica resultante de la lesión dependen de la localización y el tamaño del infarto o del foco de isquemia. Cuando la isquemia se asocia a un accidente cerebrovascular, puede ser de alcance global o focal. Se puede producir

isquemia en otros tejidos u órganos, incluyendo el riñón. La restauración del flujo de sangre o reperfusión da lugar a una serie de respuestas celulares que se sabe causan daños tisulares.

Descripción detallada

La superfamilida de polipéptidos TGF-β media su actividad por interacción con dos receptores diferentes, a los que se hace referencia como receptores de Tipo I y Tipo II (Tabla 1). Tal como se resume en la Tabla 1, actualmente se conocen siete diferentes receptores de kinasa de tipo activina de Tipo I (de ahora en adelante "ALK").

Tabla 1

Receptores de Tipo I	Receptores de Tipo II
ALK-1 (receptor de kinasa de tipo activina; TSR-1)	ActR-IIA
ALK-2 (receptor de activina de Tipo I; ActR-I)	ActR-IIB
ALK-3 (receptor de BMP de Tipo I/IA; BMPR-I/IA)	TβR-II
ALK-4 (receptor de activina de Tipo IB; ActR-IB)	BMPR-II
ALK-5 (receptor de TGF-β de Tipo I; TβR-1)	AMHR-II
ALK-6 (receptor de BMP de Tipo IB; BMPR-IB)	
ALK-7	

La unión a ligando de los receptores de Tipo I y Tipo II da lugar a la fosforilación y activación del receptor de Tipo I, lo cual es necesario para las cascadas de señal corriente abajo. Las proteínas Smad activadas por los receptores de Tipo I llevan señal al núcleo, y junto con otras proteínas dirigen las respuestas transcripcionales. Los receptores de Tipo I para la activina y el TGF-β pueden sólo reconocer el ligando que está unido al receptor de Tipo II. Por el contrario, los receptores de Tipo II pueden unirse a ligando independientemente del receptor de Tipo I, pero son incapaces de señalizar sin el receptor de Tipo I. La especificidad en la señalización, por lo tanto, viene determinada por una combinación de los receptores de Tipo I y Tipo II (Tabla 2).

La especificidad de unión a ligando de los receptores ALK está resumida en la Tabla 2. La tabla cita artículos de la literatura, patentes y solicitudes de patente publicadas que describen la unión de ligandos a los receptores ALK. Estas citas están detalladas en la "Lista de referencias", *supra*.

Tabla 2

Categoría	Ligando	ALK-1	ALK-2	ALK-3	ALK-4	ALK-5	ALK-6	ALK-7
Activinas								
	Activina					25		
	Activina				27	27		
	Activina				101			
	Activina	26						
	Activina		164		164			
	Activina A		165		165			
	Activina A		168	168	168	168	168	168
	Activina A		169	169	169	169	169	169
	Activina A		156	156	156	156	156	156
	Activina A				42			
	Activina A		162		162			
	Activina A	165		165			165	
	Activina de Tipo I		11		11			
	Activina de Tipo I				34			
Proteínas morfogenéticas óseas								
	BMP-2			38				
	BMP-2			92				
	BMP-2			112				
	BMP-4			38				
	BMP-4			59				
	BMP-4			162			162	
	BMP-4			166			166	
	BMP-4			159			159	
	BMP-5			57				
	BMP-6		6	6			6	
	BMP-6		67	67			67	
	BMP-7		42	42				
	BMP-7		11	11			11	

	BMP-7		101					
	BMP-7						77	
	BMP-7						132	
	BMP-7		162	162			162	
	BMP-7		159					
	BMP-7		166					
	BMP-7		167					
Proteína morfogénica derivada de cartílago								
	CDMP-1			70			70	
	CDMP-2			70			70	
Factores de crecimiento transformante								
	TGF-β	26						
	TGF-β	157						
	TGF-β					162		
	TGF-β					164		
	TGF-β-1	35						
	TGF-β-1					11		
	TGF-β-1	31	31			31		
	TGF-β-1					42		
	TGF-β-1					162		
	TGF-β-1	165		165			165	
	TGF-β-1	168		168			168	
	TGF-β-1	169		169			169	
	TGF-β-1	156		156			156	
	TGF-β-1					157		
	TGF-β-1	28	28		28			
	TGF-β-1				27	27		
	TGF-β-2		46			46		
	TGF-β-3	35						
	TGF-β-3		46			46		
	TGF-β-3					157		
Molécula pequeña								
	SB-431542				25	25		
Otros								
	Endoglina	35						
	Factor sérico	35						

Los receptores de Tipo I de vertebrados pueden dividirse en dos grupos diferentes según su homología de secuencia en el dominio de kinasa y sus actividades de señalización. Un grupo incluye el receptor de tipo activina de tipo 5 (en adelante ALK-5), ALK-4 y ALK-7. El otro grupo incluye ALK-1, ALK-2, ALK-3 y ALK-6. Los receptores ALK se expresan diferencialmente entre los tejidos y están regulados durante el desarrollo del embrión (Tabla 3).

En la Tabla 3 se resume la expresión tisular y celular de los receptores ALK. La tabla cita artículos de la literatura, patentes y solicitudes de patente publicadas que describen la expresión de los receptores ALK. Estas citas están detalladas en la "Lista de referencias", *supra*.

Tabla 3

Tejido	Especie	ALK-1	ALK-2	ALK-3	ALK-4	ALK-5	ALK-6	ALK-7
Hueso/cartílago								
Hueso	Ratón						149	
Tejido formador de hueso	Rata			130			130	
Fracturas óseas	Humano			95			95	
Fracturas óseas	Rata			120			120	
Fracturas femorales	Rata			143				
Células estromales de la médula ósea	Ratón			51				
Cavidad medular ósea	Ratón			125				
Rudimentos óseos	Ratón		8	8			8	
Tejido óseo	Rata		19					
Células de la bóveda craneal	Rata			138			138	
Células de la bóveda craneal	Rata		146	146			146	

Células de la bóveda craneal	Rata		147	147			147	
Células osteogénicas de la bóveda craneal ROB-C26	Rata			67			67	
Células osteogénicas de la bóveda craneal ROB-C26	Rata						132	
Cartílago (hueso)	Pollo			155			155	
Cartílago de los dedos	Ratón						56	
Condrocitos		116	116	116			116	
Condrocitos							111	
Condrocitos MC615	Ratón	13	13	13				
Condrocitos ATDC5	Ratón			16				
Condrocitos esternales				68			68	
Osteoblastos MC3T3-E1	Ratón		67	67				
Osteoblastos MC3T3-E1				11				
Osteoblastos MC3T3-E1	Ratón		162	162				
Osteoblastos			67	67			67	
Osteoblastos	Ratón			85			85	
Osteoclastos y osteoblastos				89				
Osteosarcoma	Rata		162	162				
Líneas celulares de osteosarcoma							76	
Líneas celulares de osteosarcoma	Humano			152			152	
Célula de osteosarcoma MG63				152				
KS483 preosteoblástica	Ratón		135	135	135			
Riñón								
Riñón		165	165	165	165	165		
Riñón		168	168	168	168	168		
Riñón		169	169	169	169	169		
Riñón		156	156	156	156	156		
Riñón	Rata					21		
Fibroblasto de riñón (estudio de expresión)	Mono	4		4		4	4	
Fibroblasto de riñón (estudio de expresión)	Mono	10	10	10	10	10	10	
Células tubulares proximales HK-2	Humano			93			93	
Renal	Ratas					17		
Renal	Humano		43			43		
Carcinoma renal A498						29		
Metanefros	Ratón			103				
Metanefros	Ratón			104			104	
Células epiteliales de los túbulos proximales	Humano		74	74				
Hígado								
Adenocarcinoma biliar						7		
Hígado			168		168	168		
Hígado			169		169	169		
Hígado			156		156	156		
Páncreas								
Páncreas						7		
Páncreas	Humano			94				
Páncreas			165	165	165	165		
Páncreas			168	168	168	168		
Páncreas			169	169	169	169		
Páncreas			156	156	156	156		
Tejido reproductor								
Células uterinas	Oveja						148	
Oocitos y células de la granulosa	Oveja Booroola						50	
Oocitos y células de la granulosa	Oveja Booroola						105	

Células ováricas	Rata			69			69	
Células de ovario de hámster chino	Hámster				34			
Próstata								
Próstata	Humano							158
Células de cáncer de próstata	Humano			83			83	
Células de próstata	Rata				27	27		
Células de tumor de próstata (benigno)	Humano			91			91	
LNCaP (célula de cáncer de próstata)	Humano	28	28					
LNCaP (célula de cáncer de próstata)	Humano			82			82	
Glándula endocrina	Cerdo			71				
Cavidad oral								
Pulpa dental	Rata	133	133	133	133	133	133	
Pulpa dental y fibroblasto gingival	Humano		60	60			60	
Células de la pulpa dental	Bovino		134	134	134	134		
Células de la pulpa dental	Humano		75	75			75	
Células foliculares	Ratón			154				
Fibroblastos gingivales	Humano		79	79			79	
Células de carcinoma oral	Humano			88				
Células del ligamento periodontal (PDL)	Rata		3	3			3	
Células del ligamento periodontal (PDL)	Ratón			154				
Cementoblasto, osteoblasto, células PDL	Rata			98				
Vascular								
Vasos aórticos ateroscleróticos	Humano					20		
Vasos sanguíneos	Cerdo					47		
Vasos sanguíneos	Rata		49			49		
Vasos sanguíneos pulmonares	Rata	41						
Arteria carótida	Rata		46			46		
Células mesangiales glomerulares			93	93				
Células eritroleucémicas F5-5.fl	Ratón				36	36		
Células musculares lisas vasculares			1	1		1	1	
Células musculares lisas vasculares	Rata					15		
Células musculares lisas vasculares						48		
Músculo								
Mioblasto/fibroblasto C2C12	Ratón		2	2			2	
Mioblasto/fibroblasto C2C12	Ratón	72	72	72			72	
Mioblasto/fibroblasto C2C12	Ratón		9	9		9	9	
Mioblasto/fibroblasto C2C12	Ratón		67	67				
Mioblasto/fibroblasto C2C12	Ratón			54				
Mioblasto/fibroblasto C2C12	Ratón			112				
Mioblasto/fibroblasto C2C12	Ratón			51				
Músculo esquelético		165	165	165	165	165		
Músculo esquelético		168	168	168	168	168		
Músculo esquelético		169	169	169	169	169		
Músculo esquelético		156	156	156	156	156		
Corazón								
Corazón		165	165	165	165	165		
Corazón		168	168	168	168	168		

Corazón		169	169	169	169	169		
Corazón		156	156	156	156	156		
Pulmón								
Pulmón	Ratón						5	
Pulmón							169	
Pulmón		165	165		165	165		
Pulmón		168	168		168	168		
Pulmón		169	169		169	169		
Pulmón		156	156		156	156		
Células de carcinoma de pulmón Calu-6	Humano							158
Embrionario/placentario								
Embrión	Pez cebra						114	
Embrión	Pez cebra			115				
Embrión	Ratón			38				
Embrión	Ratón		122	122			122	
Embrión/tracto reproductor	Ratón					22		
Cartílago embrionario	Pollo			55			55	
Rudimentos óseos embrionarios			77	77			77	
Células embrionarias	Codorniz			106			106	
Fibroblasto embrionario	Ratón		63	63				
Pulmón embrionario	Rata	32				32		
Tejido embrionario	Ratón			5			5	
Células madre embrionarias	Ratón					24		
Células de gastrulación	Pollo			109				
Células mesenquimales	Ratón			102			102	
Células mesenquimales	Ratón			108				
Células de la cresta neural				136				
Células precursoras neurales				121			121	
Células de carcinoma embrionarias P19	Ratón		101		101			
Placenta		165	165	165	165	165		
Placenta		168	168	168	168	168		
Placenta		169	169	169	169	169		
Placenta		156	156	156	156	156		
Vellosidades y decidua						170		
Conducto de Wolff y uréter							108	
Cerebro/SNC								
Cerebro	Rata				40			
Cerebro	Rata		128	128	128		128	
Cerebro	Ratón						5	
Cerebro			165		165	165		
Cerebro							169	
Cerebro			160		160			
Cerebro								161
Cerebro								163
Glioblastoma	Humano		162	162			162	
Glioma	Humano		142	142			142	
Células formadoras del hipocampo	Ratas con simulación		160		160			
Hipocampo	Humano							158
Núcleos hipotalámicos	Humano							158
Células progenitoras neuronales SVZa				64				
Neuronas granulares cerebelares				107			107	
Cerebelo	Rata				27	27		
Corriente migratoria rostral	Roedor			64				
Substantia nigra	Humano							158
Sistema nervioso				153			153	
Ojo								
Epitelio corneal y estroma	Humano			151			151	

Tejidos oculares	Rata	119	119	119			119	
Retina	Rata		141	141	141		141	
Retina y tallo óptico	Pollo	58	58	58				
Retina y célula de ganglio ventral	Ratón						100	
Piel								
Fibroblastos de prepucio AG1518	Humano			162				
Fibroblastos de prepucio	Humano			11				
Células germinales del folículo piloso				59				
Células cutáneas		26				26		
Fibroblastos cutáneos	Humano			66				
Epitelio de glándula sudorípara	Humano			139			139	
Otros tejidos/células								
Tejidos adultos	Ratón			5				
Tejido adiposo (grasa)	Rata				27	27		
Tejido que expresa hormona antimülleriana							73	
Células endoteliales		35						
Células endoteliales	Humano/ratón	39						
Células endoteliales HHT2	Humano	14						
Células epiteliales del oído	Pollo						61	
Células epiteliales MvlLu	Visón		162	162	162	162	162	
Células epiteliales mamarias NMuMG	Ratón		42	42	42	42		
Tejido del ligamento espinal osificado	Humano		150	150			150	
Explantes periósteos	Conejo			124			124	
Células derivadas de periósteo	Rata			78			78	
Pituitaria	Humano							158
Célula de tumor de pituitaria GH3	Rata		45			45		
Bazo				169				

I. Composiciones de la invención

A. Compuestos TDFRP

La presente invención proporciona compuestos que son análogos funcionales de los factores de diferenciación tisular, es decir, compuestos que imitan funcionalmente a las proteínas de la superfamilia TGF-beta, por ejemplo, actuando como agonistas de los receptores de la superfamilia TGF-beta, y preferentemente se unen a receptor(es) de ALK selecto(s). Los presentes compuestos son polipéptidos que comprenden la SEC. Nº ID.: 333, es decir, polipéptidos relacionados con TDF (en adelante "TDFRP"), como se detalla más adelante. En una realización, el compuesto TDFRP se une a un receptor de ALK con mayor afinidad de unión que la afinidad de unión a otros receptores de ALK en base a distintos sitios de unión o propiedades. En un aspecto de esta realización, el compuesto TDFRP se une al receptor de ALK-3 con mayor afinidad de unión que su afinidad de unión al receptor de ALK-6. En otra realización, el compuesto TDFRP se une a un receptor de ALK con mayor afinidad de unión que la afinidad de unión a otros receptores de ALK en base a diferentes afinidades. Dichos compuestos son adecuados para administración a un sujeto cuando sea deseable, por ejemplo, para promover el crecimiento y la diferenciación de células en un tejido sin promover una respuesta celular no deseable en el mismo u otro tejido. Es decir, cuanto mayor sea la especificidad en el diseño del compuesto TDFRP, más probable será que no interfiera con TDFR relacionados *(v.g.*, su especificidad para los receptores de ALK-3, pero no para los receptores de ALK-6, o viceversa). Esto minimizará los efectos colaterales potenciales debidos a interacciones no deseadas con otras dianas. Por ejemplo, los receptores de ALK-3 son más prevalentes en el tejido renal, mientras que los receptores de ALK-6 son más prevalentes en el tejido óseo; la proteína BMP-7 nativa se une a ALK-6 con mayor afinidad, y un efecto colateral potencial de la terapia con BMP-7 en la enfermedad renal es la osteogénesis. Los compuestos TDFRP son seleccionados y diseñados para una mayor especificidad hacia los receptores de ALK-3 y una menor afinidad hacia los de ALK-6 (FIG. 1), reduciendo así la no deseable osteogénesis en un sujeto que esté siendo tratado para trastornos renales o lesión miocárdica.

Los compuestos TDFRP de la presente invención son adecuados para promover el crecimiento o la diferenciación

de células y tejidos en el sujeto, tales como células renales, células mesenquimales, síntesis de la matriz extracelular, expresión de integrinas, formación de hueso y cartílago, inducción del mesodermo ventral, diferenciación del tejido neural, para promover la organogénesis, para promover la eritropoyesis, para inducir el crecimiento del mesodermo dorsal y de las células nerviosas, para promover la homeostasis de los tejidos y para inducir respuestas inmunes. Por el contrario, se piensa que condiciones patológicas tales como la fibrosis, la artritis reumatoide y la carcinogénesis, entre otras, son el resultado de una excesiva actividad de tipo factor de diferenciación tisular. Por consiguiente, es también un objeto de la invención proporcionar compuestos que sean antagonistas funcionales de los receptores de la superfamilia TGF-beta. Es también un objeto de la invención proporcionar compuestos que sean antagonistas parciales y agonistas parciales de los receptores de la superfamilia TGF-beta. Los compuestos de la presente invención pueden ser usados para tratar la enfermedad renal tanto aguda como crónica, así como el accidente cerebrovascular, la lesión miocárdica y la lesión encefálica traumática.

Las BMP son también reconocidas como reguladores críticos del crecimiento, la diferenciación y la muerte celular (apoptosis) en muchos tipos celulares.

Por consiguiente, los compuestos TDFRP pueden ser usados para tratar una o más consecuencias adversas de una lesión del sistema nervioso central que surjan de una variedad de afecciones. El término "accidente cerebrovascular" connota lesión del sistema nervioso central resultante de déficits neurológicos repentinos y dramáticos asociados a, *v.g.*, aunque sin limitación, trombos, émbolos e hipotensión sistémica. Otras lesiones pueden estar causadas por hipertensión, enfermedad vascular cerebral hipertensiva, rotura de un aneurisma, un angioma, discrasia sanguínea, insuficiencia cardíaca, parada cardíaca, shock cardiogénico, insuficiencia renal, shock séptico, traumatismo en la cabeza, traumatismo en la médula espinal, convulsiones, sangrado procedente de un tumor u otra pérdida de volumen o presión de sangre. Estas lesiones llevan a alteración de la función fisiológica, muerte posterior de neuronas y necrosis (infarto) de las áreas afectadas.

Un gran número de entidades de enfermedad tienen procesos patológicos a los que se ha denominado "respuesta a la lesión". La respuesta a la lesión ha sido descrita por Richard Ross en sus obras sobre el proceso patológico de la aterosclerosis. También se puede aplicar a otros muchos procesos de enfermedad y se puede considerar como un mecanismo general de la enfermedad. Cuando un órgano se lesiona, las células sufren un proceso de involución descrito como muerte celular programada o apoptosis. Este proceso puede ser desencadenado por muchos tipos diferentes de lesión, en muchos tipos diferentes de tejidos. Ciertos mecanismos de lesión pueden ser característicos de un órgano o incluso de un tipo celular, pero, una vez iniciado el proceso de apoptosis, los procesos celulares que se producen parecen ser similares para muchos tipos de células diferentes. En este proceso, la célula produce una serie de moléculas de señalización llamadas quimioquinas o citoquinas. Estas moléculas atraen a monocitos y macrófagos, que son parte de una respuesta inflamatoria generalizada. Como parte de este proceso, se producen otras moléculas de señalización para transformar las células en fibroblastos e iniciar los cambios fibróticos que generalmente se consideran parte de la formación de cicatrices. Estos cambios fibróticos, sin embargo, pueden prolongarse por lesión continua y pueden dar lugar a destrucción continua de tejido, para dar como resultado órganos disfuncionales. Estos procesos que se encuentran bajo el término "respuesta a la lesión" son mucho más complejos que como aquí se ha descrito. Son, sin embargo, comunes a un gran número de tejidos. Por ejemplo, la lesión que se produce en el infarto de miocardio conduce a muerte de los miocitos, inflamación y cambios fibróticos, conocidos como remodelación. Los mismos sucesos se producen en la insuficiencia renal aguda por muchos tipos diferentes de lesión. El daño producido por la cisplatina (un tratamiento para el cáncer) causa apoptosis de las células tubulares, inflamación y cicatrización fibrótica del riñón. Este mismo proceso puede producirse en la insuficiencia renal crónica o en la nefropatía diabética. La alteración de este proceso puede producirse en diversos puntos a lo largo de la cadena de sucesos de respuesta celular. Existen pocos fármacos que puedan tener efectos beneficiosos en múltiples puntos a lo largo de esta cadena, pero el sistema de la superfamilia TGF/BMP ofrece una oportunidad para intervenir en este proceso a múltiples niveles. Las composiciones TDFRP cubiertas en esta patente han mostrado tener efectos antiapoptóticos, antiinflamatorios y antifibróticos sobre múltiples tipos celulares. Estos agentes TDFRP tienen el potencial para tratar múltiples entidades morbosas en múltiples sistemas orgánicos.

Los compuestos TDFRP pueden ser usados para tratar el cáncer. Por ejemplo, todo cáncer de próstata no tratado comienza siendo sensible a la testosterona y otras hormonas masculinas, conocidas como andrógenos. La mayoría de los pacientes con metástasis precoces de células de cáncer de próstata son tratados con terapia de deprivación de andrógenos, y la consecuencia es una reducción de las células cancerosas que responden a andrógenos. Inicialmente, aproximadamente un 70-80% de los pacientes responden a esta terapia, pero en los estadios posteriores el tumor se vuelve refractario a las hormonas (independiente de hormonas) y más agresivo, lo que lleva a un pronóstico pobre.

Varias líneas de evidencia han sugerido que las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) inhiben la proliferación de células de cáncer de próstata humano sensibles a andrógenos (LNCaP) e insensibles a andrógenos (PC-3, DU-145). Los compuestos de la presente invención pueden ser usados para tratar cáncer y enfermedades proliferativas.

Los compuestos TDFRP de la presente invención pueden ser útiles para tratar lesiones traumáticas del sistema nervioso central causadas por fuerzas mecánicas, tales como un golpe en la cabeza. Dichas agresiones traumáticas de los tejidos pueden incluir, *v.g.*, aunque sin limitación, una abrasión, incisión, contusión, punción o compresión.

Las lesiones traumáticas del sistema nervioso central pueden surgir del contacto traumático de un objeto extraño con cualquier lugar de, o anexo a, la cabeza, el cuello o la columna vertebral de un mamífero. Otras formas de lesión traumática pueden surgir de la constricción o compresión del tejido del SNC de un mamífero por una acumulación inapropiada de fluido *(v.g.*, un bloqueo o disfunción de la producción, renovación o regulación del volumen normal del líquido cefalorraquídeo o del líquido del humor vítreo, o un hematoma o edema subdural o intracraneal). De forma similar, la constricción o compresión traumática puede surgir de la presencia de una masa de tejido anormal, tal como un tumor metastático o primario.

Se describen métodos basados en la estructura útiles en la identificación, el diseño y la producción de compuestos TDFRP, que actúan como moduladores funcionales de receptores selectos de la superfamilia TGF-beta.

Los compuestos TDFRP de la presente invención pueden ser útiles para tratar lesiones de tejidos causadas por infección u otras agresiones. Dichas agresiones a los tejidos pueden incluir, *v.g.*, aunque sin limitación, infecciones bacterianas (*v.g.*, mediadas por endotoxinas), fúngicas o víricas.

Las variantes, análogos, homólogos o fragmentos de estos compuestos TDFRP, tales como los homólogos de especie, quedan también incluidos en la presente invención, así como sus formas degeneradas. Los compuestos TDFRP de la presente invención pueden estar rematados en el extremo N o en el extremo C, o tanto en el extremo N como en el extremo C. Los compuestos TDFRP de la presente invención pueden estar pegilados, o modificados, *v.g.*, ramificación, en cualquier residuo de aminoácido que contenga una cadena lateral reactiva, *v.g.*, un residuo de lisina. Los compuestos TDFRP de la presente invención pueden ser lineales o estar ciclados o de algún otro modo estar constreñidos. La secuencia de cola del TDFRP puede tener una longitud variable.
El compuesto de la invención comprende la siguiente secuencia:

Secuencia	SEC. Nº ID.:
CYYDNSSSVLCKRYRS	333

donde cada cisteína está reemplazada con un aminoácido que tiene una cadena lateral que contiene un resto de hidroxilo, tiol, amina, ácido carboxílico o ácido sulfónico que puede usarse para ciclar el compuesto.

Compuestos TDFRP multidominio

La presente invención proporciona compuestos que son análogos funcionales de los factores de diferenciación tisular, es decir, compuestos que imitan funcionalmente a las proteínas de la superfamilia TGF-beta, por ejemplo, actuando como agonistas de los receptores de la superfamilia TGF-beta. Dichos compuestos son adecuados para administración a un sujeto o a tejidos aislados cuando sea deseable, por ejemplo, para promover el crecimiento o la diferenciación de células y tejidos en el sujeto o tejido, tales como células renales, células madre, células mesenquimales, síntesis de la matriz extracelular, expresión de integrinas, formación de hueso y cartílago, inducción del mesodermo ventral, diferenciación del tejido neural, para promover la organogénesis, para promover la eritropoyesis, para inducir el crecimiento del mesodermo dorsal y de las células nerviosas, para promover la homeostasis de los tejidos y para inducir o modular las respuestas inmunes. Por el contrario, se piensa que afecciones patológicas tales como la fibrosis, la artritis reumatoide y la carcinogénesis, entre otras, son el resultado de una excesiva actividad de tipo factor de diferenciación tisular. Por consiguiente, es también un objeto de la invención proporcionar compuestos que sean antagonistas funcionales de los receptores de la superfamilia TGF-beta. Es también un objeto de la invención proporcionar compuestos que sean antagonistas parciales y agonistas parciales de los receptores de la superfamilia TGF-beta. Los compuestos de la presente invención pueden ser usados para tratar la enfermedad renal tanto aguda como crónica, así como el accidente cerebrovascular y la lesión encefálica traumática, entre otras afecciones.

Se describen métodos basados en la estructura útiles en la identificación, el diseño y la producción de compuestos que actúan como moduladores funcionales de los receptores de la superfamilia TGF-beta y/o sus rutas de señalización.

Se describen compuestos que contienen múltiples polipéptidos relacionados con TDF (es decir, compuestos polipeptídicos relacionados con TDF de múltiples dominios, en adelante "TDFRP") con la estructura general mostrada a continuación:

TDFRP1-conector-TDFRP2

Donde un primer dominio TDFRP (TDFRP1, es decir, polipéptido relacionado con TDF 1) se une covalentemente a través del extremo C, del extremo N o de cualquier posición con un grupo lateral funcionalizable, *v.g.*, lisina o ácido aspártico, a una molécula conectora, la cual, a su vez, está covalentemente unida al extremo N de un segundo dominio TDFRP (TDFRP2).

Los dominios TDRFP son compuestos que incluyen moléculas pequeñas, más particularmente los polipéptidos aquí identificados, es decir, polipéptidos relacionados con TDF (TDFRP). También se describen variantes, análogos,

homólogos o fragmentos de estos compuestos, tales como homólogos de especies, así como sus formas degeneradas.

Un primer dominio se une a un segundo dominio a través de un conector. El término "conector", tal como se usa aquí, se refiere a un elemento capaz de proporcionar un apropiado espaciamiento o rigidez estructural, u orientación estructural, solo o en combinación, a un primer y un segundo dominios, *v.g.*, TDFRP1 y TDFRP2, de tal modo que se conserva la actividad biológica del TDFRP. Por ejemplo, los conectores pueden incluir, aunque sin limitación, un diaminoalcano, un ácido dicarboxílico, un ácido aminocarboxílico alcano, una secuencia de aminoácidos, *v.g.*, polipéptido de glicina, una unión disulfuro, un elemento estructural helicoidal o en forma de lámina o una cadena de alquilo. El conector puede no ser inerte, *v.g.*, puede ser química o enzimáticamente escindible *in vivo* o *in vitro*. El conector puede ser inerte, es decir, substancialmente no reactivo *in vivo* o *in vitro*, *v.g.*, no se degrada química o enzimáticamente. Como ejemplos de grupos inertes que pueden servir como grupos conectores, se incluyen cadenas alifáticas, tales como grupos alquilo, alquenilo y alquinilo *(v.g.*, C1-C20), anillos de cicloalquilo (*v.g.*, C3-C10), grupos arilo (grupos arilo carbocíclicos tales como 1-naftilo, 2-naftilo, 1-antracilo y 2-antracilo, y grupos heteroarilo tales como *N*-imidazolilo, 2-imidazol, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-furanilo, 3-furanilo, 2- piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 2-piranilo, 3-piranilo, 3-pirazolilo, 4-pirazolilo, 5-pirazolilo, 2-pirazinilo, 2-tiazol, 4-tiazol, 5-tiazol, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 2-benzotienilo, 3-benzotienilo, 2-benzofuranilo, 3- benzofuranilo, 2-indolilo, 3-indolilo, 2-quinolinilo, 3-quinolinilo, 2-benzotiazol, 2-benzooxazol, 2-bencimidazol, 2-quinolinilo, 3-quinolinilo, 1-isoquinolinilo, 3-quinolinilo, 1-isoindolilo y 3-isoindolilo), grupos heterocíclicos no aromáticos (*v.g.*, 2-tetrahidrofuranilo, 3-tetrahidrofuranilo, 2-tetrahidrotiofenilo, 3-tetrahidrotiofenilo, 2-morfolino, 3-morfolino, 4-morfolino, 2-tiomorfolino, 3-tiomorfolino, 4-tiomorfolino, 1-pirrolidinilo, 2-pirrolidinilo, 3-pirrolidinilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-piperidinilo y 4-tiazolidinilo) y grupos alifáticos en los que uno, dos o tres metilenos han sido reemplazados con -O-, -S-, -NH-, $-SO_2-$, -SO- o $-SO_2NH-$.

Los presentes compuestos incluyen moléculas pequeñas, más particularmente dominios de compuestos TDFRP, con la estructura general aquí identificada, como se detalla más adelante. Los dominios de compuestos TDFRP aquí desvelados pueden estar presentes en un compuesto TDFRP en cualquier combinación u orientación. También se incluyen en la presente invención variantes, análogos, homólogos o fragmentos de estos dominios de compuestos TDFRP, tales como homólogos de especie, así como sus formas degeneradas. Los dominios de compuestos TDFRP pueden estar rematados en el extremo N, o en el extremo C, o tanto en el extremo N como en el extremo C. Los compuestos TDFRP pueden estar pegilados, o modificados, *v.g.*, ramificación, en cualquier residuo de aminoácido que contenga una cadena lateral reactiva, *v.g.*, residuo de lisina, o grupo químicamente reactivo sobre el conector. El compuesto TDFRP de la presente invención puede ser lineal o cíclico. La secuencia de cola del TDFRP o de los dominios TDFRP puede tener una longitud variable. En un aspecto de la presente invención, los compuestos TDFRP de la invención son profármacos, es decir, que la actividad biológica del compuesto TDFRP se altera, *v.g.*, aumenta, al contactar con un sistema biológico *in vivo* o *in vitro*.

Los compuestos TDFRP pueden contener aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, d-aminoácidos y 1-aminoácidos, y cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención pueden incluir aminoácidos comúnmente encontrados que no estén genéticamente codificados. Estos aminoácidos no genéticamente codificados incluyen, aunque sin limitación, β-alanina (β-Ala) y otros omega-aminoácidos, tales como ácido 3-aminopropiónico (Dap), ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr), ácido 4-aminobutírico, etc.; ácido α-aminoisobutírico (Aib); ácido ε-aminohexanoico (Aha); ácido δ-aminovalérico (Ava); N-metilglicina o sarcosina (MeGly); ornitina (Orn); citrulina (Cit); t-butilalanina (t-BuA); t-butilglicina (t-BuG); N-metilisoleucina (Melle); fenilglicina (Phg); ciclohexilalanina (Cha); norleucina (Nle); 2-naftilalanina (2-Nal); 4-clorofenilalanina (Phe(4-Cl)); 2-fluorofenilalanina (Phe(2-F)); 3-fluorofenilalanina (Phe(3-F)); 4-fluorofenilalanina (Phe(4-F)); penicilamina (Pen); ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolino-3-carboxílico (Tic); β-2-tienilalanina (Thi); sulfóxido de metionina (MSO); homoarginina (hArg); N-acetillisina (AcLys); ácido 2,3-diaminobutírico (Dab); ácido 2,3-diaminobutírico (Dbu); p-aminofenilalanina (Phe(pNH_2)); N-metilvalina (MeVal); homocisteína (hCys) y homoserina (hSer). Se pueden producir variantes no naturales de los compuestos por técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.

El compuesto de la invención que comprende la siguiente:

Secuencia	SEC. Nº ID.:
CYYDNSSSVLCKRYRS	333

donde cada cisteína está reemplazada por un aminoácido que tiene una cadena lateral que contiene un resto hidroxilo, tiol, amina, ácido carboxílico o ácido sulfónico que puede ser usado para ciclar el compuesto.

Se describe un compuesto TDFRP que incluye un análogo u homólogo de la SEC. Nº ID.: 333. Los compuestos pueden tener homología con la SEC. Nº ID.: 333, por ejemplo, un 50% o más de identidad de aminoácidos, tal como un 75% o más de identidad de aminoácidos, o un 90% o más de identidad de aminoácidos.

Se puede medir la identidad de secuencia usando un programa de análisis de secuencia (Programa de Análisis de Secuencia del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue,

Madison, Wis. 53705), con los parámetros por defecto que en él se encuentran.

En el caso de las secuencias polipeptídicas, que son idénticas en menos de un 100% a una secuencia de referencia, las posiciones no idénticas son preferiblemente, aunque no necesariamente, substituciones conservadoras para la secuencia de referencia. Las substituciones conservadoras típicamente incluyen substituciones en los grupos siguientes: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparragina y glutamina; serina y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina. Por lo tanto, se describen péptidos que tienen secuencias mutadas de forma que sigan siendo homólogos, *v.g.*, en secuencia, en estructura, en función y en carácter antigénico u otra función, con un polipéptido que tiene la correspondiente secuencia parental. Dichas mutaciones pueden, por ejemplo, ser mutaciones que conllevan cambios de aminoácidos conservadores, *v.g.*, cambios entre aminoácidos de propiedades moleculares ampliamente similares. Por ejemplo, los intercambios dentro del grupo alifático alanina, valina, leucina e isoleucina pueden ser considerados como conservadores. A veces, la substitución con glicina de uno de éstos puede también ser considerada como conservadora. Otros intercambios conservadores incluyen los que se producen dentro del grupo alifático aspartato y glutamato; dentro del grupo amida asparragina y glutamina; dentro del grupo hidroxilo serina y treonina; dentro del grupo aromático fenilalanina, tirosina y triptófano; dentro del grupo básico lisina, arginina e histidina; y dentro del grupo que contiene azufre metionina y cisteína. A veces, la substitución dentro del grupo de la metionina y la leucina puede también ser considerada como conservadora. Los grupos preferidos de substitución conservadora son aspartato-glutamato, asparragina-glutamina, valina-leucina-isoleucina, alanina-valina, fenilalanina-tirosina y lisina-arginina.

También se describen compuestos que tienen secuencias alteradas que incluyen inserciones, de tal modo que la secuencia global de aminoácidos resulta alargada, mientras que el compuesto aún conserva las propiedades de agonista o antagonista de TDF apropiadas. Adicionalmente, las secuencias alteradas pueden incluir deleciones internas aleatorias o diseñadas que trunquen la secuencia global de aminoácidos del compuesto; sin embargo, el compuesto aún conserva sus propiedades funcionales de tipo TDF. En ciertas realizaciones, se substituyen uno o más residuos de aminoácidos dentro de la SEC. Nº ID.: 333 con otros residuos de aminoácidos que tienen propiedades físicas y/o químicas similares a los residuos a los que substituyen. Preferiblemente, son substituciones conservadoras de aminoácidos aquéllas en las que se substituye un aminoácido con otro aminoácido incluido dentro de la misma clase designada, como se describirá con mayor amplitud más adelante. Las inserciones, deleciones y substituciones son apropiadas cuando no abolen las propiedades funcionales del compuesto. Se puede estudiar la funcionalidad del compuesto alterado según los ensayos *in vitro* e *in vivo* que se describen más adelante y que están diseñados para valorar las propiedades de tipo TDF del compuesto alterado.

Los residuos de aminoácidos de la SEC. Nº ID.: 333, análogos u homólogos de la SEC. Nº ID.: 333, incluyen 1-aminoácidos genéticamente codificados, 1-aminoácidos no genéticamente codificados naturales, d-aminoácidos sintéticos o d-enantiómeros de todos los anteriores.

B. Secuencias de ácido nucleico TDFRP

Se describen uno o más polinucleótidos codificantes de la SEC. Nº ID.: 333, incluyendo sus variantes degeneradas. Por consiguiente, se describen secuencias de ácido nucleico capaces de hibridarse en condiciones poco estrictas con cualquier secuencia de ácido nucleico codificante de la SEC. Nº ID.: 333. Por ejemplo, para una secuencia de ácido nucleico de aproximadamente 20-40 bases, un protocolo típico de prehibridación, hibridación y lavado es como sigue: (1) prehibridación: incubar filtros de nitrocelulosa que contienen el ADN diana desnaturalizado durante 3-4 horas a 55°C en solución de Denhardt 5x, SSC 6x (SSC 20x consiste en 175 g de NaCl, 88,2 g de citrato de sodio en 800 ml de H_2O ajustado a pH 7,0 con NaOH 10 N), 0,1% de SDS y 100 μg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado; (2) hibridación: incubar filtros en solución de prehibridación más sonda a 42°C durante 14-48 horas; (3) lavado: tres lavados de 15 minutos en SSC 6x y 0,1% de SDS a temperatura ambiente, seguido de un lavado final de 1-1,5 minutos en SSC 6x y 0,1% de SDS a 55°C. Se conocen bien en la técnica otros procedimientos equivalentes, *v.g.*, empleando solventes orgánicos, tales como formamida. Las condiciones estándar de rigor están bien caracterizadas en los textos de clonación de biología molecular estándar. Véase, por ejemplo Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., ed., Sambrook, Fritsch, y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volúmenes I y II (D.N. Glovered., 1985); Oligonucleotide synthesis (M.J. Gait ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds., 1984).

Se describen variantes alélicas de los mismos, es decir, formas alternativas naturales de los polinucleótidos aislados que codifican polipéptidos que son idénticos u homólogos a, o que están relacionados con, los codificados por los polinucleótidos. De manera alternativa, se pueden producir variantes no naturales por técnicas de mutagénesis o por técnicas de síntesis directa bien conocidas en este campo.

C. Vectores de expresión recombinante de TDFRP

Se describen vectores que contienen una o más secuencias de ácido nucleico codificantes de un compuesto TDFRP. Para la expresión recombinante de uno o más de los polipéptidos de la invención, se inserta el ácido nucleico que contiene toda o una porción de la secuencia nucleotídica codificante del polipéptido en un vector de clonación apropiado, o un vector de expresión (es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la

transcripción y traducción de la secuencia codificante del polipéptido insertada), por técnicas de ADN recombinante bien conocidas en este campo y como se detalla más adelante.

En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas del ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente descripción, "plásmido" y "vector" pueden ser usados indistintamente, ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, se describen otras formas de vectores de expresión que técnicamente no son plásmidos, tales como vectores víricos (*v.g.*, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados defectuosos en replicación), que realizan funciones equivalentes. Dichos vectores víricos permiten la infección de un sujeto y la expresión en ese sujeto de un compuesto.

Los vectores de expresión recombinante comprenden un ácido nucleico codificante de un compuesto con propiedades de tipo TDF en una forma adecuada para expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo que significa que los vectores de expresión recombinante incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas en base a las células huésped que se habrán de usar para la expresión, que están operativamente unidas a la secuencia de ácido nucleico que se ha de expresar. En un vector de expresión recombinante, "operativamente unida" quiere significar que la secuencia nucleotídica de interés está unida a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de un modo que permite la expresión de la secuencia nucleotídica (*v.g.*, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped cuando se introduce el vector en la célula huésped).

El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (*v.g.*, señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras están descritas, por ejemplo, en Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Las secuencias reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia nucleotídica en muchos tipos de célula huésped y las que dirigen la expresión de la secuencia nucleotídica sólo en ciertas células huésped (*v.g.*, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se ha de transformar, el nivel de expresión de polipéptido deseado, *etc.* Los vectores de expresión de la invención pueden ser introducidos en células huésped para producir así polipéptidos o péptidos, incluyendo polipéptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como aquí se describe (*v.g.*, compuestos TDFRP y polipéptidos de fusión derivados de TDFRP, *etc.*).

D. Células huésped que expresan TDFRP

Se describen células huésped que expresan TDFRP, que contienen un ácido nucleico codificante de uno o más compuestos TDFRP. Los vectores de expresión recombinante pueden ser diseñados para expresión de compuestos TDFRP en células procarióticas o eucarióticas. Por ejemplo, los compuestos TDFRP pueden expresarse en células bacterianas, tales como *Escherichia coli*, células de insectos (utilizando vectores de expresión baculovirus), células fúngicas, *v.g.*, levadura, células de levadura o células de mamífero. Se discuten células huésped adecuadas en Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, CA. (1990). De manera alternativa, el vector de expresión recombinante puede ser transcrito y traducido *in vitro*, por ejemplo usando secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

La expresión de polipéptidos en procariontes es más frecuentemente realizada en *Escherichia coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de polipéptidos de fusión o de no fusión. Los vectores de fusión añaden una serie de aminoácidos a un polipéptido allí codificado, normalmente al extremo amino del polipéptido recombinante. Dichos vectores de fusión típicamente sirven a tres fines: (i) aumentar la expresión de polipéptido recombinante; (ii) aumentar la solubilidad del polipéptido recombinante; y (iii) ayudar a la purificación del polipéptido recombinante actuando como ligando en purificación por afinidad. Con frecuencia, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y el polipéptido recombinante para permitir la separación del polipéptido recombinante y del resto de fusión tras purificación del polipéptido de fusión. Dichas enzimas, y sus secuencias de reconocimiento semejantes, incluyen el Factor Xa, la trombina y la enterokinasa. Como vectores de expresión de fusión típicos, se incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith y Johrison, 1988. Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.), que fusionan glutatión S-transferasa (GST), polipéptido de unión a maltosa E o polipéptido A, respectivamente, al polipéptido recombinante diana.

Como ejemplos de vectores de expresión en *E. coli* no de fusión inducibles adecuados, se incluyen pTrc (Amrann *et al.*, (1988) Gene 69: 301-315) y pET 11d (Studier *et al.*, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89).

Una estrategia para maximizar la expresión de polipéptidos recombinantes en *E. coli* es expresar el polipéptido en bacterias huésped con una capacidad alterada para escindir proteolíticamente el polipéptido recombinante. Véase, *v.g.*, Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, CA. (1990) 119-128. Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico que se ha de insertar en un vector de expresión, de tal manera que los codones individuales para cada aminoácido sean los preferentemente utilizados en el huésped de expresión, *v.g.*, *E. coli* (véase, *v.g.*, Wada *et al.*, 1992. Nucl. Acids Res.

20: 2111-2118). Dicha alteración de secuencias de ácido nucleico de la invención puede ser llevada a cabo por técnicas de síntesis de ADN estándar.

En otra realización, el vector de expresión de TDFRP es un vector de expresión de levadura. Como ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *Saccharomyces cerivisiae*, se incluyen pYepSec1 (Baldari *et al.*, 1987. EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz, 1982. Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz *et al.*, 1987. Gene 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA.) y picZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA.). De manera alternativa, se puede expresar TDFRP en células de insecto usando vectores de expresión baculovirus. Como vectores baculovirus disponibles para la expresión de polipéptidos en células de insecto cultivadas *(v.g.*, células SF9), se incluyen la serie pAc (Smith *et al.*, 1983. Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers, 1989. Virology 170: 31-39).

Se puede expresar el ácido nucleico en células de mamífero usando un vector de expresión en mamíferos. Como ejemplos de vectores de expresión en mamíferos, se incluyen pCDM8 (Seed, 1987. Nature 329: 840) y pMT2PC (Kaufman *et al.*, 1987. EMBO J. 6: 187-195). Cuando se usa en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión son con frecuencia aportadas por elementos reguladores víricos. Por ejemplo, los promotores comúnmente utilizados derivan de polioma, adenovirus 2, citomegalovirus y virus simiano 40. Para otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procarióticas como eucarióticas, véanse, *v.g.*, los Capítulos 16 y 17 de Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

El vector de expresión recombinante en mamíferos puede ser capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo de célula particular (*v.g.*, se usan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos de tejido son conocidos en la técnica. Como ejemplos no limitativos de promotores específicos de tejido adecuados, se incluyen el promotor de albúmina (específico de hígado; Pinkert *et al.*, 1987. Genes Dev. 1: 268-277), los promotores específicos del tejido linfoide (Calame y Eaton, 1988. Adv. Immunol. 43: 235-275), en particular los promotores de los receptores de las células T (Winoto y Baltimore, 1989. EMBO J. 8: 729-733) y de inmunoglobulinas (Banerji *et al.*, 1983. Cell 33: 729-740; Queen y Baltimore, 1983. Cell 33: 741-748), los promotores específicos de neuronas *(v.g.*, el promotor del neurofilamento; Byne y Ruddle, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477), los promotores específicos del páncreas (Edlund *et al.*, 1985. Science 230: 912-916) y los promotores específicos de la glándula mamaria (*v.g.*, promotor del suero de la leche; Patente Estadounidense Nº 4,873,316 y Publicación de Solicitud Europea Nº 264,166). También se incluyen promotores regulados durante el desarrollo, *v.g.*, los promotores hox murinos (Kessel y Gruss, 1990. Science 249: 374-379) y el promotor de la α-fetoproteína (Campes y Tilghman, 1989. Genes Dev. 3: 537-546).

Se describe un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN clonada en el vector de expresión en una orientación antisentido. Es decir, la molécula de ADN está operativamente unida a una secuencia reguladora de un modo que permite la expresión (por transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido con respecto a un ARNm de TDRFP. Se pueden elegir secuencias reguladoras operativamente unidas a un ácido nucleico clonado en la orientación antisentido que dirijan la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en una variedad de tipos celulares, por ejemplo, promotores y/o potenciadores víricos, o se pueden elegir secuencias reguladoras que dirijan la expresión constitutiva específica de tejido o específica de tipo celular de ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en forma de un plásmido recombinante, un fagémido o un virus atenuado en el que se producen ácidos nucleicos antisentido bajo el control de una región reguladora de alta eficacia, cuya actividad puede ser determinada por el tipo de célula en la que se introduce el vector. Para una discusión de la regulación de la expresión génica usando genes antisentido, véase, *v.g.*, Weintraub *et al.*, "Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis", Reviews-Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986.

Se describen células huésped en las que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Los términos "célula huésped" y "célula huésped recombinante" son aquí utilizados indistintamente. Se entiende que dichos términos se refieren no sólo a la célula particular en cuestión, sino también a la progenie o potencial progenie de dicha célula. Dado que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutación o a influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero sigue siendo incluida dentro del alcance del término tal como se usa aquí.

Una célula huésped puede ser cualquier célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo, el TDFRP puede expresarse en células bacterianas, tales como *E. coli*, células de insectos, levaduras o células de mamíferos (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS). Otras células huésped adecuadas son conocidas para los expertos en la técnica.

Se puede introducir ADN vector en células procarióticas o eucarióticas por técnicas convencionales de transformación o transfección. Tal como se usan aquí, los términos "transformación" y "transfección" pretenden hacer referencia a una variedad de técnicas reconocidas en el campo para introducir ácido nucleico extraño *(v.g.*, ADN) en una célula huésped, incluyendo la coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, la lipofección o la electroporación. Se pueden encontrar métodos adecuados para

transformar o transfectar células huésped en Sambrook *et al.* (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) y en otros manuales de laboratorio.

Para la transfección estable de células de mamíferos, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección empleada, sólo una pequeña fracción de células pueden integrar el ADN extraño en su genoma. Con objeto de identificar y seleccionar estos integrantes, se introduce generalmente un gen que codifica un marcador seleccionable (*v.g.*, resistencia a antibióticos) en las células huésped junto con el gen de interés. Diversos marcadores seleccionables incluyen los que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Se puede introducir ácido nucleico codificante de un marcador seleccionable en una célula huésped en el mismo vector que el que codifica el TDFRP o se puede introducir en un vector aparte. Se pueden identificar las células establemente transfectadas con el ácido nucleico introducido por selección de fármacos *(v.g.*, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

Se puede usar una célula huésped que incluya un compuesto de la invención, tal como una célula huésped procariótica o eucaríótica en cultivo, para producir (es decir, expresar) TDFRP recombinante. El método puede incluir el cultivo de la célula huésped (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante codificante de TDFRP) en un medio adecuado de tal manera que se produzca TDFRP. En otra realización, el método incluye además la etapa de aislamiento del TDFRP del medio o de la célula huésped. La purificación de polipéptidos recombinantes es bien conocida en este campo y se incluyen técnicas de purificación por intercambio iónico o técnicas de purificación por afinidad, por ejemplo con un anticuerpo para el compuesto. Se discuten más adelante métodos de creación de anticuerpos para los compuestos de la presente invención.

E. Polipéptidos quiméricos y de fusión derivados de TDFRP

Se describen compuestos que son polipéptidos quiméricos o de fusión derivados de TDFRP. Tal como se usa aquí, un "polipéptido quimérico" o "polipéptido de fusión" derivado de TDFRP comprende un TDFRP operativamente unido a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un polipéptido que no es substancialmente homólogo al TDFRP, *v.g.*, un polipéptido que es diferente del TDFRP y que deriva del mismo organismo o de uno diferente (es decir, no TDFRP). En un polipéptido de fusión derivado de TDFRP, el TDFRP puede corresponder a todo o a una porción de un TDFRP. Un polipéptido de fusión derivado de TDFRP puede comprender al menos una porción biológicamente activa de un TDFRP, por ejemplo un fragmento de la SEC. Nº ID.: 333. Un polipéptido de fusión derivado de TDFRP puede comprender al menos dos porciones biológicamente activas de un TDFRP. Un polipéptido de fusión derivado de TDFRP comprende al menos tres porciones biológicamente activas de un polipéptido TDFRP. En el polipéptido de fusión, el término "operativamente unido" pretende indicar que el polipéptido TDFRP y el polipéptido no TDFRP se fusionan en marco entre sí. El polipéptido no TDFRP puede fusionarse al extremo N o al extremo C del TDFRP.

El polipéptido de fusión puede ser un polipéptido de fusión GST-TDFRP en el que las secuencias de TDFRP se fusionan al extremo N o al extremo C de las secuencias de GST (glutatión S-transferasa). Dichos polipéptidos de fusión pueden facilitar la purificación del TDFRP recombinante por medios de afinidad.

El polipéptido de fusión puede ser un polipéptido TDFRP que contenga una secuencia de señal heteróloga en su extremo N. En ciertas células huésped (*v.g.*, células huésped de mamíferos), se puede aumentar la expresión y/o secreción de TDFRP mediante el uso de una secuencia de señal heteróloga.

El polipéptido de fusión puede ser un polipéptido de fusión TDFRP-inmunoglobulina en el que las secuencias de TDFRP se fusionan con secuencias derivadas de un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Los polipéptidos de fusión TDFRP-inmunoglobulina pueden ser incorporados en composiciones farmacéuticas y administrados a un sujeto para inhibir una interacción entre un TDF y un polipéptido receptor de TDF sobre la superficie de una célula, para suprimir así la transducción de señal mediada por TDF *in vivo*. Los polipéptidos de fusión TDFRP-inmunoglobulina pueden ser usados para afectar a la biodisponibilidad de un TDFRP, por ejemplo, para dirigir el compuesto a una célula o tejido particular que tenga el antígeno necesario. La inhibición de la interacción TDF/receptor de TDF puede ser útil terapéuticamente para el tratamiento de trastornos tanto proliferativos como de la diferenciación, así como para modular (*v.g.*, promover o inhibir) la supervivencia celular. Además, los polipéptidos de fusión TDFRP-inmunoglobulina pueden ser usados como inmunógenos para producir anticuerpos anti-TDFRP en un sujeto, para purificar ligandos de TDFRP y en ensayos de cribado para identificar moléculas que inhiben la interacción de TDF con un ligando de TDF.

F. TDFRP1-conector-TDFRP2

Los compuestos pueden contener múltiples polipéptidos relacionados con TDF (es decir, compuestos polipeptídicos relacionados con TDF de múltiples dominios, en adelante "TDFRP") con la estructura general mostrada a continuación:

TDFRP1-conector-TDFRP2

donde un primer dominio TDFRP (TDFRP1, es decir, polipéptido relacionado con TDF 1) se une covalentemente a través del extremo C, del extremo N o de cualquier posición con un grupo lateral funcionalizable, *v.g.*, lisina o ácido aspártico, a una molécula conectora, la cual, a su vez, se une covalentemente al extremo N de un segundo dominio TDFRP (TDFRP2).

Los dominios TDRFP son compuestos que incluyen moléculas pequeñas, más particularmente los polipéptidos aquí identificados, es decir, la SEC. Nº ID.: 333. También se incluyen variantes, análogos, homólogos o fragmentos de estos compuestos, tales como homólogos de especie, en la presente invención, así como sus formas degeneradas.

Un primer dominio se une a un segundo dominio a través de un conector. El término "conector", tal como se usa aquí, se refiere a un elemento capaz de proporcionar un espaciamiento o rigidez estructural, u orientación estructural, apropiados, solo o en combinación, a un primer y un segundo dominios, *v.g.*, TDFRP1 y TDFRP2, de tal forma que se conserva la actividad biológica del TDFRP. Por ejemplo, los conectores pueden incluir, aunque sin limitación, un diaminoalcano, un ácido dicarboxílico, un ácido aminocarboxílico alcano, una secuencia de aminoácido, *v.g.*, polipéptido de glicina, una unión disulfuro, un elemento estructural helicoidal o en forma laminar o una cadena de alquilo. El conector puede no ser inerte, *v.g.*, es química o enzimáticamente escindible *in vivo* o *in vitro*. El conector puede ser inerte, es decir, substancialmente no reactivo *in vivo* o *in vitro*, *v.g.*, no se degrada química o enzimáticamente. Como ejemplos de grupos inertes que pueden servir como grupos conectores, se incluyen cadenas alifáticas, tales como grupos alquilo, alquenilo y alquinilo *(v.g.*, C1-C20), anillos de cicloalquilo *(v.g.*, C3-C10), grupos arilo (grupos arilo carbocíclicos, tales como 1-naftilo, 2-naftilo, 1-antracilo y 2-antracilo, y grupos heteroarilo, tales como *N*-imidazolilo, 2-imidazol, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-furanilo, 3-furanilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 2-piranilo, 3-piranilo, 3-pirazolilo, 4-pirazolilo, 5-pirazolilo, 2-pirazinilo, 2-tiazol, 4-tiazol, 5-tiazol, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 2-benzotienilo, 3-benzotienilo, 2-benzofuranilo, 3-benzofuranilo, 2-indolilo, 3-indolilo, 2-quinolinilo, 3-quinolinilo, 2-benzotiazol, 2-benzooxazol, 2-bencimidazol, 2-quinolinilo, 3-quinolinilo, 1-isoquinolinilo, 3-quinolinilo, 1-isoindolilo y 3-isoindolilo), grupos heterocíclicos no aromáticos (*v.g.*, 2-tetrahidrofuranilo, 3-tetrahidrofuranilo, 2-tetrahidrotiofenilo, 3-tetrahidrotiofenilo, 2-morfolino, 3-morfolino, 4-morfolino, 2-tiomorfolino, 3-tiomorfolino, 4-tiomorfolino, 1-pirrolidinilo, 2-pirrolidinilo, 3-pirrolidinilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-piperidinilo y 4-tiazolidinilo) y grupos alifáticos en los que uno, dos o tres metilenos han sido reemplazados con -O-, -S-, -NH-, -SO_2-, -SO- o -SO_2NH-.

Los presentes compuestos incluyen moléculas pequeñas, más particularmente dominios de compuestos TDFRP, con la estructura general aquí identificada, como se detalla más adelante. Los dominios de compuestos TDFRP aquí desvelados pueden estar presentes en un compuesto TDFRP en cualquier combinación u orientación. También se describen variantes, análogos, homólogos o fragmentos de estos dominios de compuestos TDFRP, tales como homólogos de especie, así como sus formas degeneradas. Los dominios de compuestos TDFRP pueden estar rematados en el extremo N, o en el extremo C, o tanto en el extremo N como en el extremo C. Los compuestos TDFRP pueden estar pegilados, o modificados, *v.g.*, ramificación, en cualquier residuo de aminoácido que contenga una cadena lateral reactiva, *v.g.*, residuo de lisina, o grupo químicamente reactivo sobre el conector. El compuesto TDFRP de la presente invención puede ser lineal o cíclico. La secuencia de cola del TDFRP o de los dominios TDFRP puede tener una longitud variable. Los compuestos TDFRP pueden ser profármacos, es decir, que la actividad biológica del compuesto TDFRP se altera, *v.g.*, aumenta, al contactar con un sistema biológico *in vivo* o *in vitro*.

Los compuestos TDFRP pueden contener aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, d-aminoácidos y 1-aminoácidos, y cualquier combinación de éstos. En ciertas realizaciones, los compuestos pueden incluir aminoácidos comúnmente encontrados que no estén genéticamente codificados. Estos aminoácidos no genéticamente modificados incluyen, aunque sin limitación, β-alanina (β-Ala) y otros omega-aminoácidos, tales como ácido 3-aminopropiónico (Dap), ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr), ácido 4-aminobutírico, etc.; ácido α-aminoisobutírico (Aib); ácido ε-aminohexanoico (Aha); ácido δ-aminovalérico (Ava); N-metilglicina o sarcosina (MeGly); ornitina (Orn); citrulina (Cit); t-butilalanina (t-BuA); t-butilglicina (t-BuG); N-metilisoleucina (Melle); fenilglicina (Phg); ciclohexilalanina (Cha); norleucina (Nle); 2-naftilalanina (2-Nal); 4- clorofenilalanina (Phe(4-Cl)); 2-fluorofenilalanina (Phe(2-F)); 3-fluorofenilalanina (Phe(3-F)); 4-fluorofenilalanina (Phe(4-F)); penicilamina (Pen); ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolino-3-carboxílico (Tic); β-2-tienilalanina (Thi); sulfóxido de metionina (MSO); homoarginina (hArg); N-acetillisina (AcLys); ácido 2,3-diaminobutírico (Dab); ácido 2,3-diaminobutírico (Dbu); p-aminofenilalanina (Phe(pNH_2)); N-metilvalina (MeVal); homocisteína (hCys) y homoserina (hSer). Se pueden producir variantes no naturales de los compuestos por técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.

II. Preparación de TDRP

A. Síntesis peptídica de los compuestos TDFRP

En una realización, se puede sintetizar un compuesto TDFRP químicamente usando técnicas de síntesis peptídica estándar, *v.g.*, síntesis peptídica en fase sólida o en fase de solución. Es decir, el compuesto desvelado como SEC. Nº ID.: 333 es químicamente sintetizado, por ejemplo, sobre un soporte sólido o en solución usando composiciones y métodos bien conocidos en la técnica; véase, *v.g.*, Fields, G.B. (1997) Solid-Phase Peptide Synthesis. Academic Press, San Diego.

En general, los péptidos son alargados desprotegiendo la alfa-amina del residuo C-terminal y copulando el siguiente aminoácido adecuadamente protegido a través de una unión peptídica usando los métodos descritos. Este procedimiento de desprotección y copulación es repetido hasta obtener la secuencia deseada. Esta copulación puede ser realizada con los aminoácidos constituyentes por etapas, o por condensación de fragmentos (de dos a varios aminoácidos), o por combinación de ambos procedimientos, o por síntesis peptídica en fase sólida según el método originalmente descrito por Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, 2149-2154 (1963).

Los compuestos de la invención pueden ser también sintetizados usando un equipo automatizado de sintetización de péptidos. Además de lo anterior, se describen procedimientos para la síntesis peptídica en Stewart y Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", 2ª ed, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1984); Gross, Meienhofer, Udenfriend, Eds., "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 1, 2, 3, 5 y 9, Academic Press, New York, (1980-1987); Chan y White, "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis", Oxford University Press, Oxford (2000); Bodanszky, "Peptide Chemistry: A Practical Textbook", Springer-Verlag, New York (1988); y Bodanszky *et al.* "The Practice of Peptide Synthesis" Springer-Verlag, New York (1984).

La copulación entre dos derivados de aminoácido, un aminoácido y un péptido, dos fragmentos peptídicos o la ciclación de un péptido puede ser llevada a cabo usando procedimientos de copulación estándar, tales como el método de la azida, el método del anhídrido del ácido carbónico mixto (cloroformiato de isobutilo), el método de la carbodiimida (diciclohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida o carbodiimidas hidrosolubles), el método del éster activo (éster p-nitrofenílico, imidoéster N-hidroxisuccínico), el método del reactivo K de Woodward, el método del carbonildiimidazol, reactivos de fósforo tales como BOP-Cl, o el método de oxidación-reducción. Algunos de estos métodos (especialmente el de la carbodiimida) pueden ser potenciados por adición de 1-hidroxibenzotriazol. Estas reacciones de copulación pueden ser llevadas a cabo en solución (fase líquida) o en fase sólida.

Los grupos funcionales de los aminoácidos constituyentes deben ser protegidos durante las reacciones de copulación para evitar que se formen enlaces no deseados. Los grupos protectores que pueden ser utilizados aparecen enumerados en Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, New York (1981), y en "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 3, Academic Press, New York (1981).

El grupo alfa-carboxilo del residuo C-terminal es normalmente protegido mediante un éster que puede ser escindido para dar el ácido carboxílico. Estos grupos protectores incluyen: 1) ésteres de alquilo, tal como metilo y t-butilo; 2) ésteres de arilo, tal como bencilo y bencilo substituido; o 3) ésteres que pueden escindirse mediante un tratamiento con una base débil o medios reductores suaves, tales como ésteres de tricloroetilo y fenacilo. En el caso de la fase sólida, se une el aminoácido C-terminal a un soporte insoluble (normalmente poliestireno). Estos soportes insolubles contienen un grupo que reaccionará con el grupo carboxilo para formar un enlace, el cual es estable a las condiciones de elongación pero se escinde después fácilmente. Son ejemplos de ellos: resina de oxima (DeGrado y Kaiser (1980), J. Org. Chem. 45, 1295-1300), resina de cloro- o bromometilo, resina de hidroximetilo y resina de aminometilo. Muchas de estas resinas están comercializadas con el aminoácido C-terminal deseado ya incorporado.

El grupo alfa-amino de cada aminoácido debe ser protegido. Se puede usar cualquier grupo protector conocido en la técnica. Son ejemplos de éstos: 1) tipos de acilo, tales como formilo, trifluoroacetilo, ftalilo y p-toluensulfonilo; 2) tipos de carbamato aromático, tales como benciloxicarbonilo (Cbz) y benciloxicarbonilos substituidos, 1-(p-bifenil)-1-metiletoxicarbonilo y 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc); 3) tipos de carbamato alifático, tales como terc-butoxicarbonilo (Boc), etoxicarbonilo, diisopropilmetoxicarbonilo y aliloxicarbonilo; 4) tipos de alquilcarbamato cíclico, tales como ciclopentiloxicarbonilo y adamantiloxicarbonilo; 5) tipos de alquilo, tales como trifenilmetilo y bencilo; 6) trialquilsilano, tal como trimetilsilano; y 7) tipos que contienen tiol, tales como feniltiocarbonilo y ditiasuccinoílo. El grupo protector de alfa-amino preferido es Boc o Fmoc. Se dispone comercialmente de muchos derivados de aminoácidos adecuadamente protegidos para la síntesis de péptidos.

El grupo protector de alfa-amino se escinde antes de la copulación del siguiente aminoácido. Cuando se usa el grupo Boc, los métodos de elección son ácido trifluoroacético, neto o en diclorometano, o HCl en dioxano. Se neutraliza entonces la sal de amonio resultante antes de la copulación o *in situ* con soluciones básicas, tales como tampones acuosos o aminas terciarias en diclorometano o dimetilformamida. Cuando se usa el grupo Fmoc, los reactivos de elección son piperidina o piperidinas substituidas en dimetilformamida, pero se puede usar cualquier amina secundaria o solución básica acuosa. Se lleva a cabo la desprotección a una temperatura de entre 0 grados C y la temperatura amiente.

Cualquiera de los aminoácidos que llevan funcionalidades de cadena lateral debe ser protegido durante la preparación del péptido usando cualquiera de los grupos antes identificados. Los expertos en la técnica apreciarán que la selección y el uso de grupos protectores apropiados para estas funcionalidades de cadena lateral dependerán del aminoácido y de la presencia de otros grupos protectores en el péptido. La selección de dicho grupo protector es importante, en el sentido de que no debe ser eliminado durante la desprotección y copulación del grupo alfa-amino. Por ejemplo, cuando se elige Boc para la protección de la alfa-amina, son aceptables los siguientes grupos protectores: restos p-toluensulfonilo (tosilo) y nitro para arginina; benciloxicarbonilo, benziloxicarbonilos substituidos o tosilo para lisina; ésteres de bencilo o alquilo, tales como ciclopentilo, para los ácidos glutámico y aspártico; éteres de bencilo para serina y treonina; éteres de bencilo, éteres de bencilo substituidos o 2-bromobenciloxicarbonilo para

tirosina; p-metilbencilo, p-metoxibencilo, acetamidometilo, bencilo o t-butilsulfonilo para cisteína; y el indol del triptófano puede dejarse sin proteger o protegido con un grupo formilo. Cuando se elige Fmoc para la protección de la alfa-amina, normalmente son aceptables grupos protectores basados en terc-butilo. Por ejemplo, se puede usar Boc para lisina, éter terc-butílico para serina, treonina y tirosina, y éster terc-butílico para los ácidos glutámico y aspártico.

Los compuestos TDFRP son preferiblemente preparados por síntesis peptídica con Fmoc (grupo protector lábil a bases) o Boc (grupo protector de a-amino lábil a ácidos).

Una vez completados el alargamiento y la ciclación del péptido, se eliminan todos los grupos protectores. Para la síntesis en fase líquida, se eliminan los grupos protectores de cualquier modo según lo dicte la elección de los grupos protectores. Estos procedimientos son bien conocidos para los expertos en la técnica. Cuando se usa una síntesis en fase sólida, el péptido debe ser separado de la resina sin separar simultáneamente los grupos protectores de los grupos funcionales que podrían interferir con el proceso de ciclación. Por lo tanto, si el péptido ha de ser ciclado en solución, hay que elegir las condiciones de escisión de tal forma que se generen un grupo alfa-carboxilato libre y un grupo alfa-amino libre sin eliminar simultáneamente otros grupos protectores. De manera alternativa, el péptido puede ser separado de la resina por hidrazinolisis y luego copulado por el método de la azida. Otro método muy conveniente conlleva la síntesis de péptidos sobre una resina de oxima, seguida de desplazamiento nucleofílico intramolecular con respecto a la resina, lo que genera un péptido cíclico (Osapay, Profit, y Taylor (1990), Tetrahedron Letters 43, 6121-6124). Cuando se emplea la resina de oxima, generalmente se elige el esquema de protección con Boc. Entonces, el método preferido para eliminar grupos protectores de cadena lateral generalmente conlleva el tratamiento con aditivos que contienen HF anhidro, tales como sulfuro de dimetilo, anisol, tioanisol o p-cresol, a 0 grados C. También se puede llevar a cabo la escisión del péptido mediante otros reactivos ácidos, tales como mezclas de ácido trifluorometanosulfónico/ácido trifluoroacético.

Los compuestos TDFRP pueden contener aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, d-aminoácidos y 1-aminoácidos y cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención pueden incluir aminoácidos comúnmente encontrados que no estén genéticamente codificados. Estos aminoácidos no genéticamente codificados incluyen, aunque sin limitación, β-alanina (β-Ala) y otros omega-aminoácidos, tales como ácido 3-aminopropiónico (Dap), ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr), ácido 4-aminobutírico, etc.; ácido α-aminoisobutírico (Aib); ácido ε-aminohexanoico (Aha); ácido δ-aminovalérico (Ava); N-metilglicina o sarcosina (MeGly); ornitina (Orn); citrulina (Cit); t-butilalanina (t-BuA); t-butilglicina (t-BuG); N-metilisoleucina (Melle); fenilglicina (Phg); ciclohexilalanina (Cha); norleucina (Nle); norvalina (Nva), 2-naftilalanina (2-Nal); 4-clorofenilalanina (Phe(4-Cl)); 2-fluorofenilalanina (Phe(2-F)); 3-fluorofenilalanina (Phe(3-F)); 4-fluorofenilalanina (Phe(4-F)); penicilamina (Pen); ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolino-3-carboxílico (Tic); β-2-tienilalanina (Thi); sulfóxido de metionina (MSO); homoarginina (hArg); N-acetillisina (AcLys); ácido 2,3-diaminobutírico (Dab); ácido 2,3-diaminobutírico (Dbu); p-aminofenilalanina (Phe(pNH_2)); N-metilvalina (Me-Val); homocisteína (hCys) y homoserina (hSer). Se pueden producir variantes no naturales de los compuestos TDFRP por técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.

Se puede preparar un compuesto TDFRP cíclico sintéticamente, ya que cada residuo de cisteína es reemplazado con un aminoácido que tiene una cadena lateral que contiene un resto hidroxilo, tiol, amina, ácido carboxílico o ácido sulfónico que puede ser usado para ciclar el compuesto después del tratamiento para formar el entrecruzamiento. Como enlaces de entrecruzamiento, se incluyen, aunque sin limitación, disulfuro, lactona, tiolactona, amida, amidas N-substituidas, urea, carbamatos, carbonato, cetales, éter, tioéter, sulfóxido, sulfona, sulfonamida y sulfonamidas N-substituidas. Se favorecerá la ciclación cuando se incorpora un aminoácido inductor de giro. Como aminoácidos preferidos capaces de entrecruzar un compuesto TDFRP, se incluyen cisteína (Cys) y homocisteína (hCys) para formar disulfuro, tioéter y tiolactonas; ácidos aspártico y glutámico, ácido 2-aminoadípico y ácido 2-aminopimélico para formar lactonas o lactamas; serina, treonina y ácido 2-amino-4-hidroxibutírico para formar lactonas y carbamatos; ornitina (Orn), 4,5-deshidroornitina, citrulina (Cit), homoarginina (hArg), ácido 2,3-diaminopropiónico (Dap), ácido 2,3-diaminobutírico (Dab) y p-aminofenilalanina (Phe(pNH_2)) para formar lactamas y ureas; y un quelante, tal como ácido gamma-carboxilglutámico (Gla) (Bachem), para quelar un metal de transición y formar un entrecruzamiento. Se puede preparar ácido gamma-carboxilglutámico protegido modificando la síntesis descrita por Zee-Cheng y Olson (Biophys. Biochem. Res. Commun., 94: 1128-1132 (1980)).

Se puede oxidar un compuesto TDFRP en el que la secuencia peptídica comprende al menos dos aminoácidos que contienen cadenas laterales con funcionalidad tiol para formar un disulfuro cíclico. La oxidación puede ser llevada a cabo en solución o cuando el compuesto TDFRP está aún unido a la resina. Como condiciones adecuadas para la oxidación, se incluyen, aunque sin limitación, la oxigenación de una solución tamponada del TDFRP, una solución al 20% de DMSO e iones metálicos de mercurio o talio. Si se incorporan más de dos aminoácidos que contienen cadenas laterales con funcionalidad tiol en la secuencia peptídica, se pueden usar diferentes grupos protectores de tiol (véanse Hiskey, en The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 3, Gross y Meienhofer, eds., Academic Press: New York, pp. 137-167 (1981); Ponsanti *et al.*, Tetrahedron, 46: 8255-8266 (1990)). Se puede desproteger y oxidar el primer par de tioles y se puede desproteger y oxidar después el segundo conjunto. De este modo, se puede formar un conjunto definido de entrecruzamientos disulfuro. De manera alternativa, se pueden incorporar un par de tioles y un par de análogos de aminoácidos quelantes, de tal modo que los entrecruzamientos sean de una

naturaleza química diferente.

Se puede entrecruzar un compuesto TDFRP en el que la secuencia peptídica comprende al menos dos aminoácidos con cadena lateral que contiene una funcionalidad hidroxilo, tiol, amina, ácido sulfónico o carboxílica usando procedimientos de copulación estándar, tales como el método de la azida, el método del anhídrido de ácido carbónico mixto (cloroformiato de isobutilo), el método de la carbodiimida (diciclohexilcarbodiimida, diisopropilcarbodiimida o carbodiimidas hidrosolubles), el método del éster activo (éster p-nitrofenílico, imidoéster N-hidroxisuccínico), el método del reactivo K de Woodward, el método del carbonildiimidazol, reactivos de fósforo tales como BOP-Cl, o el método de oxidación-reducción, para formar puentes cíclicos de lactona, tiolactona, amida, sulfonamida, carbamato y urea. Los grupos funcionales presentes en la cadena lateral de los aminoácidos en la secuencia del TDFRP que no participan en la reacción de entrecruzamiento pueden ser protegidos mediante grupos protectores estándar. Estas reacciones de copulación pueden ser llevadas a cabo en solución (fase líquida) o en fase sólida.

Se pueden incorporar aminoácidos no clásicos en el compuesto TDFRP con objeto de introducir unidades conformacionales particulares, por ejemplo 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolino-3-carboxilato (Kazmierski *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 113: 2275-2283 (1991)); (2S,3S)-metilfenilalanina, (2S,3R)-metilfenilalanina, (2R,3S)-metilfenilalanina y (2R,3R)-metilfenilalanina (Kazmierski y Hruby, Tetrahedron Lett. (1991)); ácido 2-aminotetrahidronaftaleno-2-carboxílico (Landis, Ph.D. Thesis, University of Arizona (1989)); hidroxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolino-3-carboxilato (Miyake *et al.*, J. Takeda Res. Labs, 43: 53-76 (1989)); beta-carbolina (D y L) (Kazmierski, Ph.D. Thesis, University of Arizona (1988)); HIC (ácido histidinoisoquinolinocarboxílico) (Zechel *et al.*, Int. J. Pep. Protein Res., 43 (1991)); y HIC (histidina urea cíclica). Se pueden incorporar análogos de aminoácido y peptidomiméticos en un péptido para inducir o favorecer estructuras secundarias específicas, incluyendo: LL-Acp-(ácido LL-3-amino-2-propenidono-6-carboxílico), un análogo dipeptídico inductor de giro beta (Kemp *et al.*, J. Org. Chem. 50: 5834-5838 (1985)); análogos inductores de lámina beta (Kemp *et al.*, Tetrahedron Lett. 29: 5081-5082 (1988)); análogos que incluyen giro beta (Kemp *et al.*, Tetrahedron Lett., 29: 5057-5060 (1988)); análogos inductores de hélice (Kemp *et al.*, Tetrahedron Lett., 29: 4935-4938 (1988)); análogos inductores de giro gamma (Kemp *et al.*, J. Org. Chem. 54: 109-115 (1989)); y análogos proporcionados por las siguientes referencias: Nagai y Sato, Tetrahedron Lett., 26: 647;14 650 (1985); DiMaio *et al.*, J. Chem. Soc. Perkin Trans. p. 1687 (1989); también un análogo de giro Gly-Ala (Kahn *et al.*, Tetrahedron Lett., 30: 2317 (1989)); isósteros de enlaces amida (Jones *et al.*, Tetrahedron Lett., 29: 3853-3856 (1988)), incluyendo hidroxietilo, vinilo y fluorovinilo; tretazol (Zabrocki *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 110: 5875-5880 (1988)); DTC (Samanen *et al.*, Int. J. Protein Pep. Res., 35: 501-509 (1990)); y análogos mostrados en Olson *et al.*, J. Am. Chem. Sci., 112: 323-333 (1990), y Garvey *et al.*, J. Org. Chem., 56: 436 (1990). Se describen miméticos conformacionalmente restringidos de giros beta y protuberancias beta, y péptidos que los contienen, en la Patente Estadounidense Nº 5,440,013, concedida el 8 de agosto de 1995 a Kahn.

A continuación de la síntesis, se puede hacer entonces que un compuesto TDFRP esté substancialmente libre de precursores químicos u otras substancias químicas mediante un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de polipéptidos estándar, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, HPLC de fase invertida, *v.g.*, usando columnas tales como C-18, C-8 y C-4, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía basada en interacciones hidrofóbicas u otro método de purificación de polipéptidos.

Los compuestos TDFRP pueden estar rematados en el extremo N o en el extremo C o tanto en el extremo N como en el extremo C. Los compuestos TDFRP de la presente invención pueden estar pegilados, o modificados, *v.g.*, ramificación, en cualquier residuo de aminoácido que contenga una cadena lateral reactiva, *v.g.*, residuo de lisina.

B. Producción de compuesto TDFRP usando técnicas de ADN recombinante

En otra realización, se producen compuestos TDFRP por técnicas de ADN recombinante; por ejemplo, la sobreesprexión de los compuestos en bacterias, levaduras, baculovirus o células eucarióticas produce cantidades suficientes de los compuestos. La purificación de los compuestos a partir de mezclas heterogéneas de materiales, *v.g.*, mezclas de reacción o lisados celulares u otras fracciones brutas, es llevada a cabo por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad u otros métodos de purificación de polipéptidos. Éstos pueden verse facilitados expresando el compuesto descrito por la SEC. Nº ID.: 333 como fusiones con un epitopo o secuencia escindible o de algún modo inerte. La elección de los sistemas de expresión, así como de los métodos de purificación, es bien conocida por los expertos en la técnica.

Los polinucleótidos proporcionados por la presente invención pueden ser usados para expresar compuestos recombinantes para análisis, caracterización o uso terapéutico, como marcadores para tejidos en los que se expresa preferentemente el correspondiente compuesto (ya sea de manera constitutiva o en una fase particular de la diferenciación o el desarrollo del tejido o en estados de enfermedad).

Para la expresión recombinante de uno o más de los compuestos de la invención, se puede insertar el ácido nucleico que contiene toda o una porción de la secuencia nucleotídica codificante del péptido en un vector de expresión apropiado (es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia codificante del péptido insertada). En algunas realizaciones, los elementos reguladores son

heterólogos (es decir, no el promotor del gen nativo). De manera alternativa, las señales necesarias para la transcripción y la traducción pueden ser suministradas también por el promotor nativo para los genes y/o sus regiones flanqueantes.

Se puede utilizar una variedad de sistemas huésped-vector para expresar la(s) secuencia(s) codificante(s) del péptido. Éstos incluyen, aunque sin limitación: (i) sistemas de células de mamíferos infectados con virus de la vaccinia, adenovirus y similares; (ii) sistemas de células de insectos infectados con baculovirus y similares; (iii) levaduras que contienen vectores de levadura; o (iv) bacterias transformadas con bacteriófago, ADN, ADN de plásmido o ADN de cósmido. Dependiendo del sistema huésped-vector utilizado, se puede usar cualquiera de una serie de elementos de transcripción y traducción adecuados.

Las secuencias promotoras/potenciadoras en los vectores de expresión pueden utilizar secuencias reguladoras de plantas, animales, insectos u hongos, tal como se provee en la invención. Por ejemplo, se pueden usar elementos promotores/potenciadores de levaduras y otros hongos *(v.g.*, el promotor GAL4, el promotor de la alcohol deshidrogenasa, el promotor de la fosfoglicerol kinasa, el promotor de la fosfatasa alcalina). De manera alternativa, o además, pueden incluir regiones animales de control de la transcripción, *v.g.*, (i) la región de control del gen de la insulina activa en células pancreáticas (véase, *v.g.*, Hanahan *et al.*, 1985. Nature 315: 115-122); (ii) la región de control del gen de inmunoglobulinas activa en células linfoides (véase, *v.g.*, Grosschedl *et al.*, 1984. Cell 38: 647-658); (iii) la región de control del gen de la albúmina activa en el hígado (véase, *v.g.*, Pinckert *et al.*, 1987. Genes y Dev 1: 268-276; (iv) la región de control del gen del polipéptido básico de la mielina activa en células oligodendrocíticas encefálicas (véase, *v.g.*, Readhead *et al.*, 1987. Cell 48: 703-712); y (v) la región de control del gen de la hormona liberadora de la gonadotropina activa en el hipotálamo (véase, *v.g.*, Mason *et al.*, 1986. Science 234: 1372-1378), y similares.

Como vectores de expresión o sus derivados, se incluyen, *v.g.*, virus humanos o animales (*v.g.*, virus de la vaccinia o adenovirus), virus de insectos (*v.g.*, baculovirus), vectores de levaduras, vectores bacteriófagos (*v.g.*, fago lambda), vectores plasmídicos y vectores cosmídicos.

Se puede seleccionar una cepa de célula huésped que module la expresión de secuencias insertadas de interés o que modifique o procese péptidos expresados codificados por las secuencias de la manera específica deseada. Además, la expresión procedente de ciertos promotores puede aumentar en presencia de ciertos inductores en una cepa huésped seleccionada, facilitando de este modo el control de la expresión de un compuesto obtenido por ingeniería genética. Además, diferentes células huésped poseen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación en la traducción y después de la traducción (*v.g.*, glicosilación, fosforilación y similares) de los péptidos expresados. Se pueden elegir, por lo tanto, líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para asegurarse de que se consiguen la modificación y el procesamiento deseados del péptido extraño. Por ejemplo, se puede usar la expresión peptídica en un sistema bacteriano para producir un péptido nuclear no glicosilado, mientras que la expresión en células de mamíferos asegura una glicosilación "nativa" de un péptido heterólogo.

C. Preparación de compuestos polipeptídicos quiméricos o de fusión derivados de TDFRP

Se puede producir un compuesto polipeptídico quimérico o de fusión derivado de TDFRP por técnicas de ADN recombinante estándar conocidas en este campo. Por ejemplo, se ligan fragmentos de ADN codificantes de las diferentes secuencias polipeptídicas entre sí en marco según técnicas convencionales, *v.g.*, empleando extremos romos o escalonados para la ligación, digestión con enzimas de restricción para obtener extremos apropiados, rellenado de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión no deseada y ligación enzimática. En otra realización, se puede sintetizar el gen de fusión por técnicas convencionales, incluyendo sintetizadores automatizados de ADN. De manera alternativa, se puede realizar una amplificación por PCR de fragmentos de genes usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden ser luego hibridados y reamplificados para generar una secuencia génica quimérica (véase, *v.g.*, Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1992). Además, se dispone a nivel comercial de muchos vectores de expresión que ya codifican un resto de fusión (*v.g.*, un polipéptido GST). Se puede clonar un ácido nucleico codificante de TDFRP en dicho vector de expresión de tal forma que el resto de fusión esté unido en marco a la secuencia de ácido nucleico codificante de TDFRP.

D. Preparación de bibliotecas de compuestos TDFRP

Además, se pueden usar bibliotecas de fragmentos de las secuencias de ácido nucleico codificantes de los compuestos TDFRP para generar una población de fragmentos de TDFRP para cribado y posterior selección de variantes de un compuesto TDFRP. En una realización, se puede generar una biblioteca de fragmentos de secuencias codificantes tratando un fragmento de PCR de doble hélice de una secuencia de ácido nucleico codificante de un compuesto TDFRP con una nucleasa en condiciones en las que se produce la formación de mellas sólo aproximadamente una vez por molécula, desnaturalizando el ADN de doble hélice, renaturalizando el ADN para formar ADN de doble hélice que puede incluir pares sentido/antisentido a partir de diferentes productos mellados, separando las porciones de una sola hélice de los dúplex vueltos a formar por tratamiento con nucleasa S1 y ligando

la biblioteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Mediante este método, se pueden derivar bibliotecas de expresión que codifican fragmentos N-terminales, C-terminales e internos de diversos tamaños de los compuestos TDFRP.

Se conocen diversas técnicas en este campo para cribar productos génicos de bibliotecas combinatorias producidas por mutaciones puntuales o truncamiento y para cribar bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una propiedad seleccionada. Dichas técnicas son adaptables a un cribado rápido de las bibliotecas de ADN generadas por la mutagénesis combinatoria del compuesto TDFRP. Las técnicas más ampliamente utilizadas, que pueden ser llevadas a análisis de alto rendimiento para cribar grandes bibliotecas de genes, típicamente incluyen la clonación de la biblioteca génica en vectores de expresión replicables, la transformación de células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y la expresión de los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector codificante del gen cuyo producto fue detectado. Se puede usar mutagénesis de conjunto recursiva (REM), una nueva técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, en combinación con los ensayos de cribado para identificar variantes de los compuestos TDFRP. Véanse, *v.g.*, Arkin y Yourvan, 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7811-7815; Delgrave *et al.*, 1993. Polypeptide Engineering 6: 327-331.

Se puede producir una biblioteca de compuestos TDRFP por expresión en fagos. Se pueden explotar la conocida expresión en fagos u otros sistemas de expresión de nucleótidos para producir simultáneamente un gran número de construcciones candidatas de TDFRP. Se puede cribar posteriormente la reserva de construcciones candidatas en cuanto a especificidad de unión usando, por ejemplo, una columna de cromatografía que comprende receptores inmovilizados en superficie, elución en gradiente salino para seleccionar y para concentrar candidatos de alta unión y ensayos *in vitro* para determinar si candidatos aislados particulares son o no agonistas de la actividad del miembro de la superfamilia plantilla. La identificación de una construcción útil va seguida de la producción de líneas celulares que expresan cantidades útiles desde el punto de vista comercial de la construcción para uso de laboratorio y en último lugar para producir fármacos de utilidad terapéutica. Se contempla también que se pueden producir construcciones preferidas de una sola cadena, una vez identificadas y caracterizadas por las metodologías del ADN recombinante antes descritas, por metodologías de síntesis peptídica estándar.

De manera alternativa, se puede preparar una biblioteca de construcciones de ADN sintéticas simultáneamente, por ejemplo, mediante el montaje de secuencias nucleotídicas sintéticas que difieren en la composición de nucleótidos en una región preseleccionada. Por ejemplo, se contempla que, durante la producción de una construcción basada en un miembro específico de la superfamilia TGF-beta, el experto en la técnica puede elegir regiones de dedo y talón apropiadas para dicho miembro de la superfamilia. Una vez seleccionadas las regiones apropiadas de dedo y talón, el experto en la técnica puede entonces producir ADN sintético codificante de estas regiones, que posteriormente pueden ser conectadas por secuencias conectoras codificantes de conectores polipeptídicos. Por ejemplo, si se incluyen una pluralidad de moléculas de ADN codificantes de diferentes secuencias conectoras en una reacción de ligación que contiene moléculas de ADN codificantes de secuencias de dedo y talón, mediante una elección juiciosa de sitios de restricción y condiciones de reacción apropiadas, el experto en la técnica puede producir una biblioteca de construcciones de ADN donde cada una de las construcciones de ADN codifica regiones de dedo y talón, pero conectadas por diferentes secuencias conectoras. Se ligan entonces los ADN resultantes en un vehículo de expresión adecuado, es decir, un plásmido útil en la preparación de una biblioteca de expresión en fagos, se transfectan en una célula huésped y se expresan los polipéptidos codificados por los ADN sintéticos para generar una reserva de compuestos candidatos. Se puede cribar después la reserva de compuestos candidatos para identificar compuestos principales que tienen afinidad de unión y/o selectividad por un receptor preseleccionado.

Se puede realizar el cribado pasando una solución que incluye los compuestos candidatos a través de una columna de cromatografía que contiene receptor inmovilizado en superficie. Se eluyen entonces los compuestos principales con la especificidad de unión deseada, por ejemplo, por medio de un gradiente salino y/o un gradiente de concentración del miembro de la superfamilia TGF-beta plantilla. Se pueden aislar y caracterizar después las secuencias nucleotídicas codificantes de los compuestos principales. Una vez identificadas las secuencias nucleotídicas apropiadas de los compuestos principales, se pueden producir después los compuestos principales por metodologías convencionales de ADN recombinante o de síntesis peptídica, en cantidades suficientes para estudiar si la construcción particular imita la actividad del miembro de la superfamilia TGF-beta plantilla. (Amberg *et al.* (1993) "SurfZAP Vector: Linking Phenotype to Genotype for Phagemid Display Libraries", Strategies in Molecular Biology 6: 2-6.; Lowman *et al.* (1991) "Selecting High-Affinity Binding Proteins by Monovalent Phage Display", Biochemistry 30: 10832-10838; Marks *et al.* (1992) "Molecular Evolution of Proteins on Filamentous Phage", Journal of Biological Chemistry 267: 16007-16010; McCafferty *et al.* (1990) "Phage Antibodies: Filamentous Phage Displaying Antibody Variable Domains", Nature: 348: 552-554).

Se aprecia, sin embargo, que una biblioteca de construcciones de ADN codificante de una pluralidad de secuencias puede ser producida simultáneamente por metodologías de ADN recombinante estándar, tales como las descritas anteriormente, Por ejemplo, el experto en la técnica, mediante el uso de mutagénesis en casete o de mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, puede producir, por ejemplo, una serie de construcciones de ADN cada una de las cuales contiene diferentes secuencias de ADN en una localización predefinida, *v.g.*, en una casete de ADN

codificante de una secuencia conectora. Se puede expresar después la biblioteca de construcciones de ADN resultante, por ejemplo, en una biblioteca de expresión en fagos y se puede aislar cualquier construcción de proteína que se una a un receptor específico por purificación de afinidad, *v.g.*, usando una columna cromatográfica que tiene receptor inmovilizado en superficie. Una vez aisladas las moléculas que se unen al receptor preseleccionado, se pueden modular sus propiedades de unión y agonistas usando los ensayos de unión y actividad aquí descritos.

Cuando se usan metodologías de ADN recombinante, es necesario establecer y mantener una conexión física entre el polipéptido de interés y el ácido nucleico que lo codifica. Un sistema útil en la práctica de este aspecto de la invención incluye, por ejemplo, metodologías de expresión en fagos, donde se inmoviliza el péptido de interés sobre la superficie del fago como una fusión con una proteína de la cubierta del fago; véanse, por ejemplo, Scott *et al.* (1990) Science 249: 386-390; Parmely *et al.* (1988) Gene 73: 305-318; Devlin *et al.*, (1990) Science 249: 404-406; McCafferty *et al.* (1990) Nature 348: 552-554; Marks *et al.* (1992) J. Biol. Chem. 267: 16007-16010; Lowman *et al.* (1991) Biochem. 30: 10832-10838; Wells *et al. supra*; Amberg *et al.* en Strategies in Molecular Biology 6: 2-4; y el manual de instrucciones Recombinant Phage Antibody System de Pharmacia, P-L Biochemicals.

Para explicarlo brevemente, se expresan los ADN codificantes de construcciones candidatas sobre la superficie de partículas de fagos, típicamente como fusiones N-terminales con una proteína menor de la cubierta del fago. En un experimento típico, se contempla que se pueden aleatorizar nucleótidos codificantes de porciones específicas del gen sintético, *v.g.*, los que codifican secuencias conectoras, para producir una biblioteca de secuencias de ácido nucleico codificantes de construcciones que tienen secuencias de aminoácidos aleatorias en esa región. Una vez producida una biblioteca de moléculas de ADN codificantes de las construcciones seleccionadas, se ligan los ADN en el genoma del fago en una posición adyacente al gen codificante de una proteína menor de la cubierta. Se empaquetan los ADN resultantes, se amplifican en una célula huésped y se expresan para producir partículas de fagos recombinantes que tienen sobre su superficie celular proteínas menores de la cubierta fusionadas a la proteína de interés. Se aíslan después las partículas de fagos recombinantes que expresan construcciones seleccionadas que tienen la afinidad de unión y/o especificidad deseadas por un receptor de interés por varias tandas de enriquecimiento de afinidad seguidas de crecimiento de fagos. Usando estos enfoques, se pueden aislar partículas simples de fagos que expresan polipéptidos que tienen propiedades biológicas específicas de manera rutinaria a partir de bibliotecas de fagos que comprenden más de 10^6 - 10^8 partículas de fagos.

El enriquecimiento de afinidad puede ser, por ejemplo, realizado pasando una solución que contiene partículas de fagos recombinantes a través de una columna cromatográfica que tiene receptor inmovilizado en superficie en condiciones que permitan que construcciones seleccionadas expresadas sobre la superficie de partículas de fagos recombinantes se unan al receptor. Se lava entonces la columna para eliminar el fago residual y/o unido de una manera no específica, y se eluyen los fagos que expresan las construcciones conformacionalmente activas por desorción específica, por ejemplo, por adición de un exceso del miembro de la superfamilia TGF-beta plantilla, o por desorción inespecífica, por ejemplo, usando el pH, agentes reductores de la polaridad o sales caotrópicas. Las partículas con la mayor unión pueden ser eluidas usando un gradiente de concentración del reactivo inductor de desorción, donde las partículas con la mayor unión eluyen a mayores concentraciones del reactivo. Las partículas con la mayor unión, una vez eluidas son reamplificadas, y el ácido nucleico codificante del morfón de interés es aislado y secuenciado. Una vez se ha determinado la secuencia de ADN, y por lo tanto la secuencia de ácido nucleico de los morfones de mayor unión, se puede repetir luego el proceso de refinamiento, por ejemplo, por mutagénesis de otra porción de la molécula, hasta haber producido moléculas de morfones que tienen una actividad de unión preferida. Se pueden estudiar a continuación las construcciones resultantes en cuanto a actividad biológica usando ensayos *in vivo* o *in vitro* que han sido desarrollados para cada uno de los miembros de la superfamilia TGF-beta plantilla identificados hasta la fecha.

Tras la identificación de construcciones útiles, se pueden producir las construcciones en cantidades comercialmente útiles, por ejemplo, produciendo líneas celulares que expresen la construcción de interés o produciendo péptidos sintéticos definiendo la secuencia apropiada de aminoácidos. Se aprecia, sin embargo, que las metodologías convencionales para producir las líneas celulares apropiadas y para producir péptidos sintéticos son bien conocidas y están ampliamente documentadas en la técnica, y por ello no son discutidas aquí en detalle.

También se puede producir una biblioteca de compuestos variantes TDFRP, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de tal forma que un conjunto degenerado de secuencias de compuestos TDFRP potenciales sean expresables como polipéptidos individuales, o, de manera alternativa, como un conjunto de polipéptidos de fusión de mayor tamaño (*v.g.*, para expresión en fagos) que contienen el conjunto de secuencias de compuestos TDFRP. Existen una variedad de métodos que pueden ser usados para producir bibliotecas de compuestos variantes TDFRP potenciales a partir de una secuencia oligonucleotídica degenerada. Se puede llevar a cabo la síntesis química de una secuencia génica degenerada en un sintetizador de ADN automático, y el gen sintético es entonces ligado en un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite la provisión, en una mezcla, de todas las secuencias codificantes del conjunto deseado de secuencias de compuestos TDFRP potenciales. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados son bien conocidos en la técnica. Véanse, *v.g.*, Narang, 1983. Tetrahedron 39: 3; Itakura *et al.*, 1984. Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura *et al.*, 1984. Science 198: 1056; Ike *et al.*, 1983. Nucl. Acids Res. 11:477.

E. Anticuerpos anticompuestos TDFRP

Se describen compuestos que incluyen polipéptidos y fragmentos de polipéptidos adecuados para uso como inmunógenos para producir anticuerpos anticompuestos TDFRP. Los compuestos pueden ser usados para producir anticuerpos completos y fragmentos de anticuerpos, tales como Fv, Fab o $(Fab)_2$, que se unen inmunoespecíficamente a cualquiera de los compuestos TDFRP de la invención, incluyendo anticuerpos biespecíficos u otros anticuerpos multivalentes.

Se puede usar un compuesto polipeptídico TDFRP aislado, o una porción o fragmento del mismo, como inmunógeno para generar anticuerpos que se unan al compuesto TDFRP o a los polipéptidos TDF usando técnicas estándar para la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Se pueden usar los polipéptidos TFD de longitud total o, de manera alternativa, la invención provee el uso de compuestos, incluyendo compuestos TDFRP o fragmentos de TDFRP, como inmunógenos. El compuesto TDFRP tiene al menos 4 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. Nº ID.: 333, e incluye un epítopo del compuesto TDFRP, de tal forma que un anticuerpo producido contra el péptido forma un inmunocomplejo específico con el polipéptido TDF o con el compuesto TDFRP. Preferiblemente, el péptido antigénico comprende al menos 5, 8, 10, 15, 20 ó 30 residuos de aminoácidos. A veces son preferibles péptidos antigénicos de mayor longitud sobre péptidos antigénicos más cortos, dependiendo del uso y según métodos bien conocidos para los expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones de la invención, al menos un epítopo incluido en el péptido antigénico es una región de polipéptido TDF que se localiza sobre la superficie del polipéptido (*v.g.*, una región hidrofílica). Como medio para dirigir la producción de anticuerpos, se pueden generar gráficos de hidropatía que muestren regiones de hidrofilicidad e hidrofobicidad por cualquier método bien conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los métodos de Kyte Doolittle o de Hopp Woods, con o sin transformación de Fourier (véanse, *v.g.*, Hopp y Woods, 1981. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 3824-3828; Kyte y Doolittle, 1982. J. Mol. Biol. 157: 105-142).

Tal como se divulga aquí, los compuestos TDFRP o sus derivados pueden ser utilizados como inmunógenos en la generación de anticuerpos que se unan inmunoespecíficamente a estos componentes polipeptídicos. Se describen anticuerpos para polipéptidos TDFRP humanos. Se pueden usar diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales para una secuencia de compuesto TDFRP de SEC. Nº ID.: 333, o un derivado, fragmento, análogo u homólogo de la misma. Más adelante se discuten algunos de estos polipéptidos.

Para la producción de anticuerpos policlonales, se puede inmunizar a diversos animales hospedadores adecuados (*v.g.*, conejo, cabra, ratón u otro mamífero) por inyección con el polipéptido nativo, o una variante sintética del mismo, o un derivado de los anteriores. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, compuesto TDFRP recombinantemente expresado o un compuesto TDFRP químicamente sintetizado. La preparación puede incluir además un adyuvante. Entre los diversos adyuvantes usados para aumentar la respuesta inmuinológica, se incluyen, aunque sin limitación, adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales (*v.g.*, hidróxido de aluminio), substancias tensoactivas (*v.g.*, lisolecitina, polioles Pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, dinitrofenol, *etc.*), adyuvantes humanos, tales como el Bacilo Calmette-Guerin y *Corynebacterium parvum*, o compuestos inmunoestimulantes similares. Si se desea, se pueden aislar las moléculas de anticuerpo dirigidas contra TDF o el compuesto TDFRP del sujeto *(v.g.*, de la sangre) y purificarlas después por técnicas bien conocidas, tales como cromatografía en polipéptido A, para obtener la fracción de IgG.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia un compuesto TDFRP particular, o de derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos, se puede utilizar cualquier técnica que permita la producción de moléculas de anticuerpo por cultivo de líneas celulares continuas. Dichas técnicas incluyen, aunque sin limitación, la técnica de hibridomas (véase, *v.g.*, Kohler & Milstein, 1975. Nature 256: 495-497); la técnica de trioma; la técnica de hibridomas de células B humanas (véase, *v.g.*, Kozbor *et al.*, 1983. Immunol. Today 4: 72), y la técnica del hibridoma por EBV, para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase, *v.g.*, Cole *et al.*, 1985. En: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Se pueden utilizar anticuerpos monoclonales humanos en la práctica de la invención y pueden ser producidos usando hibridomas humanos (véase, *v.g.*, Cote *et al.*, 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) o transformando células B humanas con virus Epstein Barr *in vitro* (véase, *v.g.*, Cole *et al.*, 1985. En: Monoclonal Anbibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Se pueden añadir a árboles dendroméricos sintéticos cadenas laterales con aminoácidos reactivos, *v.g.*, lisina, para aumentar las propiedades inmunogénicas de los compuestos TDFRP. Además, se puede usar la técnica de CPG-dinucleótido para aumentar las propiedades inmunogénicas de los compuestos TDFRP. Las técnicas pueden ser adaptadas para la producción de anticuerpos de una sola cadena específicos para un compuesto TDFRP (véase, *v.g.*, la Patente Estadounidense Nº 4.946.778). Además, los métodos pueden ser adaptados para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (véase, *v.g.*, Huse *et al.*, 1989. Science 246: 1275-1281) para permitir una identificación rápida y efectiva de fragmentos Fab monoclonales con la deseada especificidad para un compuesto TDFRP, *v.g.*, un polipéptido o derivados, fragmentos, análogos u homólogos del mismo. Se pueden “humanizar” anticuerpos no humanos por técnicas bien conocidas en este campo. Véase, *v.g.*, la Patente Estadounidense Nº 5.225.539. Se pueden producir fragmentos de anticuerpo que contengan los idiotipos para un compuesto TDFRP por técnicas conocidas en este campo, incluyendo, aunque sin limitación: (i) un fragmento $F(ab')_2$ producido por

digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento Fab generado por reducción de los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')2; (iii) un fragmento Fab generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un compuesto reductor; y (iv) fragmentos Fv.

Adicionalmente, se describen anticuerpos recombinantes anti-compuesto TDFRP, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones tanto humanas como no humanas, que pueden ser producidos usando técnicas de ADN recombinante estándar. Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden ser producidos por técnicas de ADN recombinante conocidas en este campo, por ejemplo usando los métodos descritos en la Solicitud Internacional Nº PCT/US86/02269; la Solicitud de Patente Europea Nº 184.187; la Solicitud de Patente Europea Nº 171.496; la Solicitud de Patente Europea Nº 173.494; la Publicación Internacional PCT Nº WO 86/01533; las Patentes Estadounidenses Nº 4.816.567 y 5.225.539; la Solicitud de Patente Europea Nº 125.023; Better *et al.*, 1988. Science 240: 1041-1043; Liu *et al.*, 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443; Liu *et al.*, 1987. J. Immunol. 139: 3521-3526; Sun *et al.*, 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218; Nishimura *et al.*, 1987. Cancer Res. 47: 999-1005; Wood *et al.*, 1985. Nature 314: 446-449; Shaw *et al.*, 1988. J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559); Morrison (1985), Science 229: 1202-1207; Oi *et al.* (1986), BioTechniques 4: 214; Jones *et al.*, 1986. Nature 321: 552-525; Verhoeyan *et al.*, 1988. Science 239: 1534; y Beidler *et al.*, 1988. J. Immunol. 141: 4053-4060.

Entre los métodos para el cribado de anticuerpos que poseen la especificidad deseada para los compuestos TDFRP, se pueden incluir, aunque sin limitación, el ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) y otras técnicas inmunológicamente mediadas conocidas en este campo. En una realización específica, la selección de anticuerpos que son específicos para un dominio particular de un compuesto TDFRP es facilitada por la generación de hibridomas que se unen al fragmento de un compuesto TDFRP que posee dicho dominio. Por lo tanto, también se proporcionan aquí anticuerpos que son específicos para un dominio deseado en un compuesto TDFRP, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos.

Se pueden usar anticuerpos anti-compuestos TDFRP en métodos conocidos en la técnica relacionados con la localización y/o cuantificación de un polipéptido TDF o compuesto TDFRP *(v.g.*, para uso en la medición de los niveles del polipéptido TDF o compuesto TDFRP en muestras fisiológicas apropiadas, para uso en métodos diagnósticos, para uso en imagen del polipéptido y similares). En una realización dada, se utilizan anticuerpos para compuestos TDFRP, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos que contienen el dominio de unión derivado de anticuerpo, como compuestos farmacológicamente activos (en adelante "terapéuticos").

Se puede usar un anticuerpo anti-compuesto TDFRP (*v.g.*, anticuerpo monoclonal) para aislar un compuesto TDFRP o polipéptido TDF por técnicas estándar, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Un anticuerpo anti-compuesto TDFRP puede facilitar la purificación de polipéptido TDF natural a partir de células y de compuesto TDFRP producido recombinantemente expresado en células huésped. Además, se puede usar un anticuerpo anti-compuesto TDFRP para detectar polipéptido TDF o compuestos TDFRP (*v.g.*, en un lisado celular o sobrenadante celular) con objeto de evaluar la abundancia y el patrón de expresión del polipéptido TDF o compuesto TDFRP. Se pueden usar anticuerpos anti-compuestos TDFRP de manera diagnóstica para monitorizar los niveles de polipéptido en tejidos como parte de un procedimiento de estudio clínico, *v.g.*, para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. Se puede facilitar la detección por copulación (es decir, unión física) del anticuerpo a una substancia detectable. Como ejemplos de substancias detectables, se incluyen diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Como ejemplos de enzimas adecuadas, se incluyen la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la beta-galactosidasa o la acetilcolinesterasa; como ejemplos de complejos de grupos protésicos adecuados, se incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; como ejemplos de materiales fluorescentes adecuados, se incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; como ejemplos de materiales bioluminiscentes, se incluyen luciferasa, luciferina y aequorina, y como ejemplos de materiales radiactivos adecuados, se incluyen ^{32}P, ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S, ^{33}P, ^{14}C, ^{13}C o ^{3}H.

III. Medición de la unión o de la actividad biológica de los compuestos TDFRP

A. Agonistas y antagonistas de TDF

Los compuestos TDFRP pueden funcionar como agonistas de los receptores de TDF (es decir, miméticos) o como antagonistas de los receptores de TDF, así como del propio TDF. Un agonista del TDFR (o TDF) puede conservar substancialmente las mismas actividades biológicas, o un subconjunto de ellas, de la forma natural del polipéptido TDF. Un antagonista del compuesto TDFRP (o TDF) puede inhibir una o más de las actividades de la forma natural del polipéptido TDF, por ejemplo, por unión competitiva a un miembro secuencia abajo o secuencia arriba de una cascada de señalización celular, que incluye el polipéptido del receptor de TDF. Así, se pueden provocar efectos biológicos específicos por tratamiento con una variante de función limitada. En una realización, el tratamiento de un sujeto con una variante que tiene un subconjunto de las actividades biológicas de la forma natural del polipéptido tiene menos efectos colaterales en un sujeto en relación al tratamiento con la forma natural del polipéptido TDF. Por ejemplo, los receptores ALK-3 son más prevalentes en el tejido renal, mientras que los receptores ALK-6 son más

prevalentes en el tejido óseo; la proteína BMP-7 nativa se une a ALK-6 con una mayor afinidad, y un efecto colateral potencial de la terapia con BMP-7 en la enfermedad renal es la osteogénesis. Es un objeto de la presente invención proporcionar un compuesto TDFRP que se une preferentemente a un receptor ALK en comparación con la afinidad de unión del compuesto TDFRP por otros receptores ALK, reduciendo así las respuestas celulares no deseables, *v.g.*, efectos colaterales tales como, aunque sin limitación, respuesta celular en tejido no diana. En una realización preferida, se seleccionan los compuestos TDFRP y se diseñan para tener una mayor especificidad hacia ALK-3 y una menor afinidad por los receptores ALK-6, reduciendo así la osteogénesis no deseable en un sujeto que esté siendo tratado para trastornos renales. En otra realización, el compuesto TDFRP puede señalizar preferentemente a través de receptores ALK específicos dirigiendo los compuestos a los tejidos o poblaciones celulares deseadas.

Por consiguiente, el compuesto TDFRP desvelado como SEC. Nº ID.: 333 es usado como agonista o antagonista de los polipéptidos TDF o de los receptores de TDF, y se usa, por ejemplo, para modular la transducción de señal a través de una membrana celular de una célula que expresa, *v.g.*, receptores de TDF de Tipo I o de TDF de Tipo II. La modulación de la transducción de señal en dichas células parece producirse como resultado de una interacción de unión específica del compuesto desvelado como SEC. Nº ID.: 333 con uno o más receptores de la superficie celular, incluyendo correceptores (es decir, moléculas DRAGON y miembros de la familia relacionados). La unión de BMP a los receptores de Tipo I y Tipo II activa las Smad intracelulares, que se translocan al núcleo para regular la expresión de genes diana. Los compuestos TDFRP pueden activar funcionalmente las rutas de transducción de señal de las BMP. En respuesta a la unión de BMP a receptores, las Smad se fosforilan y se translocan al núcleo de las células. Esta activación dependiente de dosis de la señalización de BMP puede ser detectada usando anticuerpos anti-fosfo-Smad 1, -5, -8 para identificar agonistas funcionales de las BMP.

Interacción específica significa unión de los compuestos a un receptor de TDF con una constante de disociación en equilibrio mayor de 10^6 M^{-1}. Una estructura de membrana unida a la superficie celular también puede aumentar la especificidad de la interacción de unión. Las moléculas extracelulares pueden modular la especificidad y la actividad de la interacción de los compuestos con los receptores de TDF. Se pueden identificar las variantes de los compuestos TDFRP que funcionan como agonistas de TDF (es decir, miméticos) o como antagonistas de TDFRP por cribado de bibliotecas de mutantes (*v.g.*, mutantes de truncación) del compuesto TDFRP en cuanto a actividad agonista o antagonista de TDF.

Fosforilación de Smad

B. Medición de la unión de TDFRP

En una realización, un ensayo de unión de TDFRP se refiere a un formato de ensayo competitivo donde se mezclan un receptor de TDF, su ligando macromolecular y un TDFRP en condiciones adecuadas para la unión entre el receptor de TDF y el ligando y se valora la cantidad de unión entre el receptor de TDF y su ligando. Se compara la cantidad de unión con un control adecuado, que puede ser la cantidad de unión en ausencia del TDFRP, la cantidad de unión en presencia de un inhibidor conocido o ambas. Se puede valorar la cantidad de unión por cualquier método adecuado. Como métodos de ensayo de unión, se incluyen, por ejemplo, ELISA, ensayos de unión de radiorreceptores, ensayos de proximidad de escintigrafía, ensayos de unión a receptores de la superficie celular, ensayos de transferencia de energía de fluorescencia, cromatografía líquida y ensayos de filtración a través de membrana.

En un ensayo típico de unión ligando/receptor útil en la práctica de esta invención, se marcan péptidos purificados que tiene una afinidad cuantificable conocida por un receptor preseleccionado (véase, por ejemplo, Ten Dijke *et al.* (1994), Science 264: 101-103) con un resto detectable, por ejemplo, un radiomarcaje, un marcaje cromogénico o un marcaje fluorogénico. Se incuban alícuotas de receptor purificado, fragmentos de dominios de unión a receptor o células que expresan el receptor de interés sobre su superficie con péptido marcado en presencia de diversas concentraciones del péptido no marcado. Se puede medir la afinidad de unión relativa del péptido cuantificando la capacidad del candidato (péptido no marcado) para inhibir la unión de péptido marcado con el receptor. Al realizar el ensayo, se incuban concentraciones fijas del receptor y del péptido en presencia y ausencia de péptido no marcado. Se puede aumentar la sensibilidad preincubando el receptor con el análogo de TDFRP antes de añadir péptido marcado. Después de haber añadido el competidor marcado, se deja tiempo suficiente para la adecuada unión del competidor y se separan luego el péptido marcado libre y el unido el uno del otro, y se mide uno u otro. Como marcajes útiles en la práctica de los procedimientos de cribado, se incluyen marcajes radiactivos (*v.g.*, ^{125}I, ^{131}I, ^{111}In o ^{77}Br), marcajes cromogénicos, marcajes espectroscópicos (tales como los desvelados en Haughland (1994), "Handbook of Fluorescent and Research Chemicals 5 ed.", de Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.), o enzimas conjugadas que tienen altos índices de renovación, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o beta-galactosidasa, usadas en combinación con substratos quimioluminiscentes o fluorogénicos. La máxima señal de unión es la señal medida en presencia del ligando nativo, pero sin presencia de TDFRP en la mezcla de ensayo. Señal de fondo es la señal de unión medida sin el ligando nativo.

En un ensayo típico de unión compuesto/receptor útil en la práctica de esta invención, se marcan compuestos de referencia purificados que tienen una afinidad cuantificable conocida por un receptor preseleccioando con un resto detectable, por ejemplo, un radiomarcaje, un marcaje cromogénico o un marcaje fluorogénico (véase, por ejemplo,

Ten Dijke *et al.* (1994), Science 264: 101-103). Se incuban alícuotas de receptor purificado, fragmentos de dominios de unión a receptor o células que expresan el receptor de interés sobre su superficie con compuestos marcados en presencia de diversas concentraciones de los compuestos no marcados.

Típicamente, se puede medir la afinidad de unión relativa del péptido cuantificando la capacidad del candidato (péptido no marcado) para inhibir la unión de péptido marcado con el receptor. Al realizar el ensayo, se incuban concentraciones fijas del receptor y del péptido en presencia y ausencia de péptido no marcado. Se puede aumentar la sensibilidad preincubando el receptor con el compuesto TDFRP antes de añadir péptido marcado. Después de haber añadido el competidor marcado, se deja tiempo suficiente para la adecuada unión del competidor, y se separan luego el péptido marcado libre y el unido el uno del otro, y se mide uno u otro. Como marcajes útiles en la práctica del los procedimientos de cribado, se incluyen marcajes radiactivos (*v.g.*, ^{125}I, ^{131}I, ^{51}Cr, ^{111}In o ^{77}Br), marcajes cromogénicos, marcajes espectroscópicos (tales como los desvelados en Haughland (1994), "Handbook of Fluorescent and Research Chemicals 5 ed.", de Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.), o enzimas conjugadas que tienen altos índices de renovación, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o beta-galactosidasa, usadas en combinación con substratos quimioluminiscentes o fluorogénicos.

En otra realización, un ensayo de unión a TDFRP se refiere a mezclar un ligando de unión a TDFRP y un compuesto TDFRP en condiciones adecuadas para la unión entre el ligando de unión a TDFRP y el compuesto TDFRP y valorar el grado de unión entre el ligando de unión a TDFRP y el compuesto TDFRP, por ejemplo, midiendo la constante de disociación y derivando la constante de unión en el equilibrio por análisis de Scatchard o de regresión no lineal. Se compara la cantidad de unión con un control adecuado o con la cantidad de unión en presencia de un inhibidor conocido, o ambas. Se puede valorar la cantidad de unión por cualquier método adecuado. Como métodos de ensayo de unión, se incluyen, por ejemplo, ELISA, ensayos de unión a radiorreceptores, ensayos de proximidad de escintigrafía, ensayos de unión a receptores de la superficie celular, ensayos de transferencia de energía de fluorescencia, cromatografía líquida, ensayos de filtración a través de membrana y similares.

Son ensayos biofísicos para la medición directa de la unión de TDFRP a ligandos de unión a TDFRP, por ejemplo, la resonancia magnética nuclear, la florescencia, la polarización de la fluorescencia y la resonancia de plasmones superficiales (chips BIACORE). Como ligandos de unión a TDFRP, se incluyen, aunque sin limitación, receptor de TDF, anticuerpo anti-TDFRP, lípidos, moléculas pequeñas y ácidos nucleicos, *v.g.*, ADN y ARN. Se determina la unión específica por ensayos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayos de unión a radioligandos, ELISA, FRET, inmunoprecipitación, SPR, RMN (RMN 2D) y espectroscopia de masas. También se proporcionan cocristales de los compuestos TDFRP y ligandos de unión a TDFRP, por ejemplo, aunque sin limitación, receptor de TDF, anticuerpo anti-TDFRP, lípidos, moléculas pequeñas y ácidos nucleicos, *v.g.*, ADN y ARN, descritos como un método de determinación de interacciones moleculares. Las condiciones adecuadas para la unión entre el ligando de TDFRP y un compuesto TDFRP dependerán del compuesto y su ligando y pueden ser fácilmente determinadas por alguien con conocimientos ordinarios en la técnica. Además, los métodos desvelados en las referencias resumidas en las Tablas 2 y 3 son útiles para la medición de la unión de ligandos a los receptores ALK. Estos métodos son útiles en la identificación de compuestos TDFRP selectivos para los receptores ALK de la presente invención.

C. Medición de la actividad biológica de TDFRP

Se puede caracterizar la actividad biológica, a saber, las propiedades agonistas o antagonistas de los polipéptidos TDF o de los compuestos TDFRP, usando cualquier ensayo convencional *in vivo* e *in vitro* que haya sido desarrollado para medir la actividad biológica del compuesto TDFRP, de un polipéptido TDF o de un componente de la ruta de señalización de TDF.

Los miembros de la superfamilia TGF-b/BMP se asocian a una serie de actividades celulares implicadas en las respuestas a la lesión y la regeneración. Los compuestos TDFRP pueden ser usados como agonistas de BMP o antagonistas de moléculas de TGF-b para mediar en actividades que pueden prevenir, reparar o aliviar respuestas nocivas en células, tejidos u órganos. Las actividades clave implicadas en la mediación de estos efectos serían las propiedades antiinflamatorias, antiapoptóticas y antifibróticas. Se pueden usar varios modelos *in vitro* para inflamación para valorar las respuestas de citoquinas, quimioquinas y adhesión celular, que son marcadores bien documentados de inflamación. La lesión celular inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), la cisplatina, el lipopolisacárido (LPS) u otros agentes da lugar a la producción de moléculas proinflamatorias (por ejemplo, IL-1, IL-6, IL-8, NF-kappaB) y moléculas de adhesión (por ejemplo, molécula 1 de adhesión intercelular o ICAM-1). Además, estos agentes inducen quimioquinas (IL-6, IL-8, proteína 1 quimioatrayente de monocitos o MCP-1 y RANTES), que hacen que las células inmunes se infiltren en los tejidos y como resultado se produzcan daños en los órganos.

La apoptosis o muerte celular programada se inicia o bien a través de una ruta mitocondrial, en respuesta a factores de estrés, o bien a través de una ruta mediada por receptores, desencadenada por la unión de ligandos, tales como TNF-α. Múltiples factores contribuyen al complejo proceso apoptótico, incluyendo la infiltración de neutrófilos y otras células inflamatorias que activan una clase de enzimas conocidas como caspasas. Otros marcadores útiles de la apoptosis son Bax y el anticoagulante vascular humano, Anexina V, que se une a una proteína que se transloca

desde la membrana plasmática interna hasta la externa en las células apoptóticas.

En un experimento típico, se puede valorar la actividad antiapoptótica de los compuestos TDFRP usando modelos *in vitro* de apoptosis en células cultivadas (por ejemplo, células de riñón humano (HK-2) y células de músculo cardíaco o cardiomiocitos). En las células de los túbulos proximales del riñón, se produce un significativo aumento en los niveles de Bax en respuesta a la lesión celular causada por cisplatina u otros agentes. En un experimento típico, se pueden demostrar las propiedades antiapoptóticas de los compuestos TDFRP por la inhibición de la producción de Bax inducida por TDF-α o cisplatina. Además, el tratamiento con cisplatina da lugar a la expresión de Anexina V en células HK-2.

Los cardiomiocitos raramente proliferan en los músculos cardíacos adultos y la pérdida de células musculares cardíacas puede conducir a una pérdida permanente de función cardíaca. La apoptosis miocárdica, causada por lesión de los cardiomiocitos, contribuye al, o agrave el, desarrollo de disfunción miocárdica en diversas enfermedades cardíacas. El agente quimioterapéutico doxorrubicina causa insuficiencia cardíaca, reducción en el número de células musculares cardíacas funcionales, activación de la caspasa 3 .. y apoptosis. En un experimento típico, se puede demostrar la actividad antiapoptótica de los compuestos TDFRP mostrando la inhibición de la expresión de Bax y caspasa-3 que fue inducida por doxorrubicina, LPS o isquemia, así como mostrando un aumento en los niveles de Akt fosforilado, un indicador sensible de la salud de los cardiomiocitos.

En un experimento típico, se pueden demostrar las propiedades antifibróticas de los compuestos TDFRP usando ensayos *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, se puede determinar la reversión de la fibrosis tubular inducida por TGF-β en cultivos de células del epitelio tubular del riñón de ratón usando valoraciones de la morfología celular e inmunotinción de E-cadherina (un marcador de células epiteliales) y FSP-1 (marcador de proteínas específicas de los fibroblastos). Además, se produce deposición de materiales de la matriz extracelular durante el desarrollo de fibrosis en órganos tales como los riñones. En base a los análisis histopatológicos, los compuestos TDFRP pueden disminuir la fibrosis en cuatro modelos animales *in vivo* de lesión renal (modelo de lesión por cisplatina en rata, modelo de obstrucción ureteral unilateral (OUU), modelo de nefritis por suero nefrotóxico (NNT) y modelo de estreptozotocina (STZ) de nefropatía diabética).

La lesión renal crónica (IRC o insuficiencia renal crónica) es la pérdida gradual e irreversible en la capacidad de los riñones para excretar desechos, concentrar la orina y conservar electrolitos, que normalmente progresa a enfermedad renal en fase terminal (ERFT). Las dos causas más comunes de lesión renal son la diabetes y la hipertensión. La nefropatía diabética es un síndrome clínico caracterizado por albuminuria, alteración del índice de filtración glomerular ("IFG") y mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. En un experimento típico, se puede ver que los compuestos TDFRP ralentizan la progresión de la enfermedad renal, reparan la fibrosis renal y restauran la estructura renal usando tres modelos animales diferentes de IRC, incluyendo: obstrucción ureteral unilateral (OUU), un modelo de lesión por obstrucción física; nefritis por suero nefrotóxico (NNT), un modelo de lesión por nefropatía inmune; y nefropatía diabética inducida por estreptozotocina (STZ), un modelo metabólico de diabetes. Cada uno de estos modelos induce lesión renal por diferentes mecanismos, pero comparten actividades celulares secuencia abajo que culminan en lesión y disfunción orgánica.

La OUU crónica es un modelo bien aceptado de fibrosis intersticial de lesión renal causada por la obstrucción física del uréter. Después de la obstrucción, se produce una acumulación de células inmunes y materiales de la matriz extracelular en el riñón que da lugar a inflamación, fibrosis intersticial y atrofia tubular, que pueden ser aliviadas en un experimento típico utilizando la administración de compuestos TDFRP.

En un experimento típico, los compuestos TDFRP pueden limitar el daño renal inducido por suero nefrotóxico ("SNT") en el modelo de lesión renal crónica por NNT. La mayoría de las formas de glomerulonefritis son de origen inmunológico y el modelo NNT representa un ejemplo de enfermedad glomerular inducida por anticuerpos. En un experimento típico, los compuestos TDFRP pueden disminuir la cantidad de atrofia tubular renal, de deposición de matriz/fibrosis y de glomeruloesclerosis en un modelo de enfermedad renal inmunomediada.

La diabetes de Tipo 1 inducida por STZ es un modelo experimental ampliamente utilizado para la nefropatía diabética. Los ratones a los que se da STZ *iv* desarrollan una pérdida progresiva de células beta pancreáticas que culmina en diabetes y daño renal en un período de tiempo de seis meses. En un experimento típico, los compuestos TDFRP pueden aliviar la fibrosis, reducir la proteinuria y proteger a los riñones del daño provocado por STZ.

La lesión miocárdica (LM) surge cuando una disminución en el flujo de sangre o una obstrucción en una de las arterias principales que alimentan el músculo cardíaco evita que el oxígeno y los nutrientes alcancen el músculo cardíaco. La primera fase de este proceso es un estado isquémico, donde una disminución en el flujo de sangre restringe el suministro de oxígeno por debajo de la demanda requerida por el músculo cardíaco. Las células miocárdicas quedan privadas del oxígeno y de los nutrientes transportados por la sangre. Esta situación sólo puede ser mantenida durante períodos muy cortos de tiempo antes de que las células queden irreversiblemente lesionadas y mueran. La muerte de estas células constituye un infarto y las células dañadas liberan substancias químicas que incitan la aparición de reacciones inflamatorias.

La isquemia miocárdica (IM) conduce a apoptosis, inflamación y fibrosis. La TPA, administrada poco después de un infarto de miocardio, limita el daño (reabriendo el vaso sanguíneo), pero no tiene ningún efecto sobre los procesos celulares de apoptosis, inflamación y fibrosis. Los tejidos del corazón expresan los mismos receptores de BMP-7 que los tejidos del riñón, lo que sugiere que BMP-7, con un papel documentado como mecanismo protector endógeno, y los compuestos TDFRP reducirán el infarto en un experimento típico con modelos de isquemia miocárdica.

En un experimento típico, se pueden usar los compuestos TDFRP para demostrar las actividades antiinflamatorias y antiapoptóticas en cardiomiocitos cultivados. En un estudio típico de modelo animal, se pueden usar los compuestos TDFRP para reducir el tamaño del infarto, mantener la función endotelial de las arterias coronarias e inhibir la adherencia de los neutrófilos al endotelio vascular (lesión por reperfusión reducida) en modelos en rata de IM. El modelo en rata de IM (llamado modelo de oclusión DAI) conlleva la ligadura transitoria de la arteria descendente anterior izquierda para crear isquemia. Al retirar la ligadura, el flujo de sangre hacia el corazón inicia la lesión por reperfusión, que puede ser monitorizada perfundiendo el área con colorante y valorando el grado de infarto. En un experimento DAI típico, se pueden administrar los compuestos TDFRP antes y después de la isquemia inducida por ligadura del ventrículo cardíaco. Se puede determinar la eficacia por morfología y valorando los niveles de CK-MB entre las regiones con infarto y sin infarto del ventrículo después de la reperfusión.

Ensayos de unión a receptores de radioligandos para ALK-3, ALK-6 y BMPR-2:

Los ensayos se basan en la competición entre TDF-1 marcado con ^{125}I (BMP-7 o OP-1 u otras BMP) y los compuestos TDFRP candidatos o TDF-1 no marcado por la unión a los receptores respectivos (ALK-3, ALK-6 o BMPR-2 u otros receptores o correceptores de BMP). Resumiendo, el procedimiento conlleva la inmovilización de receptor en placas Removawell de 96 pocillos, el bloqueo de los pocillos con BSA al 3% en PBS y posteriormente el lavado de los pocillos. Se añaden entonces concentraciones crecientes de TDF-1 no marcado o compuestos TDFRP o control (TDF-1 no marcado) preparados en tampón de unión. Se incuba la placa durante 1 hora a temperatura ambiente y se añade después una cantidad fijada de TDF-1 marcado con ^{125}I (de 250,000 a 350,000 cpm) a los pocillos y se vuelve a incubar en frío (4°C) durante 20 horas. Se aspiran los contenidos de los pocillos y se lavan los pocillos cuatro veces con un tampón de lavado, y se cuenta el TDF-1 marcado con ^{125}I unido a receptores en un autocontador gamma.

Usando este procedimiento, se valora la unión de los compuestos TDFRP a receptores ALK selectos. Por consiguiente, se pueden identificar compuestos TDFRP que se unen preferentemente a receptores ALK selectos. Por ejemplo, compuestos TDFRP que se unen preferentemente al receptor ALK-3 en comparación con la unión a otros receptores ALK, *v.g.*, ALK-6 (FIG. 1, 15).

Ensayo de fosfatasa alcalina basado en células de osteosarcoma de rata (ROS):

Las interacciones de las BMP con los receptores de Tipo I y de Tipo II puede inducir actividad fosfatasa alcalina, un marcador para la actividad de los osteoblastos, en células ROS. Se usó un procedimiento de ensayo como el descrito en Maliakal, J.C., Asahina, I., Hauschka, P.V. y Sampath, T.K. (1994), Growth factors 11, 227-234, para determinar las actividades biológicas de los compuestos TDFRP. En un experimento típico, se plaquean células de osteosarcoma de rata (17/2,8) en placas de 96 pocillos (3,0 x 10^4 células/pocillo) y se incuban durante la noche a 37 C en una incubadora con un 5-6% de CO_2. Al día siguiente, se tratan las células sanas y confluentes con concentraciones crecientes de patrón de BMP-7 (1-10,000 ng/ml) como control positivo o de compuestos TDFRP (0,02-200 uM) preparados en medio que contiene FBS al 1% y se incuban durante 2 días a 37 C en una incubadora con un 5-6% de CO_2. Se determina el contenido celular de actividad fosfatasa alcalina por el método de Reddi y Huggins (Reddi, A.H. y Huggins, C.B (1972), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1601-1605). Se realizan las estimaciones enzimáticas en placas de 96 pocillos. Después de eliminar el medio de cultivo, se lavan las células con PBS precalentado (150 ul) y se incuban en 100 ul de Tritón X-100 al 1% precalentado durante 30 minutos a 37 C. Se centrifugan las placas durante 10 minutos a velocidad total y se estudian las muestras recuperadas (15 ul) en cuanto a actividad enzimática añadiendo 90 ul de fosfato de p-nitrofenilo (Sigma) como substrato en tampón glicina-NaOH 0,05 M, pH 9,3, e incubando durante 20 minutos a 37 C. Se detiene la reacción añadiendo 75 ul de NaOH 0,2 N/pocillo y se mide la absorbancia a 405/490 nm en un lector de placas Dynatech MR 700. Se expresan los resultados como actividades relativas en comparación con un patrón de BMP-7. Los compuestos TDFRP (SEC. números de ID. 15-21, 23-33, 41-43, 45, 65, 130, 208-219, 221) no indujeron actividad fosfatasa alcalina en los ensayos con células ROS.

Ensayo de implante subcutáneo para la inducción de hueso:

BMP-7 induce la formación de hueso en la rata cuando se implanta subcutáneamente mediante un procedimiento descrito en Sampath, T.K., Maliakal, J.C., Hauschka, P.V. *et al.* (1992) J. Bio. Chem. 267, 20352-20362. Este ensayo es utilizado para valorar la capacidad de inducción ósea de los compuestos TDFRP. Se añaden 25 mg de matriz ósea desmineralizada a BMP-7 (serie de concentración) en 150 ul de acetonitrilo al 50% y TFA al 0,15%, se mezcla y luego se liofiliza como control positivo para la actividad de inducción ósea. Se usa la matriz ósea desmineralizada sola como control negativo. Se copulan covalentemente los compuestos TDFRP a hidrogel de alginato usando una reacción de carbodiimida. Se implantan 10 mg de compuesto copulado con alginato en el músculo de cada rata. Se

retiran los implantes el día 14 para hacer la evaluación. Se fijan los implantes en solución de Bouin, se embeben en medio plástico JB4, se cortan en secciones de 1 um y se tiñen con azul de toluidina para el examen histológico. Los compuestos TDFRP seleccionados no exhiben actividades de inducción ósea en este ensayo.

Cultivo de células de riñón 2 humanas (HK-2) y determinación de la producción de citoquinas y de moléculas de adhesión:

Las células epiteliales tubulares proximales (PTEC) residentes desempeñan un papel activo en el proceso inflamatorio mediante la producción de mediadores inflamatorios, tales como interleuquina-1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α). La estimulación de PTEC *in vitro* con estas citoquinas ha mostrado dar lugar a una mayor producción de citoquinas y quimioquinas, incluyendo interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8), MCP-1 y RANTES, y de moléculas de adhesión, tales como ICAM-1, que contribuyen además al proceso inflamatorio por infiltración intersticial de células inflamatorias y en último lugar inducen lesión tubular.

Se han estudiado varios agentes antiinflamatorios en el sistema PTEC para evaluar si éstos son efectivos para suprimir la producción de citoquinas, quimioquinas e ICAM-1 por PTEC. En el adulto, la expresión de BMP-7 y sus receptores son responsables de mantener el fenotipo diferenciado de las células tubulares a través de señalización autocrina o paracrina. En PTEC humanas primarias, BMP-7 puede reducir los aumentos estimulados por TNF-α en el ARNm de los genes proinflamatorios, interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-1β (IL-1β), interleuquina-8, MCP-1 e ICAM-1.

La lesión de PTEC por TNF-α y cisplatina (un agente antineoplásico) da lugar a la inducción de apoptosis, como muestran el daño en el ADN, la disfunción mitocondrial, la inhibición de BAX y la activación de la caspasa. BMP-7 protege la función PTEC/renal por inhibición de la apoptosis inducida por TNF-α y cisplatina en estas células. Se cultivaron las células HK-2 (Human Kidney-2) derivadas de PTEC inmortalizadas (número ATCC CRL-2190) en medio de queratinocitos libre de suero (GIBCO número 17005-042) suplementado con factor de crecimiento epidérmico (EGF: 5 ng/ml) y extracto de pituitaria bovina (40 ug/ml) durante 48 horas como se ha descrito previamente (Ryan *et al.* (1994), Kidney International 45: 48-57). Se transfirieron las células a placas de 24 pocillos a una densidad de $3x10^5$ células por pocillo. Después de 24 horas, se incubaron las células con medio fresco que contenía TNF-alfa (5 ng/ml) durante 20 horas. Los controles recibieron medio solo. Se lavaron entonces las células dos veces con medio de cultivo fresco y se volvieron a incubar con medio de cultivo solo (pocillos de control de medio y de control de TNF) o TDF-1 a tres concentraciones diferentes (40, 200 ó 1,000 ng/ml) o compuestos TDFRP a tres concentraciones diferentes (4, 20 ó 100 uM) durante sesenta horas. Durante la incubación, las células fueron mantenidas en una atmósfera húmeda con un 5% CO_2 a 37°C. Al final de la incubación, se retiraron los medios y se guardaron congelados hasta su estudio. Se midieron las concentraciones de IL-6, IL-8 y sICAM-1 en los sobrenadantes de cultivo por ELISA específico (FIG. 14).

ELISA para IL-6:

Se diluye el anticuerpo de captura a la concentración de trabajo en PBS, pH 7,4 sin proteína de soporte. Se añaden 61 ul de anticuerpo de stock (360 ug/ml) a 10,939 ml de PBS y se agita suavemente en vórtex. Se reviste una microplaca de 96 pocillos (Immulon 4 HBX) con 100 ul por pocillo del anticuerpo de captura diluido. Se sella la placa y se incuba durante la noche en frío (4°C). (PBS: Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4, filtrado a través de 0,2 um). Se vacían los pocillos y se lavan tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo. (Tampón de lavado: PBS, pH 7,4 que contiene un 0,05% de Tween-20).

Se prepara tampón de bloqueo (35 ml por placa) añadiendo 0,35 gramos de BSA y 1,75 gramos de sacarosa a 35 ml de PBS, pH 7,4, y se mezcla suavemente. Se añaden 300 ul de tampón de bloqueo a cada pocillo y se incuba durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente. Se vacían los pocillos y se lavan tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo.

Se prepara una curva patrón de 8 puntos usando diluciones seriadas de razón 2 en diluyente de reactivo. Se diluye IL-6 recombinante, 70 ng/ml, hasta una concentración inicial de 2.400 ng/ml en diluyente de reactivo y se vuelve a diluir después hasta un rango de trabajo, 1.200, 600, 300, 150, 75, 37,5, 18,75 y 9,375 ng/ml, usando diluyente de reactivo. (Se prepara el diluyente de reactivo con 0,4 gramos de BSA en 40 ml de PBS, pH 7,4, y se agita suavemente en vórtex). Se diluyen 24 ul de cada muestra (de cultivos de células HK-2) con 376 ul de diluyente de reactivo. Se añaden 100 ul de patrón o de muestra por pocillo, se sella y se incuba durante la noche en frío (4°C). Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo. Se añaden 61 ul de anticuerpo de detección stock (0,1-10 ug/ml) a 10,939 ml en diluyente de reactivo y se agita en vórtex. Se añaden 100 ul de dilución de trabajo de anticuerpo de detección a cada pocillo. Se sella la placa y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo. Se prepara estreptavidina-HRP, 11 ml por placa, en diluyente de reactivo. Se añaden 55 ul de solución stock (# 890803, R&D Systems) a 10,945 ml de diluyente de reactivo y se agita suavemente en vórtex. Se añaden 100 ul de dilución de trabajo de estreptavidina-HRP a cada pocillo. Se sella la placa y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo. Se

mezclan 5,5 ml de reactivo de color A (H_2O_2) con 5,5 ml de reactivo de color B (tetrametilbenzidina) (#DY999, R&D Systems). Se añaden 100 ul de solución de substrato a cada pocillo. Se cubre la placa y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 5,0 ul de solución de parada (H_2SO_4 2 N) a cada pocillo. Se determina inmediatamente la densidad óptica de cada pocillo usando un lector de microplacas (Dynex Revelation 4,22) fijado a 450 nm y con una corrección de longitud de onda a 550 nm.

ELISA para IL-8:

El protocolo del ELISA para IL-8 es similar a los métodos para IL-6 descritos anteriormente, con las siguientes modificaciones: no se incluye sacarosa en el tampón de bloqueo, se usan muestras de 200 ul y el rango de trabajo es de 4.000 pg/ml a 31,25 pg/ml.

ELISA para ICAM- 1:

Se diluye el anticuerpo de captura hasta la concentración de trabajo en PBS, pH 7,4, sin proteína de soporte. Se añaden 61 ul de anticuerpo stock (720 ug/ml) a 10,939 ml de PBS y se agita en vórtex. Se reviste una microplaca de 96 pocillos (Immulon 4 HBX) con 100 ul por pocillo del anticuerpo de captura diluido. Se sella la placa y se incuba durante la noche en frío (4°C). (PBS: Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4, filtrado a través de 0,2 um). Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo (tampón de lavado: PBS, pH 7,4, que contiene un 0,05% de Tween-20). Se prepara tampón de bloqueo (35 ml por placa) añadiendo 0,35 gramos de BSA y 1,75 gramos de sacarosa a 35 ml de PBS, pH 7,4. Se añaden 300 ul de tampón de bloqueo a cada pocillo y se incuba durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo. Se prepara una curva patrón de 8 puntos usando diluciones seriadas de razón 2 en diluyente de reactivo. Se usa sICAM-1 recombinante, 55 ng/ml, como patrón de stock y se diluye hasta una concentración inicial de 2.000 ng/ml en diluyente de reactivo y hasta un rango de trabajo de: 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 y 7,813 ng/ml usando diluyente de reactivo. Se diluyen 160 ul de cada medio de muestra (de cultivos de células HK-2) con 240 ul de diluyente de reactivo. Se añaden 100 ul de patrón o de muestra por pocillo, se sella la placa y se incuba durante la noche en frío (4°C). Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo. Se añaden 61 ul de anticuerpo de detección stock (18 ug/ml) a 10,939 ml en diluyente de reactivo y se agita suavemente en vórtex. Se añaden 100 ul de dilución de trabajo de anticuerpo de detección a cada pocillo. Se sella la placa y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo. Se añaden 55 ul de solución stock de estreptavidina-HRP (# 890803, R&D Systems) a 10,945 ml de diluyente de reactivo y se agita suavemente en vórtex. Se añaden 100 ul de dilución de trabajo de estreptavidina-HRP a cada pocillo. Se sella la placa y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo. Se mezclan 5,5 ml de substrato de reactivo de color A (H_2O_2) con 5,5 ml de reactivo de color B (tetrametilbenzidina) (#DY999, R&D Systems). Se añaden 100 ul de solución de substrato a cada pocillo. Se cubre la placa y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 50 ul de solución de parada (H_2SO_4 2 N) a cada pocillo. Se determina la densidad óptica de cada pocillo inmediatamente usando un lector de microplacas (Dynex Revelation 4,22) fijado a 450 nm y con una corrección de longitud de onda a 550 nm.

Detección de apoptosis utilizando inmunotinción con anexina V:

Se cuantifican la apoptosis y la viabilidad celular usando tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio de células HK-2 después de un tratamiento con cisplatina. Se cultivan células HK-2 derivadas de PTEC inmortalizadas (número ATCC CRL-2190) en medio de queratinocitos libre de suero (GIBCO número 17005-042) suplementado con EGF y BPE durante 48 horas (Ryan *et al.* 1994, Kidney Int 45: 48-57). Se aspira el medio y se lavan las células con PBS y se incuban en obscuridad durante 15 min. a temperatura ambiente con 10 μl de agente de unión al medio y 1,25 μl de anexina V conjugada a FITC. Se añade yoduro de propidio (10 μl) y se analizan las muestras inmediatamente. Se realiza la cuantificación de las señales de anexina V-FITC y yoduro de propidio por microscopía de fluorescencia (Axiovert 135; Carl Zeiss). Se observan las imágenes de contraste de fase usando luz transmitida. Las células apoptóticas muestra tinción citoplásmica y las células viables permanecen sin teñir (FIG. 17).

ELISA para Bax:

Se diluye el anticuerpo de captura hasta una concentración de trabajo (se añaden 200 ul de PBS a un stock de 360 ug/ml) en PBS, pH 7,4, sin proteína de soporte. Se añaden 61,2 ul de anticuerpo stock (360 ug/ml) a 10,939 ml de PBS y se agita suavemente en vórtex. Se reviste una microplaca de 96 pocillos (Immulon 4 HBX) con 100 ul por pocillo del anticuerpo de captura diluido. Se sella la placa y se incuba durante la noche en frío (4°C). (PBS: Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4, filtrado a través de 0,2 um). Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 300 ul de tampón de lavado por pocillo. (Tampón de lavado: PBS, pH 7,4, que contiene un 0,05% de Tween-20). Se añade tampón de bloqueo (1% de BSA, 5% de sacarosa en PBS, pH 7,2-7,4) a 0,35 gramos de BSA y 1,75 gramos de sacarosa en 35 ml de PBS, pH 7,4, y se mezclan. Se añaden 300 ul de tampón de bloqueo a cada pocillo y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 300 ul de tampón de lavado por pocillo. Se genera una curva patrón de 8 puntos usando diluciones

seriadas de razón 2 en diluyente (EDTA 1 mM, 0,005% de Tween 20, 0,5% de Tritón X-100 en PBS, pH 7,2-7,4). Se diluye Bax recombinante (270 ng/ml) hasta una concentración inicial de 20 ng/ml en diluyente y hasta un rango de trabajo: 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 y 0,1562 ng/ml usando diluyente. Se añaden 100 ul de patrón o de muestra por pocillo, se sella y se incuba durante la noche a 4°C. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 300 ul de tampón de lavado por pocillo. Se añaden 100 ul de dilución de trabajo de anticuerpo de detección (11 ml por placa) a cada pocillo, se sella y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 300 ul de tampón de lavado por pocillo. Se añaden 55 ul de solución stock de estreptavidina-HRP (# 890803, R&D Systems) a 10,945 ml de diluyente y se agita suavemente en vórtex. Se añaden 100 ul de dilución de trabajo de estreptavidina-HRP a cada pocillo, se sella y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 300 ul de tampón de lavado por pocillo. Se prepara una solución fresca de substrato (11 ml por placa). Se mezclan 5,5 ml de reactivo de color A (H_2O_2) con 5,5 ml de reactivo de color B (tetrametilbenzidina) (#DY999, R&D Systems). Se añaden 100 ul de solución de substrato a cada pocillo, se cubre y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 50 ul de solución de parada (H_2SO_4 2 N) a cada pocillo. Se determina la densidad óptica de cada pocillo inmediatamente usando un lector de microplacas fijado a 450 nm y con una corrección de longitud de onda a 544 nm (FIG. 14).

Cultivo celular de cardiomiocitos y determinación de las actividades de citoquinas y apoptosis:

Se cultivan cardiomiocitos primarios de rata neonatal (Cell Applications) en medio de cultivo para cardiomiocitos con un 10% de suplemento de crecimiento (Cell Applications) durante 24 horas a 37°C y con un 5% de CO_2. Se priva a las células del suplemento de crecimiento durante 12 horas, seguido de tratamiento con doxorrubicina (333 nM) o con lipopolisacárido (LPS) (100 ng/ml) durante 24 h o 12 h, respectivamente. Los controles reciben medio solo. Se incuban las células con medio de cultivo solo o con BMP-7 (143 nM) o con compuestos TDFRP a 4 diferentes concentraciones (4, 20, 100, 500 uM) durante 24-60 h. Se mantiene a las células en una atmósfera húmeda con un 5% de CO_2 a 37°C. Al final de la incubación, se retira el medio condicionado y se estudia la fosforilación de Akt en la Serina 473 o la actividad de la enzima caspasa-3 según los protocolos del fabricante (Cell Signaling Technology o Calbiochem, respectivamente). Se mide la concentración de IL-6 de rata en los sobrenadantes del cultivo por ELISA específicos como se ha descrito anteriormente (FIG. 16).

Protocolo para detectar la fosforilación de Akt en S473:

Se estudia la actividad antiapoptótica de los compuestos TDFRP usando la creciente fosforilación de Akt como marcador de la supervivencia de las células cardiomiocíticas después de un tratamiento con doxorrubicina. Se cultivan cardiomiocitos primarios de rata neonatal (Cell Applications) en medio con un 10% de suplemento de crecimiento (Cell Applications) durante 24 horas a 37°C y con un 5% de CO_2. Se priva a las células de suplemento de crecimiento durante 12 horas, seguido de tratamiento con doxorrubicina (333 nM) durante 24 h. Los controles reciben medio solo. Se incuban las células con medio de cultivo solo, BMP-7 (143 nM) o compuestos TDFRP a 4 diferentes concentraciones (4, 20, 100, 500 uM) durante 60 h para detectar la fosforilación de Akt en la Serina 473 (Cell Signaling Technology). Se preparan lisados celulares en tampón de lisis del fabricante (10X) diluido 1:10 en agua Milli-Q y se añade PMSF hasta una concentración final de 1 mM. Se usan 200 ul de tampón de lisis helado por pocillo de una placa de 12 pocillos. Se incuban las células durante 10 min. a 4°C y se obtienen lisados celulares retirando el sobrenadante de los pocillos y aclarando por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 min. a 4°C. Se añaden 100 ul de cada dilución a las tiras de micropocillos (Cell Signaling Technology), se sella y se incuba durante la noche a 4°C. Se lavan los pocillos cuatro veces con 300 ul de tampón de lavado 1x. Se añaden 100 ul de anticuerpo de detección por pocillo y se incuba durante 1 h a 37°C. Se añaden 100 ul de anticuerpo secundario unido a HRP por pocillo y se incuba durante 30 min. a 37°C. Se añaden 100 ul de substrato TMB por pocillo y se incuba durante 30 min. a temperatura ambiente en obscuridad. Se detiene la reacción y se lee la absorbancia a 450 nM con un lector de microplacas (FIG. 14).

Protocolo para detectar la actividad caspasa-3:

Se determina la actividad antiapoptótica de los compuestos TDFRP examinando la capacidad para regular a menos la actividad caspasa-3 inducida por tratamiento con doxorrubicina o LPS de cardiomiocitos. La actividad caspasa-3 sirve como marcador de apoptosis. Se preparan lisados celulares en tampón de lisis del fabricante. Se usan 200 ul de tampón de lisis helado por pocillo de una placa de 12 pocillos. Se incuban las células durante 10 min a 4°C y se obtienen lisados retirando el sobrenadante de los pocillos y centrifugando a 10.000 rpm durante 10 min. a 4°C. Se añaden 50 ul de tampón de ensayo (Calbiochem) a cada pocillo y se añaden 40 ul de lisado y se mezclan. Se añaden 10 ul de substrato de caspasa-3 por pocillo y se lee la absorbancia a 405 nM en un lector de placas de microtitulación (FIG. 14).

Fosforilación de Smad:

La fosforilación y la translocación nuclear de Smad se producen tras la activación de los receptores de Tipo I y Tipo II y la posterior transducción de señal a dianas intracelulares de Smad. Se estudian la fosforilación y la translocación nuclear de R-Smad en células HK-2, endoteliales vasculares, de próstata humana u otras por los compuestos TDFRP por métodos de microscopía inmunofluorescente, usando anticuerpos anti-fosfo-Smad 1/5 según el

procedimiento de H Aoki, M Fujii, T Imamura, K Yagi, K Takehara, M Kato y K Miyazono. J. of Cell Sci. 114, 1483-1489, 2001) y por análisis Western blot (FIG. 2, 3,18, 2X).

Por ejemplo, se incuban células de túbulos proximales humanas HK-2 en medio de cultivo solo o expuesto a compuestos TDFRP o control durante una hora y diez minutos a 37 grados C. BMP-7 servía como control positivo en el ensayo. Se enjuaga cada pocillo con 1 ml de medio precalentado. Se añade 1 ml por pocillo de mezcla fría de acetona/metanol (1:1) y se incuba durante 2 minutos a temperatura ambiente para fijar las células. Se lavan los pocillos con 1 ml de PBS frío y se bloquean con 1 ml de tampón de bloqueo (3% de BSA, 1% de suero de cabra en PBS) durante 7 minutos. Se aspiran los pocillos sin alterar las células y se añaden 500 ul/pocillo de anticuerpo primario (anti-fosfo-Smad 1) a una concentración de 0,056 ug/ml en un 3% de BSA en PBS (sin suero de cabra). Se incuban las células durante la noche a 4 grados C. Se diluye anticuerpo secundario marcado con FITC 1:10 en suero de cabra al 1,5% en PBS y se añaden 500 ul/pocillo de anticuerpo secundario y se incuba a temperatura ambiente durante 40 minutos en obscuridad. Se lavan los pocillos dos veces, cada una de ellas con 1 ml de PBS, y se observan las células con un microscopio fluorescente.

Se puede examinar la detección de la fosforilación de Smad por análisis Western, por ejemplo en LNCaP (células de cáncer de próstata) o EC (células endoteliales vasculares) en medio de cultivo tras exposición a concentraciones variables de compuestos TDFRP o control. BMP-7 sirve como control positivo. Se lisan las células en tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, NaCl 150 mM, 1% de NP-40, 0,5% de desoxicolato de sodio, 0,1% de SDS) que contiene PMSF 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y 10 ug/ml de cóctel inhibidor de proteinasas. Se incuban los lisados sobre hielo durante 15 minutos, se centrifugan y se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio. Se usan de 50 a 100 ug para análisis por SDS-PAGE. Se electrotransfieren las proteínas resueltas a una membrana de PVDF. Se bloquea el blot incubando en leche deshidratada desnatada al 3% preparada en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación lenta constante. Se incuba el blot con 1-2 ug/ml de anticuerpo primario (anti-fosfo-Smad 1 de conejo) preparado en PBS-leche durante la noche con agitación a 4 grados C, se lava dos veces con PBS y se incuba con anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo conjugada con HRP, dilución 1:3000) a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación. Después de lavar en PBS-0,05% de Tween 20 durante 5 minutos y de enjuagar, se detecta la fosforilación de Smad mediante una reacción de HRP según las instrucciones del fabricante (FIG. 2, 3, 18, 2X).

Ensayos *in vitro* para valorar la supresión tumoral:

El cáncer de próstata es uno de los cánceres más comunes en hombres. Varias líneas de evidencia han sugerido que la proteína morfogenética ósea (BMP) inhibe la proliferación de células de cáncer de próstata humanas sensibles a andrógenos (LNCaP) e insensibles a andrógenos (PC-3, DU-145). Además, se ha visto que las señales BMP inhiben el crecimiento y la proliferación de células de tumores de próstata humanas por regulación a más del inhibidor de kinasa dependiente de ciclina (CDKI) p21 (CIP1/WAF1) y reducción de la actividad de Cdk2, lo que da lugar a hipofosforilación de proteínas Rb. Los compuestos TDFRP han sido cribados en bioensayos *in vitro* de cáncer de próstata y de vejiga para valorar la actividad inhibitoria del crecimiento de los compuestos (FIG. 3). Se usa la incorporación de ^{3}H-timidina como marcador para la actividad de proliferación celular en líneas celulares de cáncer de próstata y de vejiga humanas. La cisplatina inhibe la incorporación de ^{3}H-timidina, lo que indica una actividad supresora del crecimiento tumoral de la cisplatina en células cancerosas de próstata y de vejiga humanas. Se estudian los compuestos TDFRP en estas células cancerosas en cuanto a la capacidad para inducir fosforilación de Smad 1/5 regulada por receptores de un modo dependiente de dosis (FIG. 2).

Se desvelan ensayos específicos *in vivo* para estudiar la eficacia de un compuesto o análogo, *v.g.*, compuesto TDFRP, en una aplicación para reparar o regenerar hueso, hígado, riñón, tejido nervioso, tejido periodontal, incluyendo el cemento y/o el ligamento periodontal, y tejidos gastrointestinales y renales dañados, y tejidos con daños mediados por células inmunes en documentos abiertos al público, que incluyen, por ejemplo, EP 0.575.555, WO93/04692, WO93/05751, WO/06399, WO94/03200, WO94/06449 y WO94/06420, así como las referencias resumidas en la Tabla 2 y en la Tabla 3.

Ensayos funcionales *in vivo* para los compuestos TDF o TDFRP:

Modelo de cisplatina en rata para la lesión renal aguda:

El modelo de cisplatina en rata ha sido ampliamente estudiado y se considera un modelo relevante para la lesión renal aguda humana. Los riñones de animales tratados con cisplatina muestran poca evidencia de proliferación celular. Por el contrario, los animales que están protegidos o que son capaces de recuperarse de los efectos nefrotóxicos del tratamiento con cisplatina muestran proliferación, como se detecta mediante anticuerpos anti-antígeno nuclear de células proliferantes o PCNA. Este modelo proporciona un mecanismo para identificar agentes que pueden proteger al riñón de la lesión inflamatoria mediada por citoquinas, así como en la reparación de daños en órganos. Los macrófagos se infiltran en los riñones de animales tratados con cisplatina, y este marcador precoz de nefropatía puede ser detectado usando anticuerpos anti-CD-68. Se pueden detectar agentes que reduzcan el número de macrófagoss en los riñones y prevengan el daño mediado por células inflamatorias asociado al tratamiento con cisplatina usando análisis inmunohistológico. Las secciones de riñón tratadas con agentes que

muestran un aumento en la expresión de α-actina en las células musculares lisas (SMC) son indicativas de que hay una protección de la integridad de las SMC y un alivio del daño nocivo producido al riñón.

Se inyectan a ratas Sprague-Dawley macho (~250 g) *ip* 5 mg/kg de cisplatina (1 mg/ml en agua) en el tiempo cero para inducir insuficiencia renal aguda. En este modelo, los picos de los signos clínicos (elevación en la creatinina sérica) aparecen a los 4 a 5 días. Se administraron el compuesto de ensayo y las substancias de control *iv* a través de la vena de la cola como inyecciones en bolo lento de 0,5 ml. La substancia de control negativo era el vehículo (PBS, pH 7,2, + 5% manitol), mientras que la terapia de control positivo era BMP-7 (BMP-7 o TDF-1) madura humana recombinante. Los criterios de valoración son los niveles séricos de creatinina y BUN y la histología.

Modelo de obstrucción ureteral unilateral de lesión renal crónica:

La obstrucción ureteral unilateral (OUU) es un modelo que se asemeja a la nefropatía obstructiva humana y que representa un modelo crónico inducible de fibrosis intersticial. Se induce OUU por ligadura de un uréter, dejando que el riñón contralateral sirva como control. Como resultado del procedimiento, los ratones desarrollan inflamación tubulointersticial renal, fibrosis tubulointersticial y atrofia tubular, sin hipertensión, proteinuria, alteración en la regulación de los lípidos y poco daño glomerular que contribuya al estado de la enfermedad (Ito *et al.* (2004), J Urol. Feb; 171(2 Pt 1): 926-30.; Bhangdia *et al.* (2003), J Urol. Nov; 170(5): 2057-62.; Rawashdeh *et al.* (2003), Invest Radiol. 2003 Mar; 38(3): 153-8.; Hruska et al (2000), Am J Physiol Renal Physiol. 2000 Jul; 79(1): F130-43.). Además, la fibrosis renal se asocia a alteración de células epiteliales y fibroblásticas hacia miofibroblastos, junto con un aumento en la expresión de TGF-beta y una progresiva pérdida de función renal.

Modelo de nefritis por suero nefrotóxico (NNT) de lesión renal crónica:

La fibrosis renal conlleva fibrosis intersticial, atrofia tubular y glomeruloesclerosis. El modelo de fibrosis renal por nefritis por suero nefrotóxico (NNT) en ratón imita la lesión renal crónica humana. Los ratones NNT desarrollan glomerulonefritis tras inyección de suero nefrotóxico (SNT), que progresa a enfermedad tubulointersticial y eventualmente a fibrosis renal después de 6 semanas (véanse Lloyd *et al.* (1997), J. Exp. Med. 185, 1371-1380.; Zeisberg *et al.* (2003), Nat. Med. 9, 964-968).

IV. Animales transgénicos TDFRP

Se describe un animal transgénico, *v.g.*, un sujeto que tiene un ácido nucleico codificante de un compuesto TDFRP. Las células huésped descritas pueden ser también utilizadas para producir animales transgénicos no humanos. Por ejemplo, una célula huésped puede ser un oocito fertilizado o una célula madre embrionaria en donde se han introducido secuencias codificantes de polipéptidos TDFRP. Dichas células huésped pueden ser entonces usadas para crear animales transgénicos no humanos en cuyo genoma se han introducido secuencias de TDFRP exógenas, o animales recombinantes homólogos en los que se han alterado las secuencias de TDFRP endógenas. Dichos animales son útiles para estudiar la función y/o actividad del polipéptido TDFRP y para identificar y/o evaluar moduladores de la actividad de los polipéptidos TDFRP.

Se puede crear un animal transgénico introduciendo ácido nucleico codificante de TDFRP en los pronúcleos masculinos de un oocito fertilizado *(v.g.*, por microinyección o infección retrovírica) y dejando que el oocito se desarrolle en una hembra substituta pseudogestante. Las secuencias de ADNc TDFRP pueden ser introducidas como un transgén en el genoma de un animal no humano. También se pueden incluir secuencias intrónicas y señales de poliadenilación en el transgén para aumentar la eficacia de expresión del transgén. Se puede(n) unir operativamente una secuencia(s) reguladora(s) específica(s) de tejidos al transgén de TDFRP para dirigir la expresión del polipéptido TDFRP a células particulares. Los métodos para generar animales transgénicos por manipulación de embriones y microinyección, particularmente animales tales como ratones, se han vuelto convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nº 4.736.866, 4.870.009 y 4.873.191 y en Hogan, 1986, en: Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Se usan métodos similares para la producción de otros animales transgénicos. Se puede identificar un animal fundador transgénico en base a la presencia del transgén de TDFRP en su genoma y/o a la expresión de ARNm de TDFRP en los tejidos o células de los animales. Se puede usar entonces un animal fundador transgénico para reproducir animales adicionales portadores del transgén. Además, los animales transgénicos portadores de un transgén codificante de un polipéptido TDFRP pueden ser también cruzados con otros animales transgénicos portadores de otros transgenes.

En el vector de recombinación homóloga, el gen TDFRP está flanqueado en sus extremos 5' y 3' por ácido nucleico adicional para permitir que se produzca la recombinación homóloga entre el gen TDFRP exógeno portado por el vector y un gen endógeno en una célula madre embrionaria. El ácido nucleico flanqueante adicional tiene una longitud suficiente para una recombinación homóloga eficaz con el gen endógeno. Típicamente, se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante (tanto en el extremo 5' como en el 3') en el vector. Véase, *v.g.*, Thomas *et al.*, 1987. Cell 51: 503, para una descripción de vectores de recombinación homóloga. Se introduce entonces el vector en una línea de células madre embrionarias *(v.g.*, por electroporación) y se seleccionan las células en las que se ha recombinado el gen TDFRP introducido de manera homóloga con un gen endógeno. Véase, *v.g.*, Li *et al.*, 1992. Cell

69: 915.

Se inyectan luego las células seleccionadas en un blastocisto de un animal (*v.g.*, un ratón) para formar quimeras de agregación. Véase, *v.g.*, Bradley, 1987. En: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, Robertson, ed. IRL, Oxford, pp. 113-152. Se puede implantar entonces un embrión quimérico en una hembra substituta pseudogestante adecuada y llevar el embrión a término. Se puede usar la progenie que alberga el ADN homólogamente recombinado en sus células germinales para reproducir animales en los que todas las células del animal contienen el ADN homólogamente recombinado por transmisión a través de la línea germinal del transgén. Se describen también métodos para construir vectores de recombinación homóloga y animales recombinantes homólogos en Bradley, 1991. Curr. Opin. Biotechnol. 2: 823-829, y en las Publicaciones Internacionales PCT Nº.: WO 90/11354, WO 91/01140, WO 92/0968 y WO 93/04169.

Se pueden producir animales no humanos transgénicos que contengan sistemas seleccionados que permitan la expresión regulada del transgén de TDFRP. Un ejemplo de dicho sistema es el sistema cre/loxP recombinasa del bacteriófago P1. Para una descripción del sistema cre/loxP recombinasa, véase, *v.g.*, Lakso *et al.*, 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236. Otro ejemplo de un sistema de recombinasa es el sistema FLP recombinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Véase O'Gorman *et al.*, 1991. Science 251: 1351-4255. Si se usa un sistema cre/loxP recombinasa para regular la expresión del transgén, se requieren animales que contengan transgenes codificantes de la Cre recombinasa y de un polipéptido seleccionado. Dichos animales pueden ser obtenidos por construcción de animales transgénicos "dobles", *v.g.*, cruzando dos animales transgénicos, uno que contiene un transgén codificante de un polipéptido seleccionado y otro que contiene un transgén codificante de una recombinasa.

También se pueden producir clones de los animales transgénicos no humanos aquí descritos según los métodos descritos en Wilmut *et al.*, 1997. Nature 385: 810-813. Brevemente, se puede aislar una célula *(v.g.*, una célula somática) del animal transgénico e inducirla a salir del ciclo de crecimiento y entrar en la fase G0. Se puede fusionar entonces la célula quiescente, *v.g.*, usando pulsos eléctricos, con un oocito enucleado de un animal de la misma especie de la que se aísla la célula quiescente. Se cultiva después el oocito reconstruido de tal forma que se desarrolle a mórula o blastocito y se le transfiere luego a una hembra substituta pseudogestante. La progenie nacida de esta hembra substituta será un clon del animal del que se aísla la célula (*v.g.*, la célula somática).

V. Composiciones farmacéuticas

Los compuestos TDFRP de la invención, y sus derivados, fragmentos, análogos y homólogos, pueden ser incorporados a composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Dichas composiciones típicamente incluyen el polipéptido con o sin un soporte farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa aquí, "soporte farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos de solventes, medios de dispersión, revestimientos, compuestos antibacterianos y antifúngicos, compuestos isotónicos y retardadores de la absorción y similares, compatibles con administración farmacéutica. Se describen soportes adecuados en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en este campo. Como ejemplos preferidos de dichos soportes o diluyentes, se incluyen, aunque sin limitación, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y seroalbúmina humana al 5%. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos, tales como aceites fijos. El uso de dichos medios y compuestos para substancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en el caso de que cualquier medio convencional o compuesto sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. También se pueden incorporar en las composiciones compuestos activos adicionales.

Una composición farmacéutica de la invención es formulada de manera que sea compatible con su vía pretendida de administración. Como ejemplos de vías de administración, se incluyen la administración parenteral, *v.g.*, intravenosa, intradérmica y subcutánea, oral (*v.g.*, inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosal y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, suero salino, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; compuestos antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabenes; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; compuestos quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos, y compuestos para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ser ajustado con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Se puede encerrar la preparación parenteral en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas (cuando sean hidrosolubles) o dispersiones estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, como soportes adecuados se incluyen suero fisiológico, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfatos (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y tiene que ser fluida hasta el punto de que exista una fácil manipulabilidad mediante jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe ser preservada de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El soporte puede ser un medio solvente o de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol,

propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de surfactantes. Se puede conseguir la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos compuestos antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenes, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir compuestos isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol y sorbitol y cloruro de sodio, en la composición. Se puede conseguir una absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un compuesto que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo (*v.g.*, un compuesto TDFRP o anticuerpo anti-compuesto TDFRP) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes antes enumerados, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones son preparadas incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son desecación a vacío y liofilización, que da un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional procedente de una solución previamente esterilizada por filtración de los mismos.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un soporte comestible. Pueden ser encerradas en cápsulas de gelatina o comprimidas en tabletas. Con el fin de una administración terapéutica oral, se puede incorporar el compuesto activo con excipientes y usarlo en forma de tabletas, trociscos o cápsulas. También se pueden preparar composiciones orales usando un soporte líquido para uso como colutorio, donde el compuesto en el soporte líquido es aplicado oralmente y agitado dentro de la boca y expectorado o tragado. Se pueden incluir compuestos de unión y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles como parte de la composición. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un ligante, tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente, tal como almidón o lactosa; un compuesto desintegrante, tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante, tal como estearato de magnesio o Sterotex; un deslizante, tal como dióxido de silicio coloidal; un compuesto edulcorante, tal como sacarosa o sacarina; o un compuesto saborizante, tal como menta, salicilato de metilo o sabor de naranja.

Para administración por inhalación, los compuestos son suministrados en forma de un spray aerosol a partir de un recipiente o dispensador presurizado, que contiene un propulsor adecuado, *v.g.*, un gas, tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

También se puede realizar la administración sistémica por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que ha de ser permeada. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico. Se puede conseguir la administración transmucosal mediante el uso de sprays nasales o de supositorios. Para la administración transdérmica, se formulan los compuestos activos en ungüentos, bálsamos, geles o cremas, como es generalmente conocido en la técnica.

Los compuestos pueden también ser preparados como composiciones farmacéuticas en forma de supositorios (*v.g.*, con bases convencionales para supositorios, tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o de enemas de retención para suministro rectal. Los compuestos pueden ser preparados para uso en el acondicionamiento o tratamiento de explantes o implantes *ex vivo*.

En una realización, los compuestos activos son preparados con soportes que protegerán al compuesto frente a su rápida eliminación del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles y biodegradables, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales pueden ser también obtenidos comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos víricos) como soportes farmacéuticamente aceptables. Éstas pueden ser preparadas según métodos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente Estadounidense Nº 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria, tal como se usa aquí, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que ha de ser tratado, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el soporte farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas de dosificación unitaria de la invención vienen dictadas por, y dependen directamente de, las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se haya de conseguir, y las limitaciones inherentes

a la técnica de composición de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

Las moléculas de ácido nucleico descritas pueden ser insertadas en vectores y usadas como vectores de terapia génica. Se pueden suministrar vectores de terapia génica a un sujeto, por ejemplo, por inyección intravenosa, administración local (véase, *v.g.*, la Patente Estadounidense Nº 5.328.470) o inyección estereotáctica (véase, *v.g.*, Chen *et al.*, 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede contener una matriz de liberación lenta en la que se embebe el vehículo de administración del gen. De manera alternativa, cuando se puede producir el vector completo de administración del gen intacto a partir de células recombinantes, *v.g.*, vectores retrovíricos, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que produzcan el sistema de administración del gen. Las composiciones farmacéuticas pueden ser incluidas en un recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para su administración.

VI. Métodos de cribado y detección

Los compuestos de la invención pueden ser usados para expresar compuestos TDFRP (*v.g.*, mediante un vector de expresión recombinante en una célula huésped en aplicaciones de terapia génica), para detectar ARNm de TDFRP (*v.g.*, en una muestra biológica) o una lesión genética en un gen TDFRP y para modular la actividad de los compuestos TDFRP, como se describe más ampliamente más adelante. Además, los polipéptidos TDFRP pueden ser usados para cribar fármacos o compuestos que modulen la actividad o expresión del polipéptido TDF o del compuesto TDFRP, así como para tratar trastornos caracterizados por una producción insuficiente o excesiva de polipéptidos TDF o una producción de formas de polipéptidos TDF que tienen una actividad reducida o aberrante en comparación con el polipéptido TDF de tipo salvaje. Además, los anticuerpos anti-compuestos TDFRP descritos pueden ser usados para detectar y aislar TDF o compuestos TDFRP y modular su actividad. Por consiguiente, se describen nuevos compuestos identificados por los ensayos de cribado aquí descritos y sus usos para tratamientos como se ha descrito, *supra*.

VII. Ensayos de cribado

Se describen métodos para identificar moduladores, es decir, compuestos candidatos o de ensayo o compuestos (*v.g.*, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otros fármacos) que se unen a compuestos TDFRP o polipéptidos TDF o que tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre, *v.g.*, la expresión o actividad de los compuestos TDFRP o polipéptidos TDF (a los que también se hace aquí referencia como "ensayos de cribado"). Se describen compuestos identificados en los ensayos de cribado aquí descritos.

En una realización, se describen ensayos para cribar compuestos candidatos o de ensayo que se unen a, o modulan la actividad de, los compuestos TDFRP o polipéptidos TDF o porciones biológicamente activas de los mismos. Los compuestos de la invención pueden ser obtenidos usando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, incluyendo: bibliotecas biológicas; bibliotecas en fase sólida o en fase de solución paralelas espacialmente direccionables; métodos de bibliotecas sintéticas que requieren deconvolución; el método de bibliotecas de "una perla un compuesto"; y métodos de bibliotecas sintéticas que utilizan selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de la biblioteca biológica se limita a bibliotecas peptídicas, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a bibliotecas de compuestos peptídicos, oligoméricos no peptídicos o de pequeña molécula. Véase, *v.g.*, Lam, 1997. Anticancer Drug Design 12: 145.

Las bibliotecas de mezclas químicas y/o biológicas, tales como extractos fúngicos, bacterianos o de algas, son conocidas en la técnica y pueden ser cribadas con cualquiera de los ensayos descritos, así como con los conocidos para los expertos en la técnica. Se pueden encontrar ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares en la literatura científica, por ejemplo en: DeWitt *et al.*, 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909; Erb *et al.*, 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 11422; Zuckermann *et al.*, 1994. J. Med. Chem. 37: 2678; Cho *et al.*, 1993. Science 261: 1303; Carrell *et al.*, 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carell *et al.*, 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; y Gallop *et al.*, 1994. J. Med. Chem. 37: 1233.

Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (*v.g.*, Houghten, 1992. Biotechniques 13: 412-421) o sobre perlas (Lam, 1991. Nature 354: 82-84), sobre chips (Fodor, 1993. Nature 364: 555-556), bacterias (Ladner, Patente Estadounidense Nº 5.223.409), esporas (Ladner, Patente Estadounidense Nº 5.233.409), plásmidos (Cull *et al.*, 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869) o sobre fagos (Scott y Smith, 1990. Science 249: 386-390; Devlin, 1990. Science 249: 404-406; Cwirla *et al.*, 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 6378-6382; Felici, 1991. J. Mol. Biol. 222: 301-310; Ladner, Patente Estadounidense Nº 5.233.409).

Se puede llevar a cabo la determinación de la capacidad de un compuesto para modular la actividad de un polipéptido TDFRP, por ejemplo, determinando la capacidad del compuesto TDFRP para unirse a, o interaccionar con, una molécula diana del compuesto TDFRP. Una molécula diana es una molécula a la que se une o con la que interacciona un compuesto TDFRP, por ejemplo, una molécula sobre la superficie de una célula que expresa un polipéptido que interacciona con TDFRP, una molécula sobre la superficie de una segunda célula, una molécula en el medio extracelular, una molécula asociada a la superficie interna de una membrana celular o una molécula

citoplásmica. Una molécula diana del compuesto TDFRP puede ser una molécula de compuesto no TDFRP o un polipéptido TDFRP o polipéptido de la invención. En una realización, una molécula diana del compuesto TDFRP es un componente de una ruta de transducción de señal que facilita la transducción de una señal extracelular *(v.g.*, una señal generada por la unión de un compuesto a una molécula receptora de TDF unida a membrana) a través de la membrana celular y hacia el interior de la célula. La diana, por ejemplo, puede ser un segundo polipéptido intracelular que tiene actividad catalítica o un polipéptido que facilita la asociación de moléculas de señalización secuencia abajo con el polipéptido receptor de TDF. Los compuestos de la presente invención agonizan o antagonizan dichas interacciones y las respuestas biológicas resultantes, medidas mediante los ensayos descritos.

Se puede determinar la capacidad del compuesto TDFRP para unirse o, o interaccionar con, una molécula diana del compuesto TDFRP por uno de los métodos antes descritos para determinar la unión directa. En una realización, se puede determinar la capacidad del compuesto TDFRP para unirse a, o interaccionar con, una molécula diana del compuesto TDFRP determinando la actividad de la molécula diana. Por ejemplo, se puede determinar la actividad de la molécula diana detectando la inducción de un segundo mensajero celular de la diana (es decir, Ca^{2+} intracelular, diacilglicerol, IP3, *etc.*), detectando la actividad catalítica/enzimática de la diana y el substrato apropiado, detectando la inducción de un gen indicador (que comprende un elemento regulador que responde a TDFRP operativamente unido a un ácido nucleico codificante de un marcador detectable, *v.g.*, luciferasa), o detectando una respuesta celular, por ejemplo, supervivencia celular, diferenciación celular o proliferación celular.

Se describe un ensayo libre de células consistente en poner en contacto un compuesto TDFRP o una porción biológicamente activa del mismo con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para unirse al compuesto TDFRP o su porción biológicamente activa. Se puede determinar la unión del compuesto de ensayo al compuesto TDFRP directa o indirectamente como se ha descrito con anterioridad. El ensayo puede incluir el contacto del compuesto TDFRP o su porción biológicamente activa con un compuesto conocido que se una a TDFRP para formar una mezcla de ensayo, el contacto de la mezcla de ensayo con un compuesto de ensayo y la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para interaccionar con un compuesto TDFRP, donde la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para interaccionar con un compuesto TDFRP consiste en determinar la capacidad del compuesto ensayo para unirse preferentemente a TDFRP o su porción biológicamente activa en comparación con el compuesto conocido.

El ensayo puede ser un ensayo libre de células consistente en poner en contacto un compuesto TDFRP o una porción biológicamente activa del mismo con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular (*v.g.* estimular o inhibir) la actividad del compuesto TDFRP o su porción biológicamente activa. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad del TDFRP puede ser llevada a cabo, por ejemplo, determinando la capacidad del compuesto TDFRP para unirse a una molécula diana del compuesto TDFRP por uno de los métodos antes descritos para determinar la unión directa. De manera alternativa, se puede determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad del compuesto TDFRP determinando la capacidad del compuesto TDFRP para modular además una molécula diana del compuesto TDFRP. Por ejemplo, se puede determinar la actividad catalítica/enzimática de la molécula diana sobre un substrato apropiado como se ha descrito, *supra*.

El ensayo libre de células puede consistir en poner en contacto el compuesto TDFRP o su porción biológicamente activa con un compuesto conocido que se une al compuesto TDFRP para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interaccionar con un compuesto TDFRP, donde la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para interaccionar con un compuesto TDFRP consiste en determinar la capacidad del compuesto TDFRP para unirse preferentemente a, o modular la actividad de, una molécula diana del compuesto TDFRP.

Puede ser deseable inmovilizar o bien el compuesto TDFRP o bien su molécula diana para facilitar la separación entre las formas acomplejadas y no acomplejadas de uno o de los dos polipéptidos, así como para acomodar la automatización del ensayo. Se puede realizar la unión de un compuesto de ensayo a un compuesto TDFRP, o la interacción del compuesto TDFRP con una molécula diana en presencia y ausencia de un compuesto candidato en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Como ejemplos de dichos recipientes, se incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. Se puede aportar un polipéptido de fusión que añada un dominio que permita la unión de uno o de ambos polipéptidos a una matriz. Por ejemplo, los polipéptidos de fusión GST-TDFRP o los polipéptidos de fusión o GST-diana pueden adsorberse sobre perlas de glutatión sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, MO.) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que se combinan después con el compuesto de ensayo o el compuesto de ensayo y o bien el polipéptido diana no adsorbido o bien el compuesto TDFRP, y se incuba la mezcla en condiciones que den lugar a la formación de complejos (*v.g.*, en condiciones fisiológicas para sal y pH). Después de la incubación, se lavan las perlas o los pocillos de la placa de microtitulación para eliminar cualquier componente no unido, la matriz inmovilizada en el caso de las perlas, siendo determinado el complejo directa o indirectamente, por ejemplo, como se ha descrito, *supra*. De manera alternativa, se pueden disociar los complejos de la matriz y se puede determinar el nivel de unión o actividad del compuesto TDFRP usando técnicas estándar.

También se pueden usar otras técnicas para inmovilizar polipéptidos sobre matrices en los ensayos de cribado. Por

ejemplo, se puede inmovilizar o bien el compuesto TDFRP o bien su molécula diana utilizando conjugación de biotina y estreptavidina. Se pueden preparar compuesto TDFRP o moléculas diana biotinilados a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida) usando técnicas bien conocidas en este campo (*v.g.*, kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) e inmovilizarlos en los pocillos de placas de 96 pocillos revestidas de estreptavidina (Pierce Chemical). De manera alternativa, se pueden derivatizar anticuerpos reactivos con compuesto TDFRP o moléculas diana, pero que no interfieren con la unión del compuesto TDFRP a su molécula diana, en los pocillos de la placa, y atrapar la diana o el compuesto TDFRP no unidos en los pocillos por conjugación del anticuerpo. Como métodos para detectar dichos complejos, además de los antes descritos para los complejos inmovilizados con GST, se incluyen la inmunodetección de complejos usando anticuerpos reactivos con el compuesto TDFRP o la molécula diana, así como ensayos ligados a enzimas que se basan en la detección de una actividad enzimática asociada al compuesto TDFRP o a la molécula diana.

Se pueden identificar los moduladores de la expresión del compuesto TDFRP en un método en el que se pone en contacto una célula con un compuesto candidato y se determina la expresión de ARNm o polipéptido TDFRP en la célula. Se compara el nivel de expresión del ARNm o polipéptido TDFRP en presencia del compuesto candidato con el nivel de expresión de ARNm o polipéptido TDFRP en ausencia del compuesto candidato. Se puede identificar entonces el compuesto candidato como un modulador de la expresión de ARNm o polipéptido TDFRP en base a esta comparación. Por ejemplo, Cuando la expresión de ARNm o polipéptido TDFRP es mayor (es decir, estadísticamente significativamente mayor) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, se identifica al compuesto candidato como un estimulador de la expresión de ARNm o polipéptido TDFRP. De manera alternativa, cuando la expresión de ARNm o polipéptido TDFRP es menor (estadísticamente significativamente menor) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, se identifica al compuesto candidato como un inhibidor de la expresión de ARNm o polipéptido TDFRP. Se puede determinar el nivel de expresión de ARNm o polipéptido TDFRP en las células por los métodos aquí descritos para detectar ARNm o polipéptido TDFRP.

Los compuestos TDFRP pueden ser usados como "polipéptidos cebo" en un ensayo de dos híbridos o un ensayo de tres híbridos (véase, *v.g.*, la Patente Estadounidense Nº 5.283.317; Zervos *et al.*, 1993. Cell 72: 223-232; Madura *et al.*, 1993. J. Biol. Chem. 268: 12046-12054; Bartel *et al.*, 1993. Biotechniques 14: 920-924; Iwabuchi *et al.*, 1993. Oncogene 8: 1693-1696; y Brent WO 94/10300), para identificar otras moléculas, *v.g.*, polipéptidos, que se unen a, o interaccionan con, TDFRP ("moléculas de unión a TDFRP" o "TDFRP-bp") y modulan la actividad del TDFRP. Es probable también que dichas moléculas de unión a TDFRP estén implicadas en la propagación de señales por los compuestos TDFRP, como, por ejemplo, elementos secuencia arriba o secuencia abajo de una ruta TDF.

El sistema de dos híbridos se basa en la naturaleza modular de la mayoría de los factores de transcripción, que consisten en dominios separables de unión al, y activación del, ADN. Brevemente, el ensayo utiliza dos diferentes construcciones de ADN. En una construcción, el gen que codifica el compuesto TDFRP está fusionado a un gen codificante del dominio de unión a ADN de un factor de transcripción conocido *(v.g.*, GAL-4). En la otra construcción, una secuencia de ADN, procedente de una biblioteca de secuencias de ADN, que codifica un polipéptido no identificado ("presa" o "muestra") se fusiona a un gen que codifica el domino de activación del factor de transcripción conocido. Si los polipéptidos "cebo" y "presa" son capaces de interactuar, *in vivo*, formando un complejo dependiente de TDFRP, los dominios de unión y activación del ADN del factor de transcripción se sitúan en estrecha proximidad. Esta proximidad permite la transcripción de un gen indicador (*v.g.*, LacZ) que está operativamente unido a un sitio regulador de la transcripción que responde al factor de transcripción. La expresión del gen indicador puede ser detectada y las colonias de células que contienen el factor de transcripción funcional pueden ser aisladas y utilizadas para obtener el gen clonado que codifica el polipéptido, que interacciona con el compuesto TDFRP.

Se puede obtener un sistema que contenga información estructural relacionada con las coordenadas atómicas del compuesto TDFRP por técnicas biofísicas, *v.g.*, difracción de rayos x. Se puede valorar la unión entre un compuesto TDFRP y un compuesto por difracción de rayos x para determinar la estructura cristalina de rayos x de los complejos de compuesto TDFRP, *v.g.*, complejo polipéptido diana/fármaco. De manera alternativa, se puede usar RMN para analizar el cambio en las desviaciones químicas observadas después de que un compuesto se una con el compuesto TDFRP. Dichos enfoques pueden ser usados para cribar compuestos en base a sus interacciones de unión con los compuestos TDFRP.

Se describen compuestos TDFRP identificados mediante los ensayos de cribado antes mencionados y sus usos para tratamientos como aquí se describe.

VIII. Ensayos de detección

A. Detección de la expresión de TDFRP

Un método ejemplar para detectar la presencia o ausencia de compuesto TDFRP en una muestra biológica conlleva la obtención de una muestra biológica de un sujeto de ensayo y el contacto de la muestra biológica con un compuesto o un compuesto capaz de detectar compuesto TDFRP o ácido nucleico (*v.g.*, ARNm, ADN genómico) que codifica el compuesto TDFRP, de tal forma que se detecta la presencia de compuesto TDFRP en la muestra biológica. Un compuesto para detectar ARNm o ADN genómico de TDFRP es una sonda de ácido nucleico marcada

capaz de hibridarse con el ARNm o el ADN genómico del TDFRP. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico TDFRP de longitud total o una porción del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 5, 15, 30, 50, 100, 250 ó 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridarse específicamente en condiciones estrictas con ARNm o ADN genómico de TDFRP. Se describen aquí otras sondas adecuadas para uso en los ensayos diagnósticos de la invención.

Un ejemplo de un compuesto para detectar un compuesto TDFRP es un anticuerpo producido contra la SEC. Nº ID.: 333, capaz de unirse al compuesto TDFRP, preferiblemente un anticuerpo con un marcaje detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente monoclonales. Se puede usar un anticuerpo intacto o un fragmento del mismo (*v.g.*, Fab o F(ab')$_2$). El término "marcado", con respecto a la sonda o al anticuerpo, pretende incluir el marcaje directo de la sonda o el anticuerpo copulando (es decir, uniendo físicamente) una substancia detectable con la sonda o el anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o el anticuerpo por reactividad con otro compuesto que está directamente marcado. Como ejemplos del marcaje indirecto, se incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario fluorescentemente marcado y marcaje de extremos de una sonda de ADN con biotina, de tal forma que pueda ser detectado con estreptavidina fluorescentemente marcada. El término "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes en un sujeto. Es decir, el método de detección de la invención puede ser usado para detectar ARNm, polipéptido o ADN genómico TDFRP en una muestra biológica *in vitro*, así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de ARNm de TDFRP incluyen RT-PCR, hibridaciones Northern e hidridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de compuesto TDFRP incluyen ensayos inmunosorbentes ligados a enzimas (ELISA), Western blots, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de ADN genómico de TDFRP incluyen hibridaciones Southern. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de compuesto TDFRP incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo anti-TDFRP marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser marcado con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto pueden ser detectadas por técnicas de imagen estándar. En una realización, la muestra biológica contiene moléculas de polipéptido del sujeto de ensayo. De manera alternativa, la muestra biológica puede contener moléculas de ARNm del sujeto de ensayo o moléculas de ADN genómico del sujeto de ensayo. Una muestra biológica preferida es una muestra de leucocitos de sangre periférica aislada por medios convencionales de un sujeto.

En otra realización, los métodos conllevan además la obtención de una muestra biológica de control de un sujeto de control, el contacto de la muestra de control con un compuesto o compuesto capaz de detectar compuesto, ARNm o ADN genómico TDFRP, de tal forma que la presencia de compuesto, ARNm o ADN genómico TDFRP es detectada en la muestra biológica, y la comparación de la presencia de compuesto, ARNm o ADN genómico TDFRP en la muestra de control con la presencia de compuesto, ARNm o ADN genómico TDFRP en la muestra de ensayo.

Se describen kits para detectar la presencia de compuesto TDFRP en una muestra biológica. Por ejemplo, el kit puede incluir: un compuesto marcado o un compuesto capaz de detectar compuesto o ARNm TDFRP en una muestra biológica; medios para determinar la cantidad de compuesto TDFRP en la muestra; y medios para comparar la cantidad de compuesto TDFRP en la muestra con un patrón. El compuesto o compuesto puede estar envasado en un recipiente adecuado. El kit puede además incluir instrucciones para su uso en la detección de compuesto o ácido nucleico TDFRP.

B. Medicina predictiva

La invención también se relaciona con el campo de la medicina predictiva, en donde se usan ensayos diagnósticos, ensayos pronósticos, farmacogenómica y pruebas clínicas de monitorización con fines pronósticos (predictivos) para tratar profilácticamente a un sujeto. Por consiguiente, un aspecto de la invención se relaciona con ensayos diagnósticos para determinar la expresión de moléculas diana del compuesto TDFRP, así como la actividad de moléculas diana del compuesto TDFRP, en el contexto de una muestra biológica (*v.g.*, sangre, suero, células, tejidos), para así determinar si un individuo está afectado con una enfermedad o trastorno o si está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado a una expresión o actividad aberrante de moléculas diana del compuesto TDFRP.

La invención también proporciona ensayos pronósticos (o predictivos) para determinar si un individuo se halla en situación de riesgo de desarrollar un trastorno asociado a la expresión o actividad de moléculas diana del compuesto TDFRP. Dichos ensayos pueden ser usados con fines pronósticos o predictivos, para así tratar profilácticamente a un individuo antes de la aparición de un trastorno caracterizado por, o asociado a, un polipéptido diana de un compuesto TDFRP. Además, los métodos de la presente invención pueden también ser usados para valorar si un individuo expresa una molécula diana del compuesto TDFRP o una forma polimórfica del polipéptido diana en casos en que un compuesto TDFRP de la presente invención tiene una mayor afinidad por la molécula diana del compuesto TDFRP que por su forma polimórfica (o *viceversa*).

Los niveles de ciertos polipéptidos en un tejido particular (o en la sangre) de un sujeto pueden ser indicativos de la toxicidad, la eficacia, el índice de aclaramiento o el índice de metabolismo de un fármaco dado cuando se administra al sujeto. También se pueden usar los métodos aquí descritos para determinar los niveles de dicho(s) polipéptido(s) en sujetos para ayudar a predecir la respuesta de dichos sujetos a estos fármacos. Se describen métodos para

determinar la actividad de los compuestos TDFRP en un individuo para así seleccionar compuestos terapéuticos o profilácticos apropiados para ese individuo (a lo que se hace aquí referencia como "farmacogenómica"). La farmacogenómica permite la selección de compuestos (*v.g.*, fármacos) para el tratamiento terapéutico o profiláctico de un individuo en base al genotipo del individuo (*v.g.*, el genotipo del individuo examinado para determinar la capacidad del individuo para responder a un compuesto particular).

C. Ensayos pronósticos

Se puede utilizar la unión de un compuesto TDFRP a una molécula diana del compuesto TDFRP, *v.g.*, receptor de TDF, para identificar a un sujeto que tiene, o que presenta riesgo de desarrollar, un trastorno asociado a la expresión o actividad de las moléculas diana del compuesto TDFRP (que han sido descritas anteriormente). De manera alternativa, los ensayos pronósticos pueden ser utilizados para identificar a un sujeto que tiene, o que presenta riesgo de desarrollar, la enfermedad o trastorno. Por lo tanto, la invención proporciona un método para identificar una enfermedad o trastorno asociado a la expresión o actividad aberrante de las dianas de los compuestos TDFRP, en donde se obtiene una muestra de ensayo de un sujeto y se detecta la unión o actividad del compuesto TDFRP, donde la presencia de una alteración de la unión o actividad del compuesto TDFRP es diagnóstica para un sujeto que tiene, o que presenta riesgo de desarrollar, una enfermedad o trastorno asociado a la expresión o actividad aberrante de la diana del compuesto TDFRP. Tal como se usa aquí, una "muestra de ensayo" se refiere a una muestra biológica obtenida de un sujeto de interés. Por ejemplo, una muestra de ensayo puede ser un fluido biológico (*v.g.*, suero), una muestra de células o un tejido.

Además, los ensayos pronósticos aquí descritos pueden ser usados para determinar si se puede administrar a un sujeto un compuesto (*v.g.*, un agonista, antagonista, peptidomimético, polipéptido, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro candidato a fármaco) para tratar una enfermedad o trastorno asociado a TDF asociado a expresión o actividad aberrante de las dianas del compuesto TDFRP. Por ejemplo, dichos métodos pueden ser usados para determinar si un sujeto puede ser eficazmente tratado con un compuesto para un trastorno asociado a TDF. Por lo tanto, se describen métodos para determinar si un sujeto puede ser eficazmente tratado con un compuesto para un trastorno asociado a expresión o actividad aberrante de las dianas del compuesto TDFRP, en donde se obtiene una muestra de ensayo y se detecta la diana del compuesto TDFRP usando compuesto TDFRP (*v.g.*, donde la presencia de molécula diana del compuesto TDFRP es diagnóstica para un sujeto al que se puede administrar el compuesto para tratar un trastorno asociado a expresión o actividad aberrante de la molécula diana del compuesto TDFRP).

Se determina el nivel de la molécula diana del compuesto TDFRP en una muestra de sangre o de tejido obtenida de un sujeto y se compara con el nivel encontrado en una muestra de sangre o una muestra del mismo tipo de tejido obtenida de un individuo que está libre de la enfermedad. Una superabundancia (o subabundancia) de la molécula diana del compuesto TDFRP en la muestra obtenida del sujeto sospechoso de tener la enfermedad asociada con TDF en comparación con la muestra obtenida del sujeto sano es indicativa de la enfermedad asociada a TDF en el sujeto estudiado. Puede ser necesario un mayor estudio para hacer un diagnóstico positivo.

Hay una serie de enfermedades en las cuales se sabe que el grado de sobreexpresión (o subexpresión) de ciertas moléculas diana del compuesto TDFRP, a las que se hace aquí referencia como "polipéptidos pronósticos", es indicativo de si es probable que un sujeto con la enfermedad responda a un tipo particular de terapia o tratamiento. Así, el método de detección de una molécula diana del compuesto TDFRP en una muestra puede ser usado como un método de pronóstico, *v.g.*, para evaluar la probabilidad de que el sujeto responda a la terapia o tratamiento. Se determina el nivel del polipéptido pronóstico relevante en una muestra adecuada de tejido o de sangre del sujeto y se compara con un control adecuado, *v.g.*, el nivel en sujetos con la misma enfermedad pero que han respondido favorablemente al tratamiento. El grado en el que se sobreexpresa (o subexpresa) el polipéptido pronóstico en la muestra en comparación con el control puede ser predictivo de la probabilidad de que el sujeto no responda favorablemente al tratamiento o terapia. Cuanto mayor sea la sobreexpresión (o subexpresión) en relación al control, menos probable será que el sujeto responda al tratamiento. Hay una serie de enfermedades en las cuales se sabe que el grado de sobreexpresión (o subexpresión) de ciertos polipéptidos diana, a los que se hace aquí referencia como "polipéptidos predictivos", es indicativo de si un sujeto desarrollará una enfermedad.

Por lo tanto, el método de detección de una molécula diana del compuesto TDFRP en una muestra puede ser usado como un método de predicción de si un sujeto desarrollará una enfermedad. Se determina el nivel del polipéptido predictivo relevante en una muestra adecuada de tejido o de sangre de un sujeto que se halla en riesgo de desarrollar la enfermedad y se compara con un control adecuado, *v.g.*, el nivel en sujetos que no tienen riesgo de desarrollar la enfermedad. El grado en el que se sobreexpresa (o subexpresa) el polipéptido predictivo en la muestra en comparación con el control puede ser predictivo de la probabilidad de que el sujeto desarrolle la enfermedad. Cuanto mayor sea la sobreexpresión (o subexpresión) en relación al control, más probable será que el sujeto desarrolle la enfermedad.

Los métodos aquí descritos pueden ser realizados, por ejemplo, utilizando kits diagnósticos preenvasados que incluyen al menos un reactivo de sonda, *v.g.*, el compuesto TDFRP aquí descrito, que puede ser convenientemente utilizado, *v.g.*, en ámbitos clínicos para diagnosticar a pacientes que exhiben síntomas o historia familiar de una enfermedad o afección en la que está implicada una molécula diana de compuesto TDFRP. Además, se puede

utilizar cualquier tipo de célula o tejido en el que se exprese la molécula diana del compuesto TDFRP en los ensayos pronósticos aquí descritos.

IX. Métodos de tratamiento

La invención proporciona métodos tanto profilácticos como terapéuticos de tratamiento de un sujeto que presenta riesgo de (o que es susceptible de padecer) un trastorno o que tiene un trastorno asociado a la expresión o actividad aberrante de un polipéptido TDF o de una molécula diana del compuesto TDFRP. El TDF y las moléculas diana de un compuesto TDFRP, tales como los receptores de TDF, desempeñan un papel en la diferenciación celular. La diferenciación celular es la característica central de la morfogénesis de tejidos. La morfogénesis de tejidos es un proceso implicado en los mecanismos de reparación y regeneración de los tejidos adultos. El grado de morfogénesis en el tejido adulto varía entre diferentes tejidos y se relaciona, entre otras cosas, con el grado de renovación celular en un tejido dado.

Las proteínas morfogenéticas óseas son miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta. Ozkaynak *et al.* (EMBO J. 9: 2085-2093, 1990) purificaron un nuevo homólogo de proteína osteogénica bovina, al que denominaron 'proteína osteogénica 1' (OP-1; también conocida como BMP-7). Los autores usaron secuencias peptídicas para clonar los clones genómicos y de ADNc humanos de OP-1, posteriormente denominada BMP-7. Los ADNc de BMP-7 predecían un polipéptido de 431-aminoácidos que incluye una secuencia de señal secretora. Los compuestos TDFRP aquí descritos son miméticos estructurales de las regiones biológicamente activas de las proteínas morfogénicas óseas, por ejemplo, aunque sin limitación, BMP-7 (OP-1) y péptidos relacionados. Las regiones biológicamente activas incluyen, por ejemplo, las regiones Finger 1 y Finger 2 de BMP-7. Groppe *et al.* (Nature 420: 636-642, 2002) describieron la estructura cristalina del antagonista Noggin (602991) unido a BMP-7.

Los compuestos TDFRP son útiles para tratar enfermedades y trastornos que pueden ser llevados a tratamiento con polipéptidos BMP. Las referencias resumidas en la Tabla 2 y la Tabla 3, así como las siguientes referencias, describen ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar la eficacia de los polipéptidos TDF, *v.g.*, BMP-7, o derivados, en la profilaxis y el tratamiento de diversos estados de enfermedad. Estos ensayos son apropiados para determinar la actividad biológica de los compuestos TDFRP aquí desvelados. Como tales, los compuestos TDFRP de la invención son útiles para alterar, *v.g.*, inhibir o acelerar, la capacidad para reparar y regenerar tejidos y órganos enfermos o dañados, así como para tratar trastornos asociados a TDF. Como áreas particularmente útiles para la terapéutica humana y veterinaria basada en TDFRP, se incluyen la cirugía reconstructiva, el tratamiento de enfermedades degenerativas de los tejidos, incluyendo, por ejemplo, la enfermedad renal, el traumatismo encefálico, el accidente cerebrovascular, la aterosclerosis, la artritis, el enfisema, la osteoporosis, la cardiomiopatía, la cirrosis, las enfermedades nerviosas degenerativas, las enfermedades inflamatorias y el cáncer, y la regeneración de tejidos, órganos y miembros. Los compuestos TDFRP de la invención pueden también ser usados para promover o inhibir el crecimiento y la diferenciación del tejido muscular, óseo, cutáneo, epitelial, cardíaco, nervioso, endocrino, vascular, cartilaginoso, periodontal, hepático, retiniano y conectivo, o cualquier tejido en el que se expresen moléculas diana de compuestos TDRFP funcionales. Por consiguiente, como enfermedades asociadas a una expresión aberrante del polipéptido TDF o de las moléculas diana del compuesto TDFRP, se incluyen infecciones víricas, cáncer, curación, trastornos neurodegenerativos, *v.g.*, enfermedad de Alzheimer, trastorno de Parkinson, trastornos inmunes y trastornos óseos. Por ejemplo, las composiciones terapéuticas basadas en TDFRP son útiles para inducir la curación regenerativa de defectos óseos, tales como fracturas, así como para preservar o restaurar las propiedades metabólicas sanas en tejido enfermo, *v.g.*, tejido óseo osteopénico.

Marker *et al.* (Genomics 28: 576-580, 1995) estudiaron la distribución de transcriptos de BMP-7 en diversos sitios anatómicos alterados por mutaciones del síndrome de Holt-Oram (142900). Vieron expresión de BMP-7 en todas las estructuras que se encuentran alteradas en los pacientes de Holt-Oram, incluyendo el corazón, los miembros anteriores proximales y distales, la clavícula y la escápula, así como otros tejidos no afectados.

Solursh *et al.* (Biochem. Biophys. Res. Commun. 218: 438-443, 1996) examinaron la expresión durante el desarrollo y temporal de OP-1 por hibridación con secciones histológicas de embriones de rata durante un período de 3 días, que comprendía desde los estadios de la línea primitiva hasta los estadios precoces de los primordios de los miembros. Se detectó expresión de OP-1 en el neuroepitelio de la vesícula óptica el día E11,5 y ésta se limitaba a la placoda hipotética neural, de la retina y del cristalino en desarrollo. Desde E12,5 hasta E13,5, vieron expresión en la retina neural, el cristalino y la córnea en desarrollo.

You y Kruse (Invest. Ophthal. Vis. Sci. 43: 72-81, 2002) estudiaron la diferenciación de los miofibroblastos de la córnea y la transducción de señal inducida por los miembros de la familia TGF-β activina A y BMP-7. Vieron que la activina A inducía fosforilación de SMAD2 y BMP-7 inducía SMAD1, las dos de las cuales eran inhibidas por folistatina. Las proteínas TGF-β tienen diferentes funciones en la córnea.

Los compuestos TDFRP pueden ser usados en la profilaxis o el o tratamiento de la aterosclerosis coronaria (FIG. 19-20). La inducción de BMP y la posterior inhibición del crecimiento de las células musculares lisas vasculares y/o inducción de la formación ósea vascular pueden contribuir a los mecanismos mediante los cuales las estatinas aumentan la estabilidad de la placa en pacientes con aterosclerosis coronaria (Emmanuele *et al.*, Biochem Biophys

Res Commun. 28 Feb. 2003; 302(1): 67-72). Además, los estudios de Davies *et al.*, (J Am Soc Nephrol. Jun. 2003; 14(6): 1559-67) son consistentes con la deficiencia en BMP-7 como factor fisiopatológico en la insuficiencia renal crónica, y demuestran su eficacia como tratamiento potencial de la calcificación vascular.

Los compuestos TDFRP pueden ser usados para tratar el cáncer, *v.g.*, el cáncer de mama y el cáncer de próstata (FIG. 3). Schwalbe *et al.*, (Int J Oncol. Jul. 2003; 23(1): 89-95) analizaron muestras de tejido normal y de tejido tumoral mamario de 170 carcinomas ductales invasivos de la mama por inmunohistoquímica. Se observó expresión de BMP-7 en el tejido mamario normal en los primordios terminales, pero no en el conducto galactóforo. Se detectó proteína BMP-7 en la totalidad de las 170 muestras tumorales. La expresión de BMP-7 guardaba una gran correlación con los niveles de receptores de estrógenos (p</=0,01) y los niveles de receptores de progesterona (p</=0,01), que son importantes marcadores para el pronóstico y la terapia del cáncer de mama. Además, Masuda *et al.*, (Prostate. 1 Mar. 2003; 54(4): 268-74) demostraron una mayor expresión de la proteína morfogenética ósea 7 en el cáncer de próstata metastático a hueso.

Los compuestos TDFRP pueden ser usados para tratar la disfunción, la enfermedad y la lesión renal, *v.g.*, obstrucción ureteral, insuficiencia renal aguda y crónica, fibrosis renal y nefropatía diabética. Klar, S., J. Nephrol. Mar.-Abr. 2003; 16(2): 179-85 demostraron que el tratamiento con BMP-7 reducía significativamente la lesión renal en un modelo en rata de obstrucción ureteral (OUU) cuando se iniciaba el tratamiento en el momento de la lesión. Posteriores estudios sugirieron que el tratamiento con BMP-7 también atenuaba la fibrosis renal cuando se administraba después de haberse iniciado la fibrosis renal. También se vio que este protocolo de tratamiento aumentaba significativamente la función renal con respecto a los niveles medidos en el grupo tratado con vehículo. BMP-7 también revertía parcialmente la nefropatía diabética inducida en ratas por una sola dosis de estreptozotocina. Restauraba el índice de filtración glomerular (IFG), disminuía la excreción de proteína y restauraba la histología hacia la normalidad. Se puede usar TDFRP en la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad renal, *v.g.*, insuficiencia renal crónica (FIG. 4-12). Los estudios de Klahr *et al.*, (Kidney Int Suppl. Mayo 2002; (80): 23-6) indican que la administración de BMP-7 mantiene y restaura la función y la estructura del riñón en animales con obstrucción ureteral y nefropatía diabética.

Los compuestos TDFRP pueden ser usados en la profilaxis o el tratamiento de la nefropatía diabética (FIG. 8). Wang *et al.*, (Kidney Int. Jun. 2003; 63(6): 2037-49) han mostrado que BMP-7 revertía parcialmente la hipertrofia renal de inducción diabética, restaurando el IFG, la excreción de albúmina en orina y la histología glomerular hacia la normalidad. La restauración de la expresión de BMP-7 se asociaba a una eficaz reacción de reparación y a una reversión de la respuesta nefasta a la lesión.

Los compuestos TDFRP pueden ser usados en la profilaxis o el tratamiento de la fibrosis renal (FIG. 7). Se vio recientemente que la administración exógena de proteína morfogenética ósea humana (BMP)-7 recombinante mejoraba la fibrosis renal glomerular e intersticial en roedores con enfermedades renales experimentales (Wang y Hirschberg, Am J Physiol Renal Physiol. Mayo 2003; 284(5): F1006-13).

El síndrome de Alport es un trastorno genético resultante de mutaciones en genes de colágeno de tipo IV. El defecto da lugar a cambios patológicos en las membranas basales del glomérulo renal y del oído interno. En el riñón, la glomerulonefritis progresiva culmina en fibrosis tubulointersticial y muerte. Usando modelos génicos de ratones con gen eliminado, se ha visto que dos rutas diferentes, una mediada por el factor de crecimiento transformante (TGF)-β1 y la otra por la integrina alfa1beta1, afectan a la patogenia glomerular de Alport de maneras distintas. Los ARNm codificantes de TGF- β1 (tanto en ratones como en humanos), entactina, fibronectina y las cadenas alfa1(IV) y alfa2(IV) del colágeno resultan significativamente inducidos en el riñón total en función de la progresión de la enfermedad renal de Alport. Se observa la inducción de estos ARNm específicos en los podocitos glomerulares de animales con enfermedad avanzada. Se ve que el colágeno de tipo IV, la laminina-1 y la fibronectina están elevados en el intersticio tubular a las 10 semanas, pero no a las 6 semanas, lo que sugiere que la expresión elevada de ARNm específicos en Northern blots refleja sucesos asociados a fibrosis tubulointersticial. Por lo tanto, la acumulación concomitante de ARNm codificantes de TGF-β1 y de componentes de la matriz extracelular en los podocitos de los riñones enfermos puede reflejar sucesos clave en la progresión de la enfermedad renal de Alport. Es importante el hecho de que TGF-β1 parece tener un papel crítico en el daño tanto glomerular como tubulointersticial asociado al síndrome de Alport. Recientemente, se ha implicado a BMP-7 en la reversión de la patología renal causada por TGF-β en la progresión de la enfermedad renal de Alport. BMP-7 inhibe la desdiferenciación de las células epiteliales tubulares, la transformación mesenquimal y la apoptosis estimuladas por diversas lesiones renales. También preserva la integridad glomerular e inhibe la acumulación de matriz mesangial mediada por la lesión. BMP-7 puede ser un poderoso nuevo agente terapéutico para la enfermedad renal crónica, con el nuevo atributo de no sólo tratar la propia enfermedad renal, sino de también inhibir directamente algunas de las complicaciones más importantes del síndrome de Alport.

Los compuestos TDFRP pueden ser usados para facilitar la reparación de los tejidos. Grande *et al.*, (J Bone Joint Surg Am. 2003; 85-A Supl. 2:111-6) demostraron que la adición del gen BMP-7 o del gen Shh aumentaba significativamente la calidad del tejido reparado, para dar como resultado una superficie mucho más lisa y un cartílago de aspecto más hialino. Había, sin embargo, una notable diferencia en la persistencia de la fase de

cartílago entre el grupo que recibió el gen Shh y el grupo que recibió el gen BMP-7, pareciendo que el compartimento subcondral en este último grupo se remodelaba con hueso mucho más rápidamente

Los compuestos TDFRP pueden ser usados en la profilaxis o el tratamiento de enfermedades de la cavidad oral, *v.g.*, afectando al remate directo de moléculas bioactivas o induciendo la formación de dentina reparadora y la mineralización de la pulpa de la corona o de la raíz (Goldberg *et al.*, Am J Dent. Feb. 2003; 16(1): 66-76). Además, los TDFRP pueden ser usados en la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad periodontal. Las lesiones óseas tratadas por suministro del gen Ad-BMP-7 demostraron una rápida crondrogénesis, con posterior osteogénesis, cementogénesis y formación predecible de puentes en los defectos óseos periodontales. Estos resultados demuestran una evidencia eficaz de la ingeniería de tejidos periodontales usando transferencia génica *ex vivo* de BMP y ofrecen un nuevo enfoque para la reparación de defectos periodontales (Jin *et al.*, J Periodontol. Feb. 2003; 74(2): 202-13). Los compuestos TDFRP pueden ser usados en la profilaxis o el tratamiento de la lesión encefálica traumática, *v.g.*, accidente cerebrovascular, véase, *v.g.*, Cairns y Finkelstein, Phys Med Rehabil Clin N Am. Feb. 2003; 14(1 Supl.): S135-42). La administración intravenosa de BMP-7 tras una isquemia mejora la función motora en ratas con accidente cerebrovascular (Chang *et al.*, Stroke. Feb. 2003; 34(2): 558-64) y los compuestos TDFRP pueden proteger frente a, o reparar, la lesión por reperfusión. Además, Chang et. al. (Neuropharmacology, Sep. 2002; 43(3): 418-26) han demostrado que las proteínas morfogenéticas óseas están implicadas en la neuroprotección inducida por trasplante de tejido renal fetal en ratas con accidente cerebrovascular. Se puede prolongar la rehabilitación tras la reparación de cartílago basada en células, para dar lugar a una menor productividad y calidad de vida del paciente, tratando a un sujeto con compuestos TDFRP. La implantación de condrocitos genéticamente modificados que expresan BMP-7 acelera la aparición de tejido de reparación de tipo hialino en defectos de cartílago experimentales, y eso podría ser importante en la homeostasis del cartílago (Hidaka *et al.*, J Orthop Res. Jul. 2003; 21(4): 573-83). El sinovio es un tejido delgado que reviste las superficies no articulares de las articulaciones diartrodiales. Los tejidos sinoviales contienen diversos tipos de células, incluyendo células de tipo A, células de linaje macrofágico y células de tipo B, que son fibroblastos sinoviales especializados. Se reconoce ahora ampliamente que los tejidos sinoviales están implicados primariamente en la patogénesis de los trastornos articulares artríticos por producción de enzimas degeneradoras de la matriz y de citoquinas proinflamatorias. La evidencia acumulada sugiere que los miembros de la superfamilia TGF-beta tienen un papel esencial en el desarrollo del hueso y del cartílago. Wozney y colaboradores (Wozney, J.M. (1989), Prog. Growth factor Res. 1: 267-280) reportaron que las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) inducen la formación precoz del cartílago. Recientemente, se ha visto que la señalización ALK3 que media en la acción de las BMP tiene papeles tanto estimuladores como reguladores en la condrogénesis para inducir la diferenciación condrogénica de las células fibroblásticas sinoviales (Seto *et al.* (2004), J.Clin. Invest. 113: 718-726). Aquellos compuestos que se unen a ALK3, un receptor de tipo I para BMP, son por lo tanto analizados para examinar si inducen diferenciación condrogénica que dé lugar a una deposición de la matriz extracelular en células madre mesenquimales derivadas de la membrana sinovial. De los compuestos de SEC. Nº ID.: 16, 33, 45, 217 y 221 estudiados, los compuestos de SEC. Nº ID.: 221 y 16 aumentaban significativamente la deposición de la matriz extracelular. Los compuestos TDFRP han sido examinados en ensayos de condrogénesis *ex vivo* y de cultivo celular que podrían tener relevancia en aplicaciones de osteoartritis y en la reparación, la protección y/u la homeostasis del cartílago (FIG. 13).

Los compuestos TDFRP pueden ser usados en ingeniería de tejidos óseos. Lu *et al.*, (Biochem Biophys Res Commun. 13 Jun. 2003; 305(4): 882-90 han mostrado la eficacia de una matriz de polímero BMP en la inducción de la expresión del fenotipo osteoblástico por células derivadas de músculo y presentan un nuevo paradigma para la ingeniería de tejidos óseos. Los compuestos TDFRP pueden ser usados en el trasplante óseo (Rees y Haddad, Hosp Med. Abr. 2003; 64(4): 205-9). Los TDFRP pueden también ser usados para promover la curación del hueso. Maniscalco *et al.*, (Acta Biomed Ateneo Parmense. 2002; 73(1-2): 27-33) verifican el potencial terapéutico de esta proteína BMP-7 en fracturas cerradas de tibia recientes, usando BMP-7 asociada a osteosíntesis por medio de un fijador externo monolateral. Además, los compuestos TDFRP pueden ser usados en la regeneración del tejido óseo, *v.g.*, cirugía reconstructiva de la cadera. Cook *et al.*, (J Arthroplasty. Dic. 2001; 16(8 Supl. 1): 88-94) demostraron que el uso de BMP-7 conjuntamente con hueso canceloso fragmentado y aloinjerto de varilla cortical en modelos preclínicos mejoraba dramáticamente la actividad biológica del injerto, para dar como resultado una formación de nuevo hueso y una incorporación del injerto mayores y más precoces. El uso clínico de BMP-7 en los procedimientos reconstrucitivos de la cadera también daba lugar a una mayor y más precoz formación de nuevo hueso en el ambiente biológico más retador en comparación con el aloinjerto de hueso solo.

Los compuestos TDFRP pueden ser usados para tratar defectos esqueléticos; *v.g.*, los defectos esqueléticos adquiridos y congénitos surgen como consecuencia de un traumatismo y de anormalidades del desarrollo, así como de la cirugía por ablación del cáncer. Rutherford *et al.*, (Drug News Perspect. Ene.-Feb. 2003; 16(1): 5-10) discuten los avances recientes en la terapia con el gen de la proteína morfogenética ósea 7 *ex vivo* para la regeneración esquelética localizada que abordan estas limitaciones.

Los compuestos TDFRP pueden ser usados en la profilaxis o el tratamiento de trastornos de la hematopoyesis. Los estudios de Detmer y Walker (Cytokine. 7 Ene. 2002; 17(1): 36-42) indican que las BMP individuales forman parte del complemento de citoquinas reguladoras del desarrollo de progenitores hematopoyéticos, y en particular, señalan un papel para la BMP-4 en el control de la eritropoyesis definitiva, así como de la embrionaria. Los compuestos TDFRP han demostrado modular la producción de citoquinas en diversas poblaciones celulares (*v.g.* líneas celulares

HK-2, cardiomiocitos, tejidos renales), reparar el daño renal y/o proteger a los riñones de la lesión, lo que puede afectar a la regulación y producción de células progenitoras hematopoyéticas y factores de crecimiento (FIG. 14).

Los compuestos TDFRP pueden ser usados en el tratamiento de trastornos de la reproducción, *v.g.*, esterilidad. Zhao *et al.* (Dev Biol. 1 Dic. 2001; 240(1): 212-22) demostraron que la mutación en BMP-7 exacerba el fenotipo de mutantes BMP-8a en la espermatogénesis y el epidídimo. Indican que, de forma similar a BMP-8a, BMP-7 tiene un papel en el mantenimiento de la espermatogénesis y en la función del epidídimo, y además sugieren que BMP-8 y BMP-7 señalizan a través de los mismos o similares receptores en estos dos sistemas.

X. Enfermedad y trastornos

Las enfermedades y trastornos que se caracterizan por un aumento en los niveles (en relación a un sujeto que no sufre la enfermedad o trastorno) o en la actividad biológica de los polipéptidos TDF o de las moléculas diana de los compuestos TDFRP pueden ser tratados con compuestos terapéuticos basados en TDFRP que antagonizan (es decir, reducen o inhiben) la actividad, que pueden ser administrados de un modo terapéutico o profiláctico. Como compuestos terapéuticos que pueden ser utilizados, se incluyen, aunque sin limitación: (i) un compuesto TDFRP antes mencionado, o análogos, derivados, fragmentos u homólogos del mismo; (ii) anticuerpos anti-compuestos TDFRP para un péptido antes mencionado; (iii) ácidos nucleicos codificantes de un compuesto TDFRP; (iv) administración de ácido nucleico antisentido y ácidos nucleicos que son "disfuncionales" (es decir, debido a una inserción heteróloga en las secuencias codificantes de secuencias codificantes para un compuesto TDFRP) que se utilizan para "eliminar" la función endógena del compuesto TDFRP por recombinación homóloga (véase, *v.g.*, Capecchi, 1989. Science 244: 1288-1292); o (v) moduladores (es decir, inhibidores, agonistas y antagonistas, incluyendo peptidomiméticos adicionales de la invención o anticuerpos específicos para un péptido de la invención), que alteran la interacción entre un compuesto antes mencionado y su compañero de unión.

Las enfermedades y trastornos que se caracterizan por una reducción en los niveles (en relación a un sujeto que no sufre la enfermedad o trastorno) o en la actividad biológica del TDF o de la molécula diana del compuesto TDFRP pueden ser tratados con compuestos terapéuticos basados en TDFRP que aumentan (es decir, que son agonistas de) la actividad del TDF. Los agentes terapéuticos que regulan a más la actividad pueden ser administrados de un modo terapéutico o profiláctico. Como agentes terapéuticos que pueden ser utilizados, se incluyen, aunque sin limitación, compuestos TDFRP o análogos, derivados, fragmentos u homólogos de los mismos, o un agonista que aumente la biodisponibilidad.

Se puede detectar fácilmente un aumento o una disminución en los niveles cuantificando los péptidos y/o el ARN inducidos por TDF, obteniendo una muestra de tejido del paciente (*v.g.*, de tejido de biopsia) y estudiándola *in vitro* en cuanto a los niveles de ARN o péptidos y a la estructura y/o actividad de los péptidos expresados (o ARNm de un péptido antes mencionado). Como métodos bien conocidos en la técnica, se incluyen, aunque sin limitación, inmunoensayos (*v.g.*, por análisis Western blot, inmunoprecipitación seguida de electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio (SDS) poliacrilamida, inmunocitoquímica, *etc.*) y/o ensayos de hibridación para detectar la expresión de ARNm (*v.g.*, ensayos Northern, dot blots, hibridación *in situ* y similares).

A. Métodos profilácticos

En un aspecto, la invención proporciona un método para prevenir, en un sujeto, una enfermedad o afección asociada a una expresión o actividad aberrante de los polipéptidos TDF o de las moléculas diana del compuesto TDFRP, mediante administración al sujeto de un compuesto TDFRP o mimético de compuesto TDFRP que modula la expresión de los polipéptidos TDF o de las moléculas diana del compuesto TDFRP o al menos una actividad de los polipéptidos TDF o de las moléculas diana del compuesto TDFRP.

Los sujetos que presentan riesgo de una enfermedad que está causada por, o a la que contribuye, una expresión o actividad aberrante de los polipéptidos TDF o de las moléculas diana del compuesto TDFRP pueden ser identificados, por ejemplo, por cualquiera o por una combinación de ensayos diagnósticos o pronósticos como aquí se describe. Se puede producir la administración de un compuesto profiláctico antes de la manifestación de los síntomas característicos de la aberración, de tal forma que se previene o, de manera alternativa, se retrasa la progresión de una enfermedad o trastorno. Dependiendo del tipo de aberración, por ejemplo, se puede usar un compuesto TDFRP, un mimético de compuesto TDFRP o un anticuerpo anti-compuesto TDFRP, que actúa como un compuesto agonista de TDF o antagonista de TDF, para tratar al sujeto. Se puede determinar el compuesto apropiado en base a ensayos de cribado aquí descritos.

B. Métodos terapéuticos

Otro aspecto de la invención incluye métodos de modulación de la expresión o actividad de los polipéptidos TDF o de las moléculas diana del compuesto TDFRP en un sujeto con fines terapéuticos. El método modulador de la invención conlleva el contacto de una célula con un compuesto de la presente invención que modula una o más de las actividades del polipéptido TDF o la actividad de las moléculas diana del compuesto TDFRP asociadas a la célula. Se describe aquí un compuesto que modula una actividad de los polipéptidos TDF o de las moléculas diana

del compuesto TDFRP, tal como un ácido nucleico o un polipéptido, un ligando afín natural de un compuesto TDFRP, un compuesto TDFRP, un anticuerpo anti-compuesto TDFRP, un mimético de compuesto TDFRP o una molécula pequeña. En una realización, el compuesto estimula una o más actividades de los polipéptidos TDF o de las moléculas diana del compuesto TDFRP. Como ejemplos de dichos compuestos estimuladores, se incluyen un compuesto TDFRP y una molécula de ácido nucleico codificante de un compuesto TDFRP que se ha introducido en la célula. En otra realización, el compuesto inhibe una o más actividades de los polipéptidos TDF o de las moléculas diana del compuesto TDFRP, *v.g.*, anticuerpos anti-compuesto TDFRP. Estos métodos moduladores pueden ser llevados a cabo *in vitro* (*v.g.*, cultivando la célula con el compuesto) o, de manera alternativa, *in vivo* (*v.g.*, administrando el compuesto a un sujeto). Como tal, la invención proporciona métodos de tratamiento de un individuo afectado con una enfermedad o trastorno asociado a TDF caracterizado por la expresión o actividad aberrante de un polipéptido TDF o de una molécula diana del compuesto TDFRP o de moléculas de ácido nucleico que los codifican. En una realización, el método conlleva la administración de un compuesto (*v.g.*, un compuesto identificado mediante un ensayo de cribado aquí descrito) o de una combinación de compuestos que modula (*v.g.*, regula a más o regula a menos) la expresión o actividad de los polipéptidos TDF o de las moléculas diana del compuesto TDFRP. En otra realización, el método conlleva la administración de un compuesto TDFRP o de una molécula de ácido nucleico codificante de TDFRP como terapia para compensar la expresión o actividad reducida o aberrante de los polipéptidos TDF o de las moléculas diana del compuesto TDFRP.

La estimulación de la actividad de los polipéptidos TDF o de las moléculas diana del compuesto TDFRP es deseable en situaciones en las cuales el polipéptido TDF o la molécula diana del compuesto TDFRP está anormalmente regulada a menos y/o en las cuales es probable que un aumento en la actividad del TDF tenga un efecto beneficioso. Un ejemplo de dicha situación es cuando un sujeto tiene un trastorno caracterizado por proliferación y/o diferenciación celular aberrantes (*v.g.*, fibrosis).

C. Determinación del efecto biológico del agente terapéutico basado en TDFRP

En diversas realizaciones de la invención, se realizan ensayos adecuados *in vitro* o *in vivo* para determinar el efecto de un agente terapéutico basado en TDFRP específico y si su administración está indicada para el tratamiento del tejido afectado en un sujeto.

En diversas realizaciones específicas, se pueden realizar ensayos *in vitro* con células representativas del/de los tipo(s) implicado(s) en el trastorno del paciente, para determinar si un agente terapéutico basado en TDFRP dado ejerce el efecto deseado sobre el/los tipo(s) celular(es). Los compuestos para uso en terapia pueden ser estudiados en sistemas de modelos animales adecuados, incluyendo, aunque sin limitación ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos y similares, antes de realizar el estudio en sujetos humanos. De forma similar, para los estudios *in vivo*, se puede usar cualquiera de los sistemas de modelos animales conocidos en la técnica antes de la administración a sujetos humanos.

D. Usos profilácticos y terapéuticos de las composiciones de la invención

Los compuestos TDFRP de la presente invención son útiles en aplicaciones profilácticas y terapéuticas potenciales implicadas en una variedad de trastornos en un sujeto, incluyendo, aunque sin limitación: aquéllas en las que están implicados el desarrollo, la diferenciación y la activación de células óseas; en enfermedades o patologías de las células de la circulación sanguínea, tales como los eritrocitos y las plaquetas; diversos trastornos y/o patologías inmunológicas; enfermedades autoinmunes e inflamatorias; enfermedades cardiovasculares; enfermedades metabólicas; enfermedades de la reproducción, enfermedades renales, diabetes, traumatismo encefálico y crecimiento y metástasis cancerosa; infecciones víricas, terapia del cáncer, enfermedad periodontal; regeneración de tejidos; leucemia linfoblástica aguda; gliomas; enfermedades neurológicas; trastornos neurodegenerativos; enfermedad de Alzheimer; trastorno de Parkinson, y trastornos hematopoyéticos; véase también, *infra*, Métodos de tratamiento.

Como ejemplo, un ADNc codificante del compuesto TDFRP puede ser útil en terapia génica, y el compuesto TDFRP puede ser útil cuando se administra a un sujeto que lo necesite. A modo de ejemplo no limitativo, las composiciones de la invención tendrán eficacia para el tratamiento de pacientes que sufran de los trastornos antes mencionados.

Tanto el nuevo ácido nucleico codificante del compuesto TDFRP como el compuesto TDFRP, o sus fragmentos, pueden también ser útiles en aplicaciones diagnósticas. Otro uso es como molécula antibacteriana (es decir, se ha visto que algunos péptidos poseen propiedades antibacterianas). Estos materiales son además útiles en la generación de anticuerpos, que se unen inmunoespecíficamente a las nuevas substancias de la invención, para uso en métodos terapéuticos o diagnósticos en los que un polipéptido de la superfamilia TGF-beta se sobreexpresa o subexpresa en un sujeto.

Ejemplos

Ejemplo 1: Sistemas y métodos para el diseño racional de fármacos basado en la estructura y la síntesis de compuestos

Los compuestos TDFRP antes descritos son miméticos estructurales de las proteínas morfogénicas óseas, por ejemplo, aunque sin limitación, BMP-7 (OP-1) y BMP-2, más particularmente miméticos estructurales de las regiones biológicamente activas de estas proteínas *(v.g.*, finger 1, finger 2 y similares). Para una descripción de las condiciones de cristalización, de los métodos para obtener e interpretar las estructuras cristalinas resultantes y de discusiones sobre las regiones biológicamente activas de estas proteínas en base a modelos estructurales, véanse Griffith *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 23 Ene. 1996; 93(2): 878-83, y Scheufler *et al.*, J Mol Biol. 19 Mar. 1999; 287(1): 103-15, cada una de ellas incorporada a modo de referencia.

Los presentes compuestos TDFRP fueron diseñados y refinados, en parte, en base a modelos estructurales tales como la cristalografía de rayos x y la resonancia magnética nuclear, y las siguientes referencias (todas aquí incorporadas en su totalidad) son modelos adecuados para la cristalización, la preparación y el análisis estructural de los compuestos TDFRP aquí desvelados. Se describen métodos de diseño de fármacos basado en la estructura usando polipéptidos cristalinos en al menos las Patentes Estadounidenses Nº 6.329.184 y 6.403.330, ambas de Uppenberg. Se describen métodos para la utilización de topografía y difractometría de rayos x para mejorar el crecimiento del cristal de proteína en la Patente Estadounidense 6.468.346 de Amowitz *et al.* Se describen métodos y aparatos para seleccionar automáticamente reflexiones de Bragg, y sistemas para determinar automáticamente la orientación cristalográfica en la Patente Estadounidense Nº 6.198.796 de Yokoyama *et al.* Se describen métodos para la preparación y el marcaje de proteínas para RMN con ^{13}C, ^{15}N y ^{2}H para determinaciones estructurales en la Patente Estadounidense 6.376.253 de Anderson *et al.* Se describe la espectroscopia de RMN de proteínas grandes o complejas en la Patente Estadounidense Nº 6.198.281 de Wand *et al.* Se describe el uso de resonancia magnética nuclear para diseñar ligandos que se dirijan a biomoléculas en la Patente Estadounidense Nº 5.989.827 de Fesik *et al.*

Otro método útil para identificar compuestos TDFRP y para su posterior refinamiento es un método estadístico denominado Structure Variance Analysis™, que se describe en las Solicitudes de Patente Estadounidense y Europea US20040039543 y WO0237313, respectivamente, las cuales son aquí incorporadas como referencia. Brevemente, se clasifican secuencias homólogas como activas o inactivas en base a datos experimentales relacionados con una actividad bioquímica específica. Se usa esta información para desarrollar correlaciones positivas y negativas con la actividad de diversas propiedades fisicoquímicas en función de la posición de la secuencia. A medida que se sintetizan y estudian nuevas secuencias y se añaden los resultados al material formativo, se desarrolla un modelo cada vez más sólido del compuesto ideal. Se usa el modelo para predecir diseños de compuestos activos que tienen una creciente probabilidad de ser activos. El método reduce en gran medida la cantidad de experimentación necesaria para producir compuestos activos y se ha usado, en parte, para diseñar los presentes compuestos TDFRP aquí incluidos.

El procedimiento de diseño racional de fármacos de miméticos de las proteínas morfogenéticas óseas con resonancia magnética nuclear incluye las etapas de identificación de un compuesto TDFRP candidato que sea un ligando potencial para la molécula diana (tal como un receptor de TDF) usando espectroscopia de correlación bidimensional $^{15}N/^{1}H$-RMN; b) formación de un complejo binario uniendo el compuesto TDFRP candidato a la molécula diana, c) determinación de la estructura tridimensional del complejo binario y de este modo la orientación espacial del compuesto TDFRP candidato sobre la molécula diana. El procedimiento de diseño racional de fármacos de miméticos de las proteínas morfogenéticas óseas con cristalografía de rayos x es llevado a cabo de un modo similar, pero se obtienen primeramente los datos estructurales formando cristales del compuesto TDFRP candidato que es un ligando potencial para la molécula diana (o cocristales del complejo) y obteniendo un conjunto de datos de las reflexiones atómicas tras irradiación con rayos x. Estas técnicas son conocidas para los expertos en la técnica considerando las enseñanzas aquí proporcionadas.

Ejemplo 1: Preparación de H-Cys-Tyr-Tyr-Asp-Asn-Ser-Ser-Ser-Val-Leu-Cys-Lys-Arg-Tyr-Arg-Ser-OH (SEC. Nº ID.: 333)

Se preparó el péptido del título por síntesis peptídica en fase sólida sobre una resina Fmoc-Ser(tBu) usando los aminoácidos Fmoc/tBu como reactivos con la siguiente protección: tBu sobre Asp, Tyr y Ser; Trt sobre Asn y Cys; Boc sobre Lys; y Pbf sobre Arg. La cantidad inicial de la resina era de 6 g con una capacidad de substitución de 0,55 mmol/g (33 mmol). Se desprotegió dos veces la resina Fmoc-peptidilo usando piridina al 20%. Se realizó la copulación de Fmoc-aminoácido sobre la resina usando el método de copulación de DIC y HOBt. Se completaron todas las copulaciones en 1 a 2 horas. Se copularon los aminoácidos secuencialmente en el siguiente orden: Ser, Arg, Tyr, Arg, Lys, Cys, Leu, Val, Ser, Ser, Ser, Asn, Asp, Tyr, Tyr y Cys. Después del montaje de todos los aminoácidos, se secó la resina de peptidilo a vacío durante la noche. Se determinó el aumento de peso de la resina en 114,2 g, lo que indica una eficacia de copulación del 99%. Se escindió entonces la resina de peptidilo usando una solución de TFA / 1,2-etanodiol (EDT) / H_2O / TIS (90% / 5% / 4% / 1%, 10 ml/g) durante 3 horas. Tras la evaporación del TFA, se precipitó el péptido en éter diisopropílico frío, para obtener 69 g de material bruto, que fue

purificado por HPLC en una columna preparatoria empaquetada con 100 Angstroms-10 micras-C18 eluida con TFA al 0,1% en acetonitrilo/agua.

Ejemplo 2: Se prepararon los péptidos enumerados en la Tabla 8 usando las condiciones experimentales descritas en el Ejemplo 1, excepto por usar el aminoácido Fmoc/tBu protegido apropiado para obtener la secuencia peptídica deseada. Se usaron grupos protectores de alilo para proteger Dap y Asp, que podrían ser utilizados para formar lactama cíclica o carbamato cíclico.

Tabla 8

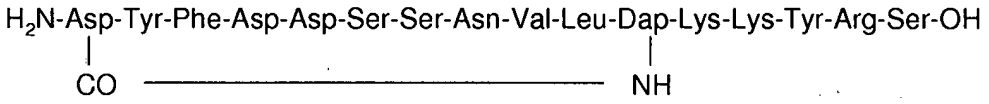
Secuencia	SEC. Nº ID.:
CYFDDSNNVLCKKYRS	(SEC. Nº ID.: 208)
CYFDDSSSVLCKKYRS	(SEC. Nº ID.: 209)
CYFNDSSNVLCKKYRS	(SEC. Nº ID.: 210)
CHFDDSSNVLCKKYRS	(SEC. Nº ID.: 211)
CYFDDSSNVLCKKYHS	(SEC. Nº ID.: 212)
CYFDDSSNVLCKKYRN	(SEC. Nº ID.: 213)
CYFDDSSNVLCKKHRS	(SEC. Nº ID.: 214)
CYFNDSSQVLCKKHRS	(SEC. Nº ID.: 215)
CYWDDSSNVLCKKYRS	(SEC. Nº ID.: 216)
CYYDDSSNVLCKKYRS	(SEC. Nº ID.: 217)
CYFDDSSQVLCKRYRS	(SEC. Nº ID.: 218)
CYYDDSSQVLCKRYRS	(SEC. Nº ID.: 219)
CYFNDSSDVLCKKYRS	(SEC. Nº ID.: 220)
CYFNDSSQVLCKRYRS	(SEC. Nº ID.: 221)
CYYDDSSNVLCKRYRS-NH_2	(SEC. Nº ID.: 222)
CYFDDSSNVLCKKYR	(SEC. Nº ID.: 223)
CYFDDSSNVLCKKY	(SEC. Nº ID.: 224)
KKYRS	(SEC. Nº ID.: 225)
KRYRS	(SEC. Nº ID.: 226)
CYFDDSSNCLIKKYRS	(SEC. Nº ID.: 227)
CYFDDSSNCLLKKYRS	(SEC. Nº ID.: 228)
CYFNDSSNCLLKKYRS	(SEC. Nº ID.: 229)
CYFDNSSNCLLKKYRS	(SEC. Nº ID.: 230)
CYFNNSSNCLLKKYRS	(SEC. Nº ID.: 231)
CYFDDSSQCLLKKYRS	(SEC. Nº ID.: 232)
CYYDDSSNCLLKKYRS	(SEC. Nº ID.: 233)
CYFDDSTNCLLKKYRS	(SEC. Nº ID.: 234)
CYFDDSSSCLLKKYRS	(SEC. Nº ID.: 235)
CYFDDSSNCALKKYRS	(SEC. Nº ID.: 236)
CYFDDSSNCLLKRYRS	(SEC. Nº ID.: 237)
CYFDDSSNCLLKKYRN	(SEC. Nº ID.: 238)
CYFDDSSNCLLKKYR	(SEC. Nº ID.: 239)
CYFDDSSNCLAKKYRS	(SEC. Nº ID.: 240)
CYFDDSSNCLLKKY	(SEC. Nº ID.: 241)
CYFDDSSNCLLKKYRS-NH_2	(SEC. Nº ID.: 242)
CYFDDSSNVNvaCKKYRS	(SEC. Nº ID.: 243)
CYFDDSSNVAbuCKKYRS	(SEC. Nº ID.: 244)
CYFDDSSNVLCSRYKK	(SEC. Nº ID.: 245)
CLVNSSDDFYCKKYRS	(SEC. Nº ID.: 246)
KKYRSCLVNSSDDFYC	(SEC. Nº ID.: 247)
SRYKKCYFDDSSNVLC	(SEC. Nº ID.: 248)
SRYKKCLVNSSDDFYC	(SEC. Nº ID.: 249)
CYFDDSSNV-Nva-CKKYRS	(SEC. Nº ID.: 343)
CYFDNSSQVLCKRYRS	(SEC. Nº ID.: 344)
CYFDNSSSVLCKRYRS	(SEC. Nº ID.: 345)
CYFDDSSNVLCKKFRS	(SEC. Nº ID.: 346)

Ejemplo 3: Preparación de H-Cys-Tyr-Tyr-Asp-Asp-Ser-Ser-Ser-Val-Leu-Cys-Lys-Lys-Tyr-Arg-Ser-OH

Se disolvió el péptido bruto del Ejemplo 1 obtenido tras precipitación en éter diisopropílico en agua a una concentración de 3 mg/ml. Se ajustó el pH a entre 7 y 8 por adición de una solución 0,1M de carbonato de amonio y se dejó que procediera la oxidación durante la noche, para obtener el péptido disulfuro bruto, que fue purificado por

HPLC preparatoria en una columna empaquetada con 100 Angstroms-10 micras-C18 usando TFA al 0,1% en acetonitrilo/agua con un gradiente del 15-25% en 30 min., para obtener el péptido disulfuro deseado.

Ejemplo 4: Preparación de: H_2N-Asp-Tyr-Phe-Asp-Asp-Ser-Ser-Asn-Val-Leu-Dap-Lys-Lys-Tyr-Arg-Ser-OH



Se preparó el péptido H_2N-Asp-Tyr-Phe-Asp-Asp-Ser-Ser-Asn-Val-Leu-Dap-Lys-Lys-Tyr-Arg-Ser-OH (SEC. Nº ID.: 250) sobre la resina como se describe en el Ejemplo 2, donde las funcionalidades de cadena lateral del último Asp en la secuencia y de Dap están protegidas con grupos protectores de alilo. Después de haber ensamblado todos los aminoácidos, se eliminaron los grupos protectores de alilo agitando la resina en $CHCl_3$/ácido acético/N-metilmorfolina 95/5/2,5-v/v/v en presencia de 3 equiv. de tetrakistrifenilfosfinopaladio(0) bajo una atmósfera de argón durante 16 horas. Se lavó extensamente la resina con diclorometano (DCM), N-metilmorfolina (NMP), un 0,5% de N,N-diisopropiletilamina en NMP y sal sódica de ácido dietiltiocarbámico 0,02M en NMP, y luego con DCM para eliminar el catalizador de Pd. Se consiguió el cierre de anillo entre las cadenas laterales no protegidas de Dap y Asp sobre la resina con 3 equiv. de hexafluorofosfato de benzotriazoliloxitris(dimetilamino)fosfonio/N-hidroxibenzotriazol en presencia de 9 equiv. de N,N-diisopropiletilamina en NMP durante 16 horas. Se escindió el péptido de la resina con TFA/agua/EDT 90/8/2 v/v/v a temperatura ambiente durante 3 horas y se precipitó con éter diisopropílico frío. Se decantó el precipitado, se lavó con éter dietílico y se liofilizó. Se desaló el péptido liofilizado bruto por cromatografía de exclusión por tamaños en Sephadex LH 20 y se purificó por HPLC preparatoria en una columna empaquetada con C_{18}, para obtener la lactama cíclica deseada.

Una vez determinada la estructura tridimensional de un compuesto TDFRP (o un refinamiento de la misma), se puede examinar su potencial terapéutico (como antagonista o agonista) mediante el uso de un modelo de ordenador empleando un programa de acoplamiento, tal como GRAM, DOCK o AUTODOCK. Como programas informáticos que pueden ser utilizados para ayudar a resolver la estructura tridimensional del compuesto TDFRP y sus complejos de unión, se incluyen QUANTA, CHARMM, INSIGHT, SYBYL, MACROMODE y ICM, MOLMOL, RASMOL y GRASP (Kraulis, J. Appl. Crystallogr. 24: 946-950 (1991)). La mayoría, si no todos, de estos programas y también de otros pueden también ser obtenidos de la World Wide Web a través de Internet. El diseño racional de compuestos TDFRP puede incluir el ajuste informático de agentes potenciales para el compuesto TDFRP para determinar cómo de bien la forma y la estructura química del compuesto TDFRP modificado complementarán o interferirán con la interacción entre el compuesto TDFRP y su ligando. También se pueden emplear programas informáticos para estimar la atracción, repulsión y bloqueo estérico del compuesto TDFRP terapéutico potencial hacia el sitio de unión a TDFR, por ejemplo. En general, cuanto mayor es el ajuste *(v.g.*, cuanto menor es el bloqueo estérico y/o cuanto mayor es la fuerza de atracción), más potente será el compuesto TDFRP terapéutico potencial, ya que estas propiedades son consistentes con una restricción de unión más estrecha. Además, cuanto mayor sea la especificidad en el diseño del compuesto TDFRP, más probable será que no interfiera con TDFR relacionados (*v.g.*, su especificidad para los receptores ALK3, pero no para los receptores ALK6, o viceversa). Esto minimizará los potenciales efectos colaterales debidos a interacciones no deseadas con otras dianas. Por ejemplo, los receptores ALK3 son más prevalentes en el tejido renal, mientras que los receptores ALK6 son más prevalentes en el tejido óseo; la proteína BMP-7 nativa se une a ALK6 con una mayor afinidad, y un potencial efecto colateral de la terapia con BMP-7 en la enfermedad renal es la osteogénesis. Los compuestos TDFRP pueden ser seleccionados y diseñados para una mayor especificidad hacia los receptores ALK3 y una menor afinidad hacia los ALK6, reduciendo así la osteogénesis no deseada en un sujeto que esté siendo tratado para trastornos renales.

Inicialmente, se puede obtener un compuesto TDFRP terapéutico potencial cribando una biblioteca peptídica aleatoria producida por bacteriófagos recombinantes, por ejemplo (Scott y Smith, Science, 249: 386-390 (1990); Cwirla *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 6378-6382 (1990); Devlin *et al.*, Science, 249: 404-406 (1990)), o una biblioteca química. Un compuesto TDFRP terapéutico candidato seleccionado de este modo es luego sistemáticamente modificado por programas de modelos informáticos hasta que se identifican uno o más compuestos TDFRP terapéuticos potenciales prometedores. Dicho análisis ha mostrado ser efectivo en el desarrollo de inhibidores de las proteasas del VIH (Lam *et al.*, Science 263: 380-384 (1994); Wlodawer *et al.*, Ann. Rev. Biochem. 62: 543-585 (1993); Appelt, Perspectives in Drug Discovery and Design 1: 23-48 (1993); Erickson, Perspectives in Drug Discovery and Design 1: 109-128 (1993)). Se puede encontrar un método basado en ordenador para clasificar y producir análogos de TDF-1 en la Publicación PCT WO/02/37313 de Keck, y es directamente relevante para la selección de compuestos TDFRP como aquí se describe.

Dichos modelos informáticos permiten la selección de un número finito de modificaciones químicas racionales, contrariamente al incontable número de modificaciones químicas esencialmente aleatorias que podrían hacerse, cualquiera de las cuales podría dar lugar a un fármaco de utilidad. Cada modificación química requiere etapas químicas adicionales, lo que, aun siendo razonable para la síntesis de un número finito de compuestos, rápidamente se vuelve abrumador si todas las modificaciones posibles tuvieran que ser sintetizadas. Por lo tanto, mediante el uso

del análisis estructural tridimensional aquí desvelado y de los modelos informáticos, se puede cribar rápidamente un gran número de estos compuestos TDFRP candidatos, y se pueden determinar unos cuantos compuestos TDFRP terapéuticos probablemente candidatos sin la laboriosa síntesis de números incalculables de compuestos TDFRP.

Los compuestos TDFRP terapéuticos candidatos pueden ser entonces estudiados en cualquier ensayo de unión estándar (incluyendo en ensayos de unión de alto rendimiento) en cuanto a su capacidad para unirse a un TDFRP o fragmento del mismo. De manera alternativa, se puede estudiar el fármaco potencial en cuanto a su capacidad para modular (ya sea inhibir o estimular) la actividad biológica de un TDFRP. Cuando se identifica un fármaco potencial adecuado, se puede realizar eventualmente un segundo análisis estructural sobre el complejo de unión formado entre el ligando y el compuesto TDFRP terapéutico candidato. Para todos los ensayos de cribado aquí descritos, generalmente serán necesarios más refinamientos de la estructura del compuesto TDFRP terapéutico candidato, y se pueden hacer mediante las iteraciones sucesivas de cualquiera y/o de todas las etapas provistas por el ensayo de cribado del fármaco particular, incluyendo además el análisis estructural por cristalografía de rayos x o RMN, por ejemplo.

Ejemplo 5: Ensayos *in vitro* para la actividad biológica

A. Ensayos de unión de receptores y radioligandos para ALK-3, ALK-6 y BMPR-2:

Protocolo general: Estos ensayos se basan en la competición entre TDF-1 (BMP-7 o OP-1) marcado con ^{125}I y los compuestos TDFRP candidatos o TDF-1 no marcado por la unión a los receptores respectivos (ALK-3, ALK-6 o BMPR-2). Brevemente, el procedimiento conlleva la inmovilización de receptor en placas Removawell de 96 pocillos, el bloqueo de los pocillos con BSA al 3% en PBS y el posterior lavado de los pocillos. Se añaden entonces concentraciones crecientes de TDF-1 no marcado o compuestos TDFRP o control TDF-1 no marcado) preparados en tampón de unión. Se incuba la placa durante 1 hora a temperatura ambiente y se añade después una cantidad fija de TDF-1 marcado con ^{125}I (de 250.000 a 350.000 cpm) a los pocillos y se vuelve a incubar en frío (4°C) durante 20 horas. Se aspiran los contenidos de los pocillos y se lavan los pocillos cuatro veces con un tampón de lavado, y se cuenta el TDF-1 marcado con ^{125}I unido al receptor en un contador gamma automático.

Usando este procedimiento, se valora la unión de los compuestos TDFRP a receptores ALK seleccionados. Por consiguiente, se pueden identificar compuestos TDFRP que se unen preferentemente a receptores ALK seleccionados. Por ejemplo, compuestos TDFRP que se unen preferentemente al receptor ALK-3 en comparación con la unión a otros receptores ALK, *v.g.*, ALK-6 (FIG. 1, 15).

B. Ensayo de fosfatasa alcalina basado en células de osteosarcoma de rata (ROS)

Las interacciones de BMP con receptores de Tipo I y Tipo II pueden inducir actividad fosfatasa alcalina, un marcador para la actividad osteoblástica, en células ROS. Se usó un procedimiento de ensayo como se ha descrito anteriormente (Maliakal, J.C., Asahina, I., Hauschka, P.V. y Sampath, T.K. (1994), Growth factors 11, 227-234) para determinar las actividades biológicas de los compuestos TDFRP. En un experimento típico, se plaquean células de osteosarcoma de rata (17/2,8) en placas de 96 pocillos (3,0 x 10^4 células/pocillo) y se incuban durante la noche a 37°C en una incubadora con un 5-6% de CO_2. Al día siguiente, se tratan las células sanas y confluentes con concentraciones crecientes de patrón de BMP-7 (1-10.000 ng/ml), que sirve como control positivo, o compuestos TDFRP (0,02-200 uM) preparados en medio que contiene un 1% de FBS y se incuban durante 2 días a 37°C en una incubadora con un 5-6% de CO_2. Se determina el contenido celular de actividad fosfatasa alcalina por el método de Reddi y Huggins (Reddi, A.H. y Huggins, C.B (1972), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1601-1605). Se realizan las estimaciones enzimáticas en placas de 96 pocillos. Tras la eliminación del medio de cultivo, se lavan las células con PBS precalentado (150 ul) y se incuban en 100 ul de Tritón X-100 al 1% precalentado durante 30 minutos a 37°C. Se centrifugan las placas durante 10 minutos a velocidad máxima y se estudian las muestras recuperadas (15 ul) en cuanto a la actividad enzimática añadiendo 90 ul de fosfato de p-nitrofenilo (Sigma) como substrato en tampón de glicina-NaOH 0,05 M, pH 9,3, e incubando durante 20 minutos a 37°C. Se detiene la reacción añadiendo 75 ul de NaOH 0,2 N/pocillo y se mide la absorbancia a 405/490 nm en un lector de placas Dynatech MR 700. Se expresan los resultados como actividades relativas en comparación con un patrón de BMP-7. Los compuestos TDFRP (SEC. Nº ID.: 15-21, 23-33, 41-43, 45, 65, 130, 208-219, 221) no indujeron actividad fosfatasa alcalina en ensayos con células ROS.

C. Ensayo de implante subcutáneo para la inducción ósea

BMP-7 induce formación de hueso en la rata cuando se implanta subcutáneamente mediante un procedimiento descrito en (Sampath, T.K., Maliakal, J.C., Hauschka, P.V. *et al.* (1992), J. Bio. Chem. 267, 20352-20362). Este ensayo es utilizado para valorar la capacidad de inducción ósea de los compuestos TDFRP. Se añaden 25 mg de matriz ósea desmineralizada a BMP-7 (serie de concentración) en 150 ul de acetonitrilo al 50%, TFA al 0,15%, se mezclan y se liofilizan después como control positivo para la actividad de inducción ósea. Se usa matriz ósea desmineralizada sola como control negativo. Se copulan covalentemente los compuestos TDFRP con hidrogel de alginato usando la reacción de carbodiimida. Se implantan 10 mg de compuesto copulado con alginato en el músculo de cada rata. Se retiran los implantes el día 14 para su evaluación. Se fijan los implantes en solución de

Bouin, se embeben en medio plástico JB4, se cortan en secciones de 1 um y se tiñen con azul de toluidina para su examen histológico. Los compuestos TDFRP seleccionados no exhiben actividades de inducción ósea en este ensayo.

D. Cultivo de células Hk-2 y determinación de la producción de citoquinas y de moléculas de adhesión

Se cultivaron las células HK-2 (Human Kidney-2) derivadas de PTEC inmortalizadas (número ATCC CRL-2190) en medio de queratinocitos libre de suero (GIBCO número 17005-042) suplementado con factor de crecimiento epidérmico (EGF: 5 ng/ml) y extracto de pituitaria bovina (40 ug/ml) durante 48 horas como se ha descrito previamente (Ryan *et al.* (1994), Kidney International 45: 48-57). Se transfirieron las células a placas de 24 pocillos a una densidad de $3x10^5$ células por pocillo. Después de 24 horas, se incubaron las células con medio fresco que contenía TNF-alfa (5 ng/ml) durante 20 horas. Los controles recibieron medio solo. Se lavaron entonces las células dos veces con medio de cultivo fresco y se volvieron a incubar con medio de cultivo solo (pocillos de control de medio y de control de TNF) o TDF-1 a tres concentraciones diferentes (40, 200 ó 1.000 ng/ml) o compuestos TDFRP a tres concentraciones diferentes (4, 20 ó 100 uM) durante sesenta horas. Durante la incubación, las células fueron mantenidas en una atmósfera húmeda con un 5% de CO_2 a 37°C. Al finalizar la incubación, se retiraron los medios y se guardaron congelados hasta su estudio. Se midieron las concentraciones de IL- 6, IL-8 y sICAM-1 en los sobrenadantes del cultivo por ELISA específico (FIG. 14).

E. ELISA para IL-6

Se diluye el anticuerpo de captura a la concentración de trabajo en PBS, pH 7,4, sin proteína transportadora. Se añaden 61 ul de anticuerpo stock (360 ug/ml) a 10,939 ml de PBS y se agita suavemente en vórtex. Se reviste una microplaca de 96 pocillos (Immulon 4 HBX) con 100 ul por pocillo del anticuerpo de captura diluido. Se sella la placa y se incuba durante la noche en frío (4°C). (PBS: Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4, filtrado a través de 0,2 um). Se vacían los pocillos y se lavan tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo. (Tampón de lavado: PBS, pH 7,4, que contiene un 0,05% de Tween-20).

Se prepara tampón de bloqueo (35 ml por placa) añadiendo 0,35 gramos de BSA y 1,75 gramos de sacarosa a 35 ml de PBS, pH 7,4, y se mezcla suavemente. Se añaden 300 ul de tampón de bloqueo a cada pocillo y se incuba durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente. Se vacían los pocillos y se lavan tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo.

Se prepara una curva patrón de 8 puntos usando diluciones seriadas de razón 2 en diluyente de reactivo. Se diluye IL-6 recombinante, 70 ng/ml, hasta una concentración inicial de 2.400 ng/ml en diluyente de reactivo y se vuelve a diluir después a un rango de trabajo, 1.200, 600, 300, 150, 75, 37,5, 18,75 y 9,375 ng/ml, usando diluyente de reactivo. (Se prepara el diluyente de reactivo con 0,4 gramos de BSA en 40 ml de PBS, pH 7,4, y se agita suavemente). Se diluyen 24 ul de cada muestra (de cultivos de células HK-2) con 376 ul de diluyente de reactivo. Se añaden 100 ul de patrón o de muestra por pocillo, se sella y se incuba durante la noche en frío (4°C). Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo. Se añaden 61 ul de anticuerpo de detección stock (0,1-10 ug/ml) a 10,939 ml en diluyente de reactivo y se agita en vórtex. Se añaden 100 ul de dilución de trabajo de anticuerpo de detección a cada pocillo. Se sella la placa y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo. Se prepara estreptavidina-HRP, 11 ml por placa, en diluyente de reactivo. Se añaden 55 ul de solución stock (# 890803, R&D Systems) a 10,945 ml de diluyente de reactivo y se agita suavemente en vórtex. Se añaden 100 ul de dilución de trabajo de estreptavidina-HRP a cada pocillo. Se sella la placa y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo. Se mezclan 5,5 ml de reactivo de color A (H_2O_2) con 5,5 ml de reactivo de color B (tetrametilbenzidina) (#DY999, R&D Systems). Se añaden 100 ul de solución de substrato a cada pocillo. Se cubre la placa y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 50 ul de solución de parada (H_2SO_4 2 N) a cada pocillo. Se determina la densidad óptica de cada pocillo inmediatamente usando un lector de microplacas (Dynex Revelation 4.22) fijado a 450 nm y con una corrección de longitud de onda a 550 nm.

F. ELISA para IL-8

El protocolo para el ELISA de IL-8 es similar a los métodos para IL-6 antes descritos con las siguientes modificaciones: no se incluye sacarosa en el tampón de bloqueo, se usan muestras de 200 ul y el rango de trabajo es de 4.000 pg/ml a 31,25 pg/ml.

G. ELISA para ICAM-1

Se diluye el anticuerpo de captura a la concentración de trabajo en PBS, pH 7,4, sin proteína transportadora. Se añaden 61 ul de anticuerpo stock (720 ug/ml) a 10,939 ml de PBS y se agita en vórtex. Se reviste una microplaca de 96 pocillos (Immulon 4 HBX) con 100 ul por pocillo del anticuerpo de captura diluido. Se sella la placa y se incuba durante la noche en frío (4°C). (PBS: Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4, filtrado a través de 0,2 um). Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo

(tampón de lavado: PBS, pH 7,4, que contiene un 0,05% de Tween-20). Se prepara tampón de bloqueo (35 ml por placa) añadiendo 0,35 gramos de BSA y 1,75 gramos de sacarosa a 35 ml de PBS, pH 7,4. Se añaden 300 ul de tampón de bloqueo a cada pocillo y se incuba durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo. Se prepara una curva patrón de 8 puntos usando diluciones seriadas de razón 2 en diluyente de reactivo. Se usa sICAM-1 recombinante, 55 ng/ml, como patrón de stock y se diluye a una concentración inicial de 2.000 ng/ml en diluyente de reactivo y a un rango de trabajo de: 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 y 7,813 ng/ml usando diluyente de reactivo. Se diluyen 160 ul de medio de cada muestra (de cultivos de células HK-2) con 240 ul de diluyente de reactivo. Se añaden 100 ul de patrón o de muestra por pocillo, se sella la placa y se incuba durante la noche en frío (4°C). Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo. Se añaden 61 ul de anticuerpo de detección stock (18 ug/ml) a 10,939 ml en diluyente de reactivo y se agita suavemente en vórtex. Se añaden 100 ul de dilución de trabajo de anticuerpo de detección a cada pocillo. Se sella la placa y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo. Se añaden 55 ul de solución stock de estreptavidina-HRP (# 890803, R&D Systems) a 10,945 ml de diluyente de reactivo y se agita suavemente en vórtex. Se añaden 100 ul de dilución de trabajo de estreptavidina-HRP a cada pocillo. Se sella la placa y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo. Se mezclan 5,5 ml de substrato de reactivo de color A (H_2O_2) con 5,5 ml de reactivo de color B (tetrametilbenzidina) (#DY999, R&D Systems). Se añaden 100 ul de solución de substrato a cada pocillo. Se cubre la placa y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 50 ul de solución de parada (H_2SO_4 2 N) a cada pocillo. Se determina la densidad óptica de cada pocillo inmediatamente usando un lector de microplacas (Dynex Revelation 4.22) fijado a 450 nm y con una corrección de longitud de onda a 550 nm.

H. Detección de apoptosis usando inmunotinción con anexina V

La apoptosis y la viabilidad celular son cuantificadas usando tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio de células HK-2 después de un tratamiento con cisplatina. Se cultivan células HK-2 derivadas de PTEC inmortalizadas (ATCC número CRL-2190) en medio de queratinocitos libre de suero (número GIBCO 17005-042) suplementado con EGF y BPE durante 48 horas (Ryan *et al.* 1994, Kidney Int 45:48-57). Se aspira el medio y se lavan las células con PBS y se incuban en obscuridad durante 15 min. a temperatura ambiente con 10 μl de agente de unión de medio y 1,25 μl de anexina V conjugada con FITC. Se añade yoduro de propidio (10 μl) y se analizan las muestras inmediatamente. Se realiza la cuantificación de las señales de anexina V-FITC y yoduro de propidio por microscopía de fluorescencia (Axiovert 135; Carl Zeiss). Se observan las imágenes de contraste de fase usando la luz transmitida. Las células apoptóticas muestran tinción citoplásmica y las células viables permanecen sin teñir (FIG. 17).

I. ELISA para Bax

Se diluye el anticuerpo de captura a una concentración de trabajo (se añaden 200 ul de PBS a un stock de 360 ug/ml) en PBS, pH 7,4 sin proteína transportadora. Se añaden 61,2 ul de anticuerpo stock (360 ug/ml) a 10,939 ml de PBS y se agita suavemente en vórtex. Se reviste una microplaca de 96 pocillos (Immulon 4 HBX) con 100 ul por pocillo del anticuerpo de captura diluido. Se sella la placa y se incuba durante la noche en frío (4°C). (PBS: Na_2HPO_4 8,1 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4, filtrado a través de 0,2 uM). Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 300 ul de tampón de lavado por pocillo. (Tampón de lavado: PBS, pH 7,4, que contiene un 0,05% de Tween-20). Se añade tampón de bloqueo (1% de BSA, 5% de sacarosa en PBS, pH 7,2-7,4) a 0,35 gramos de BSA y 1,75 gramos de sacarosa en 35 ml de PBS, pH 7,4, y se mezclan. Se añaden 300 ul de tampón de bloqueo a cada pocillo y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 300 ul de tampón de lavado por pocillo. Se genera una curva patrón de 8 puntos usando diluciones seriadas de razón 2 en diluyente (EDTA 1 mM, 0,005% de Tween 20, 0,5% de Tritón X-100 en PBS, pH 7,2-7,4). Se diluye Bax recombinante (270 ng/ml) a una concentración inicial de 20 ng/ml en diluyente y a un rango de trabajo de: 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 y 0,1562 ng/ml usando diluyente. Se añaden 100 ul de patrón o de muestra por pocillo, se sella y se incuba durante la noche a 4°C. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 300 ul de tampón de lavado por pocillo. Se añaden 100 ul de dilución de trabajo de anticuerpo de detección (11 ml por placa) a cada pocillo, se sella y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 300 ul de tampón de lavado por pocillo. Se añaden 55 ul de solución stock de estreptavidina-HRP (# 890803, R&D Systems) a 10,945 ml de diluyente y se agita suavemente en vórtex. Se añaden 100 ul de dilución de trabajo de estreptavidina-HRP a cada pocillo, se sella y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos tres veces, usando cada vez 300 ul de tampón de lavado por pocillo. Se prepara una solución fresca de substrato (11 ml por placa). Se mezclan 5,5 ml de reactivo de color A (H_2O_2) con 5,5 ml de reactivo de color B (tetrametilbenzidina) (#DY999, R&D Systems). Se añaden 100 ul de solución de substrato a cada pocillo, se cubre y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 50 ul de solución de parada (H_2SO_4 2 N) a cada pocillo. Se determina la densidad óptica de cada pocillo inmediatamente usando un lector de microplacas fijado a 450 nm y con una corrección de longitud de onda a 544 nm (FIG. 14).

I. Cultivo celular de cardiomiocitos y determinación de las actividades de citoquinas y apoptosis

Se cultivan cardiomiocitos primarios neonatales de rata (Cell Applications) en medio de cultivo de cardiomiocitos con

un 10% de suplemento de crecimiento (Cell Applications) durante 24 horas a 37°C, 5% de CO_2. Se priva a las células de suplemento de crecimiento durante 12 horas, seguido de tratamiento con doxorrubicina (333 nM) o con lipopolisacárido (LPS) (100 ng/ml) durante 24 h o 12 h, respectivamente. Los controles reciben el medio solo. Se incuban las células con medio de cultivo solo o con BMP-7 (143 nM) o con compuestos TDFRP a 4 diferentes concentraciones (4, 20, 100, 500 uM) durante 24-60 h. Se mantienen las células en una atmósfera húmeda con un 5% de CO_2 a 37°C. Al final de la incubación, se retira el medio condicionado y se estudia la fosforilación Akt en la Serina 473 o la actividad de la enzima Caspasa-3 según los protocolos del fabricante (Cell Signaling Technology o Calbiochem, respectivamente). Se mide la concentración de IL-6 de rata en los sobrenadantes del cultivo por ELISA específicos como se ha descrito anteriormente (FIG. 16).

J. Protocolo para detectar la fosforilación Akt S473

Se estudia la actividad antiapoptótica de los compuestos TDFRP usando el aumento en la fosforilación de Akt como marcador de la supervivencia de las células cardiomiocíticas después de un tratamiento con doxorrubicina. Se cultivan cardiomiocitos primarios neonatales de rata (Cell Applications) en medio con un 10% de suplemento de crecimiento (Cell Applications) durante 24 horas a 37°C, 5% de CO_2. Se priva a las células de suplemento de crecimiento durante 12 horas, seguido de tratamiento con doxorrubicina (333 nM) durante 24 h. Los controles reciben medio solo. Se incuban las células con medio de cultivo solo, con BMP-7 (143 nM) o con compuestos TDFRP a 4 concentraciones diferentes (4, 20, 100, 500 uM) durante 60 h para detectar la fosforilación Akt en la Serina 473 (Cell Signaling Technology). Se preparan lisados celulares en tampón de lisis del fabricante (10X) diluido 1:10 en agua Milli-Q, y se añade PMSF a una concentración final de 1 mM. Se usan 200 ul de tampón de lisis helado por pocillo de placa de 12 pocillos. Se incuban las células durante 10 min. a 4°C y se obtienen lisados celulares retirando el sobrenadante de los pocillos y aclarando por centrifugación a 10.000 rpm, 10 min. a 4°C. Se añaden 100 ul de cada dilución a las tiras de micropocillos (Cell Signaling Technology), se sella y se incuba durante la noche a 4°C. Se lavan los pocillos cuatro veces con 300 ul de tampón de lavado 1x. Se añaden 100 ul de anticuerpo de detección por pocillo y se incuba durante 1 h a 37°C. Se añaden 100 ul de anticuerpo secundario unido a HRP por pocillo y se incuba durante 30 min. a 37°C. Se añaden 100 ul de substrato TMB por pocillo y se incuba durante 30 min. a temperatura ambiente en obscuridad. Se detiene la reacción y se lee la absorbancia a 450 nM con un lector de microplacas (FIG. 16).

K Protocolo para detectar la actividad caspasa-3

Se determina la actividad antiapoptótica de los compuestos TDFRP examinando la capacidad para regular a menos la actividad caspasa-3 que resulta inducida por tratamiento con doxorrubicina o LPS de cardiomiocitos. La actividad caspasa-3 sirve como marcador de apoptosis. Se preparan lisados celulares en tampón de lisis del fabricante. Se usan 200 ul de tampón de lisis helado por pocillo de placa de 12 pocillos. Se incuban las células durante 10 min. a 4°C y se obtienen lisados retirando el sobrenadante de los pocillos y centrifugando a 10.000 rpm durante 10 min. a 4°C. Se añaden 50 ul de tampón de ensayo (Calbiochem) a cada pocillo y se añaden 40 ul de lisado y se mezclan. Se añaden 10 ul de substrato de caspasa-3 por pocillo y se lee la absorbancia a 405 nM en un lector de placas de microtitulación (FIG. 16).

L. Fosforilación de Smad

La fosforilación y la translocación nuclear de Smad se produce tras la activación los receptores de Tipo I y Tipo II y la posterior transducción de señal a las dianas intracelulares de Smad. Se estudia la fosforilación y la translocación nuclear de R-Smad en células HK-2 por los compuestos TDFRP por métodos de microscopía inmunofluorescente, usando anticuerpos anti-fosfo-Smad 1/5 según el procedimiento de H Aoki, M Fujii, T Imamura, K Yagi, K Takehara, M Kato y K Miyazono. J. of Cell Sci. 114, 1483-1489, 2001) y por análisis Western blot en diversos tipos celulares (FIG. 2, 3, 18, 27).

Se incuban células de los túbulos proximales humanos HK-2 en medio de cultivo solo o se las expone a TDFRP o compuestos de control durante una hora y diez minutos a 37 grados C. BMP-7 servía como control positivo en el ensayo. Se enjuaga cada pocillo con 1 ml de medio precalentado. Se añade 1 ml por pocillo de una mezcla fría de acetona/metanol (1:1) y se incuba durante 2 minutos a temperatura ambiente para fijar las células. Se lavan los pocillos con 1 ml de PBS frío y se bloquean con 1 ml de tampón de bloqueo (3% de BSA, 1% de suero de cabra en PBS) durante 7 minutos. Se aspiran los pocillos sin alterar las células y se añaden 500 ul/pocillo de anticuerpo primario (anti-fosfo-Smad 1) a 0,056 ug/ml de concentración en un 3% de BSA en PBS (sin suero de cabra). Se incuban las células durante la noche a 4 grados C. Se diluye anticuerpo secundario marcado con FITC 1:10 en un 1,5% de suero de cabra en PBS y se añaden 500 ul/pocillo de anticuerpo secundario y se incuba a temperatura ambiente durante 40 minutos en obscuridad. Se lavan los pocillos dos veces, cada una de ellas con 1 ml de PBS, y se observan las células con un microscopio fluorescente (FIG. 18).

Para la detección de la fosforilación de Smad por análisis Western, se exponen LNCaP (células de cáncer de próstata) o EC (células endoteliales vasculares) en medio de cultivo a concentraciones variables de TDFRP o compuestos de control. BMP-7 servía como control positivo. Se lisan las células en tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, NaCl 150 mM, 1% de NP-40, 0,5% de desoxicolato de sodio, 0,1% de SDS) que contenía PMSF 1

mM, ortovanadato de sodio 1 mM y 10 ug/ml de cóctel inhibidor de proteinasas. Se incuban los lisados en hielo durante 15 minutos, se centrifugan y se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio. Se usan de 50 a 100 ug para análisis por SDS-PAGE. Se electrotransfieren las proteínas resueltas a una membrana de PVDF. Se bloquea el blot incubando en leche deshidratada no grasa al 3% preparada en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación lenta constante. Se incuba el blot con 1-2 ug/ml de anticuerpo primario (anti-fosfo-Smad 1 de conejo) preparado en PBS-leche durante la noche con agitación a 4 grados C, se lava dos veces con PBS y se incuba con anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo conjugada con HRP, dilución 1:3000) a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación. Después de lavar en PBS-0,05% de Tween 20 durante 5 minutos y de enjuagar, se detecta la fosforilación de Smad mediante una reacción de HRP según las instrucciones del fabricante (FIG. 3, 27).

M. Ensayos *in vitro* para valorar la supresión tumoral

El cáncer de próstata es uno de los cánceres más comunes en hombres. Varias líneas de evidencia han sugerido que la proteína morfogenética ósea (BMP) inhibe la proliferación de células de cáncer de próstata humano sensibles a andrógenos (LNCaP) e insensibles a andrógenos (PC-3, DU-145). Además, se ha visto que las señales BMP inhiben el crecimiento y la proliferación de las células de tumores de próstata humanos por regulación a más del inhibidor de kinasa dependiente de ciclina (CDKI) p21 (CIP1/WAF1) y reducción de la actividad de Cdk2, lo que da lugar a hipofosforilación de proteínas Rb. Se han cribado compuestos TDFRP en bioensayos *in vitro* de cáncer de próstata y de vejiga para valorar la actividad inhibitoria del crecimiento de los compuestos (FIG. 3, 28). Se usa la incorporación de ^{3}H-timidina como marcador para la actividad de proliferación celular en líneas celulares de cáncer de próstata y vejiga humano. La cisplatina inhibe la incorporación de ^{3}H-timidina, lo que indica una actividad de supresión del crecimiento tumoral de la cisplatina en células de cáncer de próstata y de vejiga humano. Se estudian los compuestos TDFRP en estas células cancerosas en cuanto a la capacidad para inducir fosforilación de Smad 1/5 regulada por receptores de un modo dependiente de dosis (FIG. 3, 27, 28).

Ejemplo 6: Ensayos *in vivo* para medir la actividad biológica de los compuestos TDFRP

I. Investigación *in vivo* de la eficacia del compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) en el tratamiento de la lesión miocárdica consecutiva a una isquemia

Se investigó la eficacia del compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) en el mejoramiento de los efectos de la isquemia miocárdica en rata tras ligadura de la arteria coronaria. Se evaluaron 24 ratas no manipuladas, clasificadas en dos grandes grupos según el peso corporal inicial (>300 g antes de la cirugía). Catorce ratas fueron sometidas a cirugía la semana, 12 ratas fueron sometidas a cirugía la semana 2 y las ratas fueron clasificadas en 3 grupos de tratamiento: Grupo 1, PBS; Grupo 2, control positivo de TDF-1; Grupo 3, artículo de ensayo de TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) (véase la Tabla 13).

Tabla 13: THR 04-02: Número diana de animales para cada grupo de tratamiento

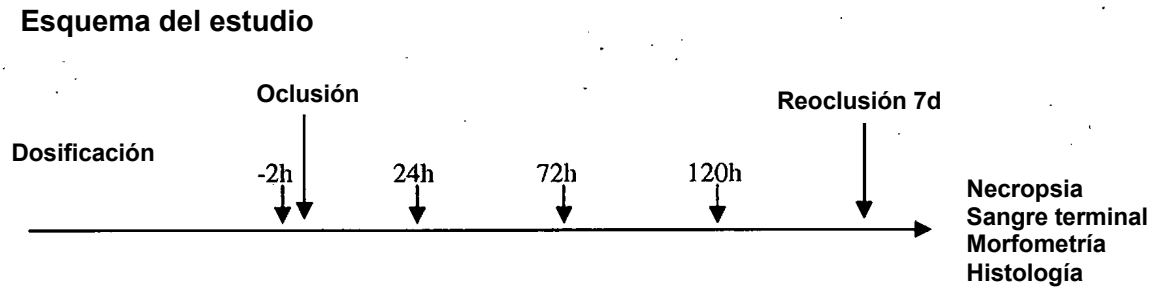
Grupo #	Compuesto de ensayo	Tamaño del grupo	Dosis/vía
1	Vehículo (control negativo)	N = 5	Igual volumen i.v.
2	TDF-1 (control positivo)	N = 3	160 μg/kg i.v. <5 ml/kg
3	TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) (artículo de ensayo)	N = 5	10 mg/kg i.v. <5 ml/kg

Tres días antes de la cirugía, se recogió una muestra de suero de la vena de la cola de cada rata (presangría). El día de la cirugía, se administró a cada rata compuesto por vía intravenosa 2 h antes de la cirugía. Se realizó la cirugía secuencialmente tras intubación y ventilación con anestésico isofluorano al 0,5%. Se monitorizó el ECG con derivación II a lo largo de toda la cirugía. Se practicó una toracotomía y se ocluyó la arteria coronaria izquierda principal durante 20 min. usando una técnica de snare (FIG. 19). Se confirmó que se había producido una oclusión eficaz de la arteria por la elevación del ST en el ECG de derivación II en los primeros 5 minutos de ligadura, y por la frecuente arritmia ventricular después de 10 minutos de ligadura. Se liberó el snare para restaurar el flujo de sangre. Se dejó en el sitio el lazo de sutura original para posterior reoclusión el Día 7. Tras el inicio de la reperfusión, se cerró la cavidad torácica con 2 capas de sutura. Se retiró a las ratas del ventilador y se las observó hasta que estuvieron totalmente conscientes y móviles. Se proporcionaron antibiótico (QD) y analgésico (Q8D). Se recogieron muestras de suero adicionales 6, 24, 72 y 120 horas después de la oclusión. Se suministraron tratamientos adicionales con compuesto, control positivo o vehículo por inyección intravenosa en la vena de la cola a las 24, 72 y 120 horas después de la oclusión.

El Día 7, se anestesió a cada rata (ketamina:xilina), se volvió a abrir la cavidad torácica y se retiró una muestra de sangre terminal (1 ml) de la vena abdominal. Se observó la patología macroscópica (es decir, inflamación) y se clasificó según una escala de inflamación de 4 puntos: 0 = sin inflamación, 1 = pericarditis ligera, 2 = moderada, 3 = severa y 4 = completa. Se reocluyó entonces la arteria coronaria izquierda usando la sutura existente y se inyectó una solución concentrada de colorante Azul de Evans en solución salina (20 mg/ml; 0,5 ml/rata) en la punta del corazón para teñir de azul el tejido cardíaco no isquémico. Se detuvo luego el corazón por inyección de una solución saturada de cloruro de potasio en el ventrículo derecho. Se extirpó entonces el corazón, se envolvió en celofán y se

guardó a -20°C durante 1,5 horas. Se cortó el corazón frío en 10 rodajas transversales (2 mm/rodaja) y se numeró cada sección y se incubó por separado en cloruro de trifeniltetrazolio (TTC al 1% en PBS) durante 10 minutos a 37°C antes de fijarla en formaldehído al 4%. A continuación, se fotografió cada rodaja. Para cada rodaja, se midieron el "área de riesgo (AR)" y el "área ocupada por necrosis (AN)" por morfometría. La razón de AN a AR es una medida del grado de daño resultante de la oclusión (FIG. 20).

Un 67% de los animales (16/24) sobrevivieron a la ligadura de la arteria coronaria y se les practicó una necropsia el día 7 después de la cirugía. Se confirmó cada oclusión por análisis de ECG durante la cirugía y finalmente tras la inyección de Azul de Evans el Día 7 en la necropsia. Todas las ratas, a excepción de una, demostraron una oclusión eficaz por el Azul de Evans en la necropsia (15/16). Se evaluaron un total de 6 animales tratados con PBS, 4 tratados con BMP-1 y 6 tratados con compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) en la necropsia. Se identificaban claramente áreas de infarto en todas las muestras de corazón y se realizó morfometría sobre la mayoría de las rodajas. Se observaron las diferencias relacionadas con el tratamiento en la patología macroscópica y la morfometría. Las ratas control tratadas con PBS mostraron una pericarditis más severa en la necropsia en comparación con una pericarditis menor en las ratas tratadas con cualquiera de los compuestos de ensayo. Los animales tratados con 10 mg/kg del compuesto mostraron una reducción del 84% en la razón AN/AR en comparación con los animales tratados con PBS, mientras que los animales tratados con 160 μg/kg de rhmBMP-7 (control positivo) tenían sólo una reducción del 7% en la razón AN/AR en comparación con los animales tratados con PBS. Además, los animales tratados con el compuesto mostraron una reducción del 78% en la puntuación de inflamación en comparación con los animales tratados con PBS (FIG. 20).



II. Modelos *in vivo* de accidente cerebrovascular

A. Isquema hipóxica severa

Se mide el efecto del compuesto TDFRP sobre el daño celular debido a lesión isquémica hipóxica severa mediante el método de Hughes y colaboradores (Hughes *et al.*, Methods of providing neuroprotection and/or neurorestoration via the neural activin type IIB receptor, Solicitud de Patente Estadounidense Nº 10/177.735, presentada el 5 de junio de 2003). Se induce una lesión encefálica hipóxico-isquémica unilateral en ratas Wistar de 21 días de edad usando una versión modificada de la preparación de "Levine" para ratas como se ha descrito previamente (Sirimanne E. S., Guan J., Williams C. E. y Gluckman P. D. (1994). J. Neurosci. Meth., 55: 7-14; Vannucci, R. C. (1993), APMIS 101, 89-95; Levine (1960), Am. J. Path. 36, 1-17). Brevemente, se anestesia a ratas de ambos sexos de 40-49 g de peso y se las mantiene con una mezcla de halotano al 2%/oxígeno. Se hace una incisión de 10 mm a lo largo de la línea media del cuello, exponiendo la arteria carótida común derecha, en la que se hace una doble ligadura usando hilo quirúrgico de seda 4-0. Después de un período de recuperación de 1 h en una incubadora infantil mantenida en un ambiente termoneutro estable (34°C, 85 +- 5% de humedad), se expone a continuación a las ratas a hipoxia severa por inhalación de oxígeno al 8% en nitrógeno durante 60 minutos a 34°C y una humedad del 80%. Se las retira luego de la incubadora y se las mantiene a temperatura ambiente de 22°C y una humedad relativa del 55±5%, y se les facilita alimento y agua *ad libitum*. Se usan dos controles: ratas control, que no fueron sometidas a ligadura o hipoxia, y ratas con "simulacro" de ligadura, que fueron sometidas a anestesia e incisión (pero no a ligadura) e hipoxia. Se llevan a cabo la administración de compuesto TDFRP y la medición del daño encefálico inducido por isquemia por análisis histológico y estudios de comportamiento como se describe más adelante.

B. Modelo de isquemia por oclusión de la arteria cerebral media (ACM)

El modelo de oclusión de la arteria cerebral media (ACM) es un modelo bien aceptado de un episodio isquémico o accidente cerebrovascular focal (Gotti, *et al.*, (1990), Brain Res. 522: 290-307). Se produce isquemia focal obstruyendo el flujo de sangre a través de la ACM, con el resultado de infarto del locus encefálico alimentado por esta arteria. El modelo ACM es razonablemente predictivo de la capacidad y de la eficacia de fármacos, tales como TDFRP o BMP, para alterar la recuperación funcional en humanos en quienes el tejido del sistema nervioso central ha resultado dañado o se ha perdido debido a accidente cerebrovascular. Por ejemplo, se considera que el modelo ACM es razonablemente predictivo de la eficacia de fármacos para restaurar o mejorar detectablemente la coordinación motora, la percepción sensorial, el habla o cualquier otra función del sistema nervioso central a la que contribuya de manera natural el tejido que se encuentra dentro del territorio de la ACM.

Chang y colaboradores (Chang *et al.*, Stroke. Feb. 2003; 34(2): 558-64) han dicho previamente que la proteína morfogenética ósea 7 (BMP-7), administrada antes de la oclusión de la arteria cerebral media (OACM), reduce la lesión isquémica en el encéfalo. Estudios recientes han indicado que los receptores para BMP están regulados a más tras una isquemia encefálica. Esta regulación a más puede facilitar la neurorreparación endógena en el encéfalo isquémico.

Se mide el efecto del compuesto TDFRP sobre el daño celular debido a lesión isquémica hipóxica por el método de Weaver y colaboradores (Weaver, *et al.* (1997), Proc Natl Acad Sci USA. 16 Sept. 1997; 94(19): 10450-4), de Chang y colaboradores (Chang *et al.*, Stroke. Feb. 2003; 34(2): 558-64), o de la Patente Estadounidense Nº 6.407.060, presentada el 18 de junio de 2002. Por ejemplo, se realiza la oclusión de la ACM bajo anestesia por halotano en ratas Wistar macho (290-320 g, Charles River Breeding Laboratory) como se ha descrito (Oliff *et al.*, (1995), Brain Res. 699, 329-331). Brevemente, se coloca un catéter permanente crónico para la administración de esteroide o de vehículo en la vena yugular izquierda. Se aíslan ambas arterias carótidas comunes (ACC) y se coloca una ligadura de seda laxa alrededor de cada arteria. Se expone la ACM izquierda y, tras ligadura permanente de la ACC ipsilateral, se coagula la ACM desde su origen hasta el tracto olfatorio. Se ocluye la ACC contralateral durante un período de 2 h.

De manera alternativa, se anestesia a ratas Sprague-Dawley adultas con hidrato de cloral. Se ocluye transitoriamente la arteria cerebral media mediante un filamento insertado a través de la arteria carótida interna derecha. Se retira el filamento después de una isquemia de 60 minutos para permitir la reperfusión.

Además, se anestesian ratas Sprague-Dawley machos de 250-300 gramos de peso (Charles River) con halotano al 2% en NO_2 al 70%/O_2 al 30%. Se canula la arteria de la cola para monitorizar los gases en sangre y la glucosa en sangre. Se monitoriza la temperatura corporal usando una sonda rectal y se mantiene a 37 +/- 0,5°C con una almohadilla calefactora. Se ocluye permanentemente la arteria cerebral media (ACM) derecha proximal usando una modificación del método de Tamura, *et al.* (1981, J. Cereb. Blood Flow Metab. 1: 53-60). Brevemente, se expone la ACM proximal transcranealmente sin retirar el arco zigomático o cortar transversalmente el nervio facial. Se electrocoagula entonces la arteria usando un microcoagulador bipolar desde la posición justo proximal al tracto olfatorio hasta la vena cerebral inferior, y se corta luego transversalmente (Bederson *et al.*, (1986), Stroke 17: 472-476). Se observa a las ratas hasta que han recuperado la conciencia y se las devuelve entonces a sus jaulas. Se administra cefazolina sódica (40 mg/kg, i.p.), un antibiótico, a todos los animales el día antes y justo después de la cirugía del accidente cerebrovascular para prevenir la infección. Durante la cirugía del accidente cerebrovascular, no hay diferencias en los niveles de gases o de glucosa en sangre entre los animales que recibieron luego tratamiento con TDF, *v.g.*, BMP-7, TDFRP o vehículo.

Se llevan a cabo la administración de compuesto TDFRP y la medición del daño encefálico inducido por isquemia por análisis histológico y estudios de comportamiento como se describe más adelante.

C. Tratamiento profiláctico y terapéutico

Se valora el efecto del compuesto TDFRP sobre el daño tisular mediado por la isquemia por administración del compuesto TDFRP solo o en combinación con TDF 0-60 minutos antes (profilaxis) o después (terapia) de la oclusión de la ACC contralateral. Por ejemplo, se administra a ratas una dosis de carga i.v. de 0,000001-10.000 mg/kg de compuesto TDFRP o TDF, seguido de infusión i.v. de TDRF o TDF a 0,000001-10.000 mg/kg por h hasta el sacrificio. Se trata a las ratas control con vehículo (tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4/DMSO al 5%/ciclodextrina al 10%). De manera alternativa, los animales reciben una sola dosis (0,000001-10.0000 mg/kg) de TDF, *v.g.*, BMP-7, compuesto TDFRP y/o vehículo intravenoso a las 0-24 h antes (profilaxis) o después (terapia) del tratamiento de isquemia.

Además, los animales en el grupo de tratamiento reciben TDF, *v.g.*, BMP-7, y/o compuesto TDFRP intracisternalmente a una dosis de 0,1-100 μg/inyección. Los animales control reciben soluciones de vehículo que carecen de compuesto TDFRP, pero con todos los demás componentes en concentraciones finales equivalentes. Se realizan las inyecciones intracisternales comenzando 24 horas después del accidente cerebrovascular y se pueden repetir hasta 30 días después de él.

Para administrar la inyección intercisternal, se anestesia a los animales con halotano en NO_2 al 70%/O_2 al 30% y se les pone en un marco estereotáxico. El procedimiento para la inyección intracisternal de soluciones que contienen compuesto TDFRP o TDF o soluciones solamente de vehículo es idéntico. Usando una técnica aséptica, se introduce compuesto TDFRP o un volumen equivalente de vehículo o solución que contiene TDF por inyección percutánea (~10 μl/inyección) en la cisterna magna usando una jeringa Hamilton equipada con una aguja de calibre 26 (Yamada, *et al.* (1991), J. Cereb. Blood Flow Metab. 11: 472-478). Antes de cada inyección, se extraen ~1-2 μl de líquido cefalorraquídeo (LCR) a través de la jeringa Hamilton para verificar la colocación de la aguja en el espacio subaracnoideo. Usando esta técnica, el colorante Azul de Evans al 1% se difunde libremente a través de las cisternas basales y sobre la corteza cerebral en una hora desde la inyección.

D. Estudios de comportamiento

Para acostumbrar a los animales a su manipulación, necesaria para las pruebas conductuales/funcionales, se les manipula durante tres días antes de la cirugía, durante 10 minutos cada día. Después de la cirugía, los animales son albergados en jaulas individuales. Se usan cuatro pruebas funcionales/conductuales estándar para valorar la función sensorimotora y refleja tras el infarto. Las pruebas han sido ampliamente descritas en la literatura, incluyendo Bederson *et al.* (1986), Stroke 17: 472-476; DeRyck *et al.* (1992), Brain Res. 573: 44-60; Markgraf *et al.* (1992), Brain Res. 575: 238-246; y Alexis *et al.* (1995), Stroke 26: 2338-2346.

i. La prueba de la colocación del miembro anterior

Brevemente, la prueba de la colocación del miembro anterior consta de tres subpruebas. Se obtienen puntuaciones independientes para cada miembro anterior. La colocación normal del miembro sobre la mesa es puntuada como "0", la colocación retardada (<2 s) es puntuada como "1" y la no colocación o la colocación muy retardada (>2 s) es puntuada como "2". Se obtienen puntuaciones independientes primeramente al traer al animal hacia delante y luego de nuevo al llevar al animal hacia los lados de la mesa (puntuación máxima por miembro = 4; en cada caso, números más altos denotan déficits mayores). Para la subprueba de colocación táctil, se mantiene al animal de forma que no pueda ver o tocar el tablero de la mesa con los bigotes. Se toca ligeramente la parte dorsal de la mano con el tablero de la mesa al traer primeramente al animal hacia delante y llevarlo luego hacia los lados de la mesa. Se puntúa la colocación cada vez como antes (puntuación máxima por miembro = 4). Para la subprueba de colocación propioceptiva, únicamente se trae al animal hacia delante y se aplica mayor presión a la parte dorsal de la mano; se puntúa la colocación como antes (puntuación máxima por miembro = 2). Se suman estas subpuntuaciones para obtener la puntuación total de colocación del miembro anterior por miembro (rango = 010). En algunos animales, se realizó la subprueba de colocación de bigotes, en donde se estudió la capacidad del animal para poner el miembro anterior en respuesta a la estimulación de los bigotes por el tablero de la mesa (puntuación máxima por miembro = 2). Se sumaron entonces las subpuntuaciones para obtener la puntuación total de colocación del miembro anterior por miembro (rango = 0-10, 0-12 con la subprueba de los bigotes. La normalización de la puntuación en una o más subpruebas en animales tratados con compuesto TDFRP hacia las puntuaciones de las subpruebas observadas en los animales operados ficticiamente que no recibieron compuesto TDFRP y alejándose de las puntuaciones de las subpruebas observadas en los animales isquémicos control que no recibieron compuesto TDFRP indica que el TDFRP tiene un efecto profiláctico o terapéutico.

ii. La prueba de la colocación del miembro posterior

La prueba de la colocación del miembro posterior es llevada a cabo del mismo modo que la prueba de la colocación del miembro anterior, pero conlleva sólo subpruebas táctiles y propioceptivas de los miembros posteriores (puntuaciones máximas 4 y 2, respectivamente; rango de puntuación total = 0-6). La normalización de la puntuación de la colocación del miembro posterior en animales tratados con compuesto TDFRP hacia la puntuación observada en los animales operados ficticiamente que no recibieron compuesto TDFRP y alejándose de la puntuación de los animales isquémicos control que no recibieron compuesto TDFRP indica que el TDFRP tiene un efecto profiláctico o terapéutico.

iii. La prueba de la barra de equilibrio modificada

La prueba de la barra de equilibrio modificada examina la actividad refleja motora vestibular cuando el animal mantiene el equilibrio sobre una estrecha barra (30 veces, 1,3 cm) durante 60 segundos. Se puntúa la capacidad del animal para equilibrarse sobre la barra como sigue: 1-el animal se equilibra con las cuatro patas sobre la barra; 2-el animal pone las patas en el lado de la barra o titubea sobre la barra; 3-uno o dos miembros se resbalan de la barra; 4-tres miembros se resbalan de la barra; 5-el animal intenta equilibrarse con las patas sobre la barra pero se cae; 6-el animal se extiende sobre la barra y luego se cae; 7-el animal se cae de la barra sin hacer ningún intento por equilibrarse. Los animales recibieron tres pruebas de entrenamiento antes de la cirugía: se toma la puntuación de la última de éstas como la puntuación basal. La normalización de la puntuación en la prueba de la barra de equilibrio modificada en los animales tratados con compuesto TDFRP hacia la puntuación observada en los animales operados ficticiamente que no recibieron compuesto TDFRP y alejándose de la puntuación observada en los animales isquémicos control que no recibieron compuesto TDFRP indica que el TDFRP tiene un efecto profiláctico o terapéutico.

iiii. La prueba del reflejo postural

La prueba del reflejo postural mide la función tanto refleja como sensorimotora. Se mantiene primeramente a los animales sujetos por la cola suspendidos sobre el suelo. Los animales que se extienden simétricamente hacia el suelo con los dos miembros anteriores son puntuados como "0". Los animales que muestran posturas anormales (flexión de un miembro, rotación del cuerpo) son puestos entonces sobre una hoja de papel con respaldo de plástico. Aquellos animales que son capaces de resistir el movimiento de lado a lado con suave presión lateral son puntuados como "1", mientras que aquéllos que son incapaces de resistir dicho movimiento son puntuados como "2". Todas las pruebas funcionales/conductuales son administradas justo antes de la cirugía del accidente cerebrovascular y luego

en días alternos desde el día 1 después del accidente cerebrovascular en adelante. En cada sesión, se deja que los animales se adapten a la sala de pruebas durante 30 minutos antes de comenzar la prueba. La normalización de la puntuación en la prueba del reflejo postural en animales tratados con compuesto TDFRP hacia la puntuación observada en los animales operados ficticiamente que no reciben compuesto TDFRP y alejándose de la puntuación observada en los animales isquémicos control que no reciben compuesto TDFRP india que el TDFRP tiene un efecto profiláctico o terapéutico.

E. Análisis histológico

i. Tinción con hematoxilina y eosina del tejido encefálico

Hasta 30 o más días después de la oclusión de la ACM, se anestesia a los animales profundamente con pentobarbital y se les perfunde transcardialmente con solución salina heparinizada, seguido de formalina tamponada al 10%. Se extraen los encéfalos, se cortan en tres piezas y se guardan en formalina tamponada al 10% antes de deshidratarlos y embeberlos en parafina. Se cortan secciones coronales (5 .mu.m) en un microtomo deslizante, se montan en portaobjetos de vidrio y se tiñen con hematoxilina y eosina. Se determina el área de infartos cerebrales en cada uno de siete cortes (+4,7, +2,7, +0,7, -1,3, -3,3, -5,3 y -7,3 en comparación con el bregma) usando un sistema de imagen conectado con ordenador (Rioquant, R&M Biometnix, Inc., Nashville, Teen.). Se determina el área total de infartos por corte mediante el "método indirecto" como [el área del hemisferio contralateral intacto] - [el área del hemisferio ipsilateral intacto] para corregir el encogimiento del encéfalo durante el procesado (Swanson *et al.*, (1990), J. Cereb. Blood Flow Metab. 10: 290-293). Se expresa entonces el volumen de infarto como porcentaje del volumen hemisférico contralateral intacto. Se determinan también los volúmenes de infarto en el córtex y el cuerpo estriado por separado usando estos métodos.

Se realiza el análisis con el observador ciego al grupo de tratamiento. La reducción en el volumen de infarto en presencia de compuesto TDFRP indica que el compuesto TDFRP tiene un efecto protector o terapéutico.

ii. Tinción con cloruro de 2,3,5-tetrazolio del encéfalo

Se sacrifica a las ratas con una sobredosis de pentobarbital hasta 30 o más días después del tratamiento quirúrgico. Se cortan los encéfalos en secciones coronales de 2 mm y se tiñen con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio por métodos bien conocidos en la técnica. Se calculan los volúmenes de infarto cortical y subcortical por integración del área de infarto y la distancia entre cortes usando un sistema de análisis de imagen (NIH IMAGE). Se realiza el análisis con el observador ciego al grupo de tratamiento. La reducción del volumen de infarto en presencia de compuesto TDFRP indica que el compuesto TDFRP tiene un efecto protector o terapéutico.

Ejemplo 7: Medición *in vivo* del efecto de TDFRP sobre la formación de la neoíntima de la arteria carótida de rata

Se estudian el compuesto TDFRP, polinucleótidos codificantes de un compuesto TDFRP o un virus, *v.g.*, aunque sin limitación, adenovirus, que contiene una construcción codificante de un compuesto TDFRP (*v.g.*, vector) en cuanto a su efecto en un modelo de rata de lesión por balón de un vaso. Por ejemplo, se anestesia a ratas Sprague-Dawley macho adultas de 450-600 g de peso con inyecciones intraperitoneales de ketamina (150 mg/kg de peso corporal) y xilazina (15 mg/kg de peso corporal). Después de una incisión en el cuello, se inserta un catéter de balón Fogarty 2F (Baxter, Irvine, CA) mediante una arteriotomía en la arteria carótida común izquierda. Para asegurar una lesión adecuada y reproducible, se infla el catéter de balón con un dispositivo de inflado calibrado a una presión de 2 atm. durante 5 min. Se pasa el balón hacia delante y hacia atrás tres veces y se retira. Se introduce un catéter de plástico (calibre 27 l/2) a través de la arteriotomía carotídea externa y se lava la arteria carótida común con PBS antes de la introducción de un vehículo adecuado solo o de vehículo que contiene compuesto TDFRP (0,000001 mg de proteína/kg de peso corporal - 100.000 mg de proteína/kg de peso corporal). De manera alternativa, se administra un vehículo que contiene polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP (0,000001 mg de polinucleótido/kg de peso corporal - 100.000 mg de polinucleótido/kg de peso corporal), o un transportador vírico, *v.g.*, adenovirus, que contiene una construcción polinucleotídica apropiada codificante de TDFRP (de 1 ufp/ml a $1X10^{14}$ ufp/ml).

Por ejemplo, se usan stocks de adenovirus recombinantes en las 2 h siguientes a la descongelación. Se instilan 50 μl de vector adenovírico de 1 ufp/ml a $1X10^{14}$ ufp/ml (AdLacZ o Ad-TDFRP) o DMEM en el segmento de la carótida común aislado lesionado a través del catéter de plástico. Después de 15 min., se aspira el adenovirus o el DMEM. Se liga la arteria carótida externa proximal y se restablece el flujo de sangre a través de la carótida común e interna. Dos semanas después de la lesión de balón, se recogen la arteria de control contralateral (que no recibió ni lesión ni tratamiento con adenovirus) y la arteria lesionada con balón sin tratamiento con adenovirus (DMEM) o con tratamiento con adenovirus (Ad-LacZ o Ad-TDFRP) y se fijan en paraformaldehído al 4% durante 48 h a 4°C, se embeben en bloques de parafina, se cortan (5 g) y se tiñen con hematoxilina y eosina o mediante el método de Von Giesen para revelar la lámina elástica interna y externa. Se adquieren imágenes y se analizan en cuanto a las áreas transversales de la neoíntima y de la media usando el programa NIH Image, y se calcula la razón de áreas.

Una reducción en la razón neoíntima a media en vasos tratados con angioplastia que reciben TDFRP en

comparación con la razón neoíntima a media observada en los vasos tratados con angioplastia que reciben vehículo solo indica que el TDFRP tiene un efecto antirreestenosis. De forma similar, una reducción en la razón neoíntima a media en vasos tratados con angioplastia que reciben un polinucleótido codificante de un TDFRP en comparación con la razón neoíntima a media observada en vasos tratados con angioplastia que reciben vehículo solo indica que el polinucleótido codificante del TDFRP tiene un efecto antirreestenosis. Más aún, una reducción en la razón neoíntima a media observada en vasos tratados con angioplastia que reciben un transportador vírico que contiene una construcción polinucleotídica codificante de un TDFRP en comparación con la razón neoíntima a media observada en vasos tratados con angioplastia que reciben un transportador vírico que contiene una construcción polinucleotídica que no codifica el TDFRP indica que el TDFRP tiene un efecto antirreestenosis. Se emplea una prueba t de Student para valorar las diferencias en las razones neoíntima a media observadas entre grupos de tratamiento. Los valores de "P" inferiores o iguales a 0,05 son considerados significativos.

Modelo de lesión arterial en cerdo

Se realiza una transferencia génica mediada por adenovirus en las arterias ilíacas de cerdos Hampshire domésticos (15 kg), con adenovirus que contiene una secuencia polinucleotídica codificante de un compuesto TDFRP (Ad-TDFRP) o con un gen indicador (Ad-LacZ). Tras sedación con ketamina (20 mg/kg de peso corporal) y xilazina (2 mg/kg), los cerdos son intubados y anestesiados con isoflurano/NO. Con técnicas quirúrgicas estériles, se inserta un catéter de balón French #3 en la arteria ilíaca a través de la arteria ilíaca interna y se infla hasta 2 atm. durante 5 min. Se enjuaga el segmento arterial con 5 ml de solución salina. Se usan stocks de adenovirus recombinantes en las 2 h siguientes a la descongelación. Se instila 1 ml de vector adenovírico de 10^{10} ufp/ml (Ad-LacZ o Ad-TDFRP) o DMEM en el segmento de arteria ilíaca aislado lesionado a través del catéter de plástico. Después de 30 min., se aspira el adenovirus o el DMEM. Después del tratamiento con adenovirus, se retira el catéter y se restaura el flujo arterial. Se sacrifica a los animales tres semanas después del tratamiento con adenovirus y se recogen los segmentos de la angioplastia de las arterias ilíacas junto con segmentos más distales usados como segmentos de control normales negativos.

Se fija el tejido vascular recogido en paraformaldehído al 4% durante 48 h a 4°C, se embebe en bloques de parafina, se corta (5 μm) y se tiñe con hematoxilina y eosina o mediante el método de Von Giesen para revelar la lámina elástica interna y externa. Se adquieren imágenes y se analizan en cuanto a las áreas transversales de neoíntima y media usando el programa NIH Image, y se calcula la razón de áreas. Se emplea una prueba t de Student para valorar la significación estadística de las razones íntima a media observadas entre grupos de tratamiento. Un valor de "P" inferior o igual a 0,05 es considerado significativo.

Ejemplo 8: Medición *in vivo del efecto del compuesto* TDFRP sobre la aterosclerosis en conejo

Se estudian un compuesto TDFRP, un polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP o un virus, *v.g.*, aunque sin limitación, adenovirus, que contiene una construcción codificante de un compuesto TDFRP (*v.g.*, vector) en cuanto a su efecto en un modelo en conejo de aterosclerosis como describen Simari y colaboradores (Simari *et al.*, Clin. Invest., 98: 225-35 (1996). Brevemente, se seda a conejos NZW con ketamina (35 mg/kg i.m.) y xilazina (5 mg/kg i.m.) y se les intuba. Se mantiene la anestesia con isoflurano. Antes de la cirugía, se miden las químicas sanguíneas y los niveles séricos de colesterol y triglicéridos (Roche Biomedical Laboratories, Nutley, NJ). Se realizan una exposición quirúrgica y una arteriotomía de la arteria femoral derecha, y se pasa un catéter de balón 3-French Fogarty (Baxter Healthcare Corp., Mundelein, IL) al interior de la arteria ilíaca común. Se infla el balón en la arteria ilíaca derecha y se retira tres veces. Se liga distalmente la arteria femoral derecha y se cierra la incisión. Después de la cirugía, se alimenta a los conejos con una dieta rica en grasas consistente en un 0,5% de colesterol y un 2,3% de aceite de cacahuete hasta su sacrificio. Todos los animales reciben aspirina, 10 mg/kg, tres veces a la semana. Dos conejos son sacrificados 3 semanas después de la lesión de denudación y de la alimentación con colesterol y se analizan las arterias ilíacas para determinar el alcance las lesiones ateroscleróticas.

Tres semanas después de la primera lesión vascular, se realiza una lesión con balón de angioplastia en la arteria ilíaca derecha. Se miden los niveles séricos de colesterol y triglicéridos. Se hace una incisión abdominal en la línea media y se aíslan las arterias aorta distal e ilíaca común. Se aíslan las ramas laterales en las arterias ilíacas y se ligan. Se hace avanzar un catéter de angioplastia de balón de 2-2,75 mm (SciMed, BSC, Maple Grove, MN) a través de una aortotomía distal hacia el interior de la arteria ilíaca derecha. Se infla el balón de angioplastia hasta seis atmósferas de presión durante 1 min. y se desinfla. Se repiten el inflamiento y desinflamiento del balón dos veces.

Se realiza el tratamiento del vaso con el agente de ensayo retirando el catéter de balón a una posición justamente proximal al sitio de la lesión. Se aísla el segmento arterial con ligaduras temporales y se enjuaga con 5 ml de solución salina tamponada con fosfatos antes de la introducción de un vehículo adecuado solo, vehículo que contiene compuesto TDFRP (0,000001 mg de proteína/kg de peso corporal - 100.000 mg de proteína/kg de peso corporal) o vehículo que contiene un polinucleótido codificante de TDFRP (0,000001 mg de polinucleótido/kg de peso corporal - 100.000 mg polinucleótido/kg de peso corporal). De manera alternativa, se administra un transportador vírico, *v.g.*, adenovirus, que contiene un vector polinucleotídico apropiado codificante del compuesto TDFRP (de 1 ufp/ml a $1X10^{14}$ ufp/ml). Por ejemplo, se usan stocks de adenovirus recombinantes en las 2 h siguientes a la descongelación. Se instilan 50 μl de vector adenovírico de 1 ufp/ml a $1X10^{14}$ ufp/ml (AdLacZ o Ad-

TDFRP) o de DMEM en el segmento de la carótida común aislado lesionado a través del catéter de plástico. Después de 15 min., se aspira el adenovirus o el DMEM. Se liga la arteria carótida externa proximal y se restablece el flujo de sangre a través de la carótida común e interna.

Tres semanas después del tratamiento, se recogen la arteria de control contralateral (que no recibió ni lesión ni tratamiento con adenovirus) y la arteria lesionada con balón sin tratamiento (control) o con tratamiento de ensayo (es decir, compuesto TDFRP, polinucleótido codificante de compuesto de ensayo o virus portador de un vector codificante de un compuesto TDFRP) y se fijan en paraformaldehído al 4% durante 48 h a 4°C, se embeben en bloques de parafina, se cortan (5 μm) y se tiñen con hematoxilina y eosina o mediante el método de Von Giesen para revelar la lámina elástica interna y externa. Se adquieren imágenes y se analizan en cuanto a las áreas transversales de la neoíntima y la media usando el programa NIH Image y se calcula la razón de áreas.

Una reducción en la razón de neoíntima a media en vasos tratados con angioplastia que reciben compuesto TDFRP en comparación con la razón de neoíntima a media observada en vasos tratados con angioplastia que reciben vehículo solo indica que el compuesto TDFRP tiene un efecto antirreestenosis. De forma similar, la reducción en la razón de neoíntima a media en los vasos tratados con angioplastia que reciben polinucleótido codificante de compuesto TDFRP en comparación con la razón de neoíntima a media observada en los vasos tratados con angioplastia que reciben vehículo solo indica que el compuesto TDFRP tiene un efecto antirreestenosis. Además, una reducción en la razón de neoíntima a media observada en los vasos tratados con angioplastia que reciben un transportador vírico que contiene una construcción de polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP en comparación con la razón de neoíntima a media observada en los vasos tratados con angioplastia que reciben un transportador vírico que contiene una construcción de polinucleótido que no codifica un compuesto TDFRP o vehículo solo indica que el compuesto TDFRP tiene un efecto antirreestenosis. Se emplea una prueba t de Student para valorar las diferencias en las razones de neoíntima a media observadas entre grupos de tratamiento. Valores de "P" inferiores o iguales a 0,05 son considerados significativos.

Ejemplo 9: Medición *in vivo* del efecto del compuesto TDFRP suministrado mediante un stent sobre la aterosclerosis del conejo

Se estudian un compuesto TDFRP, un polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP o un virus, *v.g.*, aunque sin limitación, adenovirus, que contiene una construcción codificante de un compuesto TDFRP en cuanto a su efecto, suministrados mediante un stent en un modelo en conejo de lesión de vasos por balón (Rogers *et al.*, Circulation 91: 2995-3001 (1995)).

Se anestesia a conejos Blancos de Nueva Zelanda (Millbrook Farm Breeding Labs) de 3 a 4 kg de peso, albergados individualmente en jaulas con rejilla de acero y alimentados con pienso para conejos y agua *ad libitum*, con 35 mg/kg IM de ketamina (Aveco Co.) y 4 mg/kg IV de nembutal sódico (Abbott Laboratories). Se expone y liga cada arteria femoral y se retira el endotelio arterial ilíaco mediante un catéter de embolectomía de balón 3F (Baxter Healthcare Corp., Edwards Division) que se pasa por arteriotomía de manera retrógrada hacia el interior de la aorta abdominal y se retira e infla tres veces. Se monta un stent de acero inoxidable de 7 mm de longitud coaxialmente sobre un balón de angioplastia de 3 mm y se pasa de manera retrógrada por arteriotomía hacia el interior de cada arteria ilíaca, y se expande inflando durante 10 segundos a una presión de 2 a 10 atm.. Se revisten cuatro stents con un revestimiento de 3 μm de grosor de solución de gel Pluronic F-127 al 25% (p/v) (BASF Wyandotte Co., Wyandotte, MI, EE.UU.) y se revisten otros cuatro stents con la misma solución de gel con un vehículo que contiene compuesto TDFRP (0,000001 mg de proteína/ml - 100.000 mg de proteína/kg de peso corporal) disuelto en él, y se revisten otros cuatro stents con la misma solución de gel con un vehículo solo. De manera alternativa, se revisten cuatro stents con un revestimiento de 3 μm de grosor de solución de gel Pluronic F-127 al 25% (p/v) (BASF Wyandotte Co., Wyandotte, MI, USA) y se revisten otros cuatro stents con la misma solución de gel con un vehículo que contiene un polinucleótido codificante de compuesto TDFRP (0,000001 mg de polinucleótido/ml - 100.000 mg de polinucleótido/ml) disuelto en él, y se revisten otros cuatro stents con la misma solución de gel con un vehículo. De manera alternativa, se revisten otros cuatro stents con un revestimiento de 3 μm de grosor de una solución de gel Pluronic F-127 al 25% (p/v) (BASF Wyandotte Co., Wyandotte, MI, USA) y se revisten otros cuatro stents con la misma solución de gel con un vehículo que contiene un transportador vírico, *v.g.*, adenovirus, que contiene una construcción apropiada de polinucleótido codificante de TDFRP (de 1 ufp/ml a $1X10^{14}$ ufp/ml). También se recogen cuatro arterias ilíacas sometidas únicamente a lesión por retirada del balón sin colocación de stent y se procesan para análisis histológico.

Se da a los conejos aspirina (Sigma Chemical Co.), 0,07 mg/ml en el agua de bebida, 1 día antes de la cirugía para alcanzar una dosis aproximada de 5 mg/kg al día durante la duración del experimento, y éstos recibieron un único bolo del anticoagulante estándar heparina (100 U/kg, Elkin-Sinn, Inc.) intravenosamente en el momento de la cirugía. Dos semanas después de la lesión por balón, se recogen las arterias ilíacas. Bajo anestesia profunda con nembutal sódico intravenoso, la exsanguinación de la vena cava inferior va seguida de perfusión con solución Ringer lactato por punción del ventrículo izquierdo. Se cortan ambas arterias ilíacas y se fijan en paraformaldehído al 4% durante 48 h a 4°C, se embeben en bloques de parafina, se cortan (5 g) y se tiñen con hematoxilina y eosina o mediante el método de Von Giesen para revelar la lámina elástica interna y externa. Se adquieren imágenes y se analizan en cuanto a las áreas transversales de la neoíntima y la media usando el programa NIH Image, y se calcula la razón de

áreas.

Una reducción en la razón de neoíntima a media en los vasos tratados con angioplastia que reciben el stent revestido con gel que incluye compuesto TDFRP en comparación con la razón de neoíntima a media observada en los vasos tratados con angioplastia que reciben stent más gel con vehículo solo, o stent solo, indica que el compuesto TDFRP tiene un efecto antirreestenosis. De forma similar, una reducción en la razón de neoíntima a media en los vasos tratados con angioplastia que reciben stent revestido con gel que incluye polinucleótido codificante de TDFRP en comparación con la razón de neoíntima a media observada en los vasos tratados con angioplastia que reciben stent más gel con vehículo, o stent más gel solo, o stent solo, indica que el polinucleótido codificante del compuesto TDFRP tiene un efecto antirreestenosis. Además, una reducción en la razón de neoíntima a media observada en los vasos tratados con angioplastia que reciben un stent revestido con un gel mezclado con un transportador vírico que contiene una construcción de polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP en comparación con la razón de neoíntima a media observada en los vasos tratados con angioplastia que reciben stent revestido con un gel mezclado con un transportador vírico solo indica que el transportador vírico que contiene un polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP tiene un efecto antirreestenosis. Se emplea una prueba t de Student para valorar las diferencias en las razones de neoíntima a media observadas entre los grupos de tratamiento. Valores de "P" inferiores o iguales a 0,05 son considerados significativos.

III. Modelos *in vivo* de lesión o enfermedad renal

Se describen ensayos *in vivo* para la actividad biológica de la BMP-7 de longitud total en modelos de rata en Borovecki *et al.*, The Role of Bone Morphogenetic Proteins in Kidney Development and Repair, pp 263-288, en Bone Morphogenetic Proteins, Sampath, K. ed. (Birkhauser Verlag, Basel Switzerland (2002)), aquí incorporado como referencia. La BMP-7, administrada sistémicamente a ratas, detiene la progresión de la insuficiencia renal en fase terminal en un riñón remanente (5/6 nefrectomía). Un segundo ensayo allí citado desvela la profilaxis a corto plazo por BMP-7 cuando se administra sistémicamente a ratas con obstrucción ureteral unilateral (OUU). Como se describe más adelante, los modelos de roedores proporcionan modelos de mamíferos de enfermedad renal, tratable profiláctica y terapéuticamente mediante los compuestos TDFRP de la presente invención (FIG. 4-12, 21-23).

Ejemplo 10: Estudio *in vivo* sobre la eficacia del compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) para mejorar los efectos tóxicos renales del compuesto quimioterapéutico cisplatina en la rata

Resumen

Se estudió el compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) en ratas Sprague-Dawley macho (de 250 g a 300 g) para establecer el rango de dosis y la medida en que el compuesto es capaz de mejorar profiláctica y terapéuticamente los efectos tóxicos renales de la cisplatina. El nivel de dosificación de la cisplatina era el nivel quimioterapéutico usado en humanos, 40 ug/kg pc. Los criterios de valoración eran el nivel de creatinina en suero y la histología del riñón. El control positivo utilizado era 250 ug/kg pc de la forma madura de la BMP-7 (BMP-7) humana recombinante.
Animal: Rata Sprague-Dawley macho

Grupos:	Dosis	Número/grupo
Grupo 1:	Vehículo PBS, pH 7,2, + 5% manitol	(n=10)
Grupo 2:	0,28 mg/kg TDFRP (SEC. Nº ID.: 45)	(n=10)
Grupo 3:	2,8 mg/kg TDFRP (SEC. Nº ID.: 45)	(n=8)
Grupo 4:	28 mg/kg TDFRP SEC. Nº ID.: 45)	(n=8)
Grupo 5:	250 μg/kg BMP-7	(n=8)
		44 ratas

Cronología	- 2 h	0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 7
Cisplatina		40 ug/kg					
Dosificación	+		+	+	+	+	
Sangría		+	+	+	+	+	+
Sac.							+

Se preparó una solución stock (70 mg/ml) de TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) disolviéndolo en acetato 20 mM (pH 4,2). Se volvió a diluir la solución stock en solución salina tamponada con fosfatos (PBS, pH 7,2) más un 5% de manitol hasta obtener concentraciones de compuesto de 14 mg/ml (dosis de 28 mg/kg), 1,4 mg/ml (dosis de 2,8 mg/kg) y 0,14 mg/ml (dosis de 0,28 mg/kg).

Se administró cisplatina por inyección *i.p.* (40 ug/kg pc) en el tiempo cero. Se realizó la administración de la dosificación terapéutica del compuesto, del control positivo de BMP-7 y del control negativo de vehículo por inyección lenta *i.v.* en bolo a través de la vena de la cola en cinco puntos de tiempo: 2 horas antes de la administración de cisplatina y luego a las 24 horas, 48 horas, 72 horas y 96 horas tras la administración de

cisplatina. Se recogieron muestras de sangre a través de la vena de la cola en los puntos de tiempo de 0, 24, 48, 72 y 96 horas. El séptimo día, se recogió la muestra por exsanguinación en el momento del sacrificio. Se preparó suero a partir de las muestras de sangre y se analizó en cuanto a la concentración de creatinina. La concentración sérica de creatinina, un subproducto de la actividad muscular que se libera al torrente sanguíneo y se elimina a través de los riñones, es un marcador de la función renal que tiende a elevarse cuando la función renal resulta severamente comprometida (FIG. 21).

Al realizar el sacrificio a los siete días, se recogieron los riñones, se fijaron en formalina y se embebieron en parafina. Se cortaron entonces sagitalmente y se tiñeron con tinción de H y E. También se tiñeron secciones de riñón con anticuerpos contra el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) (para identificar sitios de regeneración celular), macrófagos, I-CAM-1 y músculo liso. También se recogieron en el momento del sacrificio tejidos en y alrededor del sitio de la inyección (FIG. 22, 25, 26).

El compuesto a la dosis más alta era más eficaz que el control positivo en la reducción del nivel de elevación de creatinina en suero tras la administración de cisplatina (FIG. 21), mostrando así que el compuesto era más eficaz que el control positivo en la preservación de la función renal tras la administración de cisplatina. Incluso al nivel de dosis de 2,8 mg/kg pc, el compuesto reducía significativamente el nivel de inflamación inducida por la cisplatina de la corteza renal (FIG. 22, 23, 25), y reducía la cantidad de liberación de ICAM-1 (FIG. 25), la infiltración de macrófagos y la pérdida de músculo liso y aumentaba el grado de regeneración celular (FIG. 22,23, 25, 26).

Formulación de péptidos

Se disolvieron 313,0 mg de SEC. Nº ID.: 45 en 4,5 ml de acetato 20 mM (pH 4,2). Se añadieron 17,86 ml de PBS (pH 7,2) + 5% de manitol (volumen total = 22,36 ml; 14 mg/ml de SEC. Nº ID.: 45, o 7 mg/0,5 ml, la dosis más alta, 28 mg/kg). Se usaron 20 ml de esto para las 40 dosis en la rama de "28 mg/kg". Se añadieron 2,36 ml del resto a 21,24 ml de PBS (vol. total = 23,600 ml). Se usaron 21 ml para las 40 dosis en la rama de "2,8 mg/kg". Se añadieron 2,6 ml de esto a 23,4 ml de PBS (vol. total = 26,00 ml). Se uso esto para las 50 dosis en la rama de "0,14 mg/kg".

Dosis de cisplatina

Se uso cisplatina a una dosis de 40 ug/kg (0,25 kg/rata = 10 ug/rata en 0,5 ml de PBS (pH 7,2) para un total de 10 ug/rata (*44 ratas = 0,44 mg). La solución stock era de 40 ug/kg (0,25 kg/rata / 0,5 ml/rata = 20 ug/ml).

Dosis de BMP-7

Ocho ratas fueron evaluadas a 5 dosis de BMP-7 (0,25 kg/rata * 250 ug/kg = 3,13 mg).

Ejemplo 11: Modelo *in vivo* de fibrogénesis renal (ligadura ureteral unilateral)

Se miden los efectos del compuesto TDFRP sobre el daño celular debido a fibrogénesis renal por el método de Hruska y colaboradores (Hruska *et al.* (2000), Am. J. Physiol. Renal Physiol. 279 F130-F143). Brevemente, se somete a ratas Sprague-Dawley (250 g) o bien a un simulacro de operación (uréter manipulado, pero no ligado) o bien a una ligadura ureteral unilateral (OUU) (FIG. 4). Se colocan dos ligaduras, separadas en 5 mm, en los dos tercios superiores del uréter sobre una sección de tubo de polietileno colocada alrededor del uréter. Se confirma la obstrucción ureteral por observación de la dilatación de la pelvis y del uréter proximal y colapso del uréter distal. Se retira la sutura realizada para obstruir el uréter junto con el tubo el día 5, aliviando la obstrucción. Se valoran cultivos de orina obtenidos en el momento de la liberación en cuanto a bacterias. Se estudian los grupos siguientes el día 10: animales ficticiamente operados, animales con liberación de la obstrucción ureteral a los 5 días y animales con obstrucción ureteral unilateral mantenida durante 10 días. Se estudian las ratas ficticiamente operadas y las ratas con obstrucción ureteral unilateral de 5 días de duración por los aclaramientos de inulina y p-aminohipurato (PAH) el día 10. Las ratas reciben uno de los siguientes 10 min. antes de la obstrucción ureteral unilateral: se administran compuesto TDFRP y TDF, *v.g.*, BMP-7, solos o en combinación (0,000001-10.000 mg/kg hasta cada tres días; enalapril (~25 mg/kg de peso corporal/día ingerido) en al agua de bebida; o vehículo. Se usa el mismo protocolo experimental en ratas con obstrucción uretral unilateral de 10 días de duración.

Se comparan los efectos del compuesto TDFRP y del TDF con placebo (tratamiento con vehículo) y con un control positivo (tratamiento con enalapril) que se sabe mejora la fibrogénesis resultante de obstrucción ureteral unilateral (OUU) (Ishidoya *et al.*, (1996), Kidney Int., 49: 1110-1119). Se ha demostrado previamente que la dosis de enalapril es efectiva para mejorar la fibrogénesis resultante de obstrucción ureteral unilateral (Ishidoya *et al.* (1996), Kidney Int., 49: 1110-1119, Kaneto *et al.* (1994), Kidney Int., 45: 1637-1647). Es una dosis alta, mucho mayor que la requerida para la modulación del sistema sistémico renina-angiotensina. Se realizan los estudios de una forma ciega. Las soluciones de tratamiento son preparadas por un investigador que no forma parte del estudio y se les asigna una letra. Los investigadores que llevan a cabo el estudio no son conocedores del contenido de los diversos tratamientos hasta después de haberse completado los estudios de aclaramiento y la clasificación histopatológica. Las preparaciones histopatológicas son clasificadas por individuos también ciegos a los grupos de tratamiento.

Valoración de la función renal

Se determina la función renal midiendo el índice de filtración glomerular (IFG) de los riñones individuales por los aclaramientos de inulina y estimando el flujo sanguíneo renal (FSR) por los aclaramientos de PAH como se ha descrito previamente (Miller *et al.* (1994), Am. J. Physiol. Renal Fluid Electrolyte Physiol., 266: F129-F134; Miller *et al.* (1994), Kidney Int., 46: 201-207). Se anestesia a ratas con nembutal intraperitoneal y se colocan catéteres en la arteria y la vena femorales y en ambos uréteres. Se deja despertar a los animales en una jaula de restricción de Plexiglás y se realizan los estudios de aclaramiento en animales despiertos. La normalización del IFG y del FSR hacia los niveles de control en animales OUU tratados con compuesto TDFRP en comparación con el IFG y el FSR observados en animales OUU no tratados con compuesto TDFRP indica que el compuesto TDFRP tiene un efecto profiláctico o terapéutico sobre la fibrogénesis renal.

Tras completar los estudios de aclaramiento, se sacrifica a los animales (anestesia con metoxiflurano) y se perfunden totalmente los riñones con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) helada para eliminar las células sanguíneas. Se extraen rápidamente los riñones y se cortan sobre una placa de vidrio fría. Para los estudios histológicos, se sumergen secciones coronales de 2 mm de los riñones perfundidos con HBSS en Histochoice (Amresco, Solon, OH) o en formalina tamponada. Se embeben las secciones de riñón en parafina y se analizan secciones de 5 μm microscópicamente (FIG. 5, 6, 7).

También se valora la fibrosis renal determinando la deposición de colágeno intersticial y midiendo el volumen intersticial, realizando una inmunotinción para el colágeno de tipo IV, realizando una inmunotinción para la α-actina de músculo liso (α-SMA) y cuantificando la infiltración de monocitos/macrófagos, así como la apoptosis celular, es decir, ensayos de marcaje de mellas-extremos con dUTP mediados por desoxinucleotidil transferasa (TUNEL), como se ha descrito previamente (Ishidoya *et al.* (1996), Kidney Int., 49: 1110-1119; Kaneto *et al.* (1994), Kidney Int., 45: 1637-1647; Modi *et al.* (1990), Kidney Int., 38: 843-850) (FIG. 5-7).

Varias enfermedades renales conducen a cambios histológicos en el riñón, tales como la expansión del área tubulointersticial. La clasificación histológica de la fibrosis del área tubulointersticial está estrechamente correlacionada con la pérdida de función renal. Como elementos estromales que contribuyen a la alteración del intersticio tubular renal y al eventual desarrollo de fibrosis, se incluyen miofibroblastos, monocitos de infiltración y una superproducción de proteínas de la matriz extracelular.

La obstrucción ureteral se caracteriza por un progresivo aumento del volumen intersticial de la corteza renal. Incluso después de liberar la ligadura, aún prevalecen las fuerzas profibróticas, de tal forma que el volumen intersticial aumenta del 7 al 8% encontrado en los riñones de los animales ficticiamente operados al 17 al 20% encontrado en los riñones liberados de la obstrucción. Si no se libera la obstrucción, el volumen intersticial puede aumentar hasta aproximadamente el 50% por 10 días de obstrucción continua (Hruska *et al.* (2000), Am. J. Physiol., 280: F130-3; Ishidoya *et al.* (1996), Kidney Int., 49: 1110-1119).

En el riñón de animales normales o ficticiamente operados y en los riñones contralaterales de ratas con OUU, se encuentra colágeno IV en la membrana basal que rodea a los túbulos, en los capilares y en la matriz mesangial. En el marco de la fibrosis asociada a obstrucción ureteral, el colágeno IV se convierte en una proteína de la matriz intersticial (Hruska *et al.* (2000), Am. J. Physiol., 280: F130-3; Ishidoya *et al.* (1996), Kidney Int., 49: 1110-1119, Morrissey *et al.* (1998), Semin. Nephrol., 18: 603-11), además de su presencia en las membranas basales. La puntuación de la matriz de colágeno IV es otro medio de cuantificación de la fibrosis intersticial (Hruska *et al.* (2000), Am. J. Physiol., 280: F130-315, Morrissey *et al.* (1998), Semin. Nephrol., 18: 603-11).

Existe una pérdida inexorable de células epiteliales de los túbulos por apoptosis durante la progresión de la enfermedad renal (Truong *et al.* (1998), Semin. Nephrol., 18: 641-51; Savill *et al.* (1994), J. Am. Soc. Nephrol. 5: 12-21), con el resultado de atrofia tubular. Esta pérdida es medida a intervalos de tiempo mediante los ensayos de marcaje de mellas y extremos con dUTP mediado por deoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) (Ishidoya *et al.* (1996), Kidney Int., 49: 1110-1119) como el número de células que sufren apoptosis en ese punto de tiempo. Otro medio mediante el cual se puede determinar la atrofia tubular es por medición del diámetro tubular, lo que sería un índice de toda la pérdida de células apoptóticas hasta el punto de tiempo en que se obtiene la biopsia de riñón (FIG. 5-7).

Una reducción en la apoptosis de las células epiteliales, en la deposición intersticial de colágeno, en el volumen intersticial, en el colágeno de tipo IV, en la α-actina de músculo liso (∞-SMA) y/o en la infiltración de monocitos/macrófagos en animales con OUU tratados con compuesto TDFRP en comparación con el nivel observado en animales OUU no tratados con compuesto TDFRP indica que el compuesto TDFRP tiene un efecto profiláctico o terapéutico sobre la fibrogénesis renal (FIG. 5-7).

Ejemplo 12: Modelo *in vivo* de insuficiencia renal aguda

Se miden los efectos del compuesto TDFRP sobre el daño tisular debido a insuficiencia renal aguda por el método del pinzamiento bilateral de Vukicevic y colaboradores (Vukicevic *et al.*, JCI 102(1):202). Brevemente, se deja en

ayunas a ratas Wistar macho de 200-250 g (Pliva Breeding Laboratory, Zagreb, Croatia) durante 12 h antes de la cirugía. Después de la administración intraperitoneal de anestésico ketamina (20 mg/kg), se ocluyen ambas arterias renales dorsalmente durante 60 min. con pinzas de microaneurisma (Roboz). Se administra vehículo de tampón, compuesto TDFRP y/o TDF, *v.g.*, BMP-7, que contiene tampón acetato de sodio 20 mM (500 μl) a través de la vena de la cola. Se somete a todos los animales a administración intraperitoneal de 1-3 ml de suero salino (NaCl al 0,9%) precalentado (37°C) para compensar cualquier pérdida de fluido durante la cirugía. Los experimentos son ciegos y las ratas terminan a diferentes intervalos de tiempo, que van de 30 min. a 18 d. Se obtienen muestras de sangre (0,5 ml) del plexo orbital a, por ejemplo, 0, 24, 48, y 72 h, y, en algunos casos, a, por ejemplo, 30 min., 2, 8 y 96 h y 18 d después de la reperfusión. Para las mediciones del IFG, se recoge orina en jaulas metabólicas durante 24 h como se ha descrito previamente (Vukicevic *et al.* (1989), Bone Miner., 6: 125-139). Se mide la creatinina en suero y orina por el método de Jaffe (Whelton *et al.* (1994), en Clinical Chemistry. C.A. Burtis y E.R. Ashwood, Eds. W.B. Saunders, Philadelphia, PA. Pp. 1513-1575. Se mide el BUN por un procedimiento ultravioleta de glutamato deshidrogenasa, el fósforo por un método de molibdato y el calcio por un método de o-cresolftaleína. Se miden los electrolitos séricos por potenciometría indirecta. Para un modo profiláctico, se da BMP-7 y/o compuesto TDFRP (0,000001-10.000 mg/kg) 10 min. antes de la cirugía y luego hasta 72 h después de la misma, y para un modo terapéutico, se administra la primera inyección de BMP-7 y/o compuesto TDFRP (0,000001-10.0000 mg/kg) a 1-16 h y luego a intervalos de 24 h hasta 96 h después de la reperfusión.

La normalización del IFG, el BUN, la creatinina sérica y/o la creatinina sanguínea hacia los niveles de control en animales lesionados tratados con compuesto TDFRP en comparación con los niveles de IFG, BUN, creatinina sérica y/o creatinina sanguínea observados en animales lesionados no tratados con compuesto TDFRP indica que el compuesto TDFRP tiene un efecto profiláctico o terapéutico sobre la fibrogénesis renal.

Ejemplo 13: Modelos *in vivo* de nefropatía diabética (estreptozotocina)

Se mide el efecto de los compuestos TDFRP sobre el daño celular debido a nefropatía diabética por el método de Wang y colaboradores (Wang *et al.* (2003), 63(6): 2037) (FIG. 8A). Se induce diabetes en ratas de 200 g mediante una dosis única de estreptozotocina. Después de 16 semanas, se establecen hipertrofia glomerular y proteinuria, y se inicia una terapia con compuesto TDFRP y/o TDF, *v.g.*, BMP-7, (0,000001-10.0000 mg/kg intravenosamente, preferiblemente 1-10.000 microgramos/kg y más preferiblemente aproximadamente 10-1.000 microgramos/kg), hasta administración diaria, enalapril (20 mg/kg), o vehículo, y se continúa hasta las 32 semanas. Se miden el peso del riñón, el índice de filtración glomerular (IFG), la excreción de albúmina en orina, la presión sanguínea, la patología y la expresión de BMP-7 según describen Wang y colaboradores (Wang *et al.* (2002), J. Am. Soc. Nephrol., 13: 45A) y como se ha detallado con anterioridad. La normalización de la proteinuria, la reducción en el área glomerular y el volumen intersticial en presencia de compuesto TDFRP en comparación con la ausencia de compuesto TDFRP indicaban que el compuesto TDFRP tiene un efecto profiláctico o terapéutico (FIG. 8).

Los antagonistas de la transición de epitelial a mesenquimal (TEM) inducida por TGF-beta1, tal como BMP-7 y los compuestos TDFRP aquí descritos, pueden mejorar la progresión de la fibrosis renal crónica inducida por TGF-beta1. Además, los compuestos TDFRP, a diferencia de BMP-7, muestran la capacidad adicional de revertir la patogenia de la enfermedad. La TEM es necesaria para el desarrollo embrionario, pero está también implicada en afecciones patológicas, tales como la progresión tumoral y la fibrosis de órganos (deposición de colágeno, elastina, tenacina y otras moléculas de la matriz) en, por ejemplo, el hígado, el pulmón y el riñón. Se ha demostrado que compuestos tales como EGF y TGF-beta1 inducen TEM en células epiteliales tubulares renales y células epiteliales de los conductos mamarios, produciendo entre otros cambios una pérdida o disminución de la expresión de E-cadherina, una inhibición de la expresión de proteínas de la zonula occludens (ZO-1), la pérdida de uniones estrechas y la pérdida de la morfología de las células epiteliales. La incubación con 100 ng/ml de BMP-7 humana recombinante durante 48 horas reviere la TEM inducida por TGF-beta1, con el resultado de restauración de la expresión de E-cadherina y ZO-1, formación de uniones estrechas y restablecimiento de la morfología de las células epiteliales. Se ven efectos similares con los compuestos TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) a dosificaciones similares, es decir, de 0,1 a 100 milígramos/kg de compuestos TDFRP (FIG. 8). Sin limitarse a la teoría, se piensa que la unión a receptores ALK conduce a rutas de señalización intracelular mediadas por proteínas Smad, particularmente Smad1, Smad5 y Smad8, que transducen las acciones tanto de BMP-7 como de TDFRP en células epiteliales. Experimentos *in vitro* utilizando células epiteliales de los túbulos distales renales (NP1) como sistemas independientes de ligando respaldan estas conclusiones. Las células transfectadas para expresar de manera constitutiva construcciones de ADNc activas que expresan ALK5 y Smad3 (para imitar las rutas de señalización dependientes de TGF-beta1 y Smad) o ALK3 y Smad5 (para imitar las rutas de señalización dependientes de BMP-7 y Smad) confirman lo anterior (véase Zeisberg *et al.*, Nature Medicine, 9; 7 pp 964-968, (2003)).

Ejemplo 14: Modelos *in vivo* de insuficiencia renal crónica

La nefritis por suero nefrotóxico (NNT) es un modelo de lesión renal crónica progresiva. Los ratones a los que se administran inyecciones de suero nefrotóxico (SNT) desarrollan glomerulonefritis, que da lugar a enfermedad tubulointersticial asociada a TEM, y finalmente a fibrosis renal, a lo largo de un período de aproximadamente seis semanas. Los investigadores han reportado que el tratamiento de ratones con BMP-7 humana recombinante, aproximadamente 300 microgramos/kg, comenzando después de una semana de NNT, es suficiente para prevenir la progresión a enfermedad renal crónica y evita la atrofia tubular y la acumulación de fibroblastos intersticiales. El

inicio del tratamiento desde la semana 3 hasta la semana 6 y desde la semana 4 hasta la semana 6 revirtió casi por completo la patología renal, mostrando mejoras significativas en la función renal, medida por los niveles de creatinina en suero y los niveles de nitrógeno ureico en sangre. En estos estudios, BMP-7 era capaz de restaurar la expresión de proteínas E-cadherinas en túbulos previamente dañados. En riñones no tratados, se observaron Smad2 y Smad3 fosforiladas, indicativas de señalización TGF-beta1, en los núcleos de túbulos con expresión atenuada de E-cadherina. Se observó Smad1 fosforilada, indicativa de señalización BMP-7, en los núcleos de los túbulos tratados. Para una revisión de lo anterior, véanse Zeisberg *et al.*, Nature Medicine, 9; 7 pp. 964-968, (2003), y Kalluri *et al.*, J. Clin Investigation 112: 1776-1784 (2003). Se observan resultados similares a BMP-7 en la reversión de la fibrosis renal con los presentes compuestos TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) administrados oralmente a una dosis de 5 milígramos/kg/24 horas (FIG. 9-12).

Ejemplo 15: Inhibición o reparación de la necrosis renal y la cardiomiopatía

Se sabe que numerosos compuestos terapéuticos causan efectos tóxicos sistémicos para el sistema inmunitario, los órganos y los tejidos, por ejemplo, la toxicidad renal observada con cisplatina y sus análogos, así como otros fármacos quimioterapéuticos, y la toxicidad cardíaca observada con ciertos antibióticos. Los compuestos TDFRP de la presente invención pueden actuar como profilácticos y terapéuticos cuando se administran como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un compuesto TDFRP representativo aquí desvelado (SEC. Nº ID.: 45) se une preferentemente a los receptores de BMP de tipo I (ALK3) (FIG. 1, 15) y se expresa diferencialmente en los túbulos proximales del riñón. La exposición de las células del riñón a un agente inflamatorio, *v.g.,* TNF-alfa, causa una respuesta inflamatoria medible por detección de un aumento en IL-6 en las células de los túbulos proximales. La administración de compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) puede aliviar esta respuesta inflamatoria (FIG. 14). De igual modo, la administración de TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) puede reducir o mejorar los efectos nefrotóxicos de la exposición a cisplatina, en parte promoviendo la inducción de rutas de regeneración específicas de tejidos (FIG. 14, 21-26).

Se observan efectos cardioprotectores similares con TDFRP (SEC. Nº ID.: 45), ya que el compuesto demuestra capacidad para mejorar la inflamación y los efectos citotóxicos hacia los cardiomiocitos después de un infarto de miocardio (lesión por isquemia miocárdica y reperfusión) (FIG. 16, 19-20).

G. Formulaciones farmacéuticas de compuestos TDFRP

Los compuestos TDFRP son preparados como formulaciones farmacéuticas para administración a un paciente como se ha descrito anteriormente. En general, los compuestos TDFRP son moléculas pequeñas, incluyendo péptidos y peptidomiméticos, y pueden ser preparados en cualquier formulación farmacéutica basada en péptidos, como sería conocido en las técnicas farmacéuticas. Sin embargo, los compuestos son potentes inductores del crecimiento y la diferenciación de tejidos, y como tales es deseable incorporar los compuestos TDFRP en formulaciones de liberación mantenida o controlada, por ejemplo, en microesferas de liberación controlada. Como ejemplos de microesferas, se incluyen las microesferas ProMaxx® (Epic Therapeutics), como se describe en la Patente Estadounidense 6.458.387, aquí incorporada como referencia.

Las microesferas de TDFRP tienen un tamaño y una forma generalmente uniformes, variando en tamaño de aproximadamente 0,5 micras a aproximadamente 20 micras, dependiendo de las condiciones de fabricación. Las características de las microesferas pueden ser alteradas durante la preparación manipulando la concentración de polímero hidrosoluble, la temperatura de reacción, el pH, la concentración de proteína, el agente entrecruzante y/o la cantidad de tiempo en que el compuesto TDFRP está expuesto al agente entrecruzante y/o la fuente de energía. Las microesferas son preparadas mezclando o disolviendo los compuestos TDFRP con un polímero hidrosoluble o mezcla de polímeros hidrosolubles, tales como polímeros lineales o ramificados, a un pH próximo al punto isoeléctrico del compuesto TDFRP. Se expone la mezcla de compuesto TDFRP y polímero a un agente entrecruzante y/o a una fuente de energía, tal como calor, en condiciones suficientes para estabilizar las microesferas. Se separan entonces las microesferas de los reactivos no incorporados por métodos de separación tales como filtración o centrifugación. En general, el compuesto TDFRP representa al menos un 40% y menos de un 100% en peso del peso final de cada microesfera. Preferiblemente, la concentración de polímero en la microesfera es mayor de un 0% e inferior o igual a un 30% en peso. La superficie externa de cada microesfera es permeable al agua y a los compuestos TDFRP disueltos y no sólo permite la entrada de líquidos acuosos en la microesfera, sino que también permite la salida de compuesto TDFRP y polímero solubilizados de la microesfera. Se puede hacer que las microesferas liberen compuestos TDFRP y polímero desde el interior de la microesfera cuando se ponen en un medio acuoso apropiado, tal como los fluidos corporales o un tampón fisiológicamente aceptable, en condiciones fisiológicas a lo largo de un prolongado período de tiempo, obteniendo así una liberación mantenida de compuestos TDFRP. Además, se puede hacer que las microesferas liberen compuestos TDFRP sin una explosión o liberación rápida inicial, minimizando de este modo los efectos no deseados observados con cantidades mayores de compuestos TDFRP localizados. Se define aquí liberación mantenida como la liberación de compuestos TDFRP a lo largo de un prolongado período de tiempo. La cantidad de tiempo a lo largo del cual los compuestos TDFRP continúan siendo liberados de la microesfera depende de las características del compuesto TDFRP que esté siendo liberado y de los parámetros usados para formar las microesferas, pero en todos los casos es mayor que el de la difusión acuosa libre del compuesto TDFRP.

Formación de microesferas

Se producen microesferas mezclando los compuestos TDFRP en una mezcla acuosa con un polímero o mezcla de polímeros hidrosolubles para formar las microesferas y, eventualmente, poniendo después en contacto las microesferas con un agente entrecruzante y/o una fuente de energía, preferiblemente calor, en condiciones suficientes para estabilizar las microesferas. La solución es preferiblemente una solución acuosa. O bien se añade el compuesto TDFRP en solución al polímero, o bien se añade la solución de polímero al compuesto TDFRP en solución, para provocar la eliminación de agua o la deshidratación del compuesto TDFRP. También se hace referencia a este proceso como exclusión de volumen. Se ajusta el pH de la solución de compuesto TDFRP-polímero, antes, después o durante la mezcla del polímero con el compuesto TDFRP, a un pH próximo al punto isoeléctrico (pI) del compuesto TDFRP, preferiblemente dentro de 3 a 4 unidades de pH del pI del compuesto TDFRP, más preferiblemente dentro de 1,5 a 2 unidades de pH del pI del compuesto TDFRP.

Se puede hacer el ajuste del pH añadiendo un ácido, una base, ya sea en solución o en forma sólida, o un tampón u otra solución o sal de ajuste del pH, bien al compuesto TDFRP, bien a la solución de polímero, bien a la mezcla de compuesto TDFRP y polímero, según métodos bien conocidos para los expertos en la técnica. Preferiblemente, se disuelve el polímero en un tampón que tiene un pH próximo al pI del compuesto TDFRP y se añade luego la solución de polímero de pH ajustado al compuesto TDFRP, que ha sido disuelto en una solución acuosa. El pH de la solución final debe permanecer próximo al pI del compuesto TDFRP.

Se expone entonces la solución de compuesto TDFRP y polímero a un agente entrecruzante y/o una fuente de energía, tal como calor, radiación o ionización, sola o en combinación con sonicación, agitación en vórtice, mezcla o agitación, durante un período de tiempo predeterminado, para estabilizar las microesferas. Se separan luego las microesferas resultantes de cualquier componente no incorporado que esté presente en la solución por métodos de separación físicos bien conocidos para los expertos en la técnica, y se pueden lavar después.

El período de tiempo de incubación depende de las concentraciones respectivas de polímero y compuesto TDFRP y del nivel de energía de la fuente de energía. La estabilización de las microesferas puede empezar a producirse inmediatamente con la exposición a la fuente de energía. Preferiblemente, se calienta la mezcla de compuesto TDFRP y polímero a una temperatura mayor que la temperatura ambiente durante entre aproximadamente 5 minutos y 24 horas. Más preferiblemente, se mezclan el polímero y el compuesto TDFRP por agitación o vaivén durante 30 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 37 grados C y 70 grados C. Cuando se preparan microesferas que contienen compuestos TDFRP, se puede añadir un estabilizador de proteínas, tal como glicerol, ácidos grasos, azúcares tales como sacarosa, iones tales como zinc, cloruro de sodio o cualquier otro estabilizador de proteínas conocido para los expertos en la técnica, antes de la adición de los polímeros durante la formación de las microesferas para minimizar la desnaturalización de las proteínas.

Microesferas revestidas

Se pueden unir moléculas, distintas de los compuestos TDFRP de los que están compuestas las microesferas, a la superficie externa de las microesferas por métodos conocidos para los expertos en la técnica para "revestir" o "decorar" las microesferas. La capacidad para unir moléculas a la superficie externa de la microesfera se debe a la alta concentración de compuesto TDFRP en la microesfera. Se unen estas moléculas con fines tales como facilitar la direccionalización, aumentar la mediación de receptores y proporcionar escape de la endocitosis o la destrucción, por ejemplo, usando partes del fragmento Fc de un anticuerpo (véanse las Patentes Estadounidenses 6.485.726 y 6.538.124). Por ejemplo, se pueden unir biomoléculas tales como fosfolípidos a la superficie de la microesfera para evitar la endocitosis por endosomas; se pueden unir receptores, anticuerpos u hormonas a la superficie para promover o facilitar la direccionalización de la microesfera al órgano, tejido o células deseadas del cuerpo; y se pueden unir polisacáridos, tales como glucanos, a la superficie externa de la microesfera para potenciar o para evitar la captación por macrófagos.

Además, se pueden unir una o más moléculas escindibles a la superficie externa de las microesferas o a su interior. Las moléculas escindibles son diseñadas de manera que las microesferas se dirijan primeramente a un sitio predeterminado en condiciones biológicas apropiadas y luego, tras exposición a un cambio en las condiciones biológicas, tales como un cambio en el pH, las moléculas se escindan, para provocar la liberación de la microesfera del sitio diana. De este modo, las microesferas se unen a, o son captadas por, células debido a la presencia de las moléculas unidas a la superficie de las microesferas. Cuando se escinde la molécula, las microesferas permanecen en la localización deseada, tal como dentro del citoplasma o del núcleo de una célula, y son libres de liberar los compuestos TDFRP de los que las microesferas están compuestas. Esto es particularmente útil para la administración de fármacos, donde las microesferas contienen un fármaco que se dirige a un sitio específico que requiere tratamiento, y el fármaco puede liberarse lentamente en ese sitio. El sitio preferido de escisión es un enlace diéster.

Las microesferas pueden también estar revestidas con una o más substancias estabilizadoras, lo que puede ser particularmente útil para la formación de depósitos a largo plazo con administración parenteral o para administración oral, al permitir el paso de las microesferas a través del estómago o del intestino sin disolución. Por ejemplo, se

pueden estabilizar microesferas destinadas a administración oral con un revestimiento de una substancia tal como mucina, una secreción que contiene mucopolisacáridos producida por las células caliciformes del intestino, las glándulas submaxilares y otras células glandulares mucosas.

Adicionalmente, las partículas pueden estar revestidas de una manera no covalente con compuestos tales como ácidos grasos o lípidos. Se puede aplicar el revestimiento a las microesferas por inmersión en la substancia de revestimiento solubilizada, pulverización de las microesferas con la substancia u otros métodos bien conocidos para los expertos en la técnica.

En general, se forman las microesferas de la invención mezclando la proteína junto con al menos un polímero hidrosoluble en condiciones adecuadas que, preferiblemente, permitan al polímero hidrosoluble eliminar agua de ("deshidratar") la proteína dentro de proporciones especificadas o preferidas (p/p) de proteína a polímero hidrosoluble (*v.g.*, las razones varían de aproximadamente 1 proteína:1 polímero a aproximadamente 1 proteína:1.000 polímero). La proporción preferida de proteína a polímero hidrosoluble en la reacción de formación de las microesferas es de aproximadamente 1 proteína:5 polímero a aproximadamente 1 proteína:30 polímero. Como se ha indicado anteriormente, un "polímero hidrosoluble" de la invención se refiere a un polímero o mezcla de polímeros que preferiblemente son capaces de interaccionar con la macromolécula (*v.g.*, proteína u otra molécula) para provocar exclusión de volumen. Así, el procedimiento preferido conlleva el uso de un sistema totalmente acuoso sin implicación de aceites o solventes orgánicos. Como polímeros hidrosolubles adecuados, se incluyen polímeros lineales o ramificados solubles, preferiblemente los que tienen un alto peso molecular. Los polímeros pueden ser altamente hidrosolubles, moderadamente hidrosolubles o ligeramente hidrosolubles (más de un 2% p/vol hidrosolubles). Los polímeros hidrosolubles preferidos son hidrosolubles o solubles en un solvente miscible con agua. Los polímeros hidrosolubles pueden ser solubilizados disolviéndolos primeramente en un solvente miscible con agua y combinando luego la solución de polímero con un solvente acuoso. En las realizaciones particularmente preferidas, el polímero hidrosoluble es un polímero basado en carbohidrato.

El polímero preferido es polivinilpirrolidona, polietilenglicol, dextrano, copolímero de polioxietileno-polioxipropileno, alcohol polivinílico, almidón, hetaalmidón o sus mezclas, cuyas características se describen con más detalle más adelante. Se puede preparar el polímero o la mezcla de polímeros según los métodos expuestos en la Patente Estadounidense Nº 5.525.519 o en la Solicitud de Patente PCT Nº US93-00073 (Publicación Internacional Nº WO 93/14110), en donde se disuelve el polímero en agua o en una solución acuosa, tal como un tampón, en una concentración de entre aproximadamente 1 y 50 g/100 ml dependiendo del peso molecular del polímero. La concentración total preferida de polímero en la solución de polímero es de entre el 10% y el 80%, expresada como porcentaje peso/volumen. La concentración preferida de cada polímero en la solución de polímero es de entre el 5% y el 50%. Como se ha discutido anteriormente, el pH de la solución de polímero puede ser ajustado antes de combinarla con la macromolécula, de tal forma que la adición del polímero cause un ajuste del pH de la solución de macromolécula, más preferiblemente dentro de una unidad de pH del pI. El pH puede ser ajustado durante la preparación de la solución de polímero preparando el polímero en un tampón que tiene un pH predeterminado. De manera alternativa, se puede ajustar el pH tras la preparación de la solución de polímero con un ácido o una base. El copolímero de polioxietileno-polioxipropileno, también conocido como poloxámero, es vendido por BASF (Parsippany, N.J.) y se puede obtener en una variedad de formas con diferentes porcentajes relativos de polioxietileno y polioxipropileno en el copolímero. La PVP es un polímero hidrofílico no ionogénico que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 10.000 a 700.000 y la fórmula química $(C_6H_9NO)[n]$. La PVP es también conocida como poli[1-(2-oxo-1-pirrolidinil)etileno], Povidona, Polividona, RP 143, Kollidon, Peregal ST, Periston, Plasdone, Plasmosan, Protagent, Subtosan y Vinisil. La PVP es no tóxica, altamente higroscópica y de fácil disolución en agua o solventes orgánicos. El polietilenglicol (PEG), también conocido como poli(oxietilen)glicol, es un polímero de condensación de óxido de etileno y agua que tiene la fórmula química general $HO(CH_2CH_2O)[n]H$. Dextrano es un término aplicado a polisacáridos producidos por bacterias que crecen sobre un substrato de sacarosa. Los dextranos nativos producidos por bacterias tales como *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacteria dextranicum* normalmente tienen un elevado peso molecular. Los dextranos tienen una disponibilidad rutinaria y se usan en forma inyectable como expansores del plasma en humanos. El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero preparado a partir de acetatos de polivinilo por substitución de los grupos acetato con grupos hidroxilo y tiene la fórmula $(CH_2CHOH)[n]$. La mayoría de los alcoholes polivinílicos son solubles en agua. El PEG, el dextrano, el PVA y la PVP están comercializados por proveedores químicos tales como Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo.). Más preferiblemente, el polímero es una mezcla de polímeros que contiene una solución acuosa de PVP con un peso molecular de entre 10.000 y 360.000, más preferiblemente 40.000, y PEG con un peso molecular de entre 200 y 35.000. Se prefiere la PVP con un peso molecular de 40.000 y el PEG con un peso molecular de 3.500. Preferiblemente, se disuelve la PVP en un tampón acetato y se añade el PEG a la solución acuosa de PVP. La concentración de cada polímero es preferiblemente de entre 1 y 40 g/100 ml dependiendo del peso molecular de cada polímero. Concentraciones iguales de PVP y PEG generalmente proporcionan la mezcla de polímeros más favorable para la formación de microesferas. Un polímero preferido alternativo es un dextrano, con un peso molecular de aproximadamente 3.000 a 500.000 daltons. El volumen de polímero añadido a la macromolécula varía dependiendo del tamaño, la cantidad y la concentración de la macromolécula. Preferiblemente, se añaden dos volúmenes de la mezcla de polímeros a una concentración total de polímero del 5-50% a un volumen de una solución que contiene la macromolécula. El polímero está presente en una fase líquida durante la reacción con la macromolécula. En algunas de las realizaciones, y en particular en las realizaciones de las microesferas que no

contienen además un agente acomplejante, el polímero hidrosoluble preferiblemente no es PEG, PVP, dextrano, etoxilatos de nonilfenol y/o alcohol polivinílico. Según otro aspecto de la invención, se proporciona una microesfera que además incluye un agente acomplejante. Un agente acomplejante se refiere a una molécula que es capaz de facilitar la carga, retener y/o de algún modo retrasar la liberación del agente terapéutico de la microesfera. Éstos son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas.

Las microesferas pueden ser administradas solas o en combinación con otras terapias con fármacos como parte de una composición farmacéutica. Dicha composición farmacéutica puede incluir las microesferas en combinación con cualquier soporte estándar fisiológica y/o farmacéuticamente aceptable, los cuales son conocidos en la técnica, por ejemplo cisplatina administrada con compuestos TDFRP. Las composiciones deben ser estériles y contener una cantidad terapéuticamente efectiva de la microesfera en una unidad de peso o volumen adecuada para administración a un paciente. El término "soporte farmacéuticamente aceptable", tal como se usa aquí, significa uno o más cargas, diluyentes o substancias encapsulantes compatibles sólidas o líquidas adecuadas para administración a un humano u otro animal. El término "soporte" indica un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el principio activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también pueden ser comezclados con las moléculas de la presente invención, y entre sí, de forma tal que no haya interacción, lo que alteraría substancialmente la eficacia farmacéutica deseada. Farmacéuticamente aceptable significa además un material no tóxico que sea compatible con un sistema biológico, tal como una célula, un cultivo de células, un tejido o un organismo. Las características del soporte dependerán de la vía de administración. Como soportes fisiológica y farmacéuticamente aceptables, se incluyen diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizadores, desecantes, agentes para aumentar el volumen, propulsores, agentes acidificantes, agentes de revestimiento, solubilizadores y otros materiales, los cuales son bien conocidos en la técnica. Se pueden encontrar formulaciones de soportes adecuadas para administración oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc. en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa.

Se dispone de una variedad de vías de administración. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, del compuesto TDFRP seleccionado, de la severidad de la afección que se esté tratando y de la dosificación requerida para la eficacia terapéutica. Los métodos de la invención, hablando en general, pueden ser practicados usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, lo que significa cualquier modo que produzca niveles efectivos de los principios activos sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. Dichos modos de administración incluyen las vías oral, rectal, tópica, nasal, interdérmica o parenteral. El término "parenteral" incluye subcutáneo, intravenoso, intramuscular o infusión. Se preferirá la administración oral para el tratamiento profiláctico, debido a la conveniencia para el paciente, así como al programa de dosificación. Las microesferas son útiles para terapia o profilaxis cuando es deseable administrar el compuesto TDFRP a un paciente y que se libere lentamente de las microesferas a lo largo del tiempo. Si no se puede formar una partícula con el compuesto TDFRP, se acompleja entonces éste con un soporte, tal como albúmina, y se da forma de microesfera al complejo soporte-compuesto farmacéutico. La microesfera o bien puede permitir la liberación lenta del compuesto TDFRP por todo el organismo, o bien puede incluir una molécula de afinidad específica para un tejido diana y ser inyectada a un paciente para la liberación controlada dirigida del compuesto TDFRP.

Ejemplo 16: Uso de compuestos TDFRP como revestimientos para dispositivos

Los compuestos TDFRP de la presente invención son útiles en la prevención o el tratamiento terapéutico de, *v.g.*, la inflamación, la apoptosis, la adhesión celular, y en particular la aterosclerosis, y la reestenosis vascular después de una angioplastia. Se puede usar el compuesto TDFRP en combinación con dispositivos médicos, *v.g.*, stents o catéteres, para prevenir o tratar, por ejemplo, la reestenosis vascular después de una angioplastia. Se ha reconocido que la proliferación y la migración de células musculares lisas tienen un papel clave en la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular (Martínez-González J *et al.*, Circ Res.; 92(1): 96-103 (2003)), incluyendo la reestenosis después de una angioplastia que da lugar a formación de neoíntima (Segev A *et al.*, Cardiovasc Res; 53(1): 232-41 (2002)).

La presente invención también proporciona stents y catéteres, que consisten en una estructura generalmente tubular (que incluye, por ejemplo, formas espirales), cuya superficie está revestida con un compuesto TDFRP, un polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP o un virus portador de una construcción codificante de un compuesto TDFRP antes descrito. Un stent es un andamiaje, normalmente de forma cilíndrica, que puede ser insertado en una vía de paso del cuerpo (*v.g.*, conductos biliares) o una porción de una vía de paso del cuerpo que se ha estrechado, adquirido un contorno irregular, obstruido u ocluido por un proceso morboso (*v.g.*, crecimiento hacia el interior por un tumor) con objeto de prevenir el cierre o cierre de nuevo de la vía de paso. Los stents actúan manteniendo físicamente abiertas las paredes de la vía de paso del organismo en la que se insertan.

En un aspecto, la invención proporciona un dispositivo médico implantable revestido que, cuando se le implanta a un sujeto, previene o trata un trastorno en el sujeto. El revestimiento sobre el dispositivo médico implantable puede contener una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo consistente en las SEC. Nº ID.: 1-347, o polinucleótidos codificantes de las SEC. Nº ID.: 1-347, y variantes, análogos, homólogos, o fragmentos de las mismas. Un dispositivo médico implantable se refiere a, e incluye, dispositivos contenidos en el cuerpo de un sujeto, tales como un stent, o aquéllos parcialmente incluidos en el cuerpo de un mamífero, tales como un trócar, un catéter

o una vía.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de producción de un dispositivo adecuado para implantación en un sujeto obteniendo un dispositivo médico implantable y revistiendo el dispositivo médico. El revestimiento sobre el dispositivo implantable puede contener una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo consistente en las SEC. Nº ID.: 1-347, o polinucleótidos codificantes de las SEC. Nº ID.: 1-347, y variantes, análogos, homólogos o fragmentos de las mismas.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de utilización de un dispositivo para prevenir o tratar un a trastorno en un sujeto. El método incluye la identificación de un sujeto con un trastorno, la obtención después de un dispositivo médico implantable que además tiene un revestimiento que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo consistente en las SEC. Nº ID.: 1-347, o polinucleótidos codificantes de las SEC. Nº ID.: 1-347, y variantes, análogos, homólogos o fragmentos de las mismas, y la implantación del dispositivo en un sujeto. En una realización, el dispositivo es implantado en un sujeto con un trastorno del sistema cardiovascular.

Se pueden usar catéteres de angioplastia de balón revestidos con gel de poli(óxido de etileno) [PEO] y poli(ácido acrílico) [PAA] comerciales como sistemas de administración local de fármacos (Gehrke *et al.*, en Intelligent Materials & Novel Concepts for Controlled Release Technologies, S. Dinh y J. DeNuzzio, Eds., ACS Symposium Series, Washington, D.C., 728, 43-53 (1999)). Se puede duplicar aproximadamente la carga de compuesto TDFRP, polinucleótidos codificantes de compuestos TDFRP o virus portador de un vector codificante de un compuesto TDFRP en revestimientos de gel de PEO con la adición de dextrano soluble a la solución de carga. La liberación de solutos, *v.g.*, compuesto TDFRP o virus portador de polinucleótidos codificantes de compuesto TDFRP, de revestimientos de gel está limitada por difusión, aunque la resistencia puede ser debida a la capa de límite, así como al gel.

Se puede utilizar una variedad de stents y catéteres en el contexto de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, stents esofágicos, stents vasculares, stents biliares, stents pancreáticos, stents ureterales y uretrales, stents lacrimales, stents para la trompa de Eustaquio, stents para las trompas de Falopio y stents traqueales/bronquiales, catéteres vasculares y catéteres uretrales.

Se pueden obtener fácilmente stents y catéteres de fuentes comerciales, o se pueden construir según técnicas bien conocidas. Como ejemplos representativos de stents que pueden ser llevados a un revestimiento con compuesto TDFRP, polinucleótidos codificantes de compuestos TDFRP o virus portadores de un vector codificante de un compuesto TDFRP, se incluyen los descritos en la Patente Estadounidense Nº 4.768.523, titulada "Adhesivo de hidrogel", la Patente Estadounidense Nº 4.776.337, titulada "Injerto intraluminal expandible y método y aparato para implantar un injerto intraluminal expandible"; la Patente Estadounidense Nº 5.041.126, titulada "Stent endovascular y sistema de administración"; la Patente Estadounidense Nº 5.052.998, titulada "Stent interno y método de utilización", la Patente Estadounidense Nº 5.064.435, titulada "Prótesis autoexpandible que tiene una longitud axial estable"; la Patente Estadounidense Nº 5.089.606, titulada "Espuma de hidrogel de polisacárido insoluble en agua para aplicaciones médicas"; la Patente Estadounidense Nº 5.147.370, titulada "Stent de nitinol para conductos corporales huecos"; la Patente Estadounidense Nº 5.176.626, titulada "Stent interno"; la Patente Estadounidense Nº 5.213.580, titulada "Procedimiento de sellado endoluminal polimérico biodegradable", la Patente Estadounidense Nº 5.685.847, titulada "Stent y sistema de administración terapéutica", la Patente Estadounidense Nº 5.683.448, titulada "Stent e injerto intraluminal", la Patente Estadounidense Nº 5.681.274, titulada "Stent ureteral de longitud variable", la Patente Estadounidense 5.665.115, titulada "Stent intraluminal", la Patente Estadounidense Nº 6.699.278, titulada "Stent con características óptimas de resistencia y radioopacidad", la Patente Estadounidense Nº 8 6.679.911, titulada "Stent flexible" y la Patente Estadounidense Nº 9 6.673.106, titulada "Dispositivo de stent intravascular".

Los stents y los catéteres pueden ser revestidos con un compuesto TDFRP, o polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP, o virus que contiene un vector codificante de un compuesto TDFRP, en una variedad de formas, incluyendo, por ejemplo: (a) fijando directamente al dispositivo un compuesto TDFRP, o polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP, o virus que contiene un vector codificante de un compuesto TDFRP (*v.g.*, pulverizando el stent con una película de polímero/fármaco o sumergiendo el stent en una solución de polímero/fármaco), (b) revistiendo el dispositivo con una substancia tal como un hidrogel que a su vez absorberá el compuesto TDFRP, o polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP, o virus que contiene un vector codificante de un compuesto TDFRP, (c) entretejiendo un hilo revestido de compuesto TDFRP, o polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP, o virus que contiene un vector codificante de un compuesto TDFRP (o el propio polímero formado en un hilo) en la estructura del dispositivo, (d) insertando el dispositivo en una funda o malla que está constituida por, o revestida con, un compuesto TDFRP, o polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP, o virus que contiene un vector codificante de un compuesto TDFRP, o (e) construyendo el propio dispositivo con un compuesto TDFRP. En realizaciones preferidas de la invención, el compuesto TDFRP, o polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP, o virus que contiene un vector codificante de un compuesto TDFRP debe adherirse firmemente al dispositivo durante el almacenamiento y en el momento de la inserción. Los compuestos TDFRP, o polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP, o virus que contiene un vector codificante de un compuesto TDFRP deben también preferiblemente no degradarse durante el almacenamiento, antes de la inserción o cuando se calientan hasta la temperatura corporal tras su expansión en el interior del cuerpo. Además, debe preferiblemente revestir el

dispositivo de forma lisa y uniforme, con una distribución uniforme de compuestos TDFRP, o polinucleótidos codificantes de un compuesto TDFRP, o virus que contiene un vector codificante de un compuesto TDFRP, pero sin cambiar el contorno del dispositivo. En realizaciones preferidas de la invención, la liberación del compuesto TDFRP, o polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP, de virus que contiene un vector codificante de un compuesto TDFRP debe ser uniforme y predecible y puede prolongarse al tejido que rodea al dispositivo una vez desplegado. Para stents y catéteres vasculares, además de las anteriores propiedades, el compuesto TDFRP, o polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP, o virus que contiene un vector codificante de un compuesto TDFRP no debe hacer que el stent o catéter se vuelva trombogénico (provocando la formación de coágulos de sangre), o causar una turbulencia significativa en el flujo sanguíneo (más de lo que se esperaría que causara el propio stent si no estuviese revestido).

También se pueden preparar parches a partir de materiales que contengan compuesto TDFRP o polinucleótido codificante de compuesto TDFRP, con o sin un transportador vírico. Por ejemplo, se pueden usar materiales de parche, *v.g.*, aunque sin limitación, Gelfoam o alcohol polivinílico (PVA), u otro material adecuado. Dichos parches pueden ser usados profiláctica o terapéuticamente para administrar compuesto TDFRP o polinucleótido codificante de compuesto TDFRP cuando contactan con una célula.

Ejemplo 17: Preparación de dispositivos revestidos de TDFRP

Como reactivos y equipo que se utilizan en los siguientes experimentos, se incluyen stents de grado médico obtenidos comercialmente de una variedad de fabricantes, *v.g.*, Cordis y Boston Scientific, y aparatos de contención, viales de escintigrafía de vidrio de 20 ml con tapón (de tipo inserción de plástico), atomizador de TLC, tanque de nitrógeno gaseoso, tubos de ensayo de vidrio (diversos tamaños desde 1 ml en adelante), vasos de precipitados de vidrio (diversos tamaños), pipeta Pasteur, pincitas, policaprolactona ("PCL"--PM de 10.000 a 20.000; Polysciences), compuesto TDFRP o polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP o infectado con un virus, *v.g.*, aunque sin limitación, adenovirus, que contiene dichas construcciones de TDFRP, vinilacetato de etileno ("EVA"--lavado--véase lo anterior), ácido poli(DL)láctico ("PLA"--PM de 15.000 a 25.000; Polysciences), diclorometano ("DCM"--grado HPLC, Fisher Scientific). Hay que entender que estos procedimientos pueden ser usados para revestir la superficie de muchos tipos diferentes de dispositivos, tales como stents y catéteres.

A. Procedimiento para stents pulverizados

Lo que viene a continuación describe un método que utiliza un stent de alambre metálico intercalante de 3 mm de diámetro corrugado de aproximadamente 3 cm de longitud. Para stents de mayores diámetros, se usan mayores volúmenes de solución de polímero/fármaco. Brevemente, se pesa una cantidad suficiente de polímero directamente en un vial de escintigrafía de vidrio de 20 ml, y se añade suficiente DCM para conseguir una solución al 2% p/v. Se tapa entonces el vial y se mezcla a mano para disolver el polímero. Se monta luego el stent en una orientación vertical, atando el stent a un soporte de retorta con nilón. Se sitúa este aparato de sujeción del stent a 6 a 12 pulgadas por encima del suelo de la campana de humos sobre un soporte adecuado (*v.g.*, vaso de precipitados de vidrio de 2.000 ml invertido) para permitir la pulverización horizontal. Usando una pipeta automática, se transfiere un volumen adecuado (mínimo 5 ml) de la solución de polímero al 2% a un vial de escintigrafía de vidrio de 20 ml independiente. Se añade entonces a la solución una cantidad apropiada de compuesto TDFRP o polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP o un transportador vírico, *v.g.*, aunque sin limitación, adenovirus, que contiene un vector codificante de un compuesto TDFRP y se disuelve por agitación manual. Para preparar para la pulverización, se retira la tapa del vial y se sumerge el cilindro (sólo) de un atomizador de TLC en la solución de polímero. No es necesario utilizar el reservorio del atomizador en este procedimiento: el vial de vidrio de 20 ml actúa como reservorio. Un tanque de nitrógeno está conectado a la entrada de gas del atomizador. Se aumenta gradualmente la presión hasta comenzar la atomización y la pulverización. Se anota la presión y se usa esta presión en todo el procedimiento. Se pulveriza el stent usando pulverizadores oscilantes de 5 segundos con un tiempo de secado de 15 segundos entre pulverizaciones. Después de 5 pulverizaciones, se gira el stent 90° y se pulveriza de nuevo. Se repite este procedimiento hasta que todos los lados del stent han sido pulverizados. Durante el tiempo de secado, se pellizca la conducción de gas con los dedos para evitar desperdiciar la pulverización. Se continúa pulverizando hasta que se ha depositado una cantidad adecuada de polímero sobre los stents. La cantidad puede estar basada en la aplicación específica del stent *in vivo*. Para determinar la cantidad, se pesa el stent tras haberse completado la pulverización y haberse secado el stent. Se resta el peso original del stent del peso acabado y esto da la cantidad de polímero (más compuesto TDFRP) aplicada al stent. Los stents revestidos son típicamente almacenados en un recipiente sellado hasta su uso.

B. Procedimiento para stents sumergidos

Lo que viene a continuación describe un método que utiliza un stent de alambre metálico intercalante de 3 mm de diámetro corrugado de aproximadamente 3 cm de longitud. Para stents de mayores diámetros, se usan mayores volúmenes de solución de polímero/fármaco en tubos de ensayo de mayor tamaño.

Se pesan 2 g de EVA en un vial de escintigrafía de vidrio de 20 ml y se añaden 20 ml de DCM. Se tapa el vial y se deja durante 2 horas para que se disuelvan (se agita el vial frecuentemente para ayudar al proceso de disolución).

Se pone una cantidad conocida de compuesto TDFRP, o polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP, en un tubo de ensayo de vidrio de 1 ml y se añaden 0,5 ml de la solución de polímero. Usando una pipeta Pasteur de vidrio, se suspende/disuelve el compuesto TDFRP, polinucleótido codificante de un compuesto TDFRP o transportador vírico, *v.g.*, aunque sin limitación, adenovirus, que contiene un vector codificante de un compuesto TDFRP bombeando suavemente la solución de polímero. Una vez mezclados o disueltos adecuadamente los materiales, se mantiene el tubo de ensayo en una posición casi horizontal (la pegajosa solución de polímero no fluye hacia fuera). Se inserta el stent en el tubo hasta el fondo usando un par de pincitas. Se deja que la solución que contiene polímero fluya casi hasta la boca del tubo de ensayo inclinando la boca por debajo de la horizontal y restaurando luego el tubo de ensayo a un ángulo ligeramente por encima de la horizontal. Se gira lentamente el stent en el tubo y se retira luego cuidadosamente (aproximadamente 30 segundos). Se seca el stent revestido en una posición vertical. Los stents revestidos son típicamente almacenados en un recipiente sellado hasta su uso.

Ejemplo 18: Compuestos TDFRP coadministrados con proteínas morfogenéticas óseas y otros mediadores de rutas de señalización

Los compuestos TDFRP son agonistas y antagonistas funcionales de los receptores ALK y median en actividades biológicas que se propagan a través de estos receptores. Se observan actividades biológicas similares con las proteínas morfogenéticas óseas, particularmente BMP-7 (OP-1), como se discute por toda esta solicitud. Estos efectos biológicos, comunes a las proteínas de la familia BMP y a los compuestos TDFRP aquí descritos, pueden ser descritos generalmente como efectos de tipo diferenciación tisular, efectos de tipo factor de crecimiento, compromiso de linaje y renovación y reparación de tejidos.

Las moléculas de señalización BMP coadministradas con compuestos TDFRP muestran una señalización secuencia abajo sinérgica o potenciada, como se detecta por la fosforilación de Smad. Se valoró la fosforilación de Smad por análisis Western en células LNCaP (células de cáncer de próstata) o EC (células endoteliales vasculares) en medio de cultivo expuesto a concentraciones variables de compuestos TDFRP o control. BMP-7 servía como control positivo. Se lisan las células en tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,1%) que contenía PMSF 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y 10 ug/ml de cóctel inhibidor de proteinasas. Se incuban los lisados sobre hielo durante 15 minutos, se centrifugan y se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio. Se usan de 50 a 100 ug para análisis por SDS-PAGE. Se electrotransfieren las proteínas resueltas a una membrana de PVDF. Se bloquea el blot incubando en leche desnatada deshidratada al 3% preparada en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación lenta constante. Se incuba el blot con 1-2 ug/ml de anticuerpo primario (anti-fosfo-Smad 1 de conejo) preparado en PBS-leche durante la noche con agitación a 4 grados C, se lava dos veces con PBS y se incuba con anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo conjugada con HRP, dilución 1:3000) a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación. Después de lavar en PBS-Tween 20 al 0,05% durante 5 minutos y de enjuagar, se detecta la fosforilación de Smad mediante una reacción HRP según las instrucciones del fabricante (FIG. 3, 27).

Se induce la fosforilación de Smad mediante BMP-6 o compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) en células LNCaP (FIG. 27). La cantidad de fosforilación de Smad aumenta cuando se coadministran BMP-6 y compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) en células LNCaP (FIG. 27).

Varias líneas de evidencia han sugerido que la proteína morfogenética ósea (BMP) inhibe la proliferación de células de cáncer de próstata humano sensibles a andrógenos (LNCaP) e insensibles a andrógenos (PC-3, DU-145). Las señales BMP inhiben el crecimiento y la proliferación de células de tumores de próstata humanos por regulación a más del inhibidor de kinasa dependiente de ciclina (CDKI) p21 (CIP1/WAF1) y disminución de la actividad de Cdk2, para dar lugar a hipofosforilación de proteínas Rb. Se han cribado los compuestos TDFRP en bioensayos de cáncer de próstata y vejiga *in vitro* para valorar la actividad inhibitoria del crecimiento de los compuestos (FIG. 3, 28). Se estudian los compuestos TDFRP en estas células cancerosas en cuanto a la capacidad para inducir fosforilación de Smad 1/5 regulada por receptores de un modo dependiente de la dosis (FIG. 3, 27).

Estos efectos biológicos son similares a los observados con mediadores de otras rutas de señalización. Por ejemplo, los miembros de la familia Hedgehog de moléculas señalizadoras median en muchos procesos importantes de diseño de corto y largo rango durante el desarrollo de invertebrados y vertebrados. En la mosca, un solo gen Hedgehog regula el diseño de discos segmentarios e imaginales. Aunque sólo se ha encontrado un gen Hedgehog en *Drosophila* y otros invertebrados, múltiples genes Hedgehog están presentes en vertebrados, donde una familia de genes Hedgehog está implicada en el control de, por ejemplo, la asimetría izquierda-derecha, la polaridad en el SNC, los somitas y los miembros, la organogénesis, la condrogénesis y espermatogénesis. De igual modo, se han aislado varios homólogos Hedgehog de diversas especies de vertebrados.

La familia de genes Hedgehog de vertebrados incluye al menos cuatro miembros, *v.g.*, parálogos del único gen hedgehog de *Drosophila*. Se describen ejemplos de genes y proteínas Hedgehog en las publicaciones PCT WO 95/18856 y WO 96/17924. Tres de estos miembros, a los que se hace aquí referencia como Desert Hedgehog (Dhh), Sonic Hedgehog (Shh) e Indian Hedgehog (Ihh), existen aparentemente en todos los vertebrados, incluyendo peces, aves y mamíferos. Un cuarto miembro, al que se hace aquí referencia como tiggie-winkle Hedgehog (Thh), parece específico para peces. Desert Hedgehog se expresa principalmente en los testículos, tanto en el desarrollo

embrionario del ratón como en el roedor y el humano adultos; Indian Hedgehog está implicado en el desarrollo del hueso durante la embriogénesis y en la formación del hueso en el adulto; y Sonic Hedgehog está primariamente implicado en actividades morfogénicas y neuroinductoras. Dadas las funciones inductoras críticas de los polipéptidos Hedgehog en el desarrollo y mantenimiento de los órganos de vertebrados, la identificación de proteínas que interaccionen con, o modulen, Hedgehog es de una enorme significación en contextos tanto clínicos como de investigación.

En vertebrados, se han clonado varios genes hedgehog en los últimos años. De estos genes, Shh ha recibido la mayor parte de la atención experimental, ya que se expresa en diferentes centros organizativos, que son las fuentes de señales que diseñan los tejidos próximos. La evidencia reciente indica que Shh está implicado en estas interacciones.

La expresión de Shh comienza poco después del inicio de la gastrulación en el presunto mesodermo de la línea media, el nódulo en el ratón (Chang *et al.* (1994) *supra*; Echelard, Y. *et al.* (1993) Cell 75: 1417-1430), la rata (Roelink, H. *et al.* (1994) Cell 76: 761-775) y el pollo (Riddle, R. D. *et al.* (1993) Cell 75: 1401-1416), y la armadura en el pez cebra (Ekker *et al.* (1995) *supra*; Krauss, S. *et al.* (1993) Cell 75: 1431-1444). En embriones de pollo, el patrón de expresión de Shh en el nódulo desarrolla una asimetría izquierda-derecha, que parece ser responsable del situs izquierdo-derecho del corazón (Levin, M. *et al.* (1995) Cell 82: 803-814). En el SNC, el Shh de la notocorda y la placa basal parece inducir destinos celulares ventrales. Cuando se expresa ectópicamente, Shh da lugar a una ventralización de grandes regiones del cerebro medio y posterior en el ratón (Echelard *et al.* (1993) *supra*; Goodrich, L. V. *et al.* (1996), Genes Dev. 10: 301-312), Xenopus (Roelink, H. *et al.* (1994) *supra*; Ruiz Altaba, A. *et al.* (1995), Mol. Cell. Neurosci. 6: 106-121) y el pez cebra (Ekker *et al.* (1995) *supra*; Krauss *et al.* (1993) *supra*; Hammerschmidt, M., *et al.* (1996), Genes Dev. 10: 647-658). En explantes de neuroectodermo intermedio a niveles de médula espinal, la proteína Shh induce el desarrollo de la placa basal y de las neuronas motoras con distintos umbrales de concentración, de la placa motora a altas concentraciones y de las neuronas motoras a concentraciones más bajas (Roelink *et al.* (1995) *supra*; Mart *et al.* (1995) *supra*; Tanabe, Y. *et al.* (1995), Curr. Biol. 5: 651-658). Además, el bloqueo de anticuerpos sugiere que el Shh producido por la notocorda es necesario para la inducción mediada por la notocorda de los destinos de las neuronas motoras (Mart' *et al.* (1995) *supra*). Así, la alta concentración de Shh sobre la superficie de las células de la línea media productoras de Shh parece responder de la inducción mediada por contacto de la placa basal observada *in vitro* (Placzek, M. *et al.* (1993), Development 117: 205-218) y del posicionamiento en la línea media de la placa basal inmediatamente por encima de la notocorda *in vivo*. Menores concentraciones de Shh liberadas de la notocorda y la placa basal inducen presumiblemente neuronas motoras en regiones ventrolaterales más distantes en un proceso que ha mostrado ser independiente del contacto *in vitro* (Yamada, T. *et al.* (1993), Cell 73: 673-686). En explantes tomados a niveles del cerebro medio y del cerebro anterior, Shh también induce los tipos celulares neuronales ventrolaterales apropiados, precursores dopaminérgicos (Heynes, M. *et al.* (1995), Neuron 15: 35-44; Wang, M. Z. *et al.* (1995), Nature Med. 1: 1184-1188) y colinérgicos (Ericson, J. *et al.* (1995), Cell 81: 747-756), respectivamente, lo que indica que Shh es un inductor común de la especificación ventral en la totalidad del SNC. El Shh de la línea media también diseña las regiones paraxiales del embrión de vertebrados, los somitas en el tronco (Fan *et al.* (1995) *supra*) y el mesénquima de la cabeza rostral a los somitas (Hammerschmidt *et al.* (1996) *supra*). En explantes de mesodermo paraxial de pollo y ratón, Shh promueve la expresión de marcadores específicos de esclerotomas, como Pax1 y Twist, a expensas del marcador dermamiotomal Pax3. Además, experimentos de barrera de filtro sugieren que Shh media en la inducción de la esclerotoma directamente en lugar de por activación de un mecanismo de señalización secundario (Fan, C.-M. y Tessier-Lavigne, M. (1994), Cell 79, 1175-1186). Shh también induce la expresión de genes miotomales (Hammerschmidt *et al.* (1996) *supra*; Johnson, R. L. *et al.* (1994), Cell 79: 1165-1173; Munsterberg, A. E. *et al.* (1995), Genes Dev. 9: 2911-2922; Weinberg, E. S. *et al.* (1996), Development 122: 271-280), aunque experimentos recientes indican que los miembros de la familia WNT, homólogos en vertebrados de Drosophila, áptera, son necesarios conjuntamente (Munsterberg *et al.* (1995) *supra*). Es desconcertante el hecho de que la inducción miotomal en pollos requiera mayores concentraciones de Shh que la inducción de marcadores esclerotomales (Munsterberg *et al.* (1995) *supra*), aunque la esclerotoma se origina de células somíticas situadas mucho más cerca de la notocorda. Se obtuvieron resultados similares en el pez cebra, donde altas concentraciones de Hedgehog inducen la expresión de genes marcadores miotomales y reprimen la de los genes marcadores esclerotomales (Hammerschnudt *et al.* (1996) *supra*). Contrariamente a los amniotas, sin embargo, estas observaciones son consistentes con la arquitectura del embrión de pez, ya que aquí el miótomo es el componente predominante y más axial de los somitas. Por lo tanto, la modulación de la señalización de Shh y la adquisición de nuevos factores de señalización pueden haber modificado la estructura de los somitas durante la evolución de los vertebrados.

En los primordios de los miembros de los vertebrados, un subgrupo de células mesenquimales posteriores, la "zona de actividad polarizante" (ZPA), regula la identidad anteroposterior de los dedos (revisado en Honig, L. S. (1981), Nature 291: 72-73). La expresión ectópica de Shh o la aplicación de perlas empapadas en péptido Shh imita el efecto de injertos de ZPA anteriores, generando una duplicación en imagen especular de los dedos (Chang *et al.* (1994) *supra*; López-Martínez *et al.* (1995) *supra*; Riddle *et al.* (1993) *supra*). Por lo tanto, la identidad dactilar parece depender primariamente de la concentración de Shh, aunque es posible que otras señales puedan transmitir esta información a lo largo de las substanciales distancias que parecen ser necesarias para el diseño AP (100-150 micrómetros). De forma similar a la interacción de HH y DPP en los discos imaginales de Drosophila, el Shh en el primordio de los miembros de los vertebrados activa la expresión de Bmp2 (Francis, P. H. *et al.* (1994), Development

120: 209-218), un homólogo de dpp. Sin embargo, a diferencia de DPP en Drosophila, BMP2 no consigue imitar el efecto polarizante de Shh tras aplicación ectópica en el primordio del miembro de pollo (Francis *et al.* (1994) *supra).* Además del diseño anteroposterior, Shh también parece estar implicado en la regulación del crecimiento hacia fuera proximodistal de los miembros por inducción de la síntesis del factor de crecimiento de los fibroblastos FGF4 en el borde ectodérmico apical posterior (Laguer, E. *et al.* (1994), Cell 79: 993-1003; Niswander, L. *et al.* (1994), Nature 371: 609-612).

Es probable que la estrecha relación entre las proteínas Hedgehog y las BMP se ha conservado en muchos sitios, aunque probablemente no en todos, de expresión de Hedgehog en vertebrados. Por ejemplo, en el intestino posterior del pollo, se ha visto que Shh induce la expresión de Bmp4, otro homólogo de dpp en vertebrados (Roberts, D. J. *et al.* (1995), Development 121: 3163-3174). Además, Shh y BMP2, 4 ó 6 muestran una sorprendente correlación en su expresión en las células epiteliales y mesenquimales del estómago, el sistema urogenital, el pulmón, los primordios dentales y los folículos pilosos (Bitgood, M. J. y McMahon, A. P. (1995), Dev. Biol. 172: 126-138).

La evidencia reciente sugiere un modelo en el que Indian hedgehog (Ihh) tiene un papel crucial en la regulación del desarrollo condrogénico. Ihh, uno de los otros dos genes Hedgehog en ratón, se expresa en posición adyacente a las células que expresan BMP en el intestino y el cartílago en desarrollo (Bitgood y McMahon (1995) *supra*). Durante la formación del cartílago, los condrocitos proceden desde un estado proliferante y a través de un estado prehipertrófico intermedio a condrocitos hipertróficos diferenciados. Ihh se expresa en los condrocitos prehipertróficos e inicia una cascada de señalización que conduce al bloqueo de la diferenciación de los condrocitos. Su diana directa es el pericondrio alrededor del dominio de expresión de Ihh, que responde mediante la expresión de Gli y Patched (Ptc), dianas transcripcionales conservadas de las señales Hedgehog. Muy probablemente, esto conduce a una señalización secundaria que da como resultado la síntesis de proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) en el pericondrio periarticular. La propia PTHrP retroseñaliza hacia los condrocitos prehipertróficos, bloqueando su posterior diferenciación. Al mismo tiempo, la PTHrP reprime la expresión de Ihh, formando así un bucle de retroalimentación negativa que modula el índice de diferenciación de los condrocitos.

Los compuestos TDFRP aquí descritos son adecuados para administración a un sujeto conjuntamente con BMP y otros mediadores de la ruta Hedgehog. Esto incluye la coadministración de TDFRP con BMP y mediadores de Hedgehog, por ejemplo como parte de una única formulación farmacéutica. La coadministración también incluye proporcionar los compuestos TDFRP y los mediadores de Hedgehog y/o BMP al sujeto en formulaciones farmacéuticas separadas. La coadministración incluye proporcionar los compuestos TDFRP, los mediadores de Hedgehog y/o BMP simultánea o intermitentemente, por ejemplo múltiples dosis al día, una dosis al día, una dosis en días alternos, administración semanal o mensual, etc.

Ejemplo 19: Compuestos TDFRP y rutas de señalización p38 MAPK

Las proteínas Smad son los substratos y los mediadores de las kinasas de receptores de serina/treonina unidas a BMP. La activación inducida por ligando de los receptores de BMP con actividad serina/treonina kinasa intrínseca desencadena la fosforilación de las Smad reguladas por receptores (R-Smad) Smad 1, Smad 3 y Smad 8. La dependencia multifuncional y de contexto de las respuestas BMP se refleja en la función de las Smad como integradores de señal. Ciertas Smad están somáticamente mutadas con gran frecuencia en tipos particulares de cánceres humanos. La fosforilación diferencial de R-Smad puede estar influida por la señalización MAPK. Se encuentran sitios de consenso MAPK en todas las Smad, incluyendo Smad 1, Smad 5 y Smad 8, que transmiten las acciones de las BMP. Además, se ha visto que el engranaje de las tirosina kinasas de receptores da lugar a fosforilación de sitios de consenso MAPK sobre las R-Smad en la región de conexión entre sus dominios Mad Homology 1 (MH1) y MH2 conservados (Massague J (2003), Genes & Dev. 17, 2993-2997). A nivel celular, la mutación del conector afecta a los contactos celulares, al citoesqueleto de actina y a la acumulación nuclear de beta-catenina, que guardan correlación con la retención de Smad 1 en la membrana. Además, las rutas Smad y MAPK actúan sinérgicamente en la ruta BMP para controlar el desarrollo de los miembros (Zuzarte-Luis *et al.* (2004), Dev Biol. 272, 39-52). Recientemente, se ha visto que BMP-7 actúa a través de las rutas Smad y p38 MAPK en un gradiente de actividad dependiente de dosis para controlar los índices de proliferación celular, crecimiento de los túbulos y ramificación durante el desarrollo del riñón (Hu *et al.* (2004), J Biol Chem. 279, 12051-12059). Por lo tanto, la ruta p38 MAPK parece controlar las respuestas a bajas dosis de BMP-7, dando lugar a una mayor proliferación celular y ramificación, mientras que las Smad controlan las respuestas a dosis más altas de BMP-7 para suprimir la proliferación celular y la ramificación. En otro estudio, se vio que las Smad activadas por BMP y ATF2 (una diana secuencia abajo para p38 MAPK) actuaban cooperativamente para controlar la expresión del gen de la cadena pesada de la beta-miosina y la diferenciación de los cardiomiocitos (Monzen *et al.* (2001), J Cell Biol. 153, 687-698). Los compuestos TDFRP pueden activar las rutas de señalización tanto de Smad como de p38 MAPK.

Indicaciones terapéuticas

La administración terapéutica o profiláctica de compuestos TDFRP, con cualquiera o con ambos de los mediadores de la ruta Hedgehog y/o BMP, es adecuada para tratar numerosos trastornos celulares. Como proteínas Hedgehog adecuadas para uso aquí, se incluyen Shh, Ihh o Dhh, y un mediador Hedgehog adecuado para uso aquí incluye

compuestos que regulan a más o regulan a menos la expresión de Shh, Ihh o Dhh. Las BMP adecuadas para coadministración con compuestos TDFRP incluyen BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 (Vgr-1), BMP-7 (OP-1), BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMPs-15 y BMP-16, incluyendo además cualquier proteína dimérica, tal como homodímeros, heterodímeros o sus combinaciones, solos o junto con otras moléculas capaces de inducir un efecto secuencia arriba o secuencia abajo de una BMP, tales como las proteínas Hedgehog, los TDFRP o los ADN que los codifican y cualesquiera combinaciones de los mismos. Se hace referencia de manera colectiva a estos Hedgehog, BMP y compuestos TDFRP como "compuestos" a partir de aquí, y las formulaciones que contienen Hedgehog, BMP y compuestos TDFRP en diversas combinaciones son adecuadas para las siguientes indicaciones usando las dosificaciones descritas aquí y en las referencias citadas.

Los términos "ruta de señalización hedgehog", "ruta hedgehog" y "ruta de transducción de señal hedgehog" son todos usados para referirse a la cadena de sucesos normalmente mediados por hedgehog, smoothened, ptc y gli, entre otros, y que dan lugar a cambios en la expresión génica y a otros cambios fenotípicos típicos de la actividad hedgehog. La activación de un componente secuencia abajo puede activar la ruta hedgehog incluso en ausencia de una proteína hedgehog. Por ejemplo, la sobreexpresión de smoothened activará la ruta en ausencia de hedgehog. La expresión génica de gli y ptc es indicadora de una ruta de señalización hedgehog activa. El término "antagonista de hedgehog" se refiere a un agente que potencia o recapitula la bioactividad de patched, tal como para reprimir la transcripción de genes diana. Se pueden usar antagonistas de hedgehog preferidos para superar una pérdida de función ptc y/o una ganancia de función smoothened, haciéndose también referencia a esto último como antagonistas de smoothened. Otros antagonistas preferidos de hedgehog pueden ser usados para superar un aumento inapropiado en la transducción de señal hedgehog, tanto si dicho aumento en la transducción de señal es el resultado de una mutación/lesión en un componente de la ruta de señalización hedgehog (*v.g.*, ptc, gli1, gli3, smoothened, etc) como si dicho aumento en la transducción de señal se produce en el contexto de una célula que no tiene una mutación/lesión en un componente de la ruta de señalización hedgehog (*v.g.*, una célula de tipo salvaje con respecto a los componentes de la ruta de señalización hedgehog). El término 'antagonista de hedgehog', tal como se usa aquí, se refiere no sólo a cualquier agente que pueda actuar inhibiendo directamente la función normal de la proteína hedgehog, sino también a cualquier agente que inhiba la ruta de señalización hedgehog, y de este modo recapitule la función de ptc. Un antagonista de hedgehog puede ser una molécula pequeña, un anticuerpo (incluyendo, aunque sin restricción: un diacuerpo, anticuerpo de una sola cadena, anticuerpo monoclonal, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE o un fragmento de anticuerpo que comprenda al menos un par de regiones variables), un ácido nucleico antisentido, PNA o ribozima, construcción de ARNi o una proteína hedgehog mutante que pueda alterar o inhibir la señalización hedgehog. Un aspecto de la presente solicitud se relaciona con un método para modular el estado de crecimiento de un tejido pulmonar, o una célula del mismo, *v.g.*, poniendo en contacto ectópicamente el tejido, *in vitro* o *in vivo*, con un mediador Hedgehog o una BMP, con un compuesto TDFRP en una cantidad efectiva para alterar el ritmo (promover o inhibir) de proliferación de las células en el tejido pulmonar, *v.g.*, en relación a la ausencia de administración del mediador Hedgehog o BMP, con el TDFRP, o sin ningún TDFRP. El método en cuestión puede ser usado, por ejemplo, para modular el estado de crecimiento de las células epiteliales y/o mesenquimales de un tejido pulmonar, tal como puede ser útil como parte de un régimen para la prevención de un estado de enfermedad, o en el tratamiento de un estado de enfermedad existente u otro daño en el tejido pulmonar. Para una mayor discusión de la regulación del tejido pulmonar por polipéptidos de tipo Hedgehog y formulaciones y usos relacionados con los mismos, véase la Solicitud de Patente Estadounidense 20040171546 de Pepicelli *et al.*

Para una discusión de la regulación de los adipocitos por polipéptidos y formulaciones de tipo Hedgehog y usos relacionados con los mismos, véase la Solicitud de Patente Estadounidense 20040171533 de Zehentner *et al.*

La familia de factores de crecimiento TGF-beta, particularmente el homólogo de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP)-2/4 decapentapléjico (dpp), son específicamente necesarios para mantener las células madre de la línea germinal y promover su división. La sobreexpresión de dpp bloquea la diferenciación de las células madre de la línea germinal. Las mutaciones en dpp o su receptor saxofón aceleran la pérdida de células madre y retardan la división de las células madre. La señalización de dpp es directamente recibida por las células madre de la línea germinal y, por lo tanto, la señalización de dpp ayuda a definir un nicho que controla la proliferación de las células madre de la línea germinal. La Solicitud de Patente Estadounidense 20040157324 de Spradling *et al.* discute un método para el mantenimiento y la propagación de células madre de la línea germinal usando miembros de la familia de factores de crecimiento TGF-beta (BMP). Para una discusión en cuanto a la diferenciación de células madre por polipéptidos y formulaciones de tipo Hedgehog y usos relacionados con los mismos, véase la Solicitud de Patente Estadounidense 20040171153 de Andrews *et al.*

La presente invención se relaciona con el descubrimiento de que las rutas de transducción de señal reguladas por hedgehog, patched (ptc), gli y/o smoothened pueden ser inhibidas, al menos en parte, por antagonistas de hedgehog. Aunque no deseamos estar sujetos a teoría alguna, en el caso de los antagonistas de molécula pequeña, la modulación de un receptor puede ser el mecanismo mediante el cual actúan estos agentes. Por ejemplo, la capacidad de estos agentes para inhibir la proliferación de células con pérdida de función patched (ptc.sup.lof) puede ser debida a la capacidad de dichas moléculas para interaccionar con hedgehog, patched o smoothened, o al menos para interferir con la capacidad de esas proteínas para activar una ruta de transducción de señal mediada por hedgehog, ptc y/o smoothened. Se contempla, por lo tanto, específicamente que estas moléculas pequeñas que interfieren con aspectos de la actividad de transducción de señal hedgehog, ptc o smoothened serán igualmente

capaces de cambiar el papel de una célula en el desarrollo tisular con respecto a lo que de otro modo ocurriría. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que los antagonistas para uso en la presente invención pueden antagonizar la señalización hedgehog en cualquier punto de la ruta de señalización hedgehog. Es decir, un antagonista ejemplar puede reducir la señalización hedgehog uniéndose a hedgehog y antagonizándolo, como por ejemplo usando un anticuerpo para hedgehog. De forma similar, un antagonista ejemplar puede interferir con la interacción entre hedgehog y el receptor de hedgehog patched. Adicionalmente, un experto en la técnica reconocerá que los antagonistas ejemplares pueden interferir con la señalización hedgehog actuando intracelularmente, como por ejemplo usando un antagonista de molécula pequeña que actúa sobre un componente intracelular de la ruta de señalización hedgehog. Se contempla que los antagonistas de hedgehog de la presente invención pueden ser usados para antagonizar la señalización hedgehog en una célula de tipo salvaje o en una célula que tiene una mutación en un componente de la ruta de señalización hedgehog. Por lo tanto, los métodos de la presente invención incluyen el uso de moléculas pequeñas que antagonizan la inhibición por ptc de la señalización hedgehog en la regulación del rendimiento reparador y/o funcional de un amplio rango de células, tejidos y órganos que tienen el fenotipo de ganancia de función de hedgehog y en tejidos con actividad hedgehog de tipo salvaje. Por ejemplo, el presente método tiene aplicaciones terapéuticas y cosméticas, que abarcan la regulación de tejidos neurales, la formación y reparación de hueso y cartílago, la regulación de la espermatogénesis, la regulación del músculo liso, la regulación del pulmón, del hígado y de tejidos de otros órganos que surgen del intestino primitivo, la regulación de la función hematopoyética, la regulación de la piel y el crecimiento del pelo, etc. Además, los métodos en cuestión puede ser realizados sobre células en cultivo (*in vitro*) o sobre células en un animal entero (*in vivo*). Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 95/18856 y WO 96/17924 (cuyas memorias descriptivas son aquí expresamente incorporadas a modo de referencia). En otro aspecto, la presente invención proporciona preparaciones farmacéuticas que tienen, como principio activo, un antagonista de hedgehog o agonista de ptc tal como se describe aquí, formulados en una cantidad suficiente para inhibir, *in vivo*, la proliferación u otras consecuencias biológicas de la ganancia de función hedgehog. Los tratamientos en cuestión que usan antagonistas de hedgehog pueden ser efectivos para sujetos tanto humanos como animales. Los sujetos animales a los que la invención es aplicable se extienden tanto a animales domésticos como a ganado, criados como mascotas o con fines comerciales. Son ejemplos perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos y cabras.

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con métodos de modulación de un estado diferenciado, de la supervivencia y/o de la proliferación de una célula.

Por ejemplo, se contempla que el presente método podría ser usado para inhibir la angiogénesis. Se sabe que hedgehog estimula la angiogénesis. Tapones de Matrigel impregnados con proteína hedgehog e insertados en ratones demuestran una substancial neovascularización, mientras que tapones de Matrigel que no llevan hedgehog muestran comparativamente poca vascularización. Además, las proteínas hedgehog estimulan la proliferación de las células musculares lisas vasculares *in vivo*. Las proteínas hedgehog también hacen que los fibroblastos aumenten la expresión de factores de crecimiento angiogénico tales como VEGF, bFGF, Ang-1 y Ang-2. Por último, se sabe que las proteínas hedgehog estimulan la recuperación de la lesión isquémica y estimulan la formación de vasos colaterales.

Dado que hedgehog promueve la angiogénesis, se espera que los antagonistas de hedgehog actúen como inhibidores de la angiogénesis, particularmente en situaciones en las cuales es necesario algún nivel de señalización hedgehog para la angiogénesis.

La angiogénesis es fundamental para muchos trastornos. Se produce una angiogénesis no regulada persistente en una serie de estados de enfermedad, metástasis tumorales y crecimientos anormales por las células endoteliales. La vasculatura creada como resultado de los procesos angiogénicos soporta el daño patológico observado en estas afecciones. Los diversos estados patológicos creados debido a una angiogénesis no regulada han sido agrupados conjuntamente como enfermedades dependientes de angiogénesis o asociadas a angiogénesis. Las terapias dirigidas a controlar los procesos angiogénicos podrían dar lugar a la abolición o mitigación de estas enfermedades.

Como enfermedades causadas por, soportadas por o asociadas a angiogénesis, se incluyen la enfermedad neovascular ocular, la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética, la retinopatía del prematuro, el rechazo de injerto de córnea, el glaucoma neovascular, la fibroplasia retrolental, la queratoconjuntivitis epidérmica, la deficiencia en vitamina A, el sobreuso de lentes de contacto, la queratitis atópica, la queratitis límbica superior, la queratitis seca del pterigión, el Sjögren, el acné rosácea, la filectenulosis, la sífilis, las infecciones por micobacterias, la degeneración lipídica, las quemaduras químicas, las úlceras bacterianas, las úlceras fúngicas, las infecciones por *Herpes simplex*, las infecciones por *Herpes zoster*, las infecciones protozoarias, el sarcoma de Kaposi, la úlcera de Mooren, la degeneración marginal de Terrien, la queratolisis marginal, la artritis reumatoide, el lupus sistémico, la poliarteritis, el traumatismo, la sarcoidosis de Wegener, la escleritis, la enfermedad de Stevens-Johnson, la queratotomía radial perifigoide, el rechazo de injerto de córnea, la artritis reumatoide, la inflamación crónica osteoartrítica (*v.g.*, colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn), el hemangioma, la enfermedad de Osler-Weber-Rendu y la telangiectasia hemorrágica hereditaria.

Además, la angiogénesis tiene un papel crítico en el cáncer. Un tumor no puede expandirse sin un suministro de sangre para obtener nutrientes y eliminar los desechos celulares. Como tumores en los que la angiogénesis es

importante, se incluyen tumores sólidos tales como rabdomiosarcomas, retinoblastoma, sarcoma de Ewing, neuroblastoma y osteosarcoma, y tumores benignos tales como neuroma acústico, neurofibroma, tracoma y granulomas piogénicos. Se han encontrado factores angiogénicos asociados a varios tumores sólidos. La prevención de la angiogénesis podría detener el crecimiento de estos tumores y el daño resultante ocasionado al animal debido a la presencia del tumor. La angiogénesis está también asociada a tumores sanguíneos, tales como las leucemias, cualquiera de diversas enfermedades neoplásicas agudas o crónicas de la médula ósea en las que se produce una proliferación descontrolada de leucocitos, normalmente acompañada de anemia, alteración en la coagulación de la sangre y aumento de tamaño de los nódulos linfáticos, del hígado y del bazo. Se cree que la angiogénesis desempeña un papel en las anormalidades de la médula ósea que dan lugar a tumores de tipo leucemia.

Además del crecimiento tumoral, la angiogénesis es importante en la metástasis. Inicialmente, la angiogénesis es importante en la vascularización del tumor, que permite a las células cancerosas entrar en el torrente sanguíneo y circular por todo el organismo. Después de que las células tumorales hayan abandonado el sitio primario y se hayan establecido en el secundario, el sitio de metástasis, se debe producir angiogénesis antes de que el nuevo tumor pueda crecer y expandirse. Por lo tanto, la prevención de la angiogénesis podría dar lugar a la prevención de la metástasis de tumores y posiblemente contener el crecimiento neoplásico en el sitio primario.

Se anticipa que la invención será útil para el tratamiento y/o la prevención del síndrome del distrés respiratorio o de otros trastornos resultantes de una tensión superficial pulmonar inapropiada. El síndrome del distrés respiratorio es particularmente prevalente entre los niños prematuros. El surfactante pulmonar se sintetiza normalmente a un ritmo muy bajo hasta las últimas seis semanas de vida fetal. Los bebés humanos nacidos más de seis semanas antes del término normal de una gestación tienen un elevado riesgo de nacer con cantidades inadecuadas de surfactante pulmonar e inadecuados ritmos de síntesis del surfactante. La deficiencia en surfactante produce un colapso progresivo de los alvéolos (atelectasia) debido a la decreciente capacidad del pulmón para expandirse a pesar de un máximo esfuerzo inspiratorio. Como resultado, inadecuadas cantidades de oxígeno alcanzan la sangre del niño. El SDR puede producirse también en adultos, típicamente como consecuencia en un fallo en la biosíntesis de surfactante.

El tejido pulmonar de niños prematuros muestra una elevada actividad de la ruta de señalización hedgehog. La inhibición de esta ruta usando antagonistas de hedgehog aumenta la formación de cuerpos lamelados y aumenta la expresión de genes implicados en la biosíntesis de surfactante. Los cuerpos lamelares son estructuras subcelulares asociadas a la biosíntesis de surfactante. Por estas razones, el tratamiento de niños prematuros con un antagonista de hedgehog debería estimular la biosíntesis de surfactante y mejorar el SDR. En casos en que el SDR del adulto se asocia a activación de la ruta hedgehog, el tratamiento con antagonistas de hedgehog también debería ser efectivo.

En realizaciones preferidas, se miden los niveles de transcrito gli y se tratan los tejidos enfermos o alterados que muestran niveles de gli anormalmente altos con un antagonista de gli hedgehog. El tejido del pulmón prematuro, los cánceres de pulmón (*v.g.*, adenocarcinomas, adenocarcinomas broncoalveolares, carcinomas de células pequeñas), los cánceres de mama (*v.g.*, carcinomas ductales inferiores, carcinomas lobulares inferiores, carcinomas tubulares), los cánceres de próstata (*v.g.*, adenocarcinomas) y las hiperplasias prostáticas benignas muestran todos niveles de expresión de gli-1 fuertemente elevados en algunos casos. Por consiguiente, los niveles de expresión de gli-1 son un potente dispositivo diagnóstico para determinar cuál de estos tejidos debería ser tratado con un antagonista de hedgehog. Además, existe una evidencia correlativa substancial de que los cánceres de células uroteliales (*v.g.*, cáncer de vejiga, otros cánceres urogenitales) también tendrán elevados niveles de gli-1 en ciertos casos. Por ejemplo, se sabe que la pérdida de heterozigosidad en el cromosoma 9q22 es común en cánceres de vejiga. El gen ptc-1 se localiza en esta posición y la pérdida de función de ptc-1 es probablemente una causa parcial de hiperproliferación, como en muchos otros tipos de cáncer. Por consiguiente, dichos cánceres también mostrarían una elevada expresión de gli y serían particularmente abordables mediante tratamiento con un antagonista de hedgehog.

Por ejemplo, el presente método es aplicable a técnicas de cultivo celular en donde es deseable reducir el nivel de señalización de hedgehog. Los sistemas de cultivo neuronal *in vitro* han demostrado ser herramientas fundamentales e indispensables para el estudio del desarrollo neuronal, así como para la identificación de factores neurotróficos, tales como el factor de crecimiento de los nervios (NGF), los factores tróficos ciliares (CNTF) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Un uso del presente método puede ser en cultivos de células madre neuronales, tal como el uso de dichos cultivos para la generación de nuevas neuronas y glía. En dichas realizaciones del método en cuestión, se puede poner en contacto a las células cultivadas con un antagonista de hedgehog de la presente invención para alterar el ritmo de proliferación de las células madre neuronales en el cultivo y/o alterar el ritmo de diferenciación, o para mantener la integridad de un cultivo de ciertas células neuronales terminalmente diferenciadas. En una realización ejemplar, se puede usar el presente método para cultivar, por ejemplo, neuronas sensoriales o, de manera alternativa, neuronas motoras. Dichos cultivos neuronales pueden ser usados como sistemas convenientes de ensayo, así como a modo de fuentes de células implantables para tratamientos terapéuticos.

Las células madre útiles en la presente invención son generalmente conocidas. Por ejemplo, se han identificado

varias células de la cresta neural, algunas de las cuales son pluripotentes y probablemente representan células de la cresta neural no comprometidas, y otras de las cuales pueden generar sólo un tipo de célula, tal como neuronas sensoriales, y probablemente representan células progenitoras comprometidas. El papel de los antagonistas de hedgehog empleados en el presente método para cultivar dichas células madre puede ser regular la diferenciación de la célula progenitora no comprometida, o regular la posterior restricción del destino en el desarrollo de una célula progenitora comprometida hacia convertirse en una célula neuronal terminalmente diferenciada. Por ejemplo, el presente método puede ser usado *in vitro* para regular la diferenciación de las células de la cresta neural en células gliales, células de Schwann, células cromafines, neuronas colinérgicas simpáticas o parasimpáticas y neuronas peptidonérgicas y serotonérgicas. Los antagonistas de hedgehog pueden ser usados solos o pueden ser usados en combinación con otros factores neurotróficos que actúen para potenciar más particularmente un destino de diferenciación particular de la célula progenitora neuronal.

Además de la implantación de células cultivadas en presencia de los antagonistas de hedgehog en cuestión, aún otro aspecto de la presente invención se relaciona con la aplicación terapéutica de un antagonista de hedgehog para regular el estado de crecimiento de las neuronas y de otras células neuronales tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico. A la luz de este conocimiento, la presente invención contempla específicamente aplicaciones del método en cuestión para el protocolo de tratamiento de (prevención y/o reducción de la severidad de) afecciones neurológicas derivadas de: (i) lesión aguda, subaguda o crónica del sistema nervioso, incluyendo lesión traumática, lesión química, lesión vascular y déficits (tales como la isquemia resultante del accidente cerebrovascular), junto con lesión infecciosa/inflamatoria e inducida por tumores; (ii) envejecimiento del sistema nervioso, incluyendo la enfermedad de Alzheimer; (iii) enfermedades neurodegenerativas crónicas del sistema nervioso, incluyendo la enfermedad de Parkinson, la corea de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y similares, así como degeneraciones espinocerebelares; y (iv) enfermedades inmunológicas crónicas del sistema nervioso o que afectan al sistema nervioso, incluyendo la esclerosis múltiple.

Según resulte apropiado, el presente método puede ser también utilizado en la generación de prótesis de nervios para la reparación de daños en los nervios centrales y periféricos. En particular, cuando se intuba un axón aplastado o seccionado mediante el uso de un dispositivo protésico, se pueden añadir antagonistas de hedgehog al dispositivo protésico para regular el ritmo de crecimiento y regeneración de los procesos dendríticos. Se describen ejemplos de canales de guía de nervios en las Patentes Estadounidenses Nº 5.092.871 y 4.955.892.

En otra realización, se puede usar el presente método en el tratamiento de transformaciones neoplásicas o hiperplásicas como las que pueden producirse en el sistema nervioso central. Por ejemplo, se pueden utilizar los antagonistas de hedgehog para hacer que dichas células transformadas se vuelvan o bien posmitóticas o bien apoptóticas. El presente método puede, por lo tanto, ser usado como parte de un tratamiento para, *v.g.*, gliomas, meningiomas, meduloblastomas, tumores neuroectodérmicos y ependimomas malignos.

En una realización preferida, el presente método puede ser usado como parte de un régimen de tratamiento para el meduloblastoma maligno y otros tumores primarios neuroectodérmicos malignos del SNC.

En otras realizaciones, se usa el presente método como parte de un programa de tratamiento para ependimomas. Los ependimomas representan aproximadamente un 10% de los tumores encefálicos pediátricos en niños. Macroscópicamente, se trata de tumores que surgen del revestimiento ependimal de los ventrículos y microscópicamente forman rosetas, canales y rosetas perivasculares. Dado que tantos niños que presentan esta enfermedad son bebés, éstos requieren con frecuencia una terapia multimodal.

En una realización, la presente invención hace uso del descubrimiento de que ptc, hedgehog y smoothened están aparentemente implicados en el control del desarrollo de las células madre responsables de la formación del tracto digestivo, del hígado, de los pulmones y de otros órganos que derivan del intestino primitivo. Shh sirve como señal inductora del endodermo al mesodermo, lo cual es crítico para la morfogénesis del intestino. Por lo tanto, por ejemplo, los antagonistas de hedgehog del presente método pueden ser empleados para regular el desarrollo y mantenimiento de un hígado artificial que puede tener las múltiples funciones metabólicas de un hígado normal. En una realización ejemplar, el presente método puede ser usado para regular la proliferación y diferenciación de las células madre del tubo digestivo para formar cultivos de hepatocitos que pueden ser usados para poblar matrices extracelulares, o que pueden ser encapsulados en polímeros biocompatibles para formar hígados artificiales tanto implantables como extracorpóreos.

La generación del páncreas y del intestino delgado a partir del intestino embrionario depende de la señalización intercelular entre las células endodérmicas y mesodérmicas del intestino. En particular, se ha sugerido que la diferenciación del mesodermo intestinal en músculo liso depende de señales de las células endodérmicas adyacentes. En el contexto de la presente invención, se contempla, por lo tanto, que los antagonistas de hedgehog en cuestión pueden ser usados para controlar o regular la proliferación y/o diferenciación del tejido pancreático tanto *in vivo* como *in vitro*.

En otra realización, los antagonistas de hedgehog son usados para generar tejido endodérmico a partir de células madre no endodérmicas, incluyendo células madre mesenquimales y células madre derivadas de tejidos

mesodérmicos. Como ejemplos de tejidos mesodérmicos a partir de los cuales se pueden aislar células madre, se incluyen el músculo esquelético, el músculo cardíaco, el riñón, el hueso, el cartílago y la grasa.

Existe una amplia variedad de condiciones patológicas de proliferación y diferenciación celular para las cuales los inhibidores de la presente invención pueden aportar beneficios terapéuticos, siendo la estrategia general, por ejemplo, la corrección de una expresión aberrante de insulina, o la modulación de la diferenciación. Más generalmente, sin embargo, la presente invención se relaciona con un método de inducción y/o mantenimiento de un estado diferenciado, potenciación de la supervivencia y/o producción de un efecto sobre la proliferación de las células pancreáticas, por contacto de las células con los inhibidores en cuestión. Por ejemplo, la invención contempla que, a la luz de la aparente implicación de ptc, hedgehog y smoothened en la formación de disposiciones espaciales ordenadas de los tejidos pancreáticos, el presente método podría ser utilizado como parte de una técnica para generar y/o mantener dicho tejido tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, se puede emplear la modulación de la función de hedgehog en métodos tanto de cultivo celular como terapéuticos que conllevan la generación y el mantenimiento de células beta y posiblemente también para tejido no pancreático, tal como en el control del desarrollo y mantenimiento de tejido del tracto digestivo, el bazo, los pulmones, los órganos urogenitales (*v.g.*, vejiga) y otros órganos que derivan del intestino primitivo.

En una realización ejemplar, el presente método puede ser usado en el tratamiento de trastornos hiperplásicos y neoplásicos que afectan al tejido pancreático, particularmente los caracterizados por una proliferación aberrante de las células pancreáticas. Por ejemplo, los cánceres pancreáticos están marcados por una proliferación anormal de las células pancreáticas, que puede dar lugar a alteraciones de la capacidad de secreción de insulina del páncreas. Por ejemplo, ciertas hiperplasias pancreáticas, tales como los carcinomas pancreáticos, pueden dar lugar a hipoinsulinemia debido a disfunción de las células beta o a una reducción en la masa de las células de los islotes.

Muchos tumores pueden verse afectados, en base a evidencias, tales como la implicación de la ruta hedgehog en estos tumores, o la expresión detectada de hedgehog o su receptor en estos tejidos durante el desarrollo, por el tratamiento con los compuestos en cuestión. Dichos tumores incluyen, aunque en modo alguno se limitan a éstos, tumores relacionados con el síndrome de Gorlin (*v.g.*, meduloblastoma, meningioma, etc.), tumores evidenciados en ratones con eliminación de gen ptc (*v.g.*, hemangioma, rabdomiosarcoma, etc.), tumores resultantes de la amplificación de gli-1 (*v.g.*, glioblastoma, sarcoma, etc.), tumores conectados con TRC8, un homólogo de ptc (*v.g.*, carcinoma renal, carcinoma de tiroides, etc.), tumores relacionados con Ext-1 (*v.g.*, cáncer de huesos, etc.), tumores inducidos por Shh (*v.g.*, cáncer de pulmón, condrosarcomas, etc.), y otros tumores (*v.g.*, cáncer de mama, cáncer urogenital (*v.g.*, riñón, vejiga, uréter, próstata, etc.), cáncer adrenal, cáncer gastrointestinal (*v.g.*, estómago, intestino, etc.), etc.).

Como formas ejemplares de cáncer que puede ser tratado mediante los métodos en cuestión, se incluyen, aunque sin limitación, el cáncer de próstata, el cáncer de vejiga, el cáncer de pulmón (incluyendo el cáncer tanto de células pequeñas como de células no pequeñas), el cáncer de colon, el cáncer de riñón, el cáncer de hígado, el cáncer de mama, el cáncer cervical, el cáncer endometrial u otro cáncer uterino, el cáncer de ovario, el cáncer testicular, el cáncer del pene, el cáncer de la vagina, el cáncer de la uretra, el cáncer de la vesícula biliar, el cáncer esofágico o el cáncer pancreático. Como formas ejemplares adicionales de cáncer que puede ser tratado mediante los métodos en cuestión, se incluyen, aunque sin limitación, el cáncer de músculo esquelético o liso, el cáncer de estómago, el cáncer del intestino delgado, el cáncer de la glándula salivar, el cáncer anal, el cáncer rectal, el cáncer de tiroides, el cáncer de paratiroides, el cáncer de pituitaria y el cáncer nasofaríngeo. Otras formas ejemplares de cáncer que puede ser tratado con los antagonistas de hedgehog de la presente invención incluyen cánceres que comprenden células que expresan hedgehog. Aún otras formas ejemplares de cáncer que puede ser tratado con los antagonistas de hedgehog de la presente invención incluyen cánceres que comprenden células que expresan gli. En una realización, el cáncer no se caracteriza por una mutación en patched-1.

Por ejemplo, el método de la presente invención puede ser usado como parte de un régimen para restaurar la función del cartílago a un tejido conectivo. Dichos métodos son útiles en, por ejemplo, la reparación de defectos o lesiones en el tejido del cartílago como se producen como resultado de un desgaste degenerativo, tal como el que da lugar a artritis, así como otras alteraciones mecánicas que pueden estar causadas por un traumatismo del tejido, tales como un desplazamiento del tejido de un menisco desgarrado, meniscectomía, un esfuerzo de una articulación por un ligamento desgarrado, mala alineación de articulaciones, fractura ósea o por enfermedad hereditaria. En una realización de la presente invención, el presente método consiste en tratar el tejido conectivo afectado con una cantidad terapéuticamente suficiente de un antagonista de hedgehog, particularmente un antagonista selectivo para la transducción de señal de Indian hedgehog, para regular una respuesta de reparación del cartílago en el tejido conectivo controlando el ritmo de diferenciación y/o proliferación de los condrocitos embebidos en el tejido. Tejidos conectivos tales como el cartílago articular, el cartílago interarticular (meniscos), el cartílago costal (que conecta las costillas verdaderas y el esternón), los ligamentos y los tendones son particularmente susceptibles de tratamiento en terapias reconstructivas y/o regenerativas usando el presente método. Tal como se usa aquí, las terapias regenerativas incluyen el tratamiento de estados degenerativos que han progresado hasta el punto de que la alteración del tejido es obviamente manifiesta, así como tratamientos preventivos de tejido donde la degeneración está en sus estadios más tempranos o es inminente.

En una realización ilustrativa, el presente método puede ser usado como parte de una intervención terapéutica en el tratamiento del cartílago de una articulación diartroidal, tal como una rodilla, un tobillo, un codo, una cadera, una muñeca, un nudillo de un dedo de la mano o del pie o una articulación temporomandibular. El tratamiento puede ir dirigido al menisco de la articulación, al cartílago articular de la articulación o a ambos. Para mayor ilustración, el presente método puede ser usado para tratar un trastorno degenerativo de una rodilla, tal como el que podría producirse como resultado de una lesión traumática (*v.g.*, una lesión deportiva o un desgaste excesivo) o de osteoartritis. Los presentes antagonistas pueden ser administrados como una inyección en la articulación con, por ejemplo, una aguja artroscópica. En algunos casos, el agente inyectado puede estar en forma de hidrogel u otro vehículo de liberación lenta descrito anteriormente para permitir un contacto más prolongado y regular del agente con el tejido tratado.

De forma similar, el presente método puede ser aplicado para potenciar la generación de dispositivos de cartílago protésicos y para su implantación. La necesidad de un tratamiento mejorado ha motivado una investigación dirigida a crear nuevo cartílago basado en plantillas de colágeno-glicosaminoglicano (Stone *et al.* (1990), Clin Orthop Relat Red 252:129), condrocitos aislados (Grande *et al.* (1989), J Orthop Res 7: 208; y Takigawa *et al.* (1987), Bone Miner 2: 449) y condrocitos unidos a polímeros naturales o sintéticos (Walitani *et al.* (1989), J Bone Jt Surg 71B: 74; Vacanti *et al.* (1991), Plast Reconstr Surg 88: 753; von Schroeder *et al.* (1991), J Biomed Mater Res 25: 329; Freed *et al.* (1993), J Biomed Mater Res 27: 11; y la Patente Estadounidense Nº 5.041.138) de Vacanti *et al.* Por ejemplo, se pueden cultivar condrocitos sobre soportes altamente porosos biocompatibles y biodegradables formados a partir de polímeros, tales como ácido poliglicólico, ácido poliláctico, gel de agarosa u otros polímeros que se degraden en el tiempo en función de la hidrólisis del esqueleto polimérico para dar monómeros inocuos. Las matrices están diseñadas para permitir un intercambio adecuado de nutrientes y gases con las células hasta que se produzca la injertación. Las células pueden ser cultivadas *in vitro* hasta haberse desarrollado un volumen y una densidad de células adecuados para que las células se implanten. Una ventaja de las matrices es que pueden ser vaciadas o moldeadas en una forma deseada sobre una base individual, de tal manera que el producto final guarda un estrecho parecido con la propia oreja o nariz del paciente (a modo de ejemplo), o se pueden usar matrices flexibles que permitan su manipulación en el momento de la implantación, como en una articulación.

Un método que "promueve la curación de una herida" da lugar a que la herida se cure más rápidamente como resultado del tratamiento que una herida similar que se cura en ausencia del tratamiento. "Promoción de la curación de heridas" puede también significar que el método regula la proliferación y/o el crecimiento de, entre otros, los queratinocitos, o que la herida se cura con menos cicatrización, menos contracción de la herida, menos deposición de colágeno y más área superficial. En ciertos casos, "promoción de la curación de heridas" puede también significar que ciertos métodos de curación de heridas tienen mayores índices de eficacia, (*v.g.*, los índices de aceptación de los injertos de piel) cuando se usan junto con el método de la presente invención.

A pesar del significativo progreso en las técnicas quirúrgicas reconstructivas, la cicatrización puede ser un obstáculo importante para la recuperación de la función y el aspecto normales de la piel sanada. Esto es particularmente cierto cuando una cicatrización patológica, tal como queloides o cicatrices hipertróficas de las manos o la cara, causa una discapacidad funcional o deformidad física. En las circunstancias más severas, dicha cicatrización puede precipitar distrés psicosocial y una vida de privación económica. La reparación de heridas incluye las fases de hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación. La fase proliferativa conlleva la multiplicación de fibroblastos y células endoteliales y epiteliales. Mediante el uso del presente método, se puede controlar el ritmo de proliferación de las células epiteliales que se encuentran en la herida y en su proximidad con objeto de acelerar el cierre de la herida y/o minimizar la formación de tejido cicatricial.

El presente tratamiento puede también ser efectivo como parte de un régimen terapéutico para tratar úlceras orales y paraorales, *v.g.*, resultantes de radiación y/o quimioterapia. Dichas úlceras se desarrollan comúnmente en el plazo de días tras la quimioterapia o la terapia de radiación. Estas úlceras comienzan normalmente como pequeñas lesiones dolorosas de forma irregular habitualmente cubiertas por una delicada membrana necrótica gris y rodeadas por tejido inflamatorio. En muchos casos, la falta de tratamiento da como resultado la proliferación de tejido alrededor de la periferia de la lesión sobre una base inflamatoria. Por ejemplo, el epitelio que bordea la úlcera normalmente demuestra actividad proliferativa, que da lugar a la pérdida de continuidad del epitelio superficial. Según la presente invención, un tratamiento para dichas úlceras que incluya la aplicación de un antagonista de hedgehog puede reducir la anormal proliferación y diferenciación del epitelio afectado, ayudando a reducir la severidad de los posteriores sucesos inflamatorios.

El presente método y las presentes composiciones pueden también ser usados para tratar heridas resultantes de enfermedades dermatológicas, tales como lesiones resultantes de trastornos autoinmunes, tales como la psoriasis. Dermatitis atópica se refiere a un traumatismo de la piel resultante de alergias asociadas a una respuesta inmune causada por alérgenos tales como pólenes, alimentos, caspa, venenos de insectos y toxinas de plantas.

Aún otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso del presente método para controlar el crecimiento capilar. El pelo está básicamente compuesto por queratina, una proteína dura e insoluble; su principal resistencia reside en su enlace disulfuro de cistina. Cada pelo individual comprende una vaina cilíndrica y una raíz y está contenido en un folículo, una depresión de tipo frasco en la piel. El fondo del folículo contiene una proyección de tipo

dactilar denominada la papila, que consiste en tejido conectivo a partir del cual crece el pelo y a través del cual los vasos sanguíneos suministran nutrición a las células. La vaina es la parte que se prolonga hacia el exterior de la superficie de la piel, mientras que la raíz ha sido descrita como la parte enterrada del pelo. La base de la raíz se extiende hacia el bulbo capilar, que descansa sobre la papila. Las células a partir de las cuales se produce el pelo crecen en el bulbo del folículo; se extruyen en forma de fibras a medida que las células proliferan en el folículo. "Crecimiento" capilar se refiere a la formación y el alargamiento de la fibra capilar por las células en división.

Además, como un antagonista de hedgehog será con frecuencia citostático para las células epiteliales, más que citotóxico, dichos agentes pueden ser usados para proteger a las células de los folículos pilosos frente a agentes citotóxicos que requieren la progresión hacia la fase S del ciclo celular para tener eficacia, *v.g.*, muerte inducida por radiación. El tratamiento mediante el presente método puede proporcionar protección haciendo que las células del folículo piloso se vuelvan quiescentes, *v.g.*, inhibiendo la entrada de las células en la fase S, y evitando así que las células del folículo sufran una catástrofe mitótica o una muerte celular programada. Por ejemplo, los antagonistas de hedgehog pueden ser usados para pacientes que están siendo sometidos a quimio- o radioterapia, que normalmente dan lugar a pérdida de cabello. Inhibiendo la progresión del ciclo celular durante dichas terapias, el presente tratamiento puede proteger a las células del folículo piloso de la muerte, que podría producirse de otro modo como resultado de la activación de los programas de muerte celular. Tras haber concluido la terapia, el presente método puede también ser retirado con alivio concomitante de la inhibición de la proliferación de las células foliculares.

Por ejemplo, las preparaciones farmacéuticas de la invención están destinadas al tratamiento de afecciones epidérmicas hiperplásicas, tales como queratosis, así como al tratamiento de afecciones epidérmicas neoplásicas, tales como las caracterizadas por un alto ritmo de proliferación para diversos cánceres cutáneos, como por ejemplo el carcinoma de células escamosas. El presente método puede también ser usado en el tratamiento de enfermedades autoinmunes que afectan a la piel, en particular, de enfermedades dermatológicas que conllevan la proliferación y/o queratinización mórbida de la epidermis, como por ejemplo las causadas por la psoriasis o la dermatosis atópica.

Muchas enfermedades comunes de la piel, tales como la psoriasis, el carcinoma de células escamosas, el queratoacantoma y la queratosis actínica, se caracterizan por proliferación y crecimiento anormales localizados. Por ejemplo, en la psoriasis, que se caracteriza por placas elevadas rojas y escamosas sobre la piel, se sabe que los queratinocitos proliferan mucho más rápidamente de lo normal y se diferencian menos completamente.

En una realización, las preparaciones de la presente invención son adecuadas para el tratamiento de afecciones dermatológicas ligadas a trastornos de la queratinización que causan una proliferación anormal de las células cutáneas, pudiendo estar marcados dichos trastornos por componentes inflamatorios o no inflamatorios. Para ilustrarlo, se pueden usar preparaciones terapéuticas de un antagonista de hedgehog, *v.g.*, que promueve quiescencia o diferenciación, para tratar formas variables de psoriasis, ya sean cutáneas, mucosales o ungueales. La psoriasis, como se ha descrito anteriormente, se caracteriza típicamente por queratinocitos epidérmicos que exhiben una marcada activación proliferativa y diferenciación a lo largo de una ruta "regenerativa". Se puede usar el tratamiento con una realización antiproliferativa del presente método para revertir la activación epidérmica patológica, y éste puede proporcionar una base para la remisión mantenida de la enfermedad.

El acné representa aún otra afección dermatológica que puede ser tratada mediante el presente método. El acné vulgar, por ejemplo, es una enfermedad multifactorial que aparece más comúnmente en adolescentes y adultos jóvenes y se caracteriza por la aparición de lesiones inflamatorias y no inflamatorias sobre la cara y la parte superior del tronco. El defecto básico que da lugar al acné vulgar es la hipercornificación del conducto de una glándula sebácea hiperactiva. La hipercornificación bloquea la movilidad normal de los microorganismos de la piel y del folículo, y al hacerlo estimula la liberación de lipasas por las bacterias *Propinobacterium acnes* y *Staphylococcus epidennidis* y *Pitrosporum ovale*, una levadura. El tratamiento con un antagonista antiproliferativo de hedgehog, particularmente preparaciones tópicas, puede ser útil en la prevención de las características transicionales de los conductos, *v.g.*, hipercomificación, que dan lugar a formación de lesión. El presente tratamiento puede incluir también, por ejemplo, antibióticos, retinoides y antiandrógenos.

En aún otra realización, el presente método puede ser usado en el tratamiento de cánceres humanos, tales como tumores de tejidos epiteliales, como la piel. Por ejemplo, se pueden emplear antagonistas de hedgehog en el presente método como parte de un tratamiento para carcinomas, adenocarcinomas, sarcomas y similares humanos. Como ejemplos de formas de cáncer que pueden ser tratadas mediante los presentes métodos, se incluyen, aunque sin limitación, el cáncer de próstata, el cáncer de vejiga, el cáncer de pulmón (incluyendo el cáncer de células pequeñas o de células no pequeñas), el cáncer de colon, el cáncer de riñón, el cáncer de hígado, el cáncer de mama, el cáncer cervical, el cáncer de endometrio u otro cáncer uterino, el cáncer de ovario, el cáncer testicular, el cáncer del pene, el cáncer de la vagina, el cáncer de la uretra, el cáncer de la vesícula biliar, el cáncer esofágico o el cáncer pancreático. Como ejemplos adicionales de formas de cáncer que pueden ser tratadas mediante los presentes métodos, se incluyen, aunque sin limitación, el cáncer de músculo esquelético o liso, el cáncer de estómago, el cáncer del intestino delgado, el cáncer de la glándula salivar, el cáncer anal, el cáncer rectal, el cáncer de tiroides, el cáncer de paratiroides, el cáncer de pituitaria y el cáncer nasofaríngeo. Otros ejemplos de formas de cáncer que pueden ser tratadas con los antagonistas de hedgehog de la presente invención incluyen cánceres que

comprenden células que expresan hedgehog. Aún otros ejemplos de formas de cáncer que pueden ser tratadas con los antagonistas de hedgehog de la presente invención incluyen cánceres que comprenden células que expresan gli. En una realización, el cáncer no se caracteriza por una mutación en patched-1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona preparaciones farmacéuticas que contienen antagonistas de hedgehog. Los antagonistas de hedgehog para uso en el presente método pueden ser convenientemente formulados para administración con un medio biológicamente aceptable, tal como agua, solución salina tamponada, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares) o mezclas adecuadas de los mismos. La concentración óptima del/de los principio(s) activo(s) en el medio escogido puede ser determinada empíricamente según procedimientos bien conocidos para los químicos medicinales. Tal como se usa aquí, "medio biológicamente aceptable" incluye cualquiera y todos de solventes, medios de dispersión y similares que puedan ser apropiados para la vía deseada de administración de la preparación farmacéutica. El uso de tales medios para principios farmacéuticamente activos es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con la actividad del antagonista de hedgehog, se contempla su uso en la preparación farmacéutica de la invención. Se describen vehículos adecuados y su formulación incluyendo otras proteínas, por ejemplo, en el libro Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1985). Estos vehículos incluyen "formulaciones de depósito" inyectables. Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden también incluir composiciones veterinarias, *v.g.*, preparaciones farmacéuticas de los antagonistas de hedgehog adecuadas para usos veterinarios, *v.g.*, para el tratamiento de ganado o de animales domésticos, *v.g.*, perros. También se pueden proporcionar métodos de introducción por dispositivos recargables o biodegradables. Se han desarrollado y estudiado *in vivo* diversos dispositivos poliméricos de liberación lenta en los últimos años para la administración controlada de fármacos, incluyendo productos biofarmacéuticos proteicos. Se puede usar una variedad de polímeros biocompatibles (incluyendo hidrogeles), incluyendo polímeros tanto biodegradables como no degradables, para formar un implante para la liberación mantenida de un antagonista de hedgehog en un sitio diana particular. Las preparaciones de la presente invención pueden ser administradas oral, parenteral, tópica o rectalmente. Se dan, por supuesto, mediante formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en forma de tabletas o de cápsulas, por inyección, inhalación, loción ocular, ungüento, supositorio, parche de liberación controlada, etc.; administración por inyección, infusión o inhalación; tópica por loción o ungüento; y rectal por supositorios. Se prefieren las administraciones orales y tópicas. Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente", tal como se usan aquí, significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluyen, sin limitación, la inyección y la infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraestemal. Las expresiones "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente", tal como se usan aquí, significan la administración de un compuesto, fármaco u otro material de uno modo que no sea directamente en el sistema nervioso central, de tal forma que entre en el sistema del paciente y, por lo tanto, quede sujeto al metabolismo y a otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

Estos Hedgehog, BMP y compuestos TDFRP (a los que se hace referencia de manera colectiva como "compuestos") pueden ser administrados a humanos y otros animales para terapia por cualquier vía adecuada de administración, incluyendo por vía oral, nasal, como por ejemplo un spray, rectal, intravaginal, parenteral, intracistemal y tópica, como mediante polvos, ungüentos o gotas, incluyendo bucal y sublingualmente. Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden ser usados en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención son formulados en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, tal como se describe más adelante, o por otros métodos convencionales conocidos para los expertos en la técnica. Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden variar para obtener una cantidad del principio activo que sea efectiva para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto particular de la presente invención empleado, o de su éster, sal o amida, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el antagonista de hedgehog particular empleado, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y la historia médica previa del paciente en tratamiento, y factores similares bien conocidos en las artes médicas. Un médico o veterinario con conocimientos ordinarios en la técnica puede fácilmente determinar y prescribir la cantidad efectiva de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis de los compuestos de la invención empleadas en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los necesarios para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta alcanzar el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto de la invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis más baja efectiva para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis efectiva dependerá generalmente de los factores antes descritos. En general, las dosis intravenosas, intracerebroventriculares y subcutáneas de los compuestos de esta invención para un paciente variarán de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal al día. Si se desea, la dosis diaria efectiva del compuesto activo puede ser administrada como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, eventualmente en formas de

dosificación unitaria. El término "tratamiento" pretende incluir también profilaxis, terapia y curación. El paciente que recibe este tratamiento es cualquier animal que lo necesite, incluidos los primates, en particular humanos, y otros sujetos, tales como équidos, vacas, cerdos y ovejas, y aves y animales de compañía en general. El compuesto de la invención puede ser administrado como tal o en mezclas con soportes farmacéuticamente aceptables y/o estériles, y pueden también ser administrados junto con otros agentes antimicrobianos, tales como penicilinas, cefalosporinas, aminoglicósidos y glicopéptidos. La terapia conjunta incluye, por lo tanto, la administración secuencial, simultánea y por separado del compuesto activo de forma que los efectos terapéuticos del primero administrado no hayan desaparecido por completo cuando se administra el siguiente.

Ejemplo 20: Tratamiento de la artritis reumatoide y de la osteoartritis

La osteoartritis es una enfermedad degenerativa de las articulaciones, que comúnmente afecta a las articulaciones diartrodiales axiales y periféricas en humanos. Los compuestos TDFRP aquí desvelados son útiles en la prevención y el tratamiento de la osteoartritis. Como compuestos TDFRP preferidos, se incluyen (SEC. Nº ID.: 16, 33, 45, 217, 221) (FIG. 13).

Las articulaciones son las intersecciones de dos huesos. Los extremos de los huesos están cubiertos con cartílago. El cartílago también actúa como un dispositivo amortiguador para absorber la fuerza aplicada a las articulaciones. El líquido sinovial transporta nutrientes al cartílago, evitando que éste se vuelva seco y quebradizo y manteniendo su superficie lubricada, de tal forma que las articulaciones puedan trabajar con suavidad. Una estructura denominada la cápsula articular mantiene el líquido sinovial dentro de la articulación. La cápsula envuelve a la articulación y la protege. La osteoartritis es el deterioro del cartílago de las articulaciones, dando lugar a dolor y dolor muscular. Produce poca inflamación y el dolor y el dolor muscular están causados por el deterioro del cartílago de las articulaciones. La osteoartritis es el tipo más común de artritis, una enfermedad del cartílago que se produce como resultado del deterioro no inflamatorio de la articulación. Se produce con el proceso normal de envejecimiento. Otra causa es un traumatismo, tal como una lesión de una articulación. Un paciente que se fractura un hueso del tobillo tiene más probabilidad de desarrollar osteoartritis en el tobillo más tarde. El sobreuso puede también hacer que el cartílago se destruya.

La osteoartritis es difícil de tratar. No existe cura actual salvo la aquí descrita, y el tratamiento se centra en aliviar el dolor y evitar que la articulación afectada se deforme. Se usan fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) para aliviar el dolor. Tal como indican la Patente Estadounidense Nº 4.997.850 y la Patente Estadounidense Nº 4.944.949, muchos de tales fármacos antiinflamatorios no esteroideos son conocidos y con frecuencia son efectivos en la reducción de los síntomas de la osteoartritis. Si estas medidas no resultan eficaces, los médicos pueden prescribir inyecciones de esteroides para reducir la hinchazón. También se pueden recomendar terapia física, inserciones ortopédicas en zapatos, tales como las descritas en la Patente Estadounidense Nº 5.727.335, y tobilleras hechas a medida. Si el paciente desarrolla hallux rigidus, una afección en la que el dedo gordo del pie (hallux) se vuelve dolorosamente agarrotado o rígido, el podólogo puede recomendar un zapato más grande y más rígido con una suela no flexible. Esto limita el movimiento del dedo y reduce el soporte de peso, particularmente al caminar, y evita que las superficies de la articulación del dedo rechinen dolorosamente una contra otra. En casos severos, puede ser necesario el reemplazo de la articulación. Esto es especialmente cierto en las caderas y las rodillas. Las articulaciones en la parte inferior de la pierna son más pequeñas, más complejas y difíciles de reemplazar. Si una articulación es extremadamente dolorosa y no puede ser reemplazada, se la puede fusionar. Este procedimiento detiene el dolor, pero da lugar a la pérdida permanente de la función articular, haciendo difícil caminar e inclinarse. Se conoce un método para el tratamiento de la osteoartritis, que consiste en administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de miristoleato de cetilo, gracias a la Patente Estadounidense Nº 5.569.676.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune común caracterizada por hinchazón, deformación y finalmente destrucción de las articulaciones, que culmina en discapacidad física severa. De Graaf *et al.*, en The Epidemiology of Chronic Rheumatism, Dellgren y Ball, eds. (Blackwell, Oxford, 1963), pp. 446-56; Meenam *et al.*, Arthritis Rheum., 24: 544-50 (1981); Gabriel *et al.*, J. Rheumatol, 26: 1269-74 (1999); James, Clin Exp. Rheumatol, 17: 392-93 (1999). La AR es una afección progresiva con síntomas bien reconocidos, que incluyen hinchazón simétrica de las articulaciones periféricas e inflamación sinovial, pero respetando el esqueleto axial; presencia de autoanticuerpos para el factor reumatoide (RF); mayores concentraciones de interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-1beta (IL-1beta) y factor estimulante de las colonias de granulocitos/macrofagos (GM-CSF) en suero y líquido sinovial; bajas concentraciones de interleuquina-ra (IL-ra); y remisión de la enfermedad inducida por la gestación, seguida de severas exacerbaciones posparto, es decir, que mientras que las mujeres con AR habitualmente sufren una remisión durante la gestación, la enfermedad regresa y puede ser incluso más severa y mostrar una nueva aparición o un curso más acelerado tras el parto. Véanse Turgen, en Immunology and Serology in Laboratory Medicine. 2ª edición, Shanahan ed. (Mosby Year Book, St. Louis, 1996), pp. 387-98; Hirano *et al.*, Eur. J. Immunol, 18: 1797-1801 (1988); Wilder *et al.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 876: 14-31 (1999); Iijima *et al.*, J. Rheumatol, 26: 755-56 (1999); Ostensen, Ann. N.Y Acad. Sci., 876: 13143 (1999). En la investigación médica dirigida a la comprensión, el diagnóstico y el tratamiento de la AR, se han descrito varios modelos animales de la enfermedad, pero no se ha descubierto ningún modelo animal espontáneo que imite estrechamente todas las características de la enfermedad humana (véanse, por ejemplo, Hang *et al.*, 1982. J. Exp. Med., 155: 1690-1701, y Kouskoff *et al.*, 1996. Cell, 87: 811-822). Kouskoff *et al.* describen un modelo de AR en ratón que exhibe una artritis agresiva, producido cruzando

una cepa de ratón transgénica para el receptor de las células T (TCR) con una cepa NOD. Este modelo de AR en ratón es estrictamente dependiente de la presencia del transgén KRN y se caracteriza por varias características sintomatológicas inherentes de la AR que lo distinguen, sin embargo, de la AR humana (ARh), incluyendo: 100% de penetrancia, aparición precoz (es decir, 25-35 días) de la enfermedad, ataque de las articulaciones interfalangianas distales, inflamación de la columna vertebral, gran exceso de células mieloides con respecto a los linfocitos T y a las células plasmáticas en la membrana sinovial, una total ausencia de autoanticuerpos para el factor reumatoide (RF) y un revestimiento de depósitos de IgG sobre los órganos internos. Estas características dan lugar a una AR más agresiva que la AR típicamente encontrada en humanos. La AR humana tiene una expresión preferente de la enfermedad en mujeres de mediana edad, es una enfermedad periférica que respeta las articulaciones IFD, con autoanticuerpos para el factor reumatoide, con alteraciones similares de las citoquinas periféricas y articulares, etc. El mecanismo de desarrollo de la enfermedad de tipo artritis en ratones NOD/TCR difiere dramáticamente del de la expresión de la AR natural en humanos, lo que limita la utilidad de este ratón AR como modelo para la ARh. Se ha descubierto ahora sorprendentemente que una variedad particular de ratón comúnmente utilizada en la investigación de la diabetes, es decir, el ratón diabético no obeso o "NOD", puede ser usada para producir una descendencia que exhibe una sintomatología física que se asemeja estrechamente a la sintomatología de la ARh, incluyendo: una penetrancia incompleta con mayor incidencia en hembras comparable a la de la ARh, aparición de la enfermedad más tarde en la vida (5-8 meses) con exacerbación o aparición precoz debido a la gestación comparable a la de la ARh, sin inflamación de la columna vertebral comparable a la de la ARh y perfiles histológicos y serológicos comparables a los de la ARh. Se describe un modelo de ratón para la artritis reumatoide en la Solicitud de Patente Estadounidense 20040031066.

Para tratar la osteoartritis o la artritis reumatoide, se administran a un paciente, preferiblemente un sujeto humano, los compuestos TDFRP como se ha descrito antes. Los ensayos para determinar la integridad del tejido conectivo en la articulación son bien conocidos en la técnica y el médico monitoriza al paciente en cuanto a un cambio en la competencia del tejido articular en respuesta a los regímenes de dosificación discutidos. Una detención de la progresión de la degeneración de la articulación o un aumento en la cantidad e integridad de los tejidos articulares indican que se está obteniendo un efecto terapéutico. Las consideraciones secundarias incluyen una disminución del dolor y un aumento en la flexibilidad de las articulaciones.

Lista de referencias

1. Agrotis *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996 Feb 15;219(2):613-8.
2. Aoki *et al.*, J Cell Sci 2001 Apr;114(Pt. 8):1483-9.
3. Chien *et al.*, J Periodontal Res. 1999 Aug;34(6):301-9.
4. De Winter *et al.*, Exp Cell Res. 1996 May 1;224(2):323-34.
5. Dewulf *et al.*, Endocrinology. 1995 Jun;136(6):2652-63.
7. Goggins *et al.*, Cancer Res. 1998 Dec 1;58(23):5529-32.
8. Haaijman *et al.*, Growth Factors. 2000;17(3):177-92.
9. Kawai *et al.*, Biochem Biophys Res Commun. 2000 May 19;271(3):682-7.
10. ten Dijke *et al.*, Science. 1994 Apr 1;264(5155):101-4.
11. ten Dijke *et al.*, J Biol Chem 1994 Jun 24;269(25):16985-8.
12. ten Dijke *et al.*, Oncogene 1993 Oct;8(10):2879-87.
13. Valcourt *et al.*, J Biol Chem 2002 Sept 13;277(37):33545-58.
14. Abdalla *et al.*, Eur J Hum Genet. 2003 Apr;11(4):279-87.
15. Agrotis *et al.*, FEBS Lett 2000 Feb 4;467(1):128-32.
16. Akiyama *et al.*, Cell Struct. Funct. 2000 Jun;25(3):195-204.
17. Ali *et al.*, Pharmacology. 1998 Jul; 57(1):20-7.
18. Armes et. al., Development. 1997 Oct;124(19):3797-804.
19. Aspenberg *et al.*, Acta Orthop Scand. 2000 Dec;71(6):558-62.
20. Bobik *et al.*, Circulation 1999 Jun 8;99(22):2883-91.
21. Choi *et al.*, Am J Physiol 1997 Sept;273(3 pt,2):F386-95.
22. Chow *et al.*, Mol Hum Reprod 2001 Nov;7(11):1047-56.
23. Goumans *et al.*, Int J Dev Biol 2000 Apr;44(3):253-65.
24. Goumans *et al.*, Differentiation 1998 Jul;63(3):101-13.
25. Inman *et al.*, Mol Pharmacol 2002 Jul;62(1):65-74.
26. Gold *et al.*, Am J Pathol 1997 Jan;150(1):209-22.
27. Kang *et al.*, Biochem Mol Biol Int. 1996 Nov;40(5):993-1001.
28. Kim *et al.*, Exp Cell Res 1998 May 25;241(1):151-60.
29. Laping *et al.*, Mol Pharmacol 2002 Jul;62(1):58-64.
30. Larsson *et al.*, EMBO J. 2001 Apr 2;20(7):1663-73.
31. Lui *et al.*, Kidney Int. 1998 Mar;53(3):716-25.
32. Lui *et al.*, Dev Dyn. 2000 Apr;217(4):343-60.
33. Liu *et al.*, Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. 2002 Oct;23(10):524-7.
34. Lui *et al.*, FEBS Lett. 2002 May 22;519(1-3):93-8.
35. Lux *et al.*, J Biol Chem. 1999 Apr 9;274(15):9984-92.
36. Machida *et al.*, Eur J Endocrinol 2000 Nov;143(5):705-10.

37. Miettinen *et al.*, J Cell Biol 1994 Dec;127(6 pt. 2):2021-36.
38. Mishina *et al.*, Genes Dev. 1995 Dec 15;9(24):3027-37.
39. Mo *et al.*, J Biol Chem 2002 Dec. 27;277(52):50788-94. Epub 2002 Oct. 18.
40. Morita *et al.*, Brain Res Mol Brain Res 1996 Dec;42(2):263-71.
41. Panchenko *et al.*, Am J Physiol 1996 Apr;270(4 pt 1):L547-58.
42. Piek *et al.*, J Cell Sci 1999 Dec;12(pt 24):4557-68.
43. Ramp *et al.*, Lab Invest. 1997 May;76(5):739-49.
44. Ryden *et al.*, J Biol Chem 1996 Nov 29;271(48):30603-9.
45. Takumi *et al.*, Exp Cell Res 1995 Jan;216(1):208-14.
46. Ward *et al.*, Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997 Nov;17(11):2461-70.
47. Ward *et al.*, Arterioscler Thromb Vasc. Biol 2002 Jun 1;22(6):940-8.
48. Ward *et al.*, FEBS Lett 1998 Jan 30;422(2):197-200.
49. Ward *et al.*, Atherosclerosis. 1998 Apr;137(2):267-75.
50. Wilson *et al.*, Biol Reprod 2001 Apr;64(4):1225-35.
51. Wu *et al.*, J Cell Physiol 1996 Aug;168(2):453-61.
52. Abe *et al.*, J Bone Min. Res. 2000 Apr;15(4):663-73.
53. Adelman *et al.*, Development. 2002 Jan;129(2):539-49.
54. Akiyama *et al.*, Exp Cell Res 1997 Sep 15;235(2):362-9.
55. Ashique *et al.*, Int J Dev Biol 2002 Mar;46(2):243-53.
56. Baur *et al.*, Development 2000 Feb;127(3):605-19.
57. Beck *et al.*, BMC Neurosci. 2001;2(1):12 Epub 2001 Sep 11.
58. Belecky-Adams *et al.*, J Comp Neruol. 2001 Feb 19;430(4):562-72.
59. Botchkarev *et al.*, FASEB J. 2001 Oct;15(12):2205-14.
60. Buurma *et al.*, Eur J Oral Sci. 1999 Aug;107(4):282-9.
61. Chang *et al.*, Dev Biol. 2002 Nov 15;251(2):380-94.
62. Cheifetz, Crit Rev Oral Biol Med. 1999;10(2):182-98.
63. Cheifetz, Eur J Oral Sci 1998 Jan;106 Suppl 1:174-8.
64. Coskun, *et al.*, J Neurosci Res. 2002 Sep 15;69(6):795-802.
65. De Caestecker *et al.*, Respir Res. 2001;2(4):193-7.
66. Deng *et al.*, Zhonghua Wai Ke Za Zhi. 2002 Aug;40(8):592-5.
67. Ebisawa *et al.*, J Cell Sci 1999 Oct;112 (Pt 20):3519-27.
68. Enomoto-Iwamoto *et al.*, J Cell Biol 1998 Jan 26;140(2):409-18.
69. Erickson *et al.*, Reprod Biol Endocrinol. 2003 Feb 5;1(1):9 Epub 2003.
70. Erlacher *et al.*, J Bone Miner Res 1998 Mar;13(3):383-92.
71. Franzen *et al.*, Endocrinology. 1999 Sep;140(9):4300-10.
72. Fujii *et al.*, Mol Biol Cell. 1999 Nov;10(11):3801-13.
73. Gouedard *et al.*, J Biol Chem. 2000 Sep 8;275(36):27973-8.
74. Gould *et al.*, Kidney Int. 2002 Jan;61(1):51-60.
75. Gu *et al.*, Arch Oral Biol 1996 Oct;41(10):919-23.
76. Guo *et al.*, Clin Orthop. 1999 Aug;(365):175-83.
77. Haaijman *et al.*, Growth Factors. 2000;17(3):177-92.
78. Hanada *et al.*, J Cell Biochem. 2001 Mar 26;81(2):284-94.
79. Hillmann *et al.*, Biomaterials 2002 Mar;23(6):1461-9.
80. Hoshi *et al.*, Bone. 1997 Aug;21(2):155-62.
81. Howe *et al.*, Nat Genet 2001 Jun;28(2):184-7.
82. Ide *et al.*, Cancer Res. 1997 Nov 15;57(22):5022-7.
83. Ide *et al.*, Oncogene 1997 Mar 20;14(11): 1377-82.
84. Ikeda *et al.*, Dev Dyn 1996 Jul;206(3):318-29.
85. Ishidou *et al.*, J Bone Miner Res 1995 Nov;10(11):1651-9.
86. Jazwinska *et al.*, Cell. 1999 Feb 19;96(4):563-73.
87. Jikko *et al.*, J Bone Miner Res 1999 Jul;14(7):1075-83.
88. Jin *et al.*, Oral Oncol 2001 Apr;37(3) :225-33.
89. Kaneko *et al.*, Bone. 2000 Oct ;27(4) :479-86.
90. Kawakami *et al.*, Development 1996 Nov ; 122(11) :3557-66.
91. Kim *et al.*, Cancer Res 2000 Jun 1;60(11):2840-4.
92. Kirsch *et al.*, EMBO J 2000 Jul 3;19(13):3314-24.
93. Kitten *et al.*, J Cell Physiol 1999 Dec;181(3):410-5.
94. Kleeff et al, Gastroenterology. 1999 May;116(5):1202-16.
95. Kloen *et al.*, J Bone Joint Surg. Am. 2002 Nov;84-A(11):1909-18.
96. Koenig *et al.*, Mol Cell Biol 1994 Sep;14(9):5961-74.
97. Lecerf *et al.*, Nucleic Acids Res 2001 Sep 1;29(17):E87-7.
98. Li *et al.*, J Bone Miner Res 2001 Jun;16(6):1068-76.
99. Liu *et al.*, Mol Cell Biol 1995 Jul;15(7):3479-86.
100. Liu *et al.*, Dev Biol 2003 Apr 1;256(1):34-48.
101. Macias-Silva *et al.*, J Biol Chem 1998 Oct 2;273(40):25628-36.
102. Marinova-Mutafchieva *et al.*, Arthritis Rheum. 2002 Feb;46(2):507-13.

103. Martinez *et al.*, Int J Dev Biol 2002;46(4):525-33.
104. Martinez *et al.*, Exp Nephrol. 2001;9(6):372-9.
105. McNatty *et al.*, Reprod Fertil Dev. 2001;13(7-8):549-55
106. McPherson *et al.*, Dev Biol 2000 May 1-221(1):220-32.
107. Ming *et al.*, Neuroscience 2002;114(4):849-57.
108. Miyazaki *et al.*, J Clin Invest 2000 Apr;105(7):863-73.
109. Monsoro-Burq *et al.*, Mech Dev. 2000 Oct;97(1-2):105-8.
110. Mori *et al.*, Bone 1998 Feb;22(2):99-105.
111. Nakase *et al.*, J Orthop Res 2001 Nov;19(6):1085-8.
112. Namiki *et al.*, J Biol Chem. 1997 Aug 29;272(35):22046-52.
113. Natsume *et al.*, J Biol Chem 1997 Apr 25;272(17):11353-40.
114. Nikaido *et al.*, Mech Dev. 1999 Apr;82(1-2):219-22.
115. Nikaido *et al.*, Development. 1999 Jan;126(1):181-90.
116. Nishihara *et al.*, Biochem Biophys Res Commun. 2003 Feb 7;301(2):617-22.
117. Nishimura *et al.*, J Biol Chem 1998 Jan 23;274(4):1872-9.
118. Nishitoh *et al.*, J Biol Chem. 1996 Aug 30;271(35):21345-52.
119. Obata *et al.*, Acta Ophthalmol Scand. 1999 Apr;77(2):151-6.
120. Onishi *et al.*, Bone 1998 Jun;22(6):605-12.
121. Panchision *et al.*, Genes Dev 2001 Aug 15 ;15(16) :2094-110.
122. Roelen *et al.*, Int J Dev Biol 1997 Aug ;41(4) :541-9.
123. Sakou *et al.*, J Bone Miner Res. 1999 Jul;14(7):1145-52.
124. Sanyal *et al.*, J Orthop Res 2002 Jan;20(1):58-65.
125. Shimizu *et al.*, Bone 1998 Aug;23(2):127-33.
126. Shukunami *et al.*, FEBS Lett 2000 Mar 3;469(1):83-7.
127. Skillington *et al.*, J Cell Biol 2002 Oct 14;159(1):135-46.
128. Soderstrom *et al.*, Cell Tissue Res 1996 Nov;286(2):269-79.
129. Takae *et al.*, Spine 1999 Jul 15;24(14):13897-401.
130. Takeda, Kokubyo Gakkai Zasshi, 1994 Dec;61(4):512-26.
131. Takeda *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 1994 Oct 14;204(1):203-9.
132. Tmaki *et al.*, J Cell Physiol. 1998 Nov;177(2):355-63.
133. Toyono *et al.*, J Dent Res. 1997 Sep;76(9):1555-60.
134. Toyono *et al.*, Arch Oral Biol 1997 Jul;42(7):481-8.
135. van der Horst *et al.*, Bone 2002 Dec;31(6):661-9.
136. Varley *et al.*, Dev Biol 1998 Apr 1;196(1):107-18.
137. Volk *et al.*, J Bone Miner Res 2000 Aug;15(8):1630-9.
138. Wada *et al.*, Bone 1998 May;22(5):479-85.
139. Wollina *et al.*, Acta Derm Venereol. 1999 May;79(3):183-6140.
140. Wu *et al.*, J Cell Physiol 1996 Aug;168(2):453-61.
141. Yamada *et al.*, Jpn J Opthalmol 1999 Jul-Aug;43(4):290-4.
142. Yamada *et al.*, Br J Cancer 1996 Mar;73(5):624-9.
143. Yaoita *et al.*, J Bone Miner Metab 2000;18(2):63-70.
144. Yazaki *et al.*, Anticancer Res 1998 Jul-Aug;18(4A):2239-44.
145. Yeh *et al.*, J Cell Physiol 2002 Mar;190(3):322-31.
146. Yeh *et al.*, J Cell Physiol 2000 Oct;185(1):87-97.
147. Yeh *et al.*, J Bone Miner Res 1998 Dec;13(12):1870-9.
148. Yi *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 2001 Jul 3;98(14):7994-9 Epub 2001 Jun 19.
149. Yi *et al.*, Development 2000 Feb;127(3):621-30.
150. Yonemori *et al.*, Am J Pathol 1997 Apr;150(4):1335-47.
151. You *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci 1999 Feb;40(2):296-311.
152. Zehentner *et al.*, J Bone Miner Res 1999 Oct;14(10):17,4-41.
153. Zhang *et al.*, J Neurosci 1998 May 1;18(9):3314-26.
154. Zhao *et al.*, J Bone Miner Res 2002 Aug;17(8):1441-51.
155. Zou *et al.*, Genes Dev. 1997 Sep 1;11(17):2191-203.
156. Miyazono, Kohei; *et al.*, Antibodies which bind specifically to activin preceptor like kinases, Publ. Nº 20020123139, Sol. Pat. EE.UU. Nº 10/903.068, presentada el 5 Sept. de 2002.
157. Caniggia, Isabella *et al.*, Methods to diagnose a required regulation of trophoblast invasion, Publ. Nº 20020110833, Sol. Pat. EE.UU. Nº 10/028.158. presentada el 15 de agosto de 2002.
158. Plowman, Gregory *et al.*, Diagnosis and treatment of ALK-7 related disorders, Publ. Nº 20030073143, Sol. Pat. EE.UU. Nº 10/069.228, presentada el 17 de abril de 2003.
159. Rosenbaum, Jan Susan, Use of a BMP protein receptor complex for screening bone metabolism actives and cells cotransfected with a type II BMP receptor and a type I BMP receptor, 20030096296, Sol. Pat. EE.UU. Nº 10/742,153, presentada May 22, 2003.
160. Hughes, Paul E, *et al.*, Methods of providing neuroprotection and/or neurorestoration via the neural Activin type IIB receptor, Publ. Nº 20030103959, Sol. Pat. EE.UU. Nº 10/177.735, presentada el 5 de junio de 2003.
161. Ibáñez *et al.*, Antibodies that specifically bind to ALK-7, a novel serine theronine kinase receptor, USSN 5811245, concedida el 22 de Sept. de 1998.

162. ten Dijke *et al.*, Methods of antagonizing OP-1 binding to a cell superficie receptor utilizing ALK polypeptides, USSN 5863738, concedida el 26 de Ene. de 1999.
163. Ibáñez et al, Serine threonine kinase receptor, ALK-7, USSN 5891638, concedida el 6 de abril de 1999.
164. Ichijo *et al.*, Method for identifying an OP-1 analog which binds an ALK-1 receptor, 5968752, 19 de oct. de 1999.
165. Miyazono *et al.*, Activin receptor-like kinases, ALK-3 and ALK-6, and nucleic acids encoding them, USSN 6207814, concedida el 27 de marzo de 2001.
166. Rosenbaum, Use of a BMP protein receptor complex for screening bone metabolism actives and cells cotransfected with a type II BMP receptor and type I BMP receptor, USSN 6210899, concedida el 3 de abril de 2001.
167. Rosenbaum *et al.*, CDNA encoding a BMP type II receptor, USSN 6306622, concedida el 23 de oct. de 2001
168. Miyazono *et al.*, Activin receptor-like kinases, proteins having serine threonine kinase domains and polynucleotides encoding same, 6316217, 13 de nov. de 2001.
169. Miyazono *et al.*, Isolated nucleic acid molecules which encode activin-receptor like kinases, expression vectors and cells containing these, USSN 6331621, concedida el 18 de dic. de 2001.
170. Caniggia *et al.*, Methods to diagnose a required regulation of trophoblast invasion, USSN 6376199, concedida el 23 de abril de 2002.

Lista de secuencias

<110> THRASOS THERAPEUTICS, INC.

<120> Compuestos relacionados con TDF y análogos de los mismos

<130> P133176EP00

<140> EP12171205,3
<141> 20-09-2006

<150> US 60/719014
<151> 20-09-2005

<160> 1

<170> PatentIn versión 3,3

<210> 333
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia genérica

<400> 333

```
Cys Tyr Tyr Asp Asn Ser Ser Ser Val Leu Cys Lys Arg Tyr Arg Ser
1               5                  10                  15
```

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende la SEC. Nº ID.: 333 y sus variantes, donde cada residuo de cisteína está reemplazado con un aminoácido que tiene una cadena lateral que contiene un resto hidroxilo, tiol, amina, ácido carboxílico o ácido sulfónico que puede ser usado para ciclar el compuesto.

2. A compuesto de la reivindicación 1, donde el compuesto es un péptido cíclico.

3. Un compuesto de la reivindicación 1, donde uno de dos residuos de cisteína está reemplazado por Asp y el otro de dichos dos residuos de cisteína está reemplazado por Dap, formando así un enlace de lactama que cicla el péptido.

4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un soporte farmacéuticamente aceptable.

5. Un método para determinar la presencia de, o la predisposición a, una enfermedad asociada a niveles alterados del receptor del factor de diferenciación tisular en un primer sujeto, donde el método consiste en:

obtener una muestra de ensayo del primer sujeto;
poner en contacto la muestra de ensayo del primer sujeto con un compuesto de la reivindicación 1;
detectar el nivel de complejo compuesto/receptor del factor de diferenciación tisular; cuantificar el nivel de expresión del receptor del factor de diferenciación tisular en la muestra del primer sujeto; y
comparar la cantidad del receptor del factor de diferenciación tisular en la muestra de la etapa (a) con la cantidad del receptor del factor de diferenciación tisular presente en una muestra de control de un segundo sujeto que se sabe que no padece, o que no está predispuesto a padecer, la enfermedad, donde una alteración en el nivel de expresión del receptor del factor de diferenciación tisular en el primer sujeto en comparación con la muestra de control indica la presencia de, o predisposición a, la enfermedad.

6. Un compuesto para uso en el tratamiento de un trastorno o enfermedad asociada al factor de diferenciación tisular, donde el compuesto comprende la SEC. Nº ID.: 333.

7. El uso de un compuesto para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado al factor de diferenciación tisular, donde el compuesto comprende la SEC. Nº ID.: 333.

8. Un dispositivo consistente en un dispositivo médico implantable que tiene un revestimiento, donde el revestimiento está constituido por un compuesto de la reivindicación 1.

FIG. 1

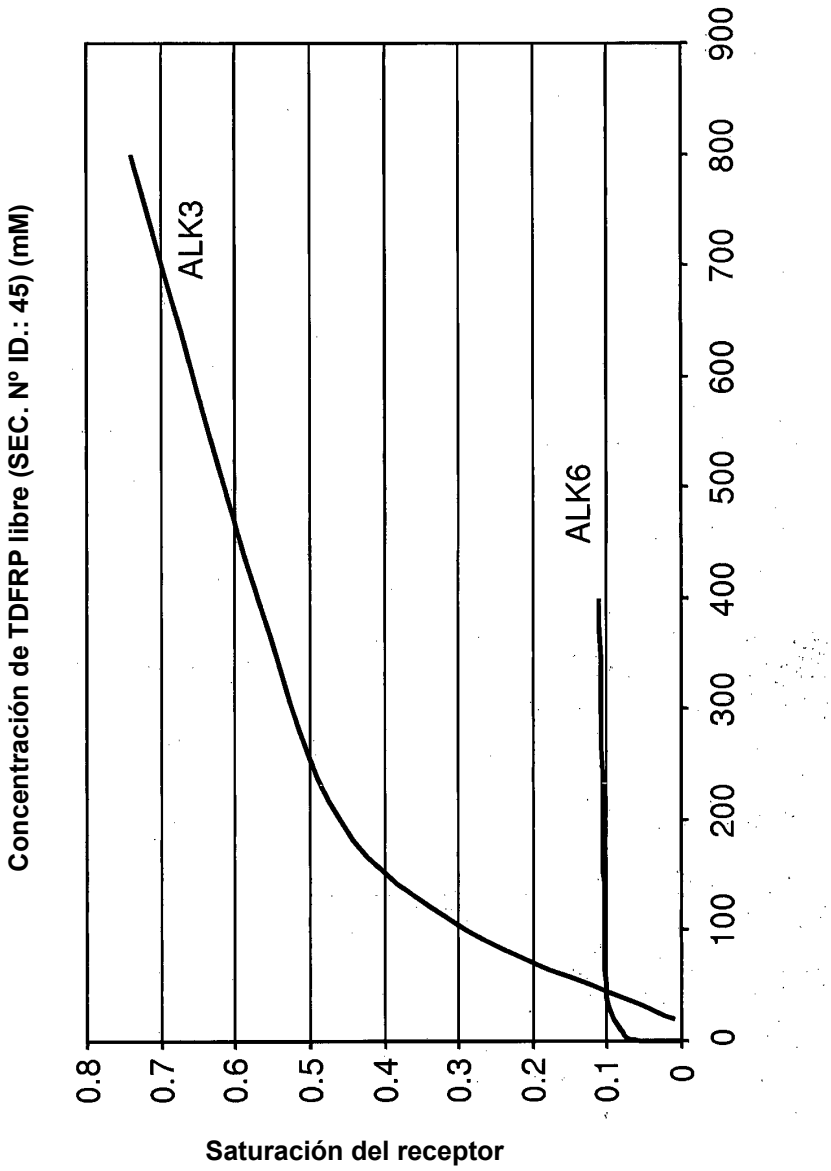

Concentración de TDFRP libre (SEC. Nº ID.: 45) (mM)
ALK3
ALK6
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Saturación del receptor

FIG. 2

Actividad agonista de BMP (fosforilación de Smad) de los compuestos TDFRP en ensayos con células endoteliales vasculares

Compuesto TDFRP SEC. Nº ID.	Fosforilación SMAD 1/5
45	+
43	+
24	+
209	+
33	+
221	+
16	Sin actividad

FIG. 3

Actividad agonista de BMP (fosforilación de Smad) de los compuestos TDFRP en células de cáncer de próstata humano LNCaP

Compuesto TDFRP SEC. Nº ID.	Fosforilación Smad 1/5
45	+
16 (Control negativo)	—

FIG. 4

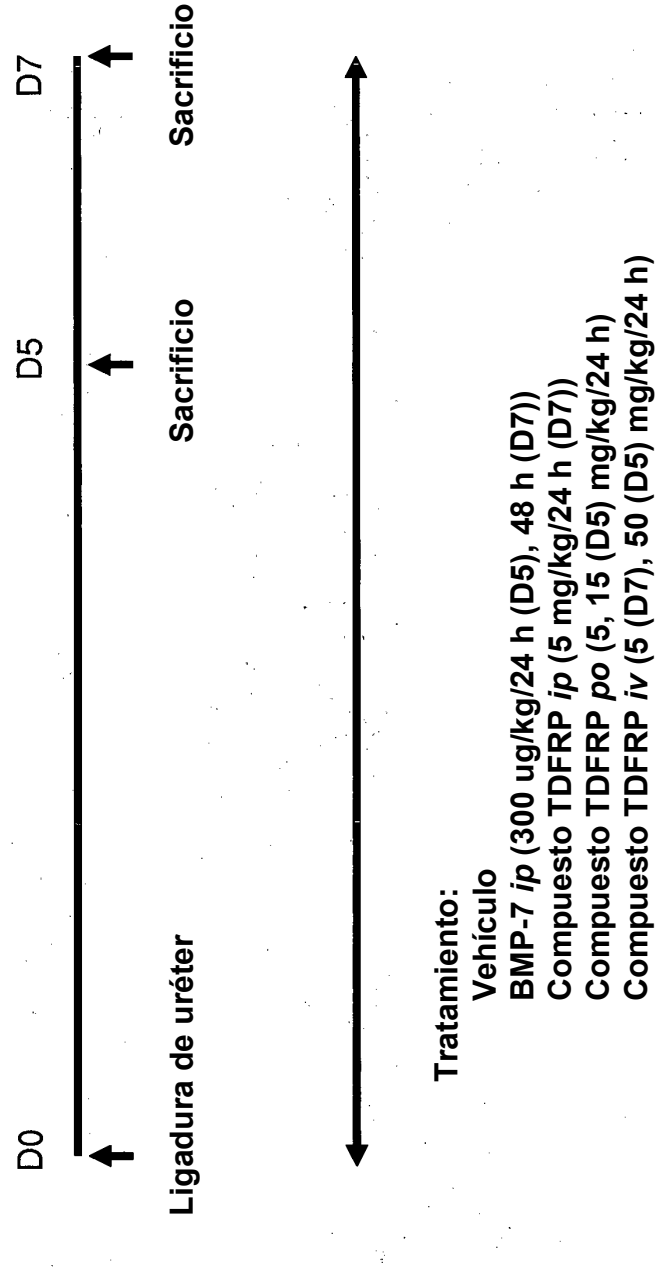

D0
D5
D7
Ligadura de uréter
Sacrificio
Sacrificio
Tratamiento:
Vehículo
BMP-7 ip (300 ug/kg/24 h (D5), 48 h (D7))
Compuesto TDFRP ip (5 mg/kg/24 h (D7))
Compuesto TDFRP po (5, 15 (D5) mg/kg/24 h)
Compuesto TDFRP iv (5 (D7), 50 (D5) mg/kg/24 h)

FIG. 5B

FIG. 5D

FIG. 5A

FIG. 5C

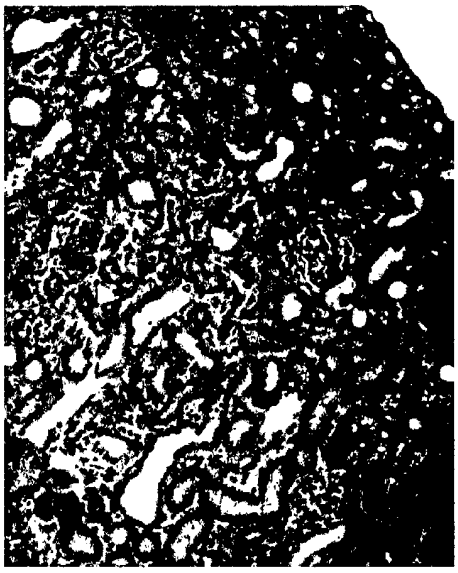


FIG. 6B

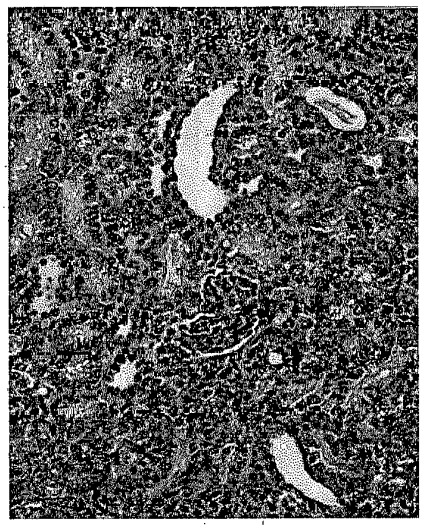


FIG. 6D

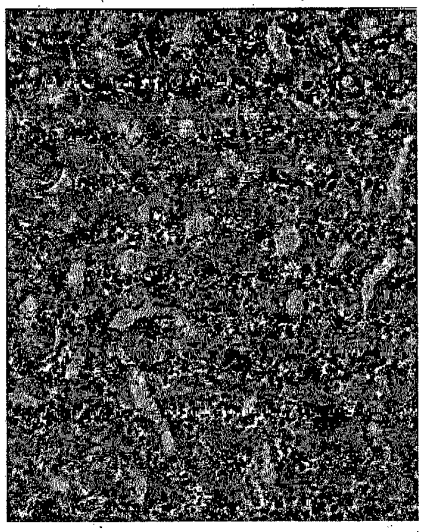


FIG. 6A

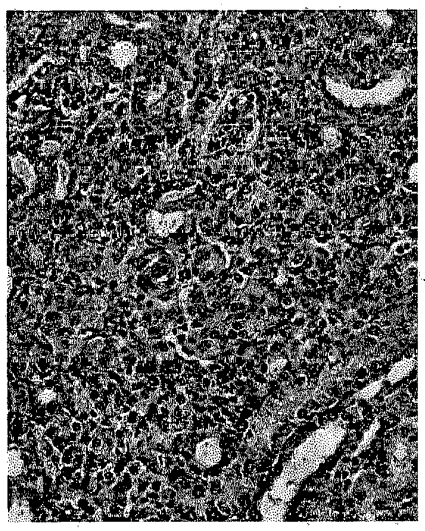


FIG. 6C

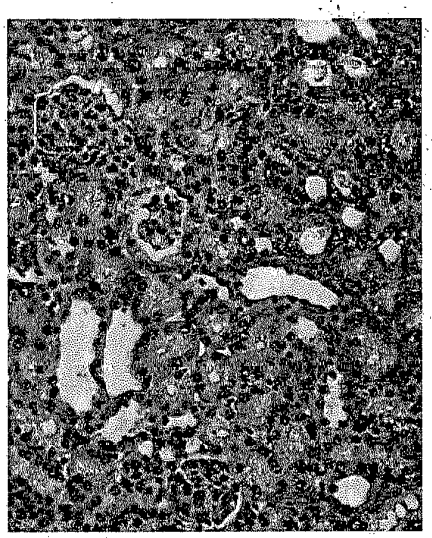


FIG. 7

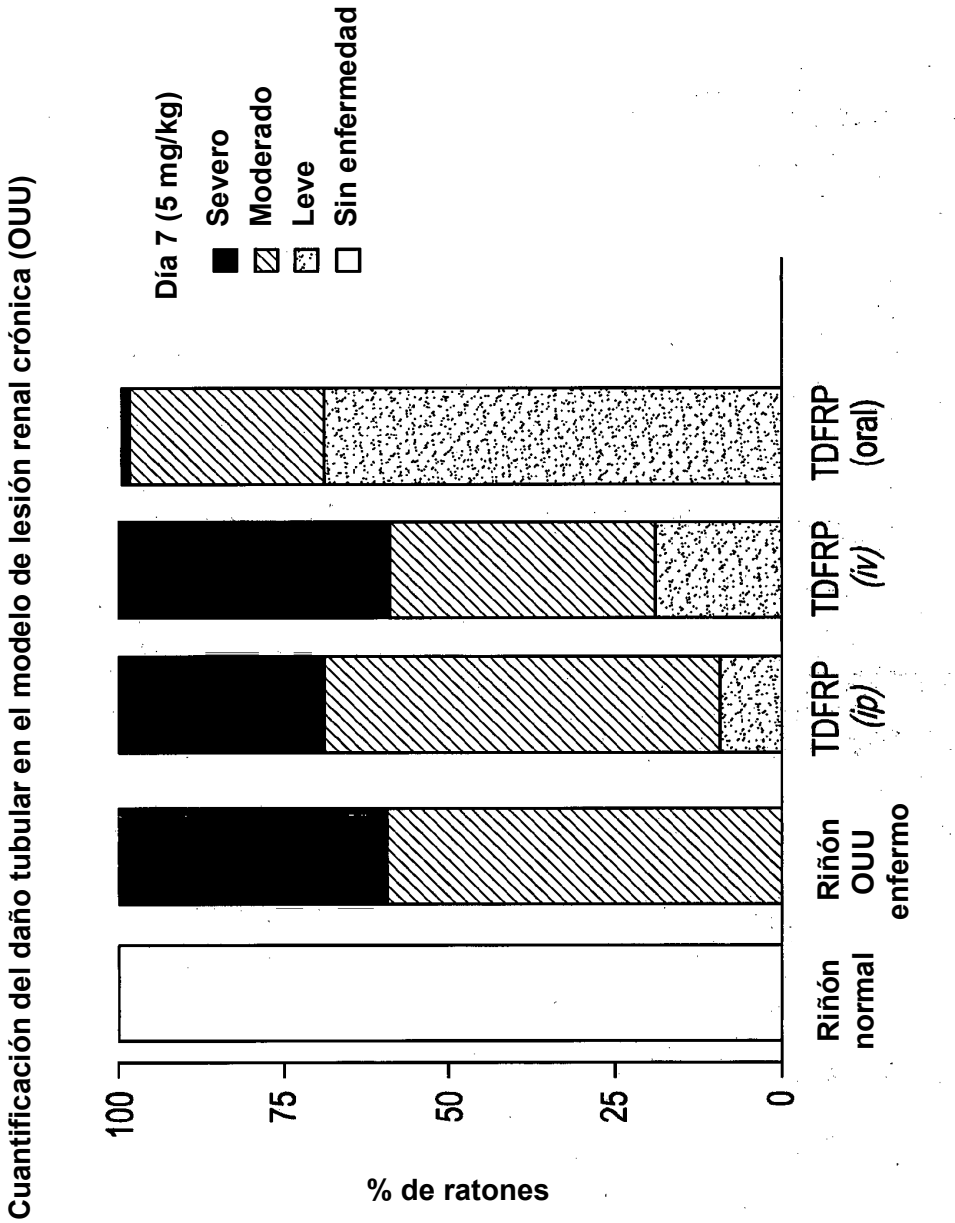

Cuantificación del daño tubular en el modelo de lesión renal crónica (OUU)
Día 7 (5 mg/kg)
Severo
Moderado
Leve
Sin enfermedad
100
75
50
25
0
% de ratones
Riñón normal
Riñón OUU enfermo
TDFRP (ip)
TDFRP (iv)
TDFRP (oral)

FIG. 8A

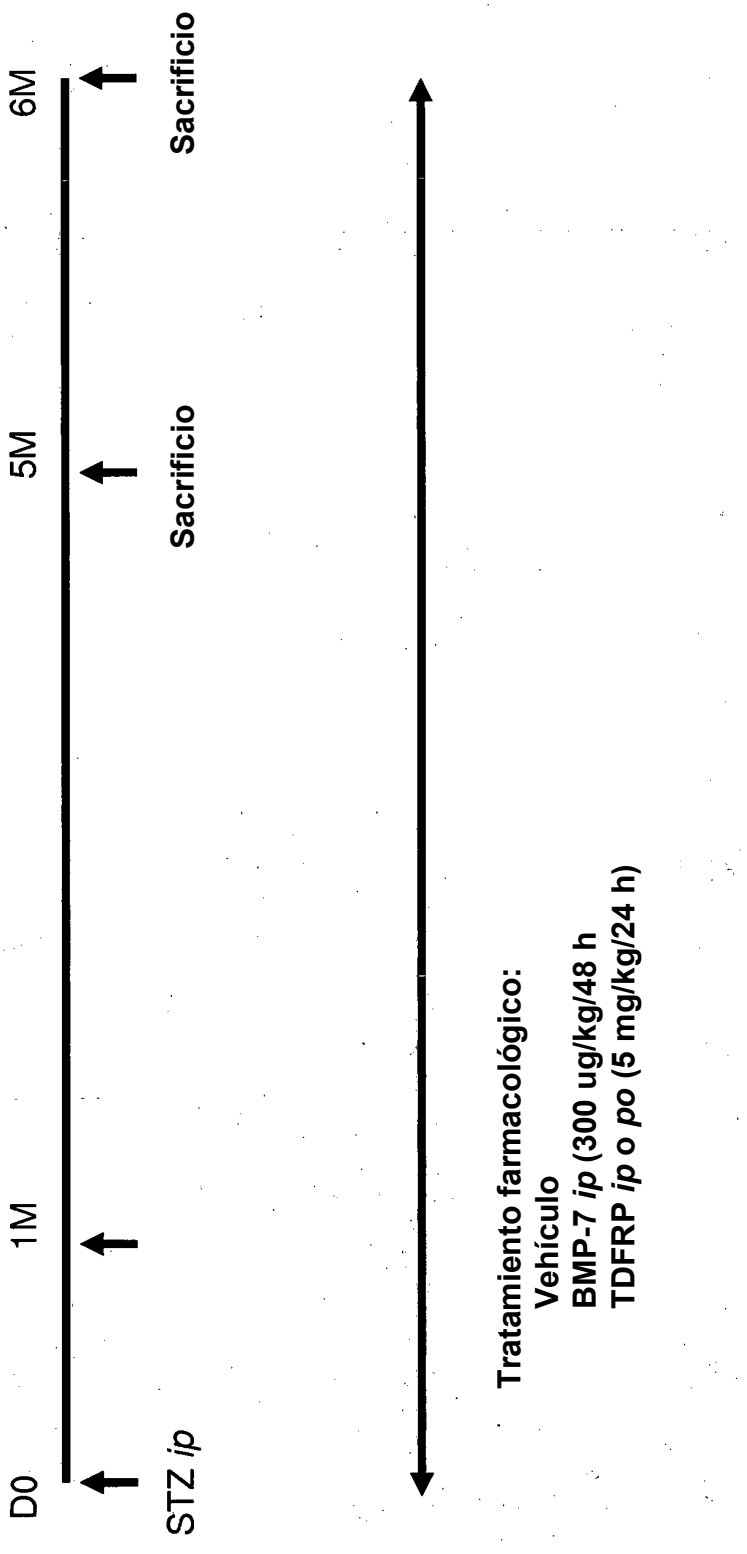

D0
1M
5M
6M
STZ *ip*
Sacrificio
Sacrificio
Tratamiento farmacológico:
Vehículo
BMP-7 *ip* (300 ug/kg/48 h
TDFRP *ip* o *po* (5 mg/kg/24 h)

FIG. 8C

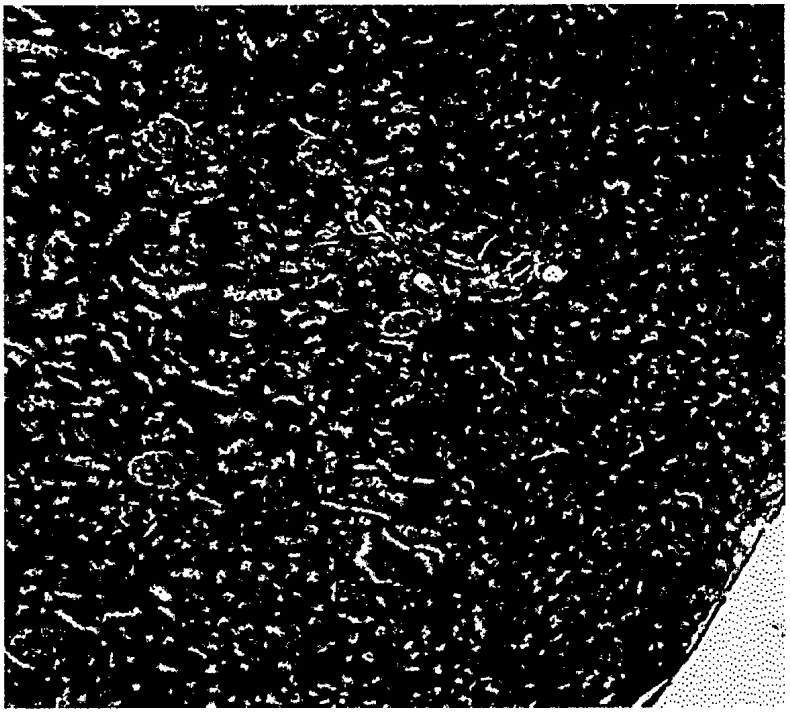


FIG. 8B

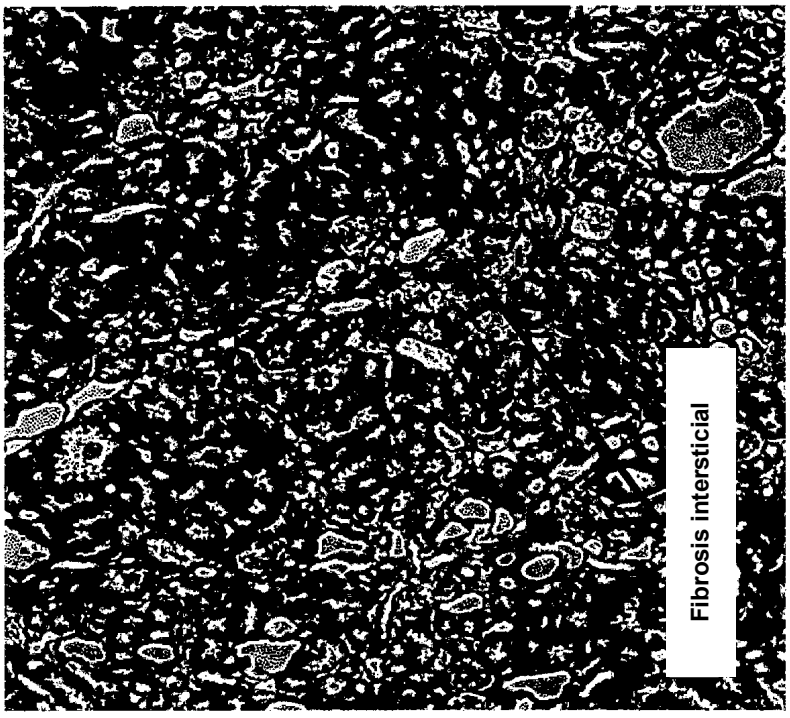


FIG. 9A

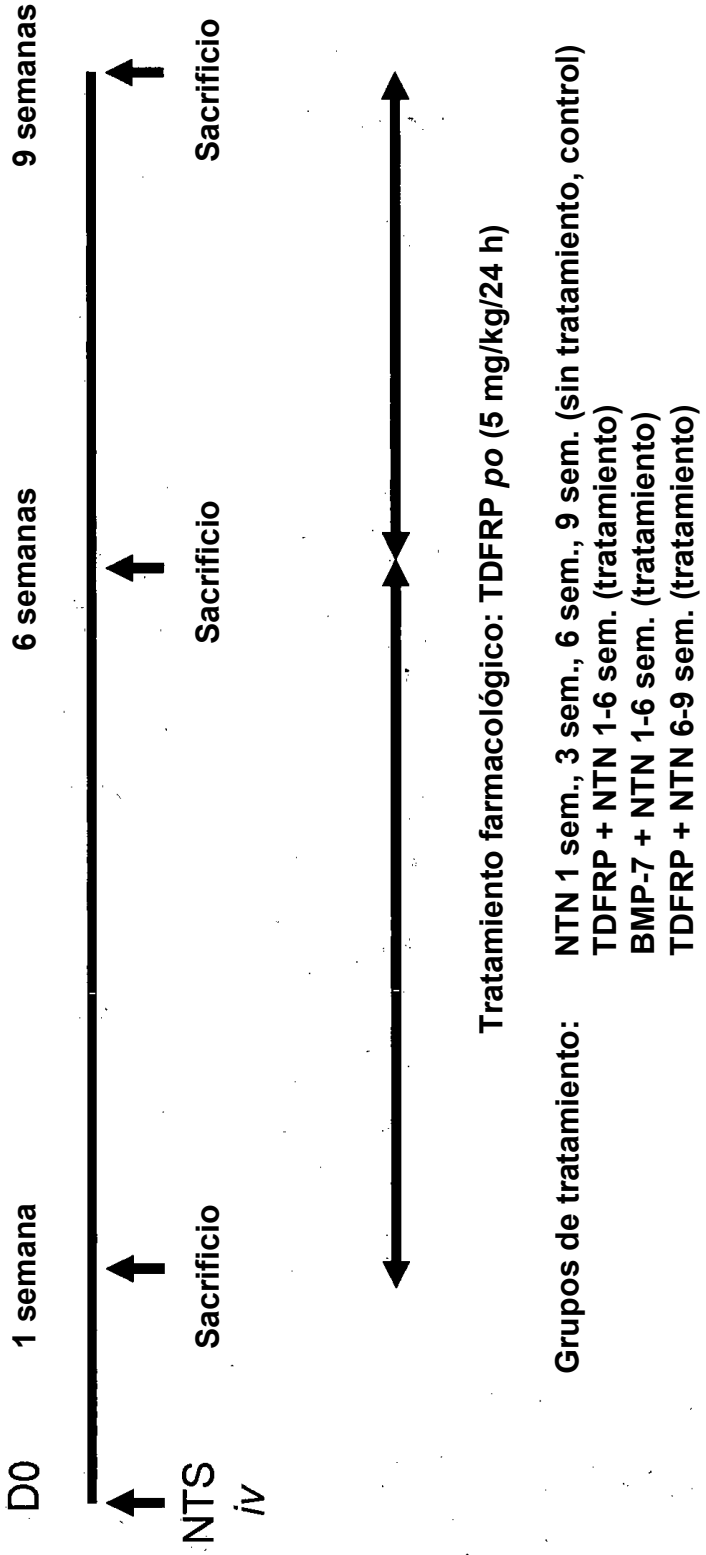

D0
1 semana
6 semanas
9 semanas
NTS
iv
Sacrificio
Sacrificio
Sacrificio
Tratamiento farmacológico: TDFRP po (5 mg/kg/24 h)
Grupos de tratamiento:
NTN 1 sem., 3 sem., 6 sem., 9 sem. (sin tratamiento, control)
TDFRP + NTN 1-6 sem. (tratamiento)
BMP-7 + NTN 1-6 sem. (tratamiento)
TDFRP + NTN 6-9 sem. (tratamiento)

FIG. 9B

Modelo de insuficiencia renal crónica por nefritis nefrotóxica (NNT)

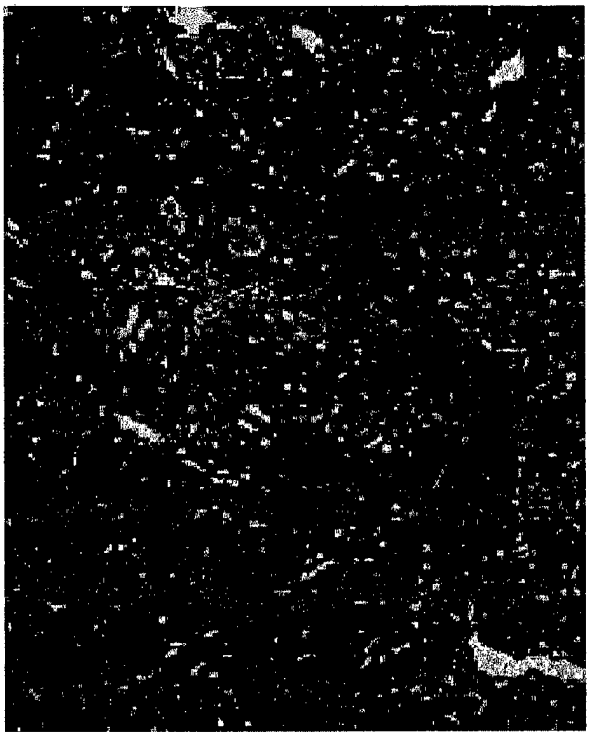
NNT (a las 9 sem.) + tratamiento con vehículo

Fibrosis

FIG. 9C

Modelo de insuficiencia renal crónica por nefritis nefrotóxica (NNT)

NNT (a las 9 sem.) + tratamiento con TDFRP de 6→9 sem. (*po*)



(X 50)

FIG. 10

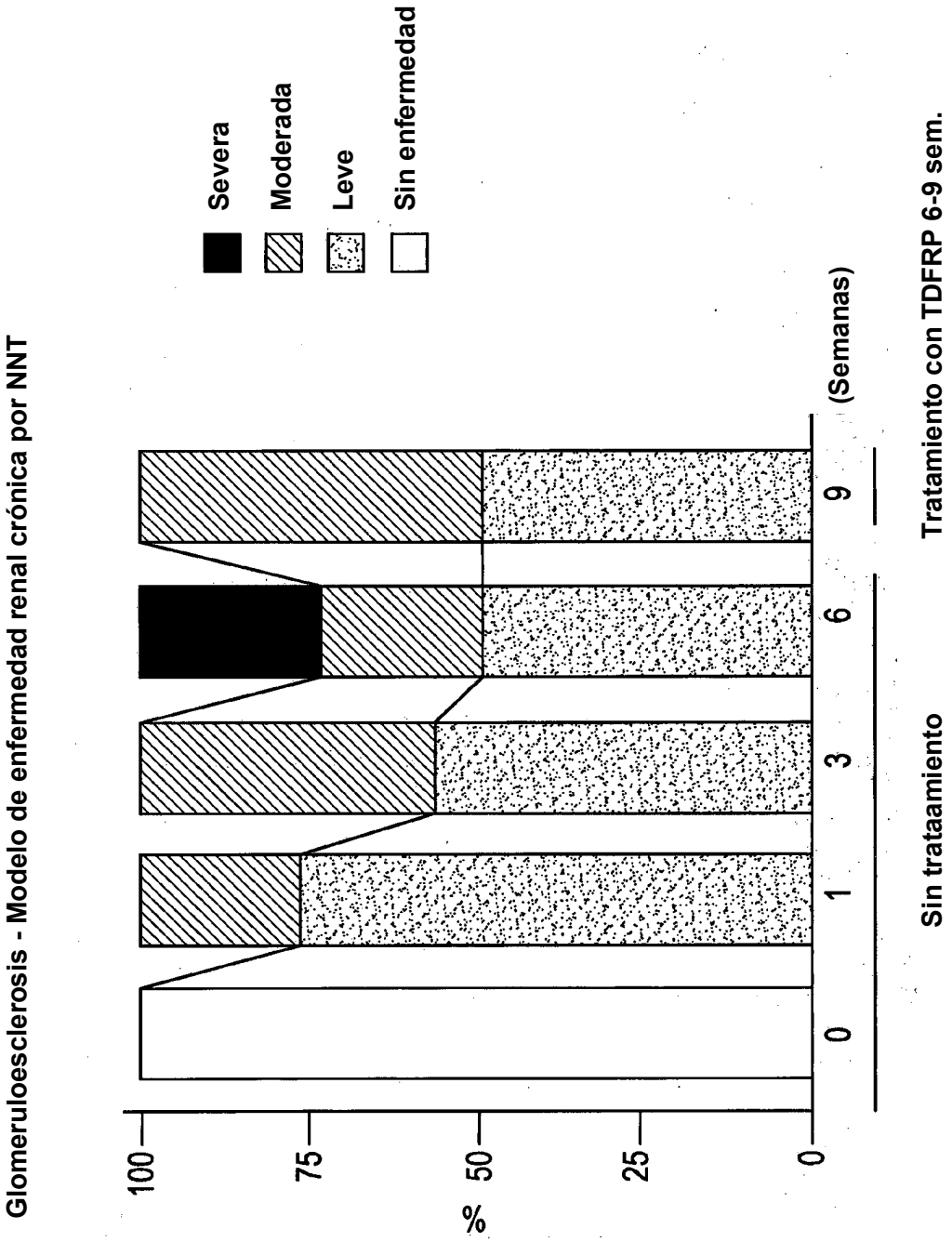

Glomeruloesclerosis - Modelo de enfermedad renal crónica por NNT
Severa
Moderada
Leve
Sin enfermedad
100
75
50
25
0
%
0
1
3
6
9
(Semanas)
Sin trataamiento
Tratamiento con TDFRP 6-9 sem.

FIG. 11

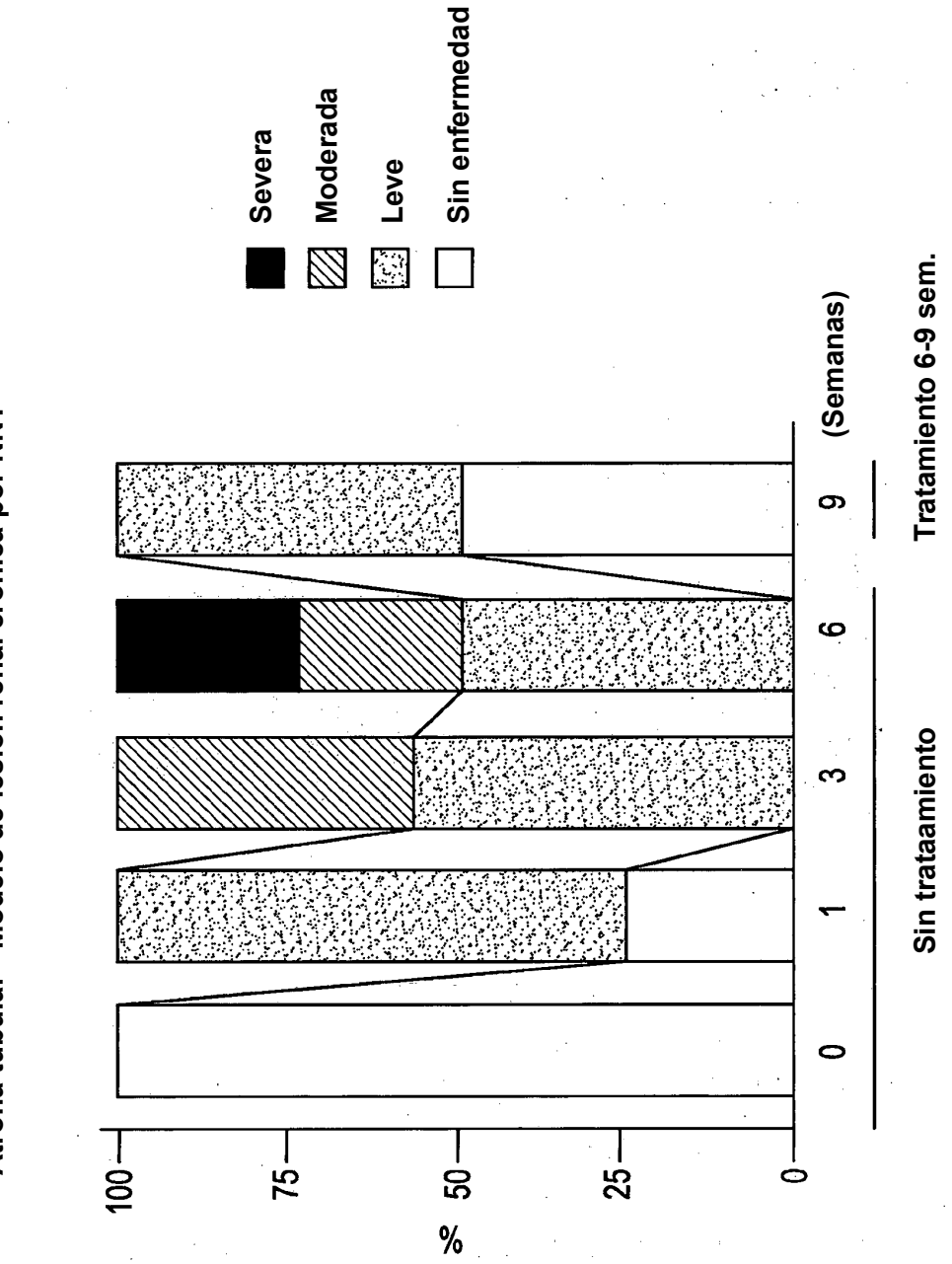

Atrofia tubular - Modelo de lesión renal crónica por NNT
Severa
Moderada
Leve
Sin enfermedad
100
75
50
25
0
%
0
1
3
6
9
(Semanas)
Sin trataamiento
Tratamiento 6-9 sem.

FIG. 12

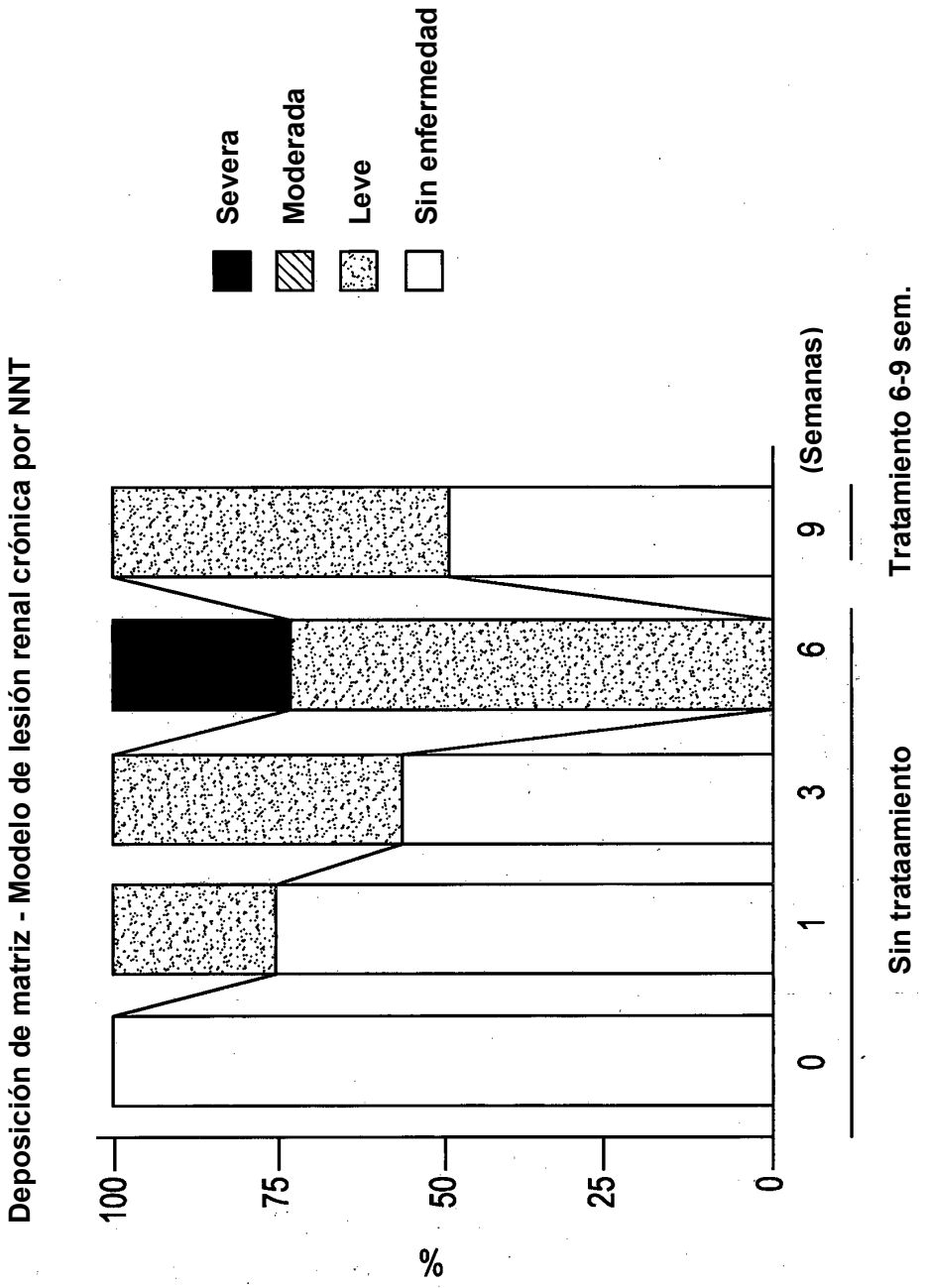

Deposición de matriz - Modelo de lesión renal crónica por NNT
Severa
Moderada
Leve
Sin enfermedad
100
75
50
25
0
%
0
1
3
6
9
(Semanas)
Sin trataamiento
Tratamiento 6-9 sem.

FIG. 13

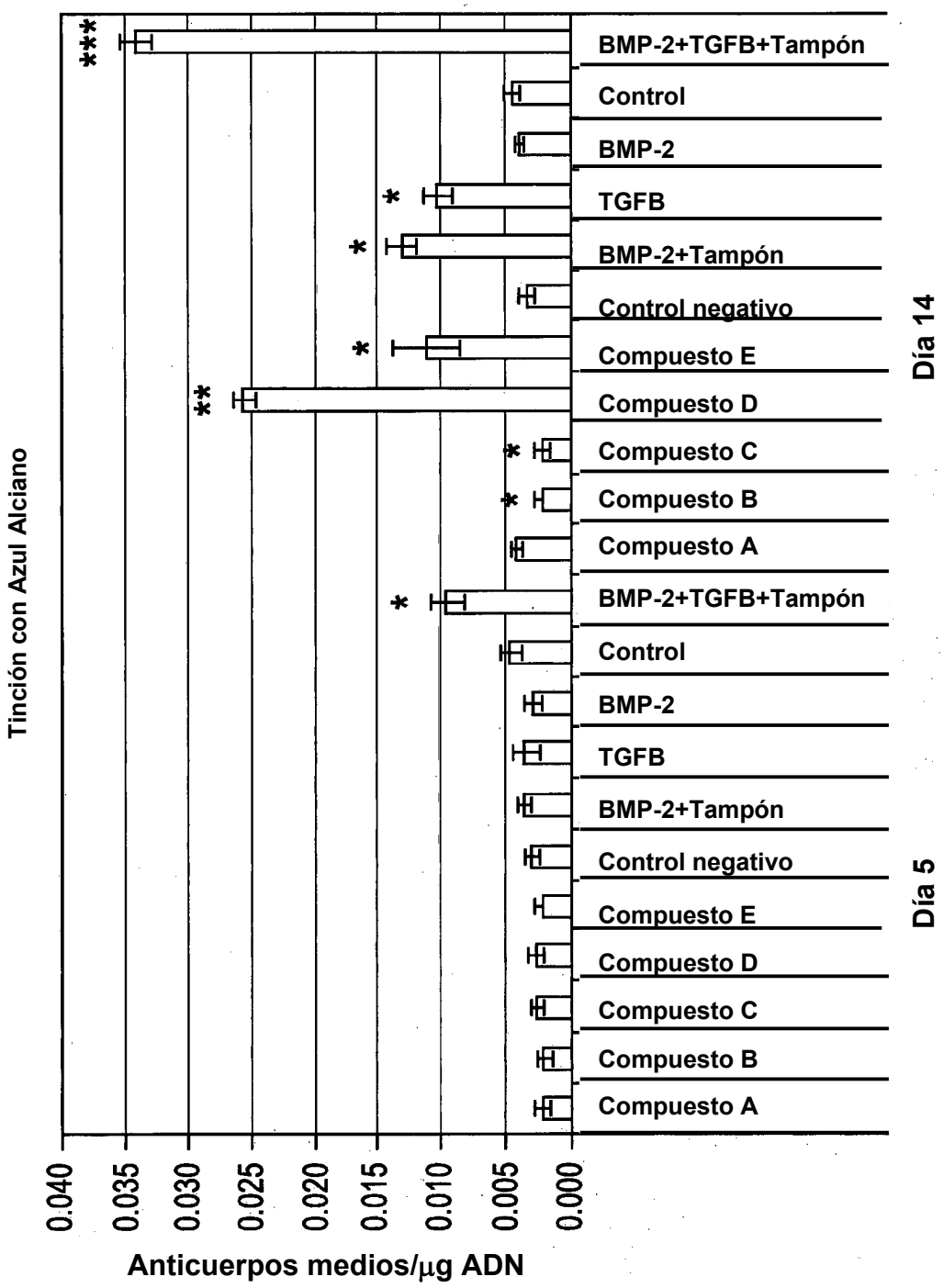

Tinción con Azul Alciano
BMP-2+TGFB+Tampón
Control
BMP-2
TGFB
BMP-2+Tampón
Control negativo
Compuesto E
Compuesto D
Compuesto C
Compuesto B
Compuesto A
Día 14
Día 5
0.040
0.035
0.030
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
Anticuerpos medios/µg ADN

FIG. 14

Datos de actividad *in vitro* del compuesto TDFRP en líneas celulares tubulares proximales Human Kidney-2

TDFRP (SEC. Nº ID.:)	IL-6 TNF-α	IL-8 TNF-α	ICAM-1 TNF-α	Bax TNF-α	Bcl-xL TNF-α	Bax Cisplatina	IL-8 Cisplatina
45	+	+	+	+	+	+	+
43	+	+	+				
24	+	+	+				
209	+	+	+	+			
213	+	+	+				
33	+	+	+				
217	+	+	+				
221	+	+	+				
222	+						
23	+						
250	+						
251	+						
333	+						
131	+						
25	+						
211	+						
215	+						
16	-						

FIG. 15

Datos de unión TDFRP - receptor de BMP *in vitro*			
TDFRP (SEC. Nº ID.:)	BMPR-II	ALK-3	ALK-6
45	+	+	-
43	+	+	
24	-	+	
209	+	+	
213	+	+	
33	+	+	
217	+	+	
221	+	+	
222		-	
16	-	-	-

FIG. 16

Datos de actividad de TDFRP *in vitro* en ensayos de cardiomiocitos

SEC. Nº ID.:	pAkt Privación	pAkt Doxorrubicina	Caspasa-3 Doxorrubicina	pAkt LPS	Caspasa-3 LPS	IL-6 LPS	TNF-α LPS	MCP-1 LPS
45		+	+	+	+	+	+	+
217	+							

FIG. 17A

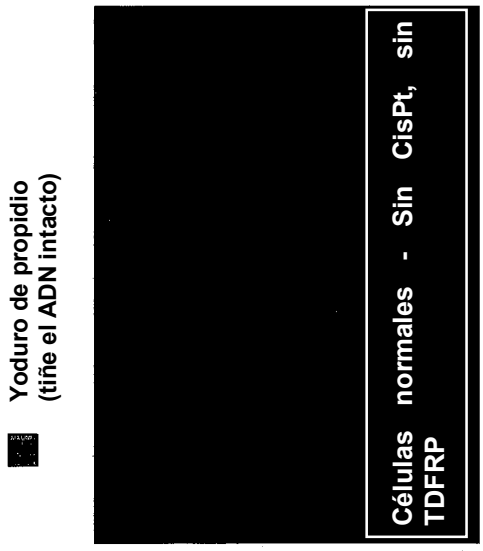


FIG. 17B

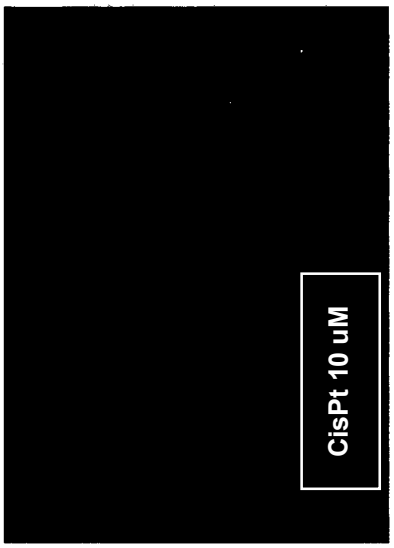


FIG. 17C

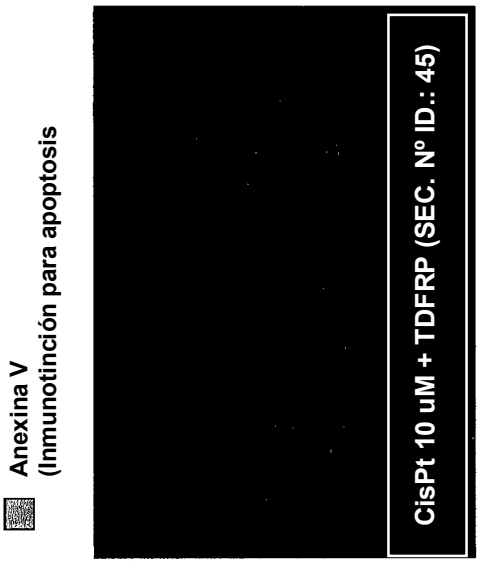


FIG. 17D

FIG. 18A

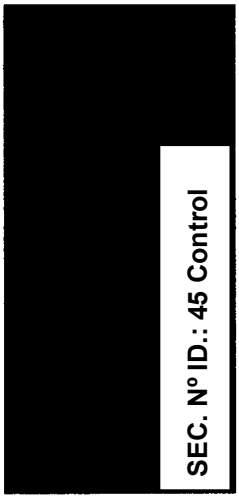
Smad1
(Fluorescencia)

FIG. 18D

Células
(contraste de fase)

Concentración de compuesto TDFRP (*v.g.*, SEC. Nº ID.: 45)

0.0 µM



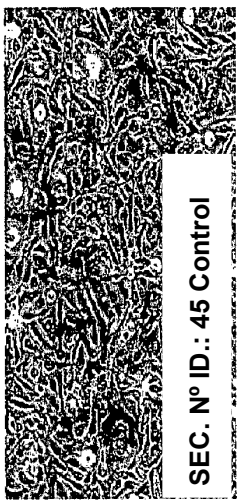


FIG. 18B

1.3 µM

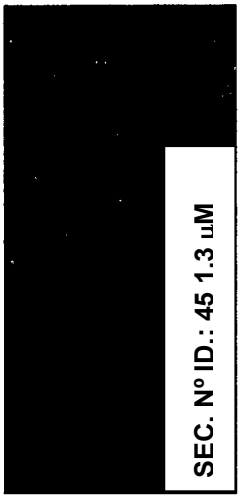


FIG. 18E

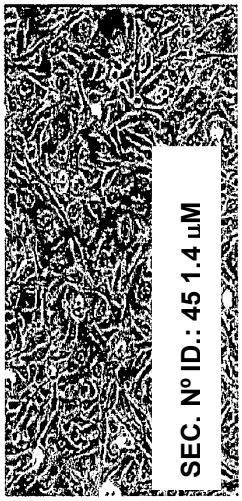


FIG. 18C

33.0 µM

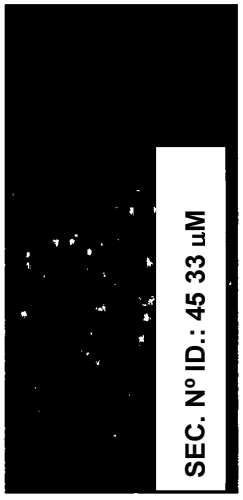


FIG. 18F

FIG. 19

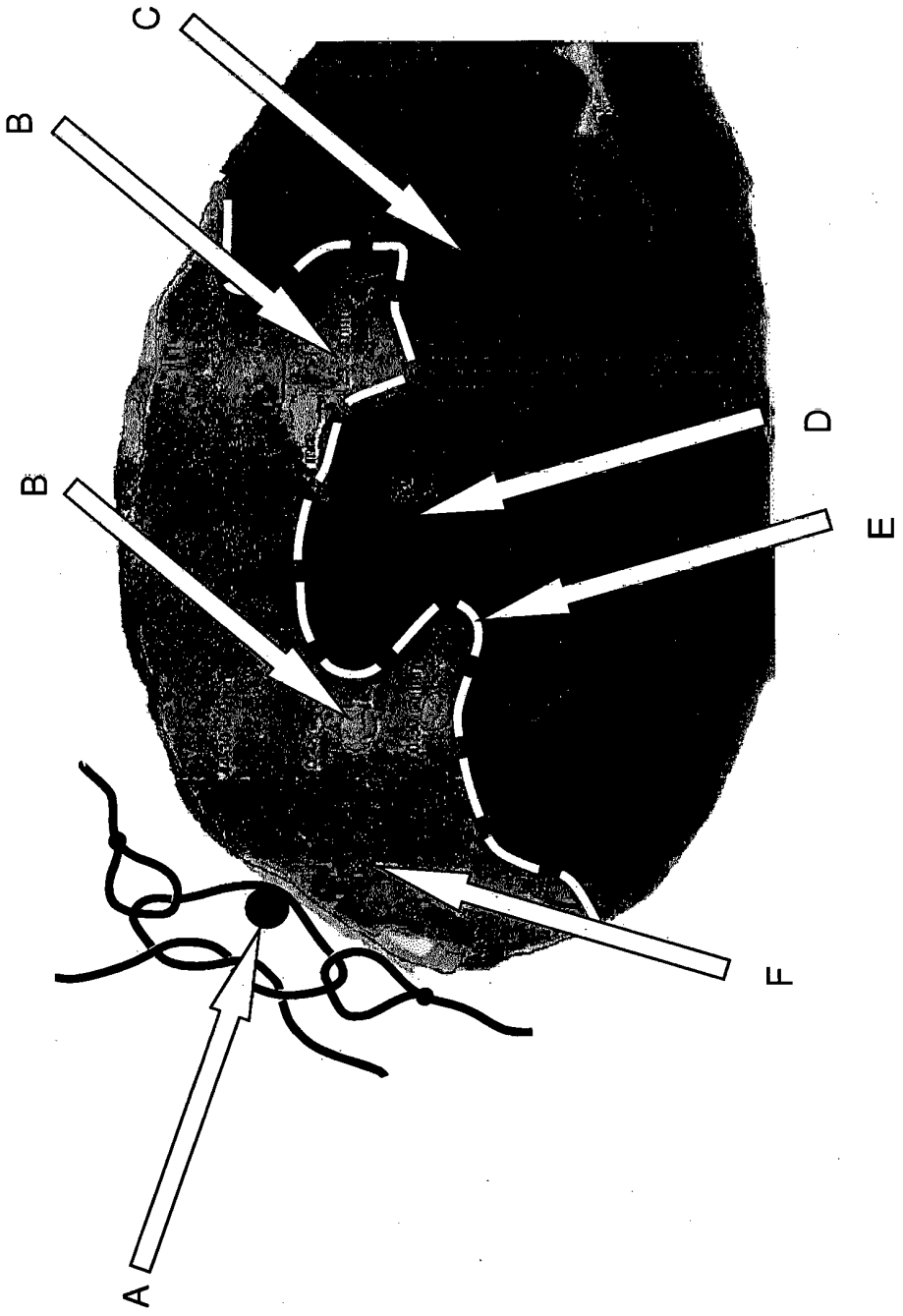


FIG. 20A

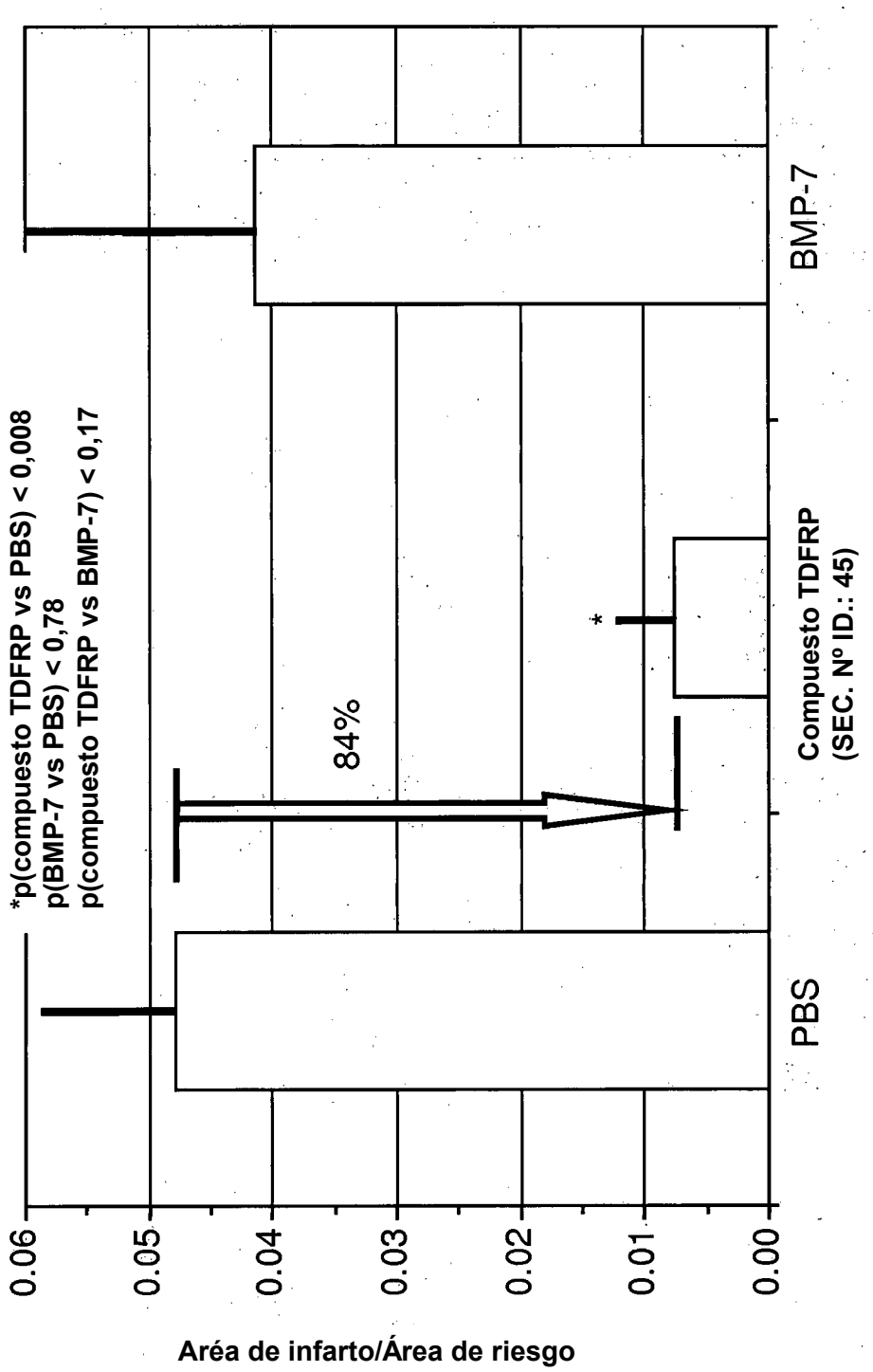

*p(compuesto TDFRP vs PBS) < 0,008
p(BMP-7 vs PBS) < 0,78
p(compuesto TDFRP vs BMP-7) < 0,17
84%
*
PBS
BMP-7
Compuesto TDFRP
(SEC. Nº ID.: 45)
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
Aréa de infarto/Área de riesgo

FIG. 20B

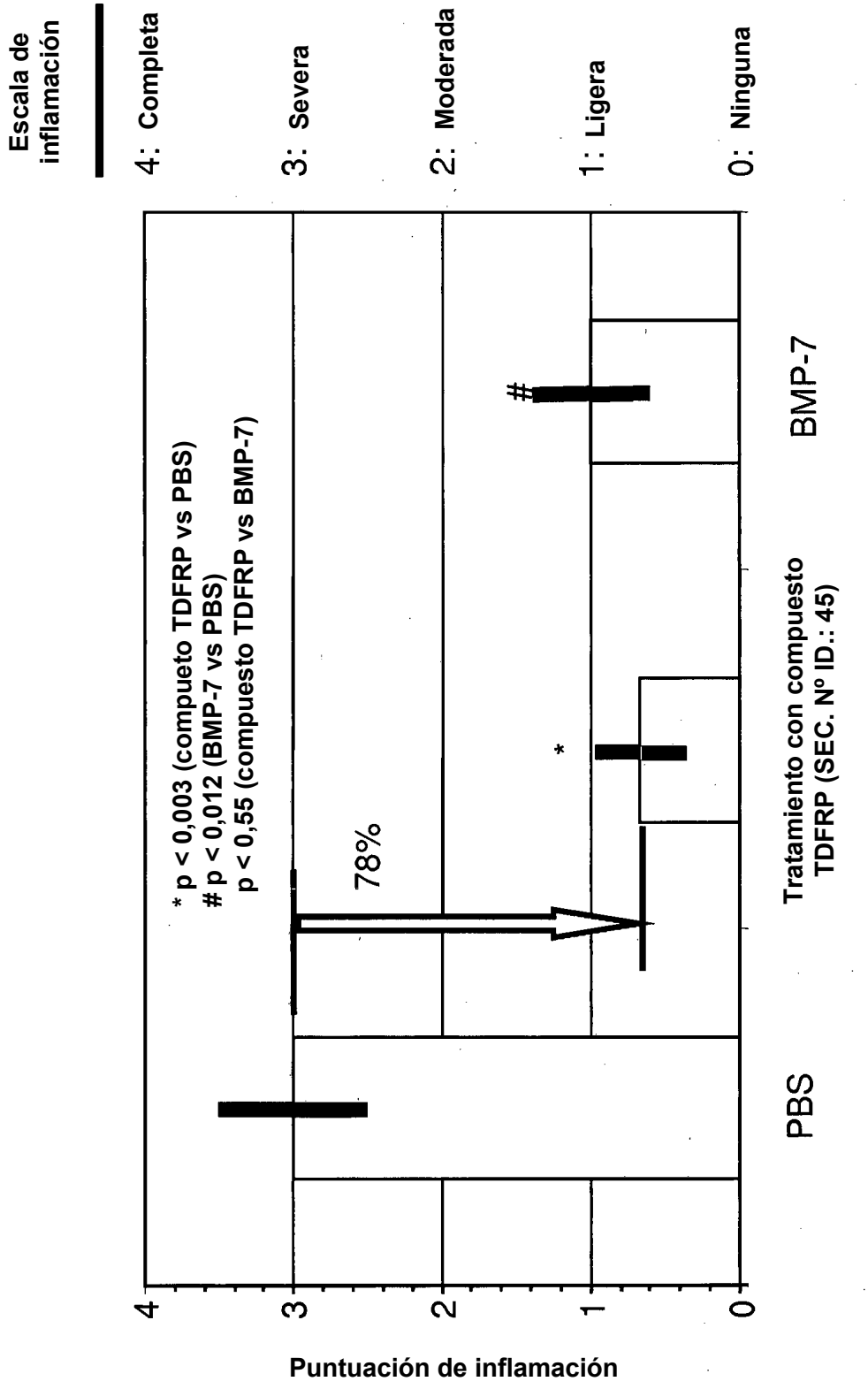

Escala de inflamación
4: Completa
3: Severa
2: Moderada
1: Ligera
0: Ninguna
* p < 0,003 (compueto TDFRP vs PBS)
# p < 0,012 (BMP-7 vs PBS)
p < 0,55 (compuesto TDFRP vs BMP-7)
78%
*
#
PBS
BMP-7
Tratamiento con compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45)
4
3
2
1
0
Puntuación de inflamación

FIG. 21

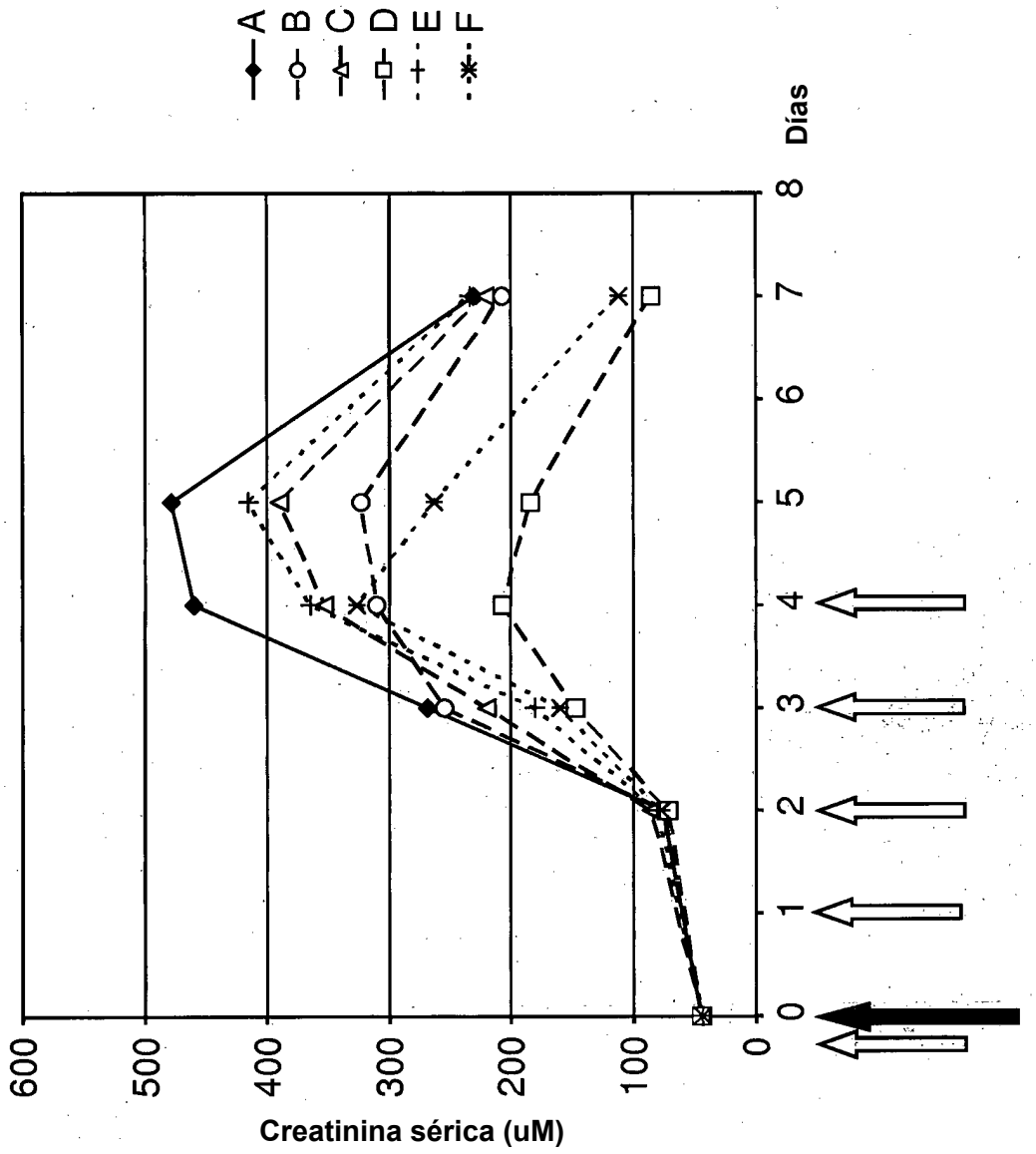
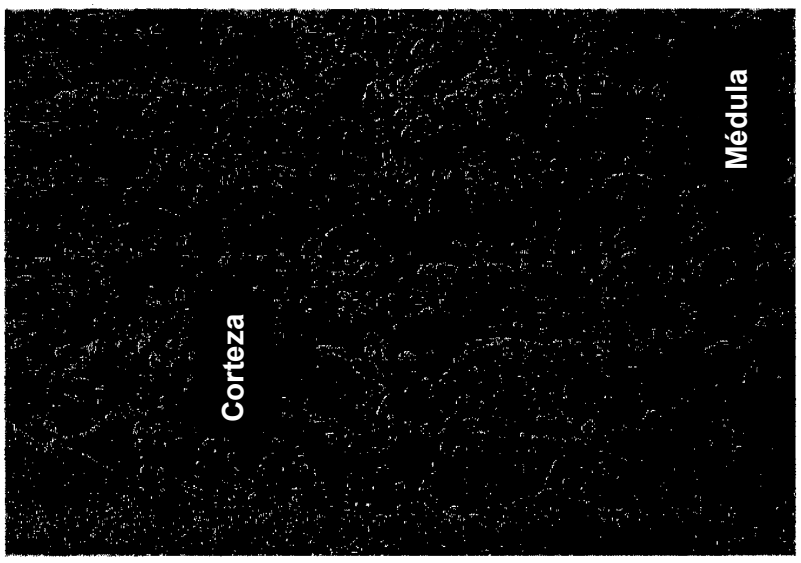

A
B
C
D
E
F
Días
0
1
2
3
4
5
6
7
8
600
500
400
300
200
100
0
Creatinina sérica (uM)

FIG. 22A

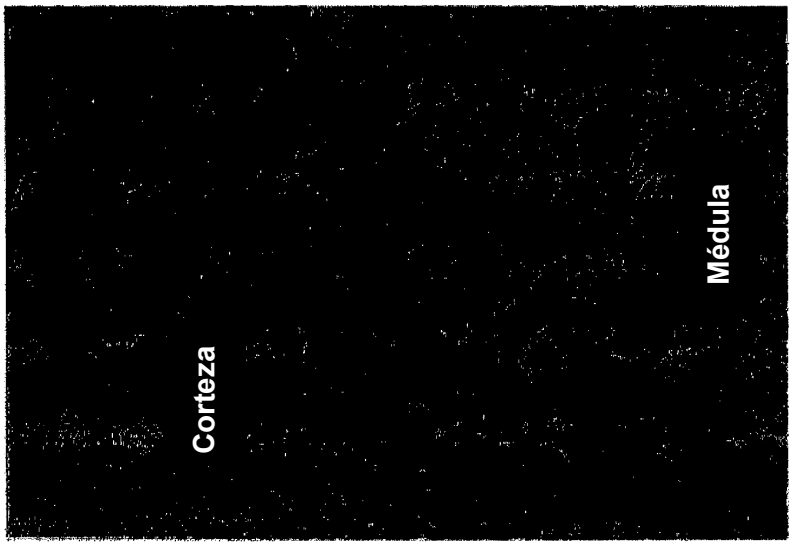
Riñón de rata con cisplatina



Control: 5 mg/kg pc de cisplatina
Día 7

FIG. 22B

Efecto de 2,8 mg/kg de compuesto TDFRP



Dosis media de TDFRP = 2,8 mg/kg
pc
Día 7

FIG. 23

Mejoramiento de la morfología tubular renal por TDFRP o BMP-7 tras tratamiento con cisplatina

Tratamiento	Área tisular total TAr (mm^2)	Área tubular dilatada (%) DAr/TAr-(NAr+IAr)	Área tubular taponada (%) PAr/TAr-(NAR+IAr)
Vehículo	108 ± 8	77 ± 16	31 ± 9
TDFRP (Bajo)	94 ± 18	63 ± 9	26 ± 12
TDFRP (Medio)	104 ± 17	58 ± 7	29 ± 13
TDFRP(Alto)	88 ± 11	42 ± 7**	17 ± 6**
BMP-7 (Bajo)	91 ± 11	68 ± 12	26 ± 15
BMP-7 (Alto)	86 ± 11	55 ± 11*	18 ± 5**

**P < 0,01 vs vehículo
*P < 0,03 vs vehículo
Prueba de Mann Whitney-U

FIG. 24

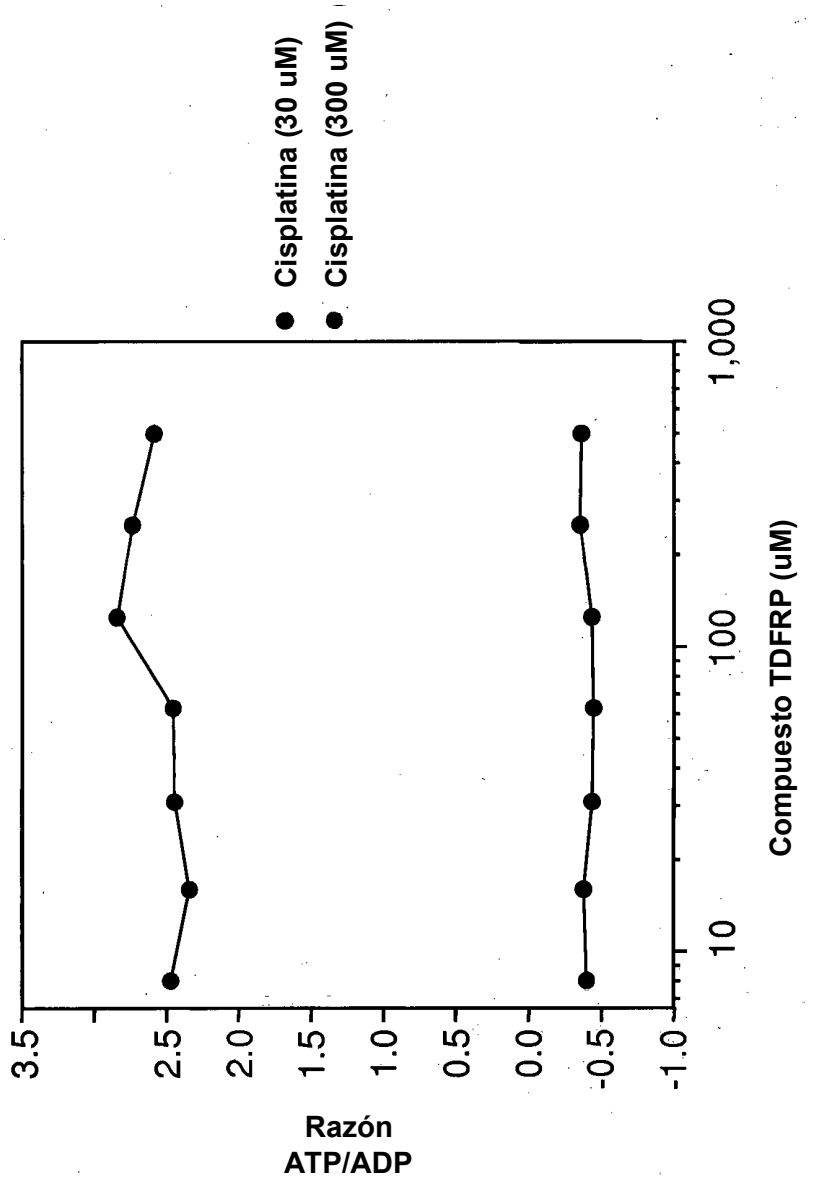
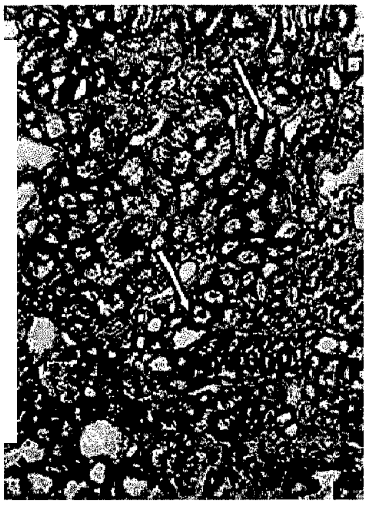

Cisplatina (30 uM)
Cisplatina (300 uM)
3.5
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
Razón
ATP/ADP
10
100
1,000
Compuesto TDFRP (uM)

FIG. 25A

VEHÍCULO (cisplatina sola)



I-CAM [CD54]

FIG. 25B

Compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) y cisplatina

I-CAM [CD54]

FIG. 25C

VEHÍCULO (cisplatina sola)

Mac CD-68

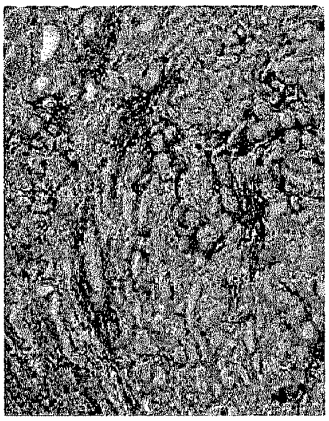
FIG. 25D

Compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) y cisplatina

Mac CD-68

FIG. 26B

Compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) y cisplatina



Actina de músculo liso

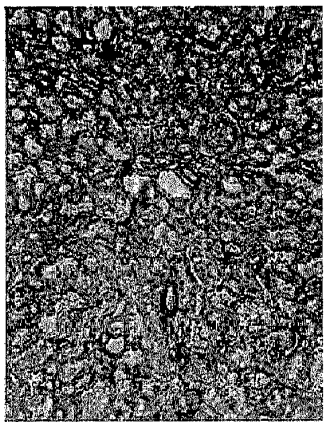
FIG. 26D

Compuesto TDFRP (SEC. Nº ID.: 45) y cisplatina

Antígeno nuclear de célula proliferante

FIG. 26A

VEHÍCULO (cisplatina sola)



Actina de músculo liso

FIG. 26C

VEHÍCULO (cisplatina sola)

Antígeno nuclear de célula proliferante

FIG. 27A

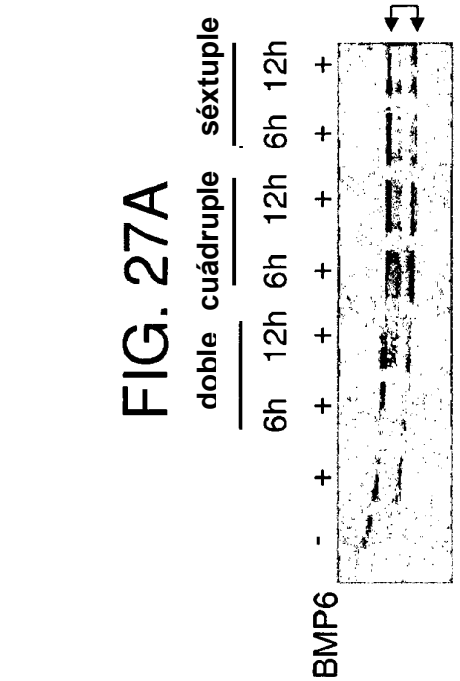


FIG. 27C

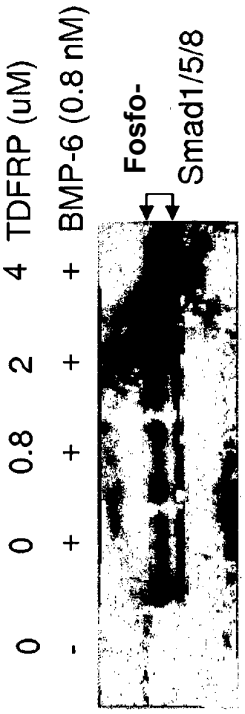


FIG. 27B

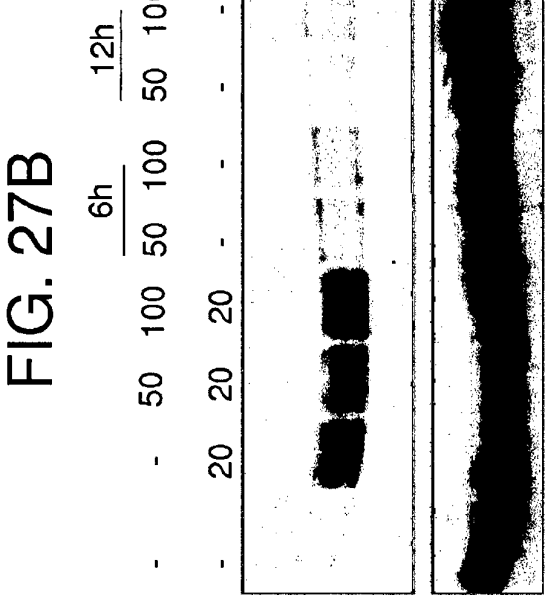
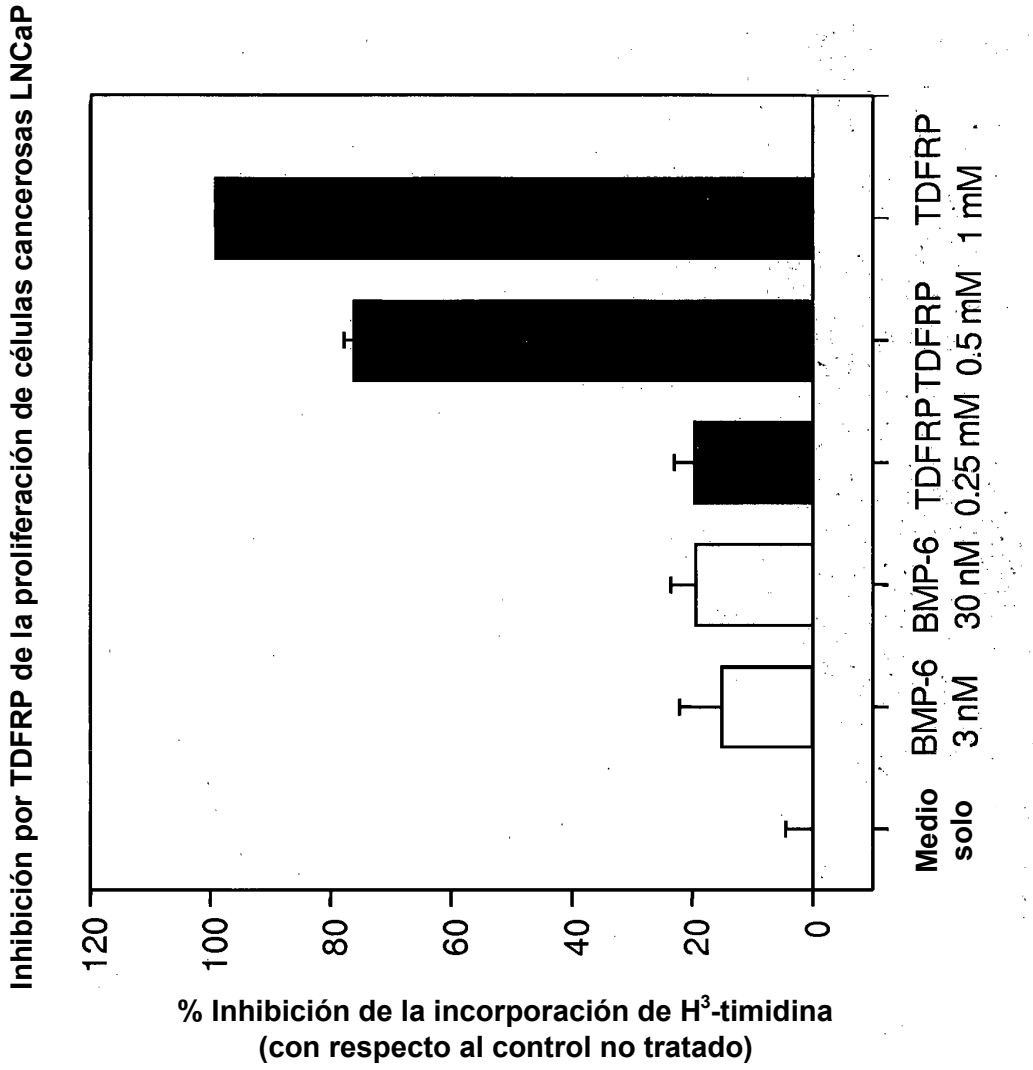


FIG. 28


Inhibición por TDFRP de la proliferación de células cancerosas LNCaP
120
100
80
60
40
20
0
% Inhibición de la incorporación de H3-timidina
(con respecto al control no tratado)
Medio solo
BMP-6 3 nM
BMP-6 30 nM
TDFRP 0.25 mM
TDFRP 0.5 mM
TDFRP 1 mM