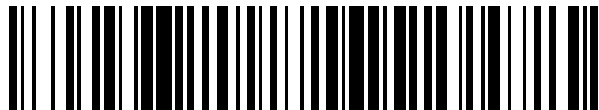


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 140**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2011 PCT/EP2011/067236**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2012 WO12042061**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2011 E 11764183 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2622095**

54 Título: **Métodos para predecir la progresión y tratar una enfermedad renal crónica en un paciente**

30 Prioridad:

01.10.2010 EP 10306077

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

22.03.2017

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (100.0%)

**101, rue de Tolbiac
75013 Paris Cédex 13, FR**

72 Inventor/es:

**TERZI, FABIOLA;
VIAU, AMANDINE;
NGUYEN, CLÉMENT y
BURTIN, MARTINE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 606 140 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para predecir la progresión y tratar una enfermedad renal crónica en un paciente

Campo de la invención:

5 La presente invención se refiere a un método para predecir la progresión de una enfermedad renal crónica (ERC) en un paciente y también a un inhibidor de la expresión del gen de NGAL o un antagonista de NGAL para uso en la prevención o el tratamiento de ERC.

Antecedentes de la invención:

10 Independientemente de la lesión inicial, la enfermedad renal crónica humana (ERC) se caracteriza por una destrucción progresiva del parénquima renal y la pérdida de nefronas funcionales lo que, en última instancia, conduce a una insuficiencia renal en estadio terminal (IRET). La ERC representa un problema mundial: en los EE.UU., 102.567 pacientes comenzaron una diálisis en 2003 (341 pacientes/año por/millón) (1), y tasas similares se han encontrado en países en desarrollo y en grupos étnicos particulares (2). Sin embargo, estas cifras son una pequeña fracción de los millones de pacientes que se cree que tienen algún grado de insuficiencia renal. En los Estados Unidos, la prevalencia de una función renal reducida crónica es del 11% de los adultos (3). Una comprensión de la fisiopatología de la progresión de la ERC es, por lo tanto, un desafío clave para la planificación médica.

15 Los mecanismos de progresión de la ERC son poco conocidos. Se ha mostrado que la reducción del número de nefronas funcionales desencadena eventos moleculares y celulares que promueven el crecimiento compensatorio de las restantes (4). En algunos casos, este proceso de compensación se convierte en patológico con el desarrollo de lesiones renales e IRET. Aunque la fisiopatología de la compensación y la progresión es compleja, una proliferación no regulada de las células glomerulares, tubulares e intersticiales puede favorecer el desarrollo de glomerulosclerosis, quistes tubulares y fibrosis intersticial (5-7). Los programas moleculares que controlan esta cascada de eventos se desconocen en gran parte.

20 Los intentos de analizar con detalle las bases moleculares de la ERC han sido facilitados por el desarrollo de diversos modelos experimentales de deterioro renal. Entre estos, el modelo de riñón remanente es el pilar principal, ya que la reducción de nefronas caracteriza el desarrollo de la mayoría de las ERC humanas. En consecuencia, este modelo recapitula muchas características de la ERC humana, incluyendo hipertensión, proteinuria y lesiones glomerulares y tubulointersticiales. Durante los últimos cincuenta años, este modelo ha conducido al descubrimiento de rutas decisivas y, con mayor importancia, al diseño de estrategias terapéuticas para frenar la progresión de la ERC, tales como inhibidores de renina-angiotensina ampliamente utilizados clínicamente (8).

25 Más recientemente, unos estudios en diferentes cepas de ratón han puesto de relieve la importancia de factores genéticos en la evolución de la reducción experimental de nefronas (9-11). Hemos observado anteriormente que el curso y el grado de las lesiones renales después de una reducción de las nefronas, varían significativamente entre dos cepas de ratón: mientras que los ratones FVB/N desarrollan lesiones graves, los ratones (C57BL/6xDBA2)F1 (denominados de aquí en adelante, B6D2F1) sufren solo una compensación (12). Por otra parte, observamos que el desarrollo de lesiones renales era paralelo a la extensión de la proliferación celular (12). De hecho, una vez que se logra el crecimiento compensatorio, se produce una segunda oleada de proliferación celular solo en la cepa FVB/N.

30 En la técnica existe una necesidad de un biomarcador fiable que permita la predicción de la progresión de la ERC, en particular en pacientes humanos que padecen dicha enfermedad, así como tratamientos relevantes para prevenir o tratar la ERC.

40 Compendio de la invención:

La presente invención se refiere por tanto a un método para predecir la progresión de la enfermedad renal crónica (ERC) o para el seguimiento de una terapia de ERC en un paciente,

que comprende las siguientes etapas:

- a. proporcionar una muestra de orina de dicho paciente que padece ERC,
- 45 b. determinar el nivel de expresión del gen de la lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos (NGAL), en donde dicho nivel de expresión del gen de NGAL se expresa como la relación de niveles de expresión de NGAL frente a creatinina en nanogramos por miligramo (ng/mg), y en donde dicho nivel de expresión del gen de NGAL se determina midiendo la concentración de proteína NGAL en una muestra de orina obtenida a partir de dicho paciente, y
- 50 c. correlacionar el nivel de expresión del gen de NGAL con la predicción de la progresión de ERC.

La presente invención también se refiere a un inhibidor de la expresión del gen de NGAL para uso en la prevención

o el tratamiento de la ERC.

La presente invención se refiere además a un antagonista de NGAL para uso en la prevención o el tratamiento de la ERC.

La presente invención es como se define en las reivindicaciones.

5 Descripción detallada de la invención:

Definiciones:

En toda la memoria descriptiva se emplean diversos términos y se definen en los párrafos siguientes.

Tal como se emplea en el presente documento, los términos "Lipocalina 2" (Lcn2) o "NGAL" tienen su significado general en la técnica y se refieren a la lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos tal y como se describe en Schmidt-Ott KM. et al. (2007). NGAL puede proceder de cualquier fuente, pero normalmente es una NGAL de mamífero (por ejemplo, ser humano y primate no humano), particularmente una NGAL humana. La expresión "gen de NGAL" se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos que codifica el ARNm y la proteína de NGAL, tal como una secuencia de ADN genómico y cualquier NGAL de origen natural y variantes y formas modificadas de las mismas. También puede incluir secuencias artificiales, tales como un ADNc que codifica el ARNm y la proteína de NGAL. Una secuencia de nucleótidos de NGAL humana natural a modo de ejemplo se proporciona en la base de datos GenBank con el número de orden NM_005564. La expresión "ARNm de NGAL" tiene su significado general en la técnica y se refiere al ARN mensajero que se sintetiza después de la expresión del gen de NGAL. La expresión "proteína NGAL" se refiere a la secuencia de aminoácidos resultante de la expresión del gen de NGAL, y a cualquier NGAL de origen natural y variantes y formas modificadas de las mismas. Una secuencia de aminoácidos de NGAL humana natural a modo de ejemplo, se proporciona en la base de datos GenPept con el número de orden NP_005555. NGAL es una glicoproteína y se identificó originalmente como un componente granular específico de neutrófilos y un miembro de la familia de proteínas de la lipocalina. Se mostró que la proteína existe tanto como un monómero de 25 kDa como un homodímero unido por disulfuro de 45 kDa, y también puede formar complejos covalentemente con gelatinasa de neutrófilos (también conocida como metaloproteínasa matricial 9, MMP-9) a través de un puente disulfuro intermolecular, como una forma heterodímera de 135 kDa.

Un "inhibidor de la expresión génica" se refiere a un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir o reducir la expresión de un gen de manera significativa. Por lo tanto, un "inhibidor de la expresión del gen de NGAL" se refiere a un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir o reducir significativamente la expresión del gen que codifica NGAL.

La expresión "antagonista de NGAL" se refiere a un compuesto, natural o no, que tiene la capacidad de inhibir (parcial o totalmente) la actividad biológica de la proteína NGAL. El alcance de la presente invención incluye todos aquellos antagonistas de NGAL conocidos actualmente y los antagonistas de NGAL que se descubran en el futuro. Esta expresión incluye anticuerpos anti-NGAL.

La expresión "anticuerpo anti-NGAL" se refiere a un anticuerpo o a un fragmento del mismo que reconoce NGAL.

La expresión "enfermedad renal crónica" (ERC) tiene su significado general en la técnica y se utiliza para clasificar numerosas afecciones que afectan al riñón, destrucción del parénquima renal y pérdida de nefronas funcionales. La ERC incluye la enfermedad renal poliquística (enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ERPAD) y enfermedad renal poliquística autosómica recesiva (ERPAR), glomerulonefritis, nefritis intersticial, nefropatía y uropatía obstructiva.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "valor predeterminado" se refiere a la cantidad de NGAL en muestras biológicas, obtenidas a partir de la población general o de una población de sujetos seleccionada. Por ejemplo, la población seleccionada puede estar compuesta por sujetos aparentemente sanos, tales como individuos que no han tenido previamente ningún signo o síntomas que indiquen la presencia de enfermedad renal crónica (ERC). En otro ejemplo, el valor predeterminado puede ser la cantidad de NGAL obtenida a partir de sujetos que tienen una ERC establecida. El valor predeterminado puede ser un valor umbral o un intervalo. El valor predeterminado se puede establecer basándose en mediciones comparativas entre sujetos aparentemente sanos y sujetos con ERC establecida.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "paciente" significa un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferiblemente, un paciente de acuerdo con la invención es un ser humano.

Métodos predictivos de la invención:

La presente invención se refiere a un método para predecir la progresión de una enfermedad renal crónica (ERC) o para el seguimiento de una terapia de ERC en un paciente,

que comprende las siguientes etapas:

- a. proporcionar una muestra de orina procedente de dicho paciente que padece ERC,
- b. determinar el nivel de expresión del gen de lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos (NGAL),

en donde dicho nivel de expresión del gen de NGAL se expresa como la relación de niveles de expresión de NGAL frente a creatinina en nanogramos por miligramo (ng/mg), y

- 5 en donde dicho nivel de expresión del gen de NGAL se determina midiendo la concentración de proteína NGAL en una muestra de orina obtenida a partir de dicho paciente, y

- c. correlacionar el nivel de expresión del gen de NGAL con la predicción de la progresión de ERC.

10 En una realización descrita en este documento, la presente solicitud describe un método para predecir la progresión de una enfermedad renal crónica (ERC) o para el seguimiento de una terapia de ERC en un paciente que comprende determinar la cantidad de ARNm que codifica NGAL en una muestra celular de tejido obtenido a partir de dicho paciente.

En una realización particular descrita en este documento, la muestra de tejido es una biopsia renal.

La determinación del nivel de expresión de un gen se puede realizar a través de una variedad de técnicas. En general, el nivel de expresión tal como se determina es un nivel de expresión relativo.

- 15 Más preferiblemente, la determinación comprende poner en contacto la muestra con reactivos selectivos tales como sondas, cebadores o ligandos, y detectar de este modo la presencia, o medir la cantidad de ácidos nucleicos de interés que están originalmente en la muestra.

En una realización preferida descrita en este documento, el nivel de expresión se puede determinar mediante la determinación de la cantidad de ARNm.

- 20 Los métodos para determinar la cantidad de ARNm son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en las muestras (por ejemplo, una célula o un tejido preparado procedente del paciente) se extrae primero de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, empleando enzimas líticas o soluciones químicas o se extrae a través de resinas que se unen a ácido nucleico, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm extraído se detecta a continuación por hibridación (por ejemplo, análisis de transferencia Northern) y/o por amplificación (por ejemplo, RT-PCR). En una realización preferida, el nivel de expresión del gen de NGAL se determina por RT-PCR, preferiblemente RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa, incluso más preferiblemente RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa en tiempo real.

- 30 Otros métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación mediada por transcripción (TMA), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) y la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA).

- 35 Los ácidos nucleicos que tienen al menos 10 nucleótidos y que presentan complementariedad u homología de secuencia con el ARNm de interés en el presente documento, tienen utilidad como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Se entiende que tales ácidos nucleicos no tienen que ser idénticos, pero que normalmente son al menos aproximadamente un 80% idénticos a la región homóloga de tamaño comparable, más preferiblemente un 85% idénticos y aún más preferiblemente un 90-95% idénticos. En ciertas realizaciones, será ventajoso emplear ácidos nucleicos en combinación con medios apropiados, tales como un marcador detectable, para detectar la hibridación. Una amplia variedad de indicadores apropiados son conocidos en la técnica, e incluyen ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros ligandos (por ejemplo, avidina/biotina).

- 40 Las sondas comprenden normalmente ácidos nucleicos monocatenarios de entre 10 a 1000 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de entre 10 y 800, más preferiblemente de entre 15 y 700, normalmente de entre 20 y 500. Los cebadores normalmente son ácidos nucleicos monocatenarios más cortos, de entre 10 a 25 nucleótidos de longitud, diseñados para emparejarse perfectamente a o casi a la perfección con un ácido nucleico de interés, que se va a amplificar. Las sondas y los cebadores son "específicos" de los ácidos nucleicos con los que se hibridan, es decir, se hibridan preferiblemente en condiciones de hibridación altamente rigurosas (correspondientes a la temperatura de fusión T_m más elevada, por ejemplo, 50% de formamida, 5x o 6x SCC. SCC es NaCl 0,15 M, citrato de Na 0,015 M).

- 45 Los cebadores o las sondas de ácido nucleico usadas en el método de amplificación y detección anterior pueden ensamblarse como un kit. Un kit de este tipo incluye cebadores de consenso y sondas moleculares. Un kit preferido también incluye los componentes necesarios para determinar si se ha producido una amplificación. El kit también puede incluir, por ejemplo, tampones y enzimas para la PCR; secuencias de control positivas, cebadores de control de la reacción; e instrucciones para amplificar y detectar las secuencias específicas.

En otra realización descrita en el presente documento, la presente solicitud describe un método para predecir la progresión de ERC o para el seguimiento de una terapia de ERC en un paciente, que comprende medir la concentración de proteína NGAL en una muestra biológica obtenida a partir de dicho paciente.

En una realización particular descrita en el presente documento, la concentración de la proteína NGAL se mide en una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de suero o una muestra de orina obtenida a partir de dicho paciente.

5 En una realización, los métodos de la invención comprenden poner en contacto la muestra de orina con un ligando capaz de interactuar selectivamente con la proteína NGAL presente en la muestra de orina. El ligando puede ser un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferiblemente monoclonal. En otra realización, el ligando puede ser un aptámero.

10 Los anticuerpos policlonales de la invención o un fragmento de los mismos se puede producir de acuerdo con métodos conocidos, mediante la administración del antígeno o epítipo apropiado a un animal hospedador seleccionado, por ejemplo, de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Se pueden utilizar diversos adyuvantes conocidos en la técnica para mejorar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales.

15 Los anticuerpos monoclonales de la invención o un fragmento de los mismos se pueden preparar y aislar utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo, mediante líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y el aislamiento incluyen, pero no se limitan a la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975); la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Cote et al., 1983); y la técnica de hibridoma de EBV (Cole et al. 1985).

20 Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (véase, por ejemplo el documento de patente de EE.UU. n° 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla anti-NGAL. Los anticuerpos útiles en la práctica de la presente invención también incluyen fragmentos anti-NGAL incluyendo, pero no limitados a fragmentos F(ab')₂, que se pueden generar mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que se pueden generar mediante la reducción de puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, se pueden construir genotecas de expresión de Fab y/o scFv para permitir una identificación rápida de fragmentos que tienen la especificidad deseada para NGAL. Por ejemplo, se puede emplear la presentación en fagos de anticuerpos. En tal método, fragmentos Fv (scFv) o Fab de una sola cadena se expresan en la superficie de un bacteriófago adecuado, por ejemplo, M13. Brevemente, se retiran células del bazo de un hospedador adecuado, por ejemplo, un ratón, que ha sido inmunizado con una proteína. Las regiones codificantes de las cadenas VL y VH se obtienen de aquellas células que están produciendo el anticuerpo deseado contra la proteína. Estas regiones codificantes se fusionan entonces con un extremo de una secuencia de fago. Una vez que el fago se inserta en un vehículo adecuado, por ejemplo, bacterias, el fago presenta el fragmento de anticuerpo. La presentación en fagos de anticuerpos también se puede proporcionar por métodos combinatorios conocidos por los expertos en la técnica. Los fragmentos de anticuerpo que son presentados por un fago, se pueden utilizar entonces como parte de un inmunoensayo.

35 Se describen anticuerpos monoclonales para NGAL, por ejemplo, en Kjeldsen et al., (1996). Ejemplos de anticuerpos monoclonales disponibles comercialmente para NGAL, incluyen los obtenidos a partir de Antibody Shop, Copenhague, Dinamarca, tales como HYB-211-01, HYB-211-02 y NYB-211-05. Normalmente, HYB-211-01 y HYB-211-02 se pueden utilizar con NGAL tanto en sus formas reducidas como no reducidas. Los anticuerpos de NGAL también se pueden comprar en R&D Systems bajo la referencia AF1857.

40 En otra realización, el ligando puede ser un aptámero. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos o de oligopéptidos con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de molécula diana con afinidad y especificidad elevadas. Tales ligandos se pueden aislar a través de enriquecimiento exponencial en presencia del ligando (SELEX, del inglés "Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment") a partir de una genoteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. 1997. La genoteca de secuencias aleatorias se puede obtener mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta genoteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado de forma química, de una secuencia única. Posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas han sido revisados en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en regiones variables de anticuerpos restringidas conformacionalmente que son presentadas por una proteína soporte, tal como tiorredoxina A de *E. coli*, que se seleccionan a partir de genotecas combinatorias a través de dos métodos híbridos (Colas et al., 1996).

50 Los ligandos de la invención tales como anticuerpos o aptámeros, se pueden marcar con una molécula o una sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualquier otro marcador conocido en la técnica. Los marcadores que se conocen en la técnica generalmente proporcionan una señal (directa o indirectamente). Tal como se utiliza en esta memoria, el término "marcado", con respecto al anticuerpo o aptámero, se entiende que incluye un marcado directo del anticuerpo o del aptámero mediante acoplamiento (es decir, ligación física) de una sustancia detectable, tal como un agente radiactivo o un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)) con el anticuerpo o el aptámero, así como un marcado indirecto de la sonda o el anticuerpo con una sustancia detectable mediante reactividad. Un anticuerpo o un aptámero de la invención puede estar marcado con una molécula radiactiva a través de cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las moléculas radiactivas incluyen pero no se limitan a un átomo radiactivo para estudios gamma-

gráficos tales como I123, I124, In111, Re186, Re188.

5 Los ensayos mencionados anteriormente implican generalmente la unión del ligando (es decir, un anticuerpo o un aptámero) a un soporte sólido. Los soportes sólidos que se pueden utilizar en la práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de una membrana o un pocillo de microtitulación); poli(cloruro de vinilo) (por ejemplo, láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (por ejemplo, perlas o placas de microtitulación); poli(fluoruro de vinilideno); papel diazotado; membranas de nailon; perlas activadas, perlas sensibles al magnetismo y similares.

10 La concentración de la proteína NGAL se puede medir mediante el uso de técnicas de inmunodiagnóstico convencionales, que incluyen inmunoensayos tales como ensayos de competición, de reacción directa o de tipo sándwich. Tales ensayos incluyen, pero no están limitados a, pruebas de aglutinación; inmunoensayos mediados y marcados con enzimas, tales como ELISAs; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación.

En una realización particular, la concentración de la proteína NGAL se mide por inmunoensayo.

15 Más particularmente, se puede utilizar un método de ELISA, en el que los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con un conjunto de anticuerpos anti-NGAL. A continuación, se añade a los pocillos recubiertos una muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene NGAL. Después de un período de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, la o las placas se pueden lavar para eliminar restos no unidos y se añade un ligando secundario marcado de forma detectable. Se deja que el ligando secundario reaccione con cualquier proteína marcadora de la muestra capturada, la placa se lava y se detecta la presencia del ligando secundario utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

20 Los métodos de ELISA adecuados para la detección de NGAL han sido descritos por Kjeldsen et al. (1996), Mishra J. et al. (2005) y Wang et al. (2007). Un inmunoensayo enzimático de tipo sándwich para la detección de NGAL ha sido descrito por Blaser J. et al. (1995). Un radioinmunoensayo para la detección de NGAL ha sido descrito por Xu SY. et al. (1994).

25 Los kits de ELISA para la detección de NGAL están disponibles comercialmente en AntibodyShop (Grusbakken 8 DK-2820 Gentofte - Dinamarca) con la referencia KIT 036 o KIT 037, en R&D Systems Europe (Lille - Francia) bajo la referencia DLCN20 y en MBL International, Woburn, MA 01801, EE.UU.) bajo la referencia CY-8070.

30 La medición de la concentración de la proteína NGAL (con o sin métodos basados en inmunoensayos) también puede incluir la separación de los compuestos: una centrifugación basada en el peso molecular del compuesto; electroforesis basada en la masa y la carga; HPLC basada en la hidrofobicidad; cromatografía de exclusión por tamaño en función del tamaño; y afinidad en fase sólida basada en la afinidad del compuesto hacia la fase sólida particular que se utilice. Una vez separados, la NGAL puede ser identificada basándose en el "perfil de separación" conocido, por ejemplo, el tiempo de retención, para ese compuesto y se mide usando técnicas convencionales.

35 Alternativamente, los compuestos separados se pueden detectar y medir, por ejemplo, a través de un espectrómetro de masas.

La descripción puede comprender adicionalmente una etapa de comparación de la concentración de la proteína NGAL con un valor umbral predeterminado. Dicha comparación es indicativa de la progresión de la ERC en el paciente o de la capacidad de respuesta del paciente al tratamiento contra la ERC.

Métodos y usos terapéuticos:

40 La invención proporciona métodos y composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) para uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad renal crónica (ERC) en un paciente.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención se refiere a un inhibidor de la expresión del gen de NGAL para uso en la prevención o el tratamiento de la ERC.

45 Los inhibidores de la expresión del gen de NGAL para uso en la presente invención pueden estar basados en estructuras artificiales de oligonucleótidos antisentido. Los oligonucleótidos antisentido, incluyendo moléculas de ARN antisentido y moléculas de ADN antisentido, actuarían para bloquear directamente la traducción del ARNm de NGAL uniéndose al mismo y evitando de este modo la traducción de la proteína o incrementando la degradación del ARNm, disminuyendo de este modo el nivel de NGAL, y por lo tanto la actividad, en una célula. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios a regiones únicas de la secuencia del transcrito de ARNm que codifica NGAL, se pueden sintetizar, por ejemplo, mediante técnicas de fosfodiéster convencionales y administrar, por ejemplo, mediante inyección o infusión intravenosa. Los métodos para utilizar técnicas antisentido para inhibir específicamente la expresión génica de genes cuya secuencia se conoce, son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véanse los documentos de patente de EE.UU. nº 6.566.135; 6.566.131; 6.365.354; 6.410.323; 6.107.091; 6.046.321; y 5.981.732).

Los ARN pequeños inhibidores (ARNsi) también pueden actuar como inhibidores de la expresión del gen de NGAL para uso en la presente invención. La expresión del gen de NGAL se puede reducir poniendo en contacto un sujeto o una célula con un ARN pequeño bicatenario (ARNds) o un vector o una estructura artificial, provocando la producción de un ARN pequeño bicatenario, de manera que la expresión del gen de NGAL se inhibe específicamente (es decir, ARN interferente o ARNi). Los métodos para la selección de un ARNds correspondiente o un vector que codifica un ARNds son bien conocidos en la técnica para genes cuya secuencia es conocida (por ejemplo, véase Tuschl, T. et al. (1999); Elbashir, S.M. et al. (2001); Hannon, G.J. (2002); McManus, M.T. et al. (2002); Brummelkamp, T.R. et al. (2002); los documentos de patentes de EE.UU. n° 6.573.099 y 6.506.559; y los documentos de publicación de patente Internacional n° WO 01/36646, WO 99/32619 y WO 01/68836). El ARN de horquilla corta (ARNhc) puede actuar también como inhibidor de la expresión del gen de NGAL para uso en la presente invención.

En una realización, la secuencia del ARNhc que se dirige a NGAL (Lcn2) está representada por SEQ ID NO: 1.

En otra realización, la secuencia del ARNhc que se dirige a NGAL (Lcn2) está representada por SEQ ID NO: 2.

Las ribozimas también pueden actuar como inhibidores de la expresión del gen de NGAL para uso en la presente invención. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas, capaces de catalizar la escisión específica de ARN. El mecanismo de acción de la ribozima implica una hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima con el ARN diana complementario, seguida de escisión endonucleolítica. Las moléculas de ribozima con motivo de horquilla o de cabeza de martillo diseñadas genéticamente que catalizan específica y eficazmente una escisión endonucleolítica de secuencias de ARNm de NGAL, son por tanto útiles en el alcance de la presente invención. Los sitios de escisión específicos de la ribozima dentro de cualquier diana potencial de ARN, se identifican inicialmente explorando la molécula diana en busca de sitios de escisión de la ribozima, los cuales normalmente incluyen las siguientes secuencias, GUA, GUU y GUC. Una vez identificados, secuencias de ARN cortas de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos, correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión, se pueden evaluar para predecir características estructurales, tales como una estructura secundaria, que pueden hacer que la secuencia del oligonucleótido sea inadecuada. La idoneidad de las dianas candidatas también se puede evaluar sometiendo a ensayo su accesibilidad para una hibridación con oligonucleótidos complementarios, usando, por ejemplo, ensayos de protección de ribonucleasa.

Los oligonucleótidos antisentido y las ribozimas útiles como inhibidores de la expresión del gen de NGAL se pueden preparar por métodos conocidos. Estos incluyen técnicas para la síntesis química, tales como, por ejemplo, mediante síntesis química con fosforamidita en fase sólida. Alternativamente, las moléculas de ARN antisentido se pueden generar mediante transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN. Tales secuencias de ADN se pueden incorporar en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados, tales como los promotores T7 o SP6 de la polimerasa. Diversas modificaciones de los oligonucleótidos de la invención se pueden introducir como medio para aumentar la estabilidad intracelular y la semivida. Las modificaciones posibles incluyen, pero no se limitan a la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de enlaces fosfodiéstera dentro de la estructura principal del oligonucleótido.

Los oligonucleótidos antisentido ARNsi y las ribozimas de la invención se pueden administrar *in vivo* solos o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del oligonucleótido antisentido ARNsi o el ácido nucleico de la ribozima a las células y, preferiblemente, células que expresan NGAL. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a células con una degradación reducida con respecto al grado de degradación que resultaría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos obtenidos a partir de fuentes víricas o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación del oligonucleótido antisentido ARNsi o secuencias de ácido nucleico de la ribozima. Los vectores víricos son un tipo preferido de vector e incluyen, pero no se limitan a secuencias de ácido nucleico procedentes de los siguientes virus: retrovirus, tales como el virus de la leucemia murina de Moloney, el virus del sarcoma murino de Harvey, el virus de tumor mamario murino y el virus del sarcoma de Rouse; adenovirus, virus adenoasociado; virus de tipo SV40; poliomavirus; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus vaccinia; virus de la poliomielitis; y virus de ARN tal como un retrovirus. Se pueden emplear sin problemas otros vectores no mencionados pero que son conocidos en la técnica.

Los vectores víricos preferidos se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que los genes no esenciales han sido reemplazados por el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (por ejemplo, lentivirus), cuyo ciclo vital implica una transcripción inversa del ARN vírico genómico en ADN, con una integración provírica posterior en el ADN celular hospedador. Los retrovirus han sido aprobados para ensayos de terapia génica humana. Los más útiles son aquellos retrovirus que tienen una replicación deficiente (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de producir una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retrovíricos alterados genéticamente tienen utilidad general para la transducción de eficacia elevada de genes *in vivo*. Los protocolos convencionales para producir retrovirus deficientes para la replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una línea celular de empaquetamiento con un plásmido, producción de retrovirus recombinantes a través de la línea celular de empaquetamiento, recogida de partículas víricas desde los medios de cultivo de tejidos e infección de las células diana con partículas víricas) se proporcionan en Kriegler, 1990 y en Murry, 1991).

Los virus preferidos para ciertas aplicaciones son los adenovirus y los virus adenoasociados, que son virus de ADN bicatenario que ya han sido aprobados para uso humano en terapia génica. El virus adenoasociado se puede diseñar genéticamente para que tenga una replicación deficiente y sea capaz de infectar una amplia gama de tipos y especies celulares. Además tiene ventajas, tales como, estabilidad térmica y frente a disolventes lípidos; frecuencias de transducción elevadas en células de diversas estirpes, incluyendo las células hematopoyéticas; y falta de inhibición de la superinfección, lo que permite múltiples series de transducciones. Según se informa, el virus adenoasociado se puede integrar en un ADN celular humano de una manera específica del sitio, minimizando de este modo la posibilidad de una mutagénesis por inserción y variabilidad de la expresión del gen insertado, característica de una infección retroviral. Además, las infecciones con virus adenoasociados de tipo silvestre se han observado en cultivo de tejidos durante más de 100 pases, en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un acontecimiento relativamente estable. El virus adenoasociado también puede actuar de manera extracromosómica.

Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito extensamente en la técnica y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989. En los últimos años, los vectores plasmídicos se han utilizado como vacunas de ADN para la entrega de genes que codifican antígenos a células *in vivo*. Son particularmente ventajosos para ello porque no tienen los mismos problemas de seguridad que muchos de los vectores víricos. Sin embargo, estos plásmidos que tienen un promotor compatible con la célula hospedadora, pueden expresar un péptido a partir de un gen codificado funcionalmente dentro del plásmido. Algunos plásmidos usados comúnmente incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos normales en la técnica. Además, los plásmidos se pueden diseñar utilizando enzimas de restricción y reacciones de ligación para retirar y añadir fragmentos específicos de ADN. Los plásmidos se pueden entregar a través de una variedad de vías parenterales, mucosas y tópicas. Por ejemplo, el plásmido de ADN se puede inyectar por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea, o por otras vías. También se puede administrar mediante pulverizadores intranasales o gotas, supositorio rectal y oralmente. También se puede administrar en la epidermis o una superficie mucosa usando una pistola génica. Los plásmidos se pueden administrar en una solución acuosa, secos sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de administración de ADN que incluye pero no se limita a liposomas, dendrímeros, coqueato y microencapsulación.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un antagonista de NGAL para uso en la prevención o el tratamiento de ERC.

En una realización, el antagonista de NGAL puede consistir en un anticuerpo (incluyendo el término un fragmento de anticuerpo) que puede bloquear la actividad de NGAL.

Los anticuerpos dirigidos contra NGAL se pueden producir de acuerdo con métodos conocidos, a través de la administración del antígeno o el epítipo apropiado a un animal hospedador seleccionado, por ejemplo, de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Diversos adyuvantes conocidos en la técnica se pueden utilizar para mejorar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales contra NGAL se pueden preparar y aislar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo a través de líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y el aislamiento incluyen, pero no se limitan a la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975); la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Cote et al., 1983); y la técnica de hibridoma de EBV (Cole et al. 1985). Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (véase, por ejemplo, el documento de patente de EE.UU. nº 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla anti-NGAL. Antagonistas de NGAL útiles en la práctica de la presente invención también incluyen fragmentos de anticuerpos anti-NGAL, incluyendo, pero no limitados a fragmentos F(ab')₂, que se pueden generar mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, se pueden construir genotecas de expresión de Fab y/o scFv para permitir una rápida identificación de fragmentos que tienen la especificidad deseada para NGAL.

Los anticuerpos anti-NGAL humanizados y fragmentos de anticuerpos de los mismos también se pueden preparar de acuerdo con técnicas conocidas. "Anticuerpos humanizados" son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (por ejemplo, de roedor) que contienen una secuencia mínima obtenida a partir de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable (CDR) del receptor, se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FRs son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Se describen métodos para preparar anticuerpos humanizados, por

ejemplo, por Winter (documento de patente de EE.UU. n° 5.225.539) y Boss (Celltech, documento de patente de EE.UU. n° 4.816.397).

A continuación, después de producir los anticuerpos dirigidos contra la NGAL, como se ha descrito anteriormente, el experto en la técnica puede seleccionar fácilmente los que bloquean la actividad de NGAL.

5 En otra realización, el antagonista de NGAL es un aptámero dirigido contra NGAL. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos o de oligopéptidos con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de molécula diana con alta afinidad y especificidad. Tales ligandos se pueden aislar a través de enriquecimiento exponencial en presencia del ligando (SELEX) de una genoteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. La genoteca de secuencias aleatorias se puede obtener mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta genoteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única. Posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas han sido revisados por Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo limitada por la conformación que se presenta en una proteína soporte, tal como la tiorredoxina A de *E. coli*, que se seleccionan a partir de 10 genotecas combinatorias a través de dos métodos híbridos (Colas et al., 1996). A continuación, después de producir aptámeros dirigidos contra la NGAL como se ha descrito anteriormente, el experto en la técnica puede seleccionar fácilmente los que bloquean la actividad de NGAL.

En todavía otra realización, el antagonista de NGAL puede ser un antagonista de bajo peso molecular, por ejemplo, una molécula orgánica pequeña. La expresión "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas que se utilizan generalmente en productos farmacéuticos. La expresión excluye macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas varían en tamaño hasta aproximadamente 5000 Da, más preferiblemente hasta 2000 Da y lo más preferiblemente hasta aproximadamente 1000 Da.

El inhibidor de la expresión del gen de NGAL o el antagonista de NGAL se pueden administrar en forma de una composición farmacéutica. Preferiblemente, dicho inhibidor o antagonista se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del antagonista o el inhibidor de NGAL para tratar y/o prevenir la enfermedad renal crónica (ERC) en una proporción razonable de beneficio/riesgo, aplicable a cualquier tratamiento médico.

30 Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico asistente dentro del alcance del juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz, específico para cualquier paciente particular, dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares que son bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, los expertos en la técnica comienzan con dosis del compuesto a niveles inferiores a las requeridas para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variar en un amplio intervalo de 35 0,01 a 1.000 mg por adulto por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se va a tratar. Un medicamento normalmente contiene desde aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente desde 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra ordinariamente a un nivel de dosificación desde 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente desde aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

Composiciones farmacéuticas:

El inhibidor de la expresión del gen de NGAL o el antagonista de NGAL para uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad renal crónica (ERC) como se ha definido anteriormente, se puede combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, con matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, se pueden administrar en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitarias adecuadas comprenden formas para vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser, en particular, soluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que tras la adición de agua esterilizada o solución salina fisiológica, dependiendo del caso, permiten la constitución de soluciones inyectables.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una inyectabilidad sencilla. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe proteger contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Las soluciones que comprenden compuestos de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables, se pueden preparar en agua mezclada de forma adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

El inhibidor de la expresión del gen de NGAL o el antagonista de NGAL de la invención se pueden formular en una composición en una forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden obtener a partir de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El vehículo también puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, con el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede estar provocada por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Una absorción prolongada de las composiciones inyectables puede estar provocada en las composiciones por el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado, con varios de los otros ingredientes mencionados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los mencionados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo, más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente esterilizada por filtración de la misma.

Después de la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe estar adecuadamente tamponada si es necesario y el diluyente líquido primero se vuelve isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para una administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos por los expertos en la técnica de cara a la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación se puede disolver en 1 ml de solución isotónica de NaCl y se añade a 1000 ml de fluido de hipodermoclisis o se inyecta en el sitio de infusión propuesto. Alguna variación en la dosificación tendrá lugar necesariamente, dependiendo del estado del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determina la dosis apropiada para el sujeto individual.

El inhibidor de la expresión del gen de NGAL o el antagonista de NGAL de la invención se puede formular dentro de una mezcla terapéutica para que comprenda aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis, más o menos. También se pueden administrar dosis múltiples.

Además de los compuestos de la invención formulados para una administración parenteral, tal como inyección intra-

venosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposómicas; cápsulas de liberación prolongada; y cualquier otra forma utilizada actualmente.

5 La invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no se deben interpretar de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

EJEMPLO:

Materiales y Métodos

10 *Animales:* Los ratones utilizados para estos estudios eran ratones FVB/N, C57BL/6 y C57BL/6xDBA2/F1 (B6D2F1) (Charles River), el mutante jck que tenía una mutación Nek8 (Jackson Laboratories), el transgénico EGFR-M que expresaba una isoforma dominante negativa de EGFR bajo el control del promotor de g-glutamyl transpeptidasa de tipo 1 específico de riñón (26) y ratones Lcn2^{-/-} (19). Los ratones Lcn2^{-/-} sobre un fondo genético FVB/N se obtuvieron utilizando una estrategia congénica de velocidad asistida por marcadores. Noventa y tres marcadores de microsatélites que incluían cada cromosoma autosómico (distancia promedio de 14,2 cM) se utilizaron para discriminar los alelos C57BL/6 y FVB/N (<http://www.cidr.jhmi.edu/mouse>). Ratones heterocigóticos C57BL/6 Lcn2^{+/-} se criaron con ratones jck heterocigóticos para obtener ratones transgénicos doblemente homocigotos Lcn2^{-/-}/jck. Todos los experimentos se realizaron con hembras de 9 semanas de edad, excepto para los ratones jck que se estudiaron 3 semanas después del nacimiento. Los animales fueron alimentados a voluntad y se alojaron a temperatura ambiente constante con un ciclo de luz de 12 horas. Los procedimientos con los animales fueron aprobados por el Director del Departamento de "Servicios veterinarios de la prefectura de policía de París" y por el comité de ética de la Universidad Descartes de París.

15 Los ratones se sometieron a una nefrectomía del 75% (Nx) o a una operación simulada (controles), como se ha descrito previamente (26). Después de la cirugía, los ratones fueron alimentados con una dieta definida que contenía 30% de caseína y 0,5% de sodio. Varios grupos de ratones fueron investigados en estudios complementarios. Para los estudios de micromatrices, 6 y 9 ratones de cada cepa fueron sometidos a una operación simulada o a Nx, respectivamente. Para el análisis a lo largo del tiempo de Lcn2, 5-6 ratones con operación simulada y 4-8 ratones Nx fueron estudiados en cada momento. Los estudios transgénicos emplearon ratones EGFR-M o Lcn2^{-/-} y compañeros de camada de tipo silvestre (WT); para cada grupo, 4-6 ratones fueron sometidos a una operación simulada y 10-16 ratones a una reducción de nefronas. Para los experimentos de quelación con hierro, 5 ratones con operación simulada y 6 ratones Nx fueron inyectados con 100 mg/kg/d de desferroxamina (DFO, Sigma) mediante mini-bombas osmóticas subcutáneas (2004, Alzet) durante 2 meses. Para los experimentos con Hypoxyprobe, 6 ratones con operación simulada y 6 ratones Nx fueron inyectados por vía intraperitoneal con 60 mg/kg de pimnidazol (Chemicon) 2 horas antes de sacrificarlos. Riñones post-isquémicos (2 horas de pinzamiento del pedículo renal) se utilizaron como controles hipóxicos positivos.

20 Los ratones se sacrificaron 2 meses después de la operación quirúrgica. Además, para el estudio a lo largo del tiempo de Lcn2, los ratones fueron sacrificados también 4 y 6 semanas después de la operación quirúrgica. Una semana antes de sacrificarlos, la presión sanguínea se registró en los ratones operados de forma simulada (n = 3) y los ratones nefrectomizados de forma subtotal (n = 6) Lcn2^{+/+} y Lcn2^{-/-}, despiertos durante 2 días consecutivos, usando pletismografía con manguito en la cola y el programa informático PowerLab/4SP (AD Instruments). También se recogieron muestras de orina, usando jaulas metabólicas, a partir de 6 ratones de cada grupo experimental a lo largo de 24 horas. En el momento del sacrificio, se extirpó el riñón para estudios morfológicos, de proteínas y ARNm.

25 *Muestras clínicas:* El estudio se realizó en 87 sujetos con enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ERPAD) (40 M, 47 H, con una media de edad de 52,4 años, intervalo 24,7 - 79,2 años). El nivel medio de creatinina sérica de los pacientes era de 252 ± 169,9 mmol/l y el eGFR (determinado mediante la fórmula MDRD (53)) era de 33 ± 20 ml/min/1,73 m². De los pacientes, 76 de los 87 pacientes eran hipertensos con el tratamiento. La disminución de la función renal se evaluó de forma retrospectiva durante más de 6 años, después los pacientes se dividieron en dos grupos: progresores lentos (disminución de eGFR <4,5 ml/min/1,73 m² por año, media = 2,4 ± 0,1, n = 52) o progresores rápidos (disminución de eGFR >4,5 ml/min/1,73 m² por año, media = 6,0 ± 0,2, n = 35).

30 Los riñones de pacientes con ERPAD (n = 9), oligomeganefronia (n = 11) y nefropatía por IgA (n = 12) se analizaron para la expresión de LCN2. Los riñones normales no utilizados para el trasplante o el polo exento de tumores de riñones extirpados para el carcinoma, se utilizaron como controles (n = 9).

Este protocolo fue aprobado por el Plan hospitalario para el Programa de Investigación Clínica (PHRC) del Ministerio de Sanidad francés. Se obtuvo un consentimiento por escrito antes de la inscripción.

35 *Células:* Para los experimentos de transfección de ARNsi, una inactivación transitoria de la expresión de Hif-1α en las células mIMCD-3 se obtuvo usando siRNA SMARTpool[®] de Dharmacon, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las células se transfectaron con ARNsi (100 nM) usando el reactivo de transfección de ARNsi DharmaFECT[®]4 (Thermo Fisher Scientific). Ocho horas después de la transfección, las células fueron privadas de suero durante 12 horas y después se trataron con 40 ng/ml de EGF (R&D Systems) en medio carente de suero durante 48 horas.

Para las transfecciones de ARNhc, las células mIMCD-3 se transfectaron de forma estable con el vector pSupresor Retro (Imgenex) que contenía un ARNhc para Lcn2 o un oligonucleótido desorganizado (Dharmacon). La secuencia de ARNhc de Lcn2 contiene o bien los nucleótidos de clonación 5'-ggaaatgacacaggtatc-3' (SEQ ID NO: 1) o 5'-gctactggatcagaacatt-3' (SEQ ID NO: 2), seguidos de un bucle de 9 bases y la secuencia de clonación invertida. En la secuencia desorganizada, la secuencia de clonación se sustituye por 5'-gagcgtaccagattaaagt-3' (SEQ ID NO: 3) o 5'-gattcgaccagacatgtat-3' (SEQ ID NO: 4). Las células transfectadas de forma estable se mantuvieron en medio DMEM/HamF12 que contenía 10% de FBS.

Para los experimentos de EGF, las células se privaron de suero durante 18 horas y después se trataron con 40 ng/ml de EGF en medio carente suero durante 24-96 horas. Las células se recogieron a las 24 horas para el ensayo de Lcn2 y los experimentos de apoptosis y a las 24-96 horas para los experimentos de proliferación.

Micromatriz de ADNc: Los ARNs se obtuvieron a partir de riñones completos de 9 ratones Nx de cada cepa, usando el kit RNeasy Midi (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los ARNs se transcribieron de forma inversa y se marcaron con cianina Cy-3 o Cy-5. Los ADNc de FVB/N Cy3 y de B6D2F1 Cy5 (y a la inversa, los ADNc de FVB/N Cy5 y B6D2F1 Cy3) se cohibridaron sobre micromatrices de ADNc de ratón que contenían 5579 ADNc que incluían marcadores de secuencias expresadas (Genopole®). Las preparaciones de ARN, ADNc y la hibridación se realizaron de acuerdo con el protocolo de Genopole® (<http://www.genopole.org/html/en/home/index.php>). Se hibridaron seis matrices. Para cada matriz, se agruparon los ARN de 3 ratones. Las micromatrices hibridadas fueron escaneadas y las imágenes se analizaron utilizando el programa informático Genepix Pro 4.0 a través de la instalación de micromatrices de Genopole®.

RT-PCR en tiempo real: El ARNm de Lcn2 se detectó en riñones de ratones y células mIMCD-3 mediante RT-PCR en tiempo real, utilizando un sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems). Gapdh y Sdha se utilizaron como controles de normalización en los riñones y las células, respectivamente.

Función renal y morfología: Para las muestras de ratones, se midió la proteinuria y nitrógeno ureico en la sangre (BUN) usando un analizador multiparamétrico de Olympus (Instrumentation Laboratory), mientras que la creatinina sérica se evaluó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Para las muestras de humanos, la creatinuria y la albuminuria se midieron usando un analizador Hitachi 917 (Roche Diagnostics).

Los riñones se fijaron en paraformaldehído al 4%, se incluyeron en parafina y secciones de 4 µm se tiñeron con PAS, Tricrómico de Masson, H&E, rojo picro-sirius. Los depósitos de hierro férrico se evidenciaron mediante una tinción con azul de Prusia de acuerdo con la reacción de Perls. El grado de lesiones glomerulares e intersticiales se evaluó utilizando una metodología de puntuación semicuantitativa como se ha descrito previamente (7). El grado de lesiones tubulares se cuantificó de forma automática, utilizando una cámara digital Nikon Dx/m/1200 y el programa informático Lucia (Laboratory Imaging Ltd). Se puntuaron diez campos microscópicos seleccionados al azar (X200). Para los ratones jck, toda la sección se cuantificó de forma automática con 100 aumentos. La puntuación tubular se expresó como la relación entre la superficie de dilatación tubular y el área total de la sección.

Hibridación in situ: La hibridación *in situ* se llevó a cabo en secciones de 8 µm de riñones de ratón incluidos en parafina, utilizando una ribosonda marcada con digoxigenina que correspondía a los nucleótidos 80 a 641 de la secuencia de Lcn2 de ratón (NM_008491). La ribosonda se sintetizó utilizando reactivos de Roche, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Transferencia Western: Las transferencias Western se realizaron como se ha descrito previamente (12), utilizando un anticuerpo de cabra para Lcn2 de ratón (R&D Systems) a 1:1.000 en 1% de leche/TBST o un anticuerpo de conejo para Hif-1α o Hif-2α de ratón (Novus Biologicals) a 1:500 y 1:200, respectivamente, en 5% de leche/TBST, seguido por un anticuerpo de conejo anti-cabra conjugado con rábano picante a 1:10.000 (Dako) o un anticuerpo de burro anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante a 1:2000 (Amersham). Un anticuerpo monoclonal de ratón α-tubulina (Sigma-Aldrich) se utilizó como control. Los extractos de proteína procedentes de riñones de ratones Lcn2^{-/-} se utilizaron para confirmar la especificidad del anticuerpo.

Inmunohistoquímica: Para las muestras de ratón, secciones de 4 µm de riñones incluidos en parafina, se incubaron con un anticuerpo de cabra anti-Lcn2 de ratón (R&D Systems) a 1:300, seguido por un anticuerpo biotinilado de conejo anti-cabra (Dako) a 1:200. Los anticuerpos biotinilados se detectaron utilizando estreptavidina marcada con HRP (Dako) a 1:500 y revelado con tetrahidrocloruro de 3-3'-diamino-bencidina (DAB).

Para los experimentos de colocalización, Lotus Tetragonolobus lectina (LTL) se detectó utilizando un LTL biotinilado (Vector) a 1:50, seguido por una estreptavidina marcada con HRP a 1:500. Para la tinción con Tamm-Horsfall, las secciones de riñón de ratón se incubaron con un anticuerpo de cabra anti-Tamm-Horsfall (Biogenesis) diluido 1:200, seguido por un anticuerpo de cabra biotinilado (DAKO) a 1:500 y una estreptavidina marcada con HRP a 1:500. Para la tinción con Acuaporina 2, las secciones se incubaron con un anticuerpo de conejo anti-acuaporina 2 (SIGMA) 1:400, seguido por un anticuerpo de burro anti-conejo conjugado con HRP (Amersham) a 1:300. La tinción fue revelada con DAB.

Para la tinción con hypoxyprome, secciones de 4 µm de riñones incluidos en parafina fueron tratadas con pronasa al 0,01%, después se incubaron con un anticuerpo de aducto anti-hypoxyprome (Chemicon) 1:200, seguido por un

anticuerpo de ratón biotinilado (DAKO) a 1:500, una estreptavidina marcada con HRP a 1:500 y revelado con DAB.

Para muestras humanas, secciones de 4 µm de riñón incluidos en parafina, se incubaron con un anticuerpo de cabra anti-LCN2 humano (R&D Systems) a 1:100, seguido por un anticuerpo de conejo anti-cabra marcado con HRP (Dako) a 1:100 y revelado con DAB.

5 *Ensayo de proliferación celular:* Las células proliferativas se detectaron en el riñón de ratón usando antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) o inmunotinción con Ki-67. Para la tinción con PCNA, secciones de 4 µm de riñones incluidos en parafina se incubaron con un anticuerpo de ratón anti-PCNA (DAKO) a 1:50, seguido por un anticuerpo de oveja anti-ratón conjugado con HRP (Amersham) a 1:100. Para la tinción con Ki-67, secciones de riñón de 4 µm se incubaron con un anticuerpo de ratón anti-Ki-67 humano (BD Pharmingen), seguido por un anticuerpo de ratón biotinilado (Vector) a 1:400 y una estreptavidina marcada con HRP a 1:1000. La tinción se reveló con DAB. El índice de proliferación tubular (IP) se calculó como el número de núcleos positivos para PCNA (o Ki-67) para el número total de núcleos tubulares en 10 campos seleccionados al azar. El índice de proliferación glomerular se calculó como el número de glomérulos con al menos un núcleo positivo para PCNA para el número total de glomérulos. La proliferación *in vitro* se evaluó mediante el recuento del número de células o mediante el uso del reactivo de proliferación celular CellTiter 96® AQueous (Promega) según las instrucciones del fabricante.

15 *Ensayo de apoptosis:* La apoptosis se detectó en secciones de 4 µm de riñones incluidos en parafina mediante un ensayo de tipo TUNEL utilizando el kit de detección *in situ* de muerte celular (Roche) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se determinó el número de células apoptóticas como el número de núcleos positivos para TUNEL por túbulo en 20 campos seleccionados al azar. El índice apoptótico glomerular se calculó como el número de glomérulos con al menos un núcleo positivo para TUNEL para el número total de glomérulos. *In vitro*, las células apoptóticas se detectaron mediante tinción con DAPI y el índice de apoptosis se calculó como el número de núcleos positivos para la apoptosis para el número total de núcleos en 10 campos seleccionados al azar.

20 *Medición de LCN2 urinaria:* La orina fresca se recogió con inhibidores de proteasa, se centrifugó a 2.000 rpm a 4°C durante 5 minutos y el material sobrenadante se retiró y se almacenó a -80°C. LCN2 se midió utilizando ELISA (AntibodyShop). Especímenes, patrones y reactivos se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los niveles de LCN2 se expresaron como nanogramos por miligramo de creatinina. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

25 *Análisis de datos y estadísticas:* Los datos se expresaron como medias ± SEM. Las diferencias entre los grupos experimentales se evaluaron mediante ANOVA, seguida cuando era significativa ($P < 0,05$) por la prueba de Tukey-Kramer. Cuando solo se compararon dos grupos, se utilizaron las pruebas de Mann-Whitney o Wilcoxon. El coeficiente de correlación de Pearson se utilizó para someter a ensayo la correlación entre las variables. Para los experimentos con micromatrices, los resultados se expresan como un Log2 de la relación Cy5/Cy3. Los genes con una tasa de falsos descubrimiento (FDR) $< 0,05$ (utilizando el procedimiento de Benjamini-Hochberg) y un factor de cambio (FC) $> 1,5$, se consideraron significativos. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa informático Graph Prism.

Resultados

30 *Perfil génico:* Para esclarecer las vías moleculares de la progresión de la ERC, realizamos un perfil imparcial de la expresión génica en riñones remanentes de dos cepas de ratón que reaccionan de manera diferente frente a la reducción de nefronas. Con el empleo de micromatrices que contenían 5579 ADNc, encontramos 70 genes cuyos niveles de expresión diferían significativamente dos meses después de la reducción de nefronas ($P < 0,05$). Entre estos transcritos, 44 estaban regulados al alza y 26 estaban regulados a la baja en los riñones FVB/N dañados, en comparación con los riñones bien conservados de B6D2F1. Con la agrupación de estos resultados mediante una categoría de ontología génica, observamos una serie de funciones para los 70 transcritos, aunque muchos de los ARNm regulados a la baja (38%) regulaban procesos metabólicos. El gen que se sometió a una inducción transcripcional máxima (cambio múltiplo de 9,95, $P = 0,008$) en la cepa FVB/N propensa a la lesión, era lipocalina 2 (Lcn2 o lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos, NGAL; también conocida como siderocalina, 24p3 o uterocalina).

40 *Lcn2 se correlaciona con la progresión de lesiones en ratón y ser humano con ERC:* Lcn2 es un miembro de la superfamilia de la lipocalina (13), una familia de proteínas que transportan moléculas hidrófobas tales como retinoides, ácidos grasos y formadores de quelatos orgánicos de hierro (14). La RT-PCR en tiempo real confirmó que el ARNm de Lcn2 se incrementaba 10 veces, dos meses después de la reducción de nefronas en ratones FVB/N, pero no en ratones B6D2F1, mientras que era casi indetectable en los animales control. La hibridación *in situ* e inmunohistoquímica corroboraron estas observaciones y mostraron un marcado aumento del ARNm y la proteína de Lcn2 en riñones dañados de ratones FVB/N. Lcn2 se encontraba predominantemente en los túbulos proximales y en unas pocas ramas ascendentes de las asas de Henle y los conductos colectores. Con gran aumento se reveló que Lcn2 se encontraba principalmente en los gránulos citoplasmáticos en la zona subapical. Mediante una combinación de la hibridación *in situ* e inmunohistoquímica en secciones en serie, se encontró que una proporción de Lcn2 se debía haber obtenido a partir del filtrado glomerular, ya que en algunos túbulos proximales el ARNm de Lcn2 era negativo, aunque una tinción anti-Lcn2 era marcadamente positiva (*in situ*- y anticuerpo+). Por otro lado, la mayoría de los epitelios proximales que se habían sometido a dilatación y transformación quística mostraban tanto mensajero de

Lcn2 como tinción de anticuerpos (in situ+ y anticuerpo+), lo que indicaba no solo una endocitosis de la proteína filtrada, sino una síntesis local en curso y secreción de Lcn2. Los niveles de ARNm renal y de proteína de Lcn2 se correlacionaban con la intensidad del daño tubular ($r = 0,87$, $P < 0,001$ y $r = 0,74$, $P < 0,01$, para el ARNm y la proteína, respectivamente). Además, observamos que el contenido en proteína renal de Lcn2 se correlacionaba significativamente con la excreción de Lcn2 ($r = 0,99$, $P < 0,01$), lo que implicaba al riñón como la principal fuente de Lcn2 urinaria.

Un análisis cuidadoso a lo largo del tiempo de la expresión de Lcn2 y la morfología renal reveló que el aumento de ambos niveles de ARNm y proteína de Lcn2 precedía al desarrollo de lesiones renales, 4 semanas después de la reducción de nefronas. Por otra parte, confirmamos que la regulación al alza de Lcn2 se asociaba con el desarrollo progresivo de dilataciones tubulares en otro modelo experimental de ERC, los ratones *jck* (riñón juvenil quístico). Es de destacar que estos ratones desarrollan una forma de enfermedad renal poliquística similar a la enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ERPAD) (15). Por último, en pacientes con ERPAD que son similares a nuestro modelo en la presentación de dilataciones tubulares graves y progresivas, la inmunoreactividad de LCN2 aumentaba notablemente, en particular en los quistes. La LCN2 urinaria era más prominente en progresores rápidos frente a ESRF que en los progresores lentos (496 ± 146 frente a 152 ± 52 ng/mg de creatinina, $P < 0,01$) y estaba inversamente correlacionada con eGFR residual ($r = -0,77$, $P < 0,0001$) y microalbuminuria ($r = 0,72$, $P < 0,0001$). Curiosamente, la expresión de LCN2 también se incrementaba en los túbulos renales de los riñones de pacientes, ya fuera con déficit congénito de nefronas, un estado patológico muy próximo a la reducción de nefronas, o nefropatía por IgA, la forma principal más común de ERC. Nuestros resultados en ratones y seres humanos, junto con trabajos recientes (16-18), sugieren que Lcn2 podría participar en la patogénesis de los quistes y ERC.

La inactivación génica de Lcn2 previene el desarrollo de lesiones y la formación de quistes: Para determinar el papel de Lcn2 en la ERC progresiva, realizamos una reducción del 75% de las nefronas (Nx) en ratones *Lcn2*^{-/-} (19). Con este fin, introducimos por primera vez el alelo mutado *Lcn2* en el fondo (FVB/N) propenso a lesiones. Los ratones *Lcn2*^{-/-} FVB/N se reproducían normalmente y no tenían ningún fenotipo aparente en condiciones fisiológicas (datos no mostrados). Como era de esperar, dos meses después de la reducción de nefronas, los ratones de tipo silvestre desarrollaron lesiones renales graves, que comprendían principalmente glomerulosclerosis, atrofia tubular y dilatación quística, fibrosis intersticial leve e infiltración multifocal de células mononucleares. Sin embargo, la frecuencia y la gravedad de las lesiones renales se redujeron drásticamente en los ratones *Lcn2*^{-/-}. Una cuantificación mostró que los ratones *Lcn2*^{-/-} tenían considerablemente menos lesiones glomerulares, tubulares e intersticiales, que en comparación con compañeros de camada de tipo silvestre. En particular, había menos dilataciones tubulares y no había quistes en los ratones *Lcn2*^{-/-}. Por ello, la función renal se conservaba mejor en los ratones *Lcn2*^{-/-}, que en comparación con sus compañeros de camada de tipo silvestre, dos meses después de la reducción de nefronas. La creatinina sérica y el nitrógeno ureico en sangre eran de $5 \pm 0,5$, $18 \pm 2,6$ y $11 \pm 0,6$ $\mu\text{mol/l}$ ($P < 0,01$) y 29 ± 1 , 109 ± 15 y 65 ± 4 mg/dl ($P < 0,01$) en el control, Nx *Lcn2*^{+/+} y Nx *Lcn2*^{-/-}, respectivamente. Como era de esperar, la presión arterial media aumentó significativamente en los ratones de tipo silvestre, en comparación con los animales control ($135 \pm 7,5$ y $116 \pm 3,4$ mm de Hg, $P < 0,05$) dos meses después de la reducción de nefronas. El aumento era de la misma magnitud en los ratones *Lcn2*^{-/-} ($143 \pm 2,2$ mm de Hg). Un desarrollo de las lesiones renales se acompañaba de proteinuria grave en los ratones de tipo silvestre ($6,16 \pm 1,21$ frente a $0,003 \pm 0,001$ mg/día, en Nx y ratones de control, respectivamente, $P < 0,001$), mientras que la proteinuria se redujo sustancialmente en los animales *Lcn2*^{-/-} ($3,30 \pm 1,03$ mg/día, $P < 0,05$). Es de destacar que la inactivación de *Lcn2* no cambiaba el curso de la reducción de nefronas en ratones C57BL/6 resistentes a la lesión.

Para confirmar el efecto beneficioso de la inactivación del gen *Lcn2* en el deterioro renal y la formación de quistes, criamos ratones *Lcn2*^{-/-} con los ratones *jck*. En particular, la gravedad de las lesiones renales se redujo sustancialmente en los ratones dobles mutantes *jck/Lcn2*^{-/-}. Una cuantificación mostraba que la puntuación de la dilatación tubular era significativamente menor en los ratones dobles mutantes, que en comparación con compañeros de camada *jck*, tres semanas después del nacimiento. En conjunto, estos resultados demostraron que Lcn2 es un efector del daño renal durante la progresión de la ERC.

La acumulación de hierro no justifica una disfunción renal progresiva: A continuación, intentamos esclarecer los mecanismos subyacentes a la lesión que favorece el efecto de Lcn2. Lcn2 podría actuar a través de la movilización de hierro (20). De hecho, niveles anormales de hierro se acumulan en los riñones durante la ERC, en donde pueden participar en el proceso de deterioro (21, 22). Una tinción con perlas confirmó que el contenido en hierro aumentaba en los túbulos dañados, dos meses después de la reducción de nefronas. Sin embargo, la acumulación de hierro era similar en los riñones remanentes de ratones *Lcn2*^{-/-}, en comparación con compañeros de camada de tipo silvestre. Más importante aún, la quelación del hierro mediante desferroxamina (DFO) agravaba inesperadamente la enfermedad renal en ratones FVB/N. En particular, las dilataciones tubulares eran más graves y difusas en los ratones tratados con DFO dos meses después de la reducción de nefronas. En particular, el ARNm de Lcn2 y la expresión de proteínas se incrementaron drásticamente en los riñones de animales tratados con DFO, en comparación con sus homólogos tratados con vehículo. La proliferación de las células tubulares también era significativamente mayor, dos meses después de la reducción de nefronas en los ratones tratados con DFO. Por lo tanto, aunque el hierro depositado en los túbulos proximales no justifica el deterioro renal en nuestro modelo, los experimentos con DFO muestran claramente que la manipulación de los niveles de Lcn2 está estrechamente correlacionada con una hiperproliferación y daño progresivo.

Lcn2 es una diana de la señalización de EGFR: Se sabe que la proliferación celular contribuye al desarrollo de lesiones renales, y en particular a la quistogénesis (23). Estudios anteriores han sugerido que *Lcn2* se puede inducir a través de una variedad de factores de crecimiento que estimulan la proliferación celular tubular (24). Entre estos, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es de particular interés, ya que es decisivo en la evolución de la ERC (25). Por lo tanto, planteamos la hipótesis de que *Lcn2* podría actuar aguas abajo del EGFR y mediar en sus efectos sobre el crecimiento. Para investigar esta hipótesis, primero tratamos células mIMCD-3 tubulares renales con EGF. El análisis de transferencia Western reveló que los niveles de proteína *Lcn2* se incrementaban notablemente después de la adición de EGF. Una RT-PCR cuantitativa mostró que los niveles de ARNm de *Lcn2* eran paralelos al aumento de la proteína en las células tratadas con EGF, indicando que el gen *Lcn2* está regulado transcripcionalmente por EGFR. Para validar estos resultados *in vivo*, nos beneficiamos de una línea de ratones transgénicos que hiperexpresan una isoforma dominante negativa de EGFR (EGFR-M) de forma selectiva en las células del túbulo proximal (26). La inhibición de EGFR impedía el aumento del ARNm de *Lcn2* en los riñones remanentes de ratones transgénicos, dos meses después de la reducción de nefronas. De forma coherente, la gravedad de las lesiones renales se redujo sustancialmente en los ratones EGFR-M, en comparación con los compañeros de camada de tipo silvestre.

Hif-1α es un intermediario decisivo entre EGFR y Lcn2: A continuación tratamos de identificar los factores que explican la transcripción de *Lcn2* después de una activación de EGFR. La observación de que el DFO estimulaba drásticamente la expresión de *Lcn2* después de una reducción de nefronas, sugería que los factores inducibles por hipoxia (HIF) podrían desempeñar un papel. De hecho, mediante la inhibición de las proliil hidroxilasas dependientes de Fe^{2+} , DFO estabiliza Hif-1α y Hif-2α (27). Curiosamente, nuestros resultados mostraron que los niveles de proteína Hif-1α se incrementaron en los riñones dañados de ratones FVB/N, dos meses después de la reducción de nefronas. Dado que estudios previos han mostrado que se puede desarrollar una hipoxia en riñones dañados en la ERC (28), analizamos la oxigenación renal dos meses después de la reducción de nefronas. Una sonda de hipoxia de pimonidazol no pudo detectar ningún túbulo positivo en los riñones remanentes de ratones FVB/N, con la excepción de los ubicados en las cicatrices quirúrgicas, lo que demuestra que la hipoxia no justificaba la hiperexpresión de Hif-1α en nuestro modelo experimental de ERC. Experimentos *in vitro* han confirmado que el EGF estimulaba la expresión de Hif-1α en células renales mIMCD-3. De hecho, los niveles de proteína Hif-1α aumentaban notablemente después de la estimulación con EGF. Los niveles de ARNm de Hif-1α, determinados por RT-PCR en tiempo real, no cambiaron ni *in vivo* después de una reducción de nefronas, ni *in vitro* después del tratamiento con EGF (datos no presentados), lo que sugiere que Hif-1α se induce a través de un mecanismo post-transcripcional. Además, observamos que el aumento de Hif-1α era específico, ya que la expresión de Hif-2α no cambiaba ni en los riñones remanentes, ni en las células estimuladas por EGF. Más importante aún, hemos mostrado que el silenciamiento de Hif-1α a través de ARNsi, inhibía parcialmente la expresión de *Lcn2*, ya sea en estado basal como, sobre todo, después de la estimulación de EGF en las líneas celulares mIMCD-3, lo que indicaba que Hif-1α es un intermediario decisivo en la hiperexpresión de *Lcn2* inducida por EGFR.

Lcn2 media en el efecto proliferativo de EGFR: Para investigar después si *Lcn2* media en el efecto mitógeno de EGFR, establecimos líneas celulares mIMCD-3 que expresaban ARNhc de *Lcn2*. Una RT-PCR cuantitativa y transferencias Western revelaron que el ARNm de *Lcn2* se agotaba en un 96%, mientras que la proteína era indetectable en células silenciadas para *Lcn2*. Curiosamente, el silenciamiento de *Lcn2* anulaba totalmente la proliferación celular después de la adición de EGF en diferentes puntos temporales experimentales. Se obtuvieron resultados similares mediante el uso de diferentes clones y un segundo ARNhc dirigido a *Lcn2* (datos no mostrados). Se encontraron resultados consistentes en nuestro modelo de ratón *in vivo*. De hecho, la delección del gen *Lcn2* impedía el aumento de la proliferación celular tubular, dos meses después de la reducción de nefronas, como se refleja en las células tubulares positivas para PCNA significativamente más bajas en los riñones remanentes de ratones *Lcn2*^{-/-}, en comparación con los compañeros de camada de tipo silvestre. Notablemente, la inactivación del gen *Lcn2* no inhibía el aumento de la proliferación celular en los glomérulos. Estos resultados se confirmaron usando un anticuerpo dirigido contra Ki-67, una proteína expresada selectivamente en células proliferantes. Por lo tanto, parece que *Lcn2* es un mediador esencial del efecto mitógeno de EGF en las células tubulares renales.

El doble efecto de la inactivación de Lcn2 sobre la apoptosis: El crecimiento tubular refleja el equilibrio entre la proliferación celular y la pérdida celular por apoptosis. Tanto EGFR como *Lcn2* han sido implicados en el control de la apoptosis (25, 29). Un análisis TUNEL reveló un aumento de la apoptosis en los túbulos y los glomérulos de ratones de tipo silvestre, en comparación con los animales de control, dos meses después de la reducción de nefronas. El número de células positivas para TUNEL se redujo significativamente en ratones *Lcn2*^{-/-} en ambas estructuras glomerulares y tubulares. Sin embargo, el silenciamiento de *Lcn2* no afectaba significativamente a la cantidad de células mIMCD-3 tubulares apoptóticas, independientemente de la presencia de EGF.

Discusión:

Análisis de perfiles génicos imparciales ofrecen un enfoque poderoso para descubrir mediadores decisivos e investigar nuevas redes moleculares de procesos biológicos complejos, como la progresión de la ERC. Mediante la combinación de modelos experimentales de la ERC, ratones procedentes de diferentes dotaciones genéticas con análisis de micromatrices, hemos establecido un papel fundamental para *Lcn2* en la regulación del avance de la ERC y la formación de quistes. Además, hemos definido un importante mecanismo fisiopatológico en el que *Lcn2* media en el efecto mitógeno de EGFR, lo que es compatible con su papel en la proliferación celular en la quistogénesis. La inhi-

bición de esta vía a través de la inactivación del gen *Lcn2* o mediante la expresión de una isoforma de EGFR dominante negativa, ha impedido el desarrollo de lesiones en los ratones transgénicos. Por el contrario, la hiperexpresión de *Lcn2* se correlacionaba significativamente con una hiperproliferación y una progresión de la ERC en ratones y seres humanos. Además hemos identificado Hif-1 α como un intermediario crucial entre EGFR y la regulación al alza de *Lcn2*. En conjunto, estos resultados explican una nueva vía molecular para la progresión de la ERC y muestran que *Lcn2* actúa como un factor que favorece el crecimiento, cuya hiperexpresión identifica pacientes con una progresión rápida de la ERC.

Lcn2, al igual que todos los miembros de la superfamilia de lipocalina, se une a ligandos hidrófobos; el ligando es para definir la función de la proteína. *Lcn2* se une a enteroquelina (20), parabactina (20) y carboximicobactina (30), que son sideróforos producidos por bacterias con el fin de unirse al hierro. La propiedad quelante de los sideróforos de *Lcn2* hace que sea un agente bacteriostático (20). Por tanto, los ratones *Lcn2* mutantes tienen un defecto profundo en la defensa contra *E. coli* (19, 31) y *M. tuberculosis* (32). No obstante, la expresión de *Lcn2* aumenta drásticamente con varios estados patológicos asépticos, tales como cánceres (33), enfermedades inflamatorias (34) o lesión renal aguda (24), lo que sugiere que *Lcn2* puede tener otras funciones. Hasta la fecha, sus actividades no infecciosas se han centrado en sus efectos sobre la proliferación celular y/o la apoptosis (24), pero una prueba de las mismas en un entorno fisiológico *in vivo* no ha sido posible. Incluso en el caso de lesión renal aguda, una enfermedad que está relacionada con la ERC, no queda claro si *Lcn2* es un mediador decisivo en los cambios tubulares (19). Por lo tanto, nuestro trabajo es la primera demostración clara de que *Lcn2 in vivo* tiene una función decisiva en un estado patológico que no sea una infección, es decir, que actúa como un regulador del crecimiento que media en la progresión de la ERC. Nuestros resultados en ratones y seres humanos se pueden aplicar generalmente a muchas formas de ERC, porque *Lcn2* también se expresa en la uropatía obstructiva (16), la nefropatía diabética (16) y en riñones dañados de pacientes con nefropatía por IgA (17) o nefropatía asociada al VIH (18).

Nuestro estudio muestra que *Lcn2*, que es inducida por EGFR, controla el crecimiento aberrante de los túbulos renales y los quistes. En particular, hemos demostrado que la inactivación del gen *Lcn2* inhibía la proliferación de las células tubulares lo que daba lugar a una marcada disminución de la formación de quistes en los ratones. En general, identificamos los epitelios tubulares quísticos como la principal fuente de producción de *Lcn2*. Estos datos sugerían que *Lcn2* podía actuar como un factor tubulogénico que controla el crecimiento celular. Esto se respalda en una evidencia adicional: primero, *Lcn2* inducía el desarrollo tubular en ensayos *in vitro* en la rata (35); segundo, una infusión de *Lcn2* favorecía la regeneración tubular después de una lesión isquémica en ratones (36); tercero, niveles elevados de *Lcn2* se asociaron con un mayor crecimiento quístico en los seres humanos (37). Esta propiedad no se limitaba a las células de mamíferos: Lpr-1, un miembro de la familia de la lipocalina recientemente identificado, controlaba el desarrollo de tubos unicelulares en el sistema excretor de *Caenorhabditis elegans* (38). Nuestros datos también sugieren que *Lcn2* puede modular la forma tubular mediante el control de la proliferación celular y la apoptosis. De hecho, el efecto beneficioso de la inactivación del gen *Lcn2* en ratones mutantes estaba acompañado por una disminución de la apoptosis tubular, de acuerdo con una observación previa en un túbulo proximal que carecía de Pkd1, un gen asociado a la enfermedad quística (39). Sin embargo, este efecto puede ser indirecto ya que el silenciamiento de *Lcn2 in vitro* no afectaba al número de células tubulares apoptóticas. Si el efecto promotor del crecimiento de *Lcn2* tiene lugar por la unión de *Lcn2* a un receptor único, lo que induce una cascada de señalización, o alternativamente por la movilización de hierro, como se sugiere por los experimentos de DFO, esto queda por esclarecer.

En el presente estudio observamos que la inactivación del gen *Lcn2* protegía frente a una glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial, después de una reducción de nefronas, a pesar del hecho de que *Lcn2* se expresaba solo en los túbulos. Se desconoce el mecanismo para esta observación. Puede ser consecuencia de la perfusión y la filtración de *Lcn2* sérica que encontramos por inmunotinción en los túbulos. Por otra parte, dado que las lesiones de las células tubulares, es decir, la proteinuria, dan como resultado la expresión de citocinas tubulares y factores de crecimiento que, en última instancia, conducen a una proliferación de las células mesangiales y síntesis de matriz (40), es tentador sugerir una interferencia entre las células renales tubulares y las células renales circundantes. Estudios en ratones transgénicos apoyan firmemente esta idea. Por ejemplo, se ha observado que los ratones que hiperexpresan VEGF de forma selectiva en los túbulos, desarrollaban fibrosis intersticial y enfermedad glomerular (41). Y, hemos observado anteriormente que la hiperexpresión de una isoforma dominante negativa de EGFR en los túbulos proximales impedía el desarrollo de lesiones glomerulares e intersticiales después de una reducción de nefronas (26). Por otro lado, se ha observado que la cicatrización intersticial daba lugar a una pérdida de microvasos que, a su vez, impactaba en los glomérulos adyacentes no afectados (42). Es digno de destacar que la síntesis de mediadores paracrinos puede aumentar la proliferación de células tubulares (43). Por lo tanto, especulamos que mediante la inhibición de la proliferación de las células tubulares, *Lcn2* podría proteger a los glomérulos y al intersticio frente al desarrollo de lesiones.

La activación de EGFR se ha implicado en el desarrollo de la ERC. La hiperexpresión de una forma de EGFR activo, el receptor c-erb-B2, induce hiperplasia tubular y el desarrollo de quistes renales en ratones transgénicos (44). Por el contrario, la expresión de una isoforma de EGFR dominante negativa inhibe la proliferación celular que conduce a una reducción de las dilataciones tubulares después de una reducción de nefronas (26). Otros enfoques genéticos y farmacológicos han confirmado el papel clave de EGFR y la proliferación celular en las enfermedades renales poliquísticas (45, 46), y se ha observado una hiperexpresión y un error de localización de EGFR en los epitelios quísticos de ratones *jck* (15). Por otra parte, hemos establecido previamente que EGFR actúa como un integrador central

de la angiotensina II, un potente mediador de la ERC (47). Aunque aún no se han dilucidado las redes moleculares exactas que median en el efecto nocivo de EGFR durante la ERC, nuestro punto de referencia es Lcn2 como diana fundamental de la transcripción de EGFR durante la formación de quistes y glomeruloesclerosis. Hay que destacar que un estudio muy reciente mostraba que Lcn2 también es necesaria para la señalización del receptor c-erb-B2 en el cáncer de mama (48). Además, nuestros datos muestran que Hif-1 α es un intermediario decisivo entre EGFR y Lcn2, lo que es compatible con el hallazgo de que Lcn2 está regulada al alza en la mayoría de los estados patológicos caracterizados por hipoxia, tales como isquemia o cánceres (24, 33). Si Hif-1 α está involucrado mayormente en el control de la expresión del gen *Lcn2*, requiere investigaciones adicionales.

Estudios clínicos han sugerido que la excreción urinaria de Lcn2 podría marcar pacientes con el curso clínico más grave (49), pero no se conoce si Lcn2 es simplemente un marcador del daño tubular o un mediador clave del proceso de deterioro. Nuestros datos muestran ahora una relación directa entre la expresión de Lcn2 y la progresión de la enfermedad y proporcionan la primera demostración de que Lcn2 es un instrumento en la ERC. La ERC es una enfermedad progresiva y existen muchas intervenciones médicas posibles a lo largo de su curso si la enfermedad es reconocida y tratada de manera temprana. Los biomarcadores actuales de la progresión de la ERC, es decir, creatinina o albuminuria, tienen sus limitaciones para este objetivo (50). Un biomarcador ideal debería reflejar la patología del tejido, actuar como un componente decisivo de la enfermedad y ser fácilmente detectable por métodos no invasivos. Al mostrar que Lcn2 reúne estas características, hemos proporcionado una prueba clara para el uso de esta molécula como un biomarcador candidato de la progresión de la ERC.

En conclusión, hemos descubierto una nueva función de Lcn2 y destacado su papel crucial en la patogénesis de la ERC progresiva. Esta es la primera demostración *in vivo* de que Lcn2 actúa como un regulador del crecimiento a través de la mediación del efecto mitógeno de la señalización de EGFR. Por otra parte, hemos identificado a Lcn2 como uno de los principales efectores de daño renal y quistogénesis y uno de los biomarcadores más prometedores de la progresión de la ERC, preparado para estudio en grandes cohortes de pacientes. Tenemos la sospecha de que nuestros resultados serán decisivos en otros estados patológicos que también se caracterizan por un crecimiento aberrante, tales como cánceres, lo que demuestra tanto la activación de EGFR como la mayor expresión de Lcn2 (51, 52).

REFERENCIAS:

En toda la solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta invención.

1. 2006. USRDS *Am J Kidney Dis* 47:1-286.

2. Meguid El Nahas, A. y Bello, A.K. 2005. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet* 365:331-340.

3. <http://kidney.niddk.nih.gov/kudiseases/pubs/kustats/index.htm>, página 1.

4. Hostetter, T.H. 1995. Progression of renal disease and renal hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 57:263-278.

5. Terzi, F., Ticozzi, C., Burtin, M., Motel, V., Beaufils, H., Laouari, D., Assael, B.M. y Kleinknecht, C. 1995. Subtotal but not unilateral nephrectomy induces hyperplasia and protooncogene expression. *Am J Physiol* 268:F793-801.

6. Kliem, V., Johnson, R.J., Alpers, C.E., Yoshimura, A., Couser, W.G., Koch, K.M. y Floege, J. 1996. Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney Int* 49:666-678.

7. Pillebout, E., Weitzman, J.B., Burtin, M., Martino, C., Federici, P., Yaniv, M., Friedlander, G. y Terzi, F. 2003. JunD protects against chronic kidney disease by regulating paracrine mitogens. *J Clin Invest* 112:843-852.

8. Remuzzi, G., Benigni, A. y Remuzzi, A. 2006. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 116:288-296.

9. Esposito, C., He, C.J., Striker, G.E., Zalups, R.K. y Striker, L.J. 1999. Nature and severity of the glomerular response to nephron reduction is strain-dependent in mice. *Am J Pathol* 154:891-897.

10. Kren, S. y Hostetter, T.H. 1999. The course of the remnant kidney model in mice. *Kidney Int* 56:333-337.

11. Ma, L.J. y Fogo, A.B. 2003. Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background. *Kidney Int* 64:350-355.

12. Pillebout, E., Burtin, M., Yuan, H.T., Briand, P., Woolf, A.S., Friedlander, G. y Terzi, F. 2001. Proliferation and remodeling of the peritubular microcirculation after nephron reduction: association with the progression of renal lesions. *Am J Pathol* 159:547-560.

13. Flower, D.R., North, A.C. y Attwood, T.K. 1991. Mouse oncogene protein 24p3 is a member of the lipocalin protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 180:69-74.

14. Schlehuber, S. y Skerra, A. 2005. Lipocalins in drug discovery: from natural ligand-binding proteins to "anticalins".

Drug Discov Today 10:23-33.

15. Smith, L.A., Bukanov, N.O., Husson, H., Russo, R.J., Barry, T.C., Taylor, A.L., Beier, D.R. y Ibraghimov-Beskrovnaya, O. 2006. Development of polycystic kidney disease in juvenile cystic kidney mice: insights into pathogenesis, ciliary abnormalities, and common features with human disease. *J Am Soc Nephrol* 17:2821-2831.
- 5 16. Kuwabara, T., Mori, K., Mukoyama, M., Kasahara, M., Yokoi, H., Saito, Y., Yoshioka, T., Ogawa, Y., Imamaki, H., Kusakabe, T., et al. 2009. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney Int* 75:285-294.
17. Ding, H., He, Y., Li, K., Yang, J., Li, X., Lu, R. y Gao, W. 2007. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Clin Immunol* 123:227-234.
- 10 18. Paragas, N., Nickolas, T.L., Wyatt, C., Forster, C.S., Sise, M., Morgello, S., Jagla, B., Buchen, C., Stella, P., Sanna-Cherchi, S., et al. 2009. Urinary NGAL marks cystic disease in HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 20:1687-1692.
19. Berger, T., Togawa, A., Duncan, G.S., Elia, A.J., You-Ten, A., Wakeham, A., Fong, H.E., Cheung, C.C. y Mak, T.W. 2006. Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to *Escherichia coli* infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1834-1839.
- 15 20. Goetz, D.H., Holmes, M.A., Borregaard, N., Bluhm, M.E., Raymond, K.N. y Strong, R.K. 2002. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 10:1033-1043.
21. Nankivell, B.J., Boadle, R.A. y Harris, D.C. 1992. Iron accumulation in human chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 20:580-584.
- 20 22. Harris, D.C., Tay, Y.C., Chen, J., Chen, L. y Nankivell, B.J. 1995. Mechanisms of iron-induced proximal tubule injury in rat remnant kidney. *Am J Physiol* 269:F218-224.
23. Igarashi, P. y Somlo, S. 2002. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 13:2384-2398.
- 25 24. Schmidt-Ott, K.M., Mori, K., Li, J.Y., Kalandadze, A., Cohen, D.J., Devarajan, P. y Barasch, J. 2007. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol* 18:407-413.
25. Zeng, F., Singh, A.B. y Harris, R.C. 2009. The role of the EGF family of ligands and receptors in renal development, physiology and pathophysiology. *Exp Cell Res* 315:602-610.
- 30 26. Terzi, F., Burtin, M., Hekmati, M., Federici, P., Grimber, G., Briand, P. y Friedlander, G. 2000. Targeted expression of a dominant-negative EGF-R in the kidney reduces tubulo-interstitial lesions after renal injury. *J Clin Invest* 106:225-234.
27. Semenza, G.L. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3:721-732.
28. Gunaratnam, L. y Bonventre, J.V. 2009. HIF in kidney disease and development. *J Am Soc Nephrol* 20:1877-1887.
- 35 29. Devireddy, L.R., Gazin, C., Zhu, X. y Green, M.R. 2005. A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell* 123:1293-1305.
30. Holmes, M.A., Paulsene, W., Jide, X., Rattledge, C. y Strong, R.K. 2005. Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial infections through iron sequestration. *Structure* 13:29-41.
- 40 31. Flo, T.H., Smith, K.D., Sato, S., Rodriguez, D.J., Holmes, M.A., Strong, R.K., Akira, S. y Aderem, A. 2004. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432:917-921.
32. Saiga, H., Nishimura, J., Kuwata, H., Okuyama, M., Matsumoto, S., Sato, S., Matsumoto, M., Akira, S., Yoshikai, Y., Honda, K., et al. 2008. Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. *J Immunol* 181:8521-8527.
33. Yang, J. y Moses, M.A. 2009. Lipocalin 2: a multifaceted modulator of human cancer. *Cell Cycle* 8:2347-2352.
- 45 34. Borregaard, N. y Cowland, J.B. 2006. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a siderophore-binding eukaryotic protein. *Biometals* 19:211-215.
35. Yang, J., Goetz, D., Li, J.Y., Wang, W., Mori, K., Setlik, D., Du, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Strong, R., et al. 2002. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell* 10:1045-1056.

36. Mori, K., Lee, H.T., Rapoport, D., Drexler, I.R., Foster, K., Yang, J., Schmidt-Ott, K.M., Chen, X., Li, J.Y., Weiss, S., et al. 2005. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 115:610-621.
- 5 37. Bolignano, D., Coppolino, G., Campo, S., Aloisi, C., Nicocia, G., Frisina, N. y Buemi, M. 2007. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Am J Nephrol* 27:373-378.
38. Stone, C.E., Hall, D.H. y Sundaram, M.V. 2009. Lipocalin signaling controls unicellular tube development in the *Caenorhabditis elegans* excretory system. *Dev Biol* 329:201-211.
39. Wei, F., Karihaloo, A., Yu, Z., Marlier, A., Seth, P., Shibasaki, S., Wang, T., Sukhatme, V.P., Somlo, S. y Cantley, L.G. 2008. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin suppresses cyst growth by Pkd1 null cells in vitro and in vivo. *Kidney Int* 74:1310-1318.
- 10 40. Tang, S., Leung, J.C., Tsang, A.W., Lan, H.Y., Chan, T.M. y Lai, K.N. 2002. Transferrin up-regulates chemokine synthesis by human proximal tubular epithelial cells: implication on mechanism of tubuloglomerular communication in glomerulopathic proteinuria. *Kidney Int* 61:1655-1665.
41. Hakrout, S., Moeller, M.J., Theilig, F., Kaissling, B., Sijmonsma, T.P., Jugold, M., Akeson, A.L., Traykova-Brauch, M., Hosser, H., Hahnel, B., et al. 2009. Effects of increased renal tubular vascular endothelial growth factor (VEGF) on fibrosis, cyst formation, and glomerular disease. *Am J Pathol* 175:1883-1895.
- 15 42. Fine, L.G. y Norman, J.T. 2008. Chronic hypoxia as a mechanism of progression of chronic kidney diseases: from hypothesis to novel therapeutics. *Kidney Int* 74:867-872.
43. Strutz, F., Zeisberg, M., Hemmerlein, B., Sattler, B., Hummel, K., Becker, V. y Muller, G.A. 2000. Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. *Kidney Int* 57:1521-1538.
- 20 44. Stocklin, E., Botteri, F. y Groner, B. 1993. An activated allele of the c-erbB-2 oncogene impairs kidney and lung function and causes early death of transgenic mice. *J Cell Biol* 122:199-208.
45. Richards, W.G., Sweeney, W.E., Yoder, B.K., Wilkinson, J.E., Woychik, R.P. y Avner, E.D. 1998. Epidermal growth factor receptor activity mediates renal cyst formation in polycystic kidney disease. *J Clin Invest* 101:935-939.
- 25 46. Sweeney, W.E., Chen, Y., Nakanishi, K., Frost, P. y Avner, E.D. 2000. Treatment of polycystic kidney disease with a novel tyrosine kinase inhibitor. *Kidney Int* 57:33-40.
47. Lautrette, A., Li, S., Alili, R., Sunnarborg, S.W., Burtin, M., Lee, D.C., Friedlander, G. y Terzi, F. 2005. Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: a new therapeutic approach. *Nat Med* 11:867-874.
- 30 48. Leng, X., Ding, T., Lin, H., Wang, Y., Hu, L., Hu, J., Feig, B., Zhang, W., Pusztai, L., Symmans, W.F., et al. 2009. Inhibition of lipocalin 2 impairs breast tumorigenesis and metastasis. *Cancer Res* 69:8579-8584.
49. Nickolas, T.L., Barasch, J. y Devarajan, P. 2008. Biomarkers in acute and chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17:127-132.
50. Lemley, K.V. 2007. An introduction to biomarkers: applications to chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 22:1849-1859.
- 35 51. Shepard, H.M., Brdlik, C.M. y Schreiber, H. 2008. Signal integration: a framework for understanding the efficacy of therapeutics targeting the human EGFR family. *J Clin Invest* 118:3574-3581.
52. Devarajan, P. 2007. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: new paths for an old shuttle. *Cancer Ther* 5:463-470.
- 40 53. Levey, A.S., Bosch, J.P., Lewis, J.B., Greene, T., Rogers, N. y Roth, D. 1999. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 130:461-470.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> INSERM
- 5 <120> Métodos para predecir la progresión y tratar una enfermedad renal crónica en un paciente
- <130> TERZI10870AS
- <160> 4
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 19
- 15 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Secuencia Lcn2 shARN
- 20 <400> 1
- ggaaatatgc acaggtatc 19
- <210> 2
- <211> 19
- 25 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 30 <223>Secuencia Lcn2 shARN
- <400> 2
- gctactggat cagaacatt 19
- 35 <210> 3
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 40 <220>
- <223> Secuencia arbitraria shARN
- <400> 3
- gagcgtacca gattaaagt 19
- 45 <210> 4
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 50 <220>
- <223> Secuencia arbitraria shARN
- <400> 4
- 55 gattcgacca gacatgtat 19

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir la progresión de una enfermedad renal crónica (ERC) o para el seguimiento de una terapia de ERC en un paciente, que comprende las siguientes etapas:
 - a. proporcionar una muestra de orina de dicho paciente que padece ERC,
 - 5 b. determinar el nivel de expresión del gen de la lipocalina asociada con gelatinasa de neutrófilos (NGAL),
en donde dicho nivel de expresión del gen de NGAL se expresa como la relación de niveles de expresión de NGAL frente a creatinina en nanogramos por miligramo (ng/mg), y
en donde dicho nivel de expresión del gen de NGAL se determina midiendo la concentración de proteína NGAL en una muestra de orina obtenida a partir de dicho paciente, y
 - 10 c. correlacionar el nivel de expresión del gen de NGAL con la predicción de la progresión de ERC.
2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho nivel de expresión del gen de NGAL se compara con un valor predeterminado.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que la concentración de proteína NGAL se mide mediante inmunoensayo.
- 15 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la ERC se selecciona en el grupo consistente en enfermedad renal poliquística (enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ERPAD) y enfermedad renal poliquística autosómica recesiva (ERPAR), glomerulonefritis, nefritis intersticial, nefropatía y uropatía obstructiva.
5. Un inhibidor de la expresión del gen de NGAL para uso en la prevención o el tratamiento de una ERC.
- 20 6. El inhibidor para uso según la reivindicación 5, en donde dicho inhibidor se selecciona a partir del grupo que consiste en moléculas de ARN o ADN antisentido, ARN pequeños inhibidores (ARNsi), ARN de horquilla corta y ribozimas.
7. Un antagonista de NGAL para uso en la prevención o el tratamiento de una ERC.
8. El antagonista para uso según la reivindicación 7, en donde dicho antagonista es un anticuerpo o un aptámero dirigido contra NGAL.
- 25 9. Una composición farmacéutica para uso en la prevención o el tratamiento de una ERC que comprende un inhibidor de la expresión del gen de NGAL tal y como se define en las reivindicaciones 5 y 6 o un antagonista de NGAL tal y como se define en las reivindicaciones 7 u 8.