

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 793**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2009 PCT/US2009/063542**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2010 WO10054189**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2009 E 09825472 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2352503**

54 Título: **Papel de uPAR soluble en la patogenia de enfermedad renal proteinúrica**

30 Prioridad:

06.11.2008 US 111873 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MIAMI (50.0%)
1951 NW 7th Avenue, Suite 300
Miami, FL 33136, US y
THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION D/B/A
MASSACHUSETTS GENERAL HOSPITAL (50.0%)**

72 Inventor/es:

REISER, JOCHEN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 642 793 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

Papel de uPAR soluble en la patogenia de enfermedad renal proteinúrica

Campo de la invención

5 Las realizaciones de la invención se refieren a composiciones que modulan la expresión, la función, la actividad del receptor uroquinasa soluble (uPAR) en los riñones.

Antecedentes

10 El hecho de que las enfermedades renales glomerulares después del trasplante renal puedan reaparecer horas después de la cirugía representa un misterio persistente en la medicina que alberga enormes desafíos. Las últimas décadas atestiguanon mucho progreso en la biología de los podocitos, sin embargo, la patogenia exacta que subyace a la mayoría de enfermedades renales proteinúricas todavía está lejos de ser evidentes. Esto es cierto con la glomeruloesclerosis segmental focal (GEFS). Aunque las mutaciones a ciertas moléculas que incluyen podocina, nefrina, α -actinina, TRPC6, se han reivindicado responsables de alguna forma familiar de GEFS, se conoce poco acerca de la patogenia de la forma adquirida de GEFS. La GEFS frecuentemente da lugar a un fallo renal de fase final y recurriendo significativamente en un 30-60 % de los riñones trasplantados.

15 El documento WO 98/21230 A1, el documento WO 2009/055613 A2, el documento US 2008/152587A1 y el documento US 2007/244046 se refiere a los inhibidores de la unión del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) al receptor del activador del plasminógeno de uroquinasa (uPAR) y su uso, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer.

20 El documento WO 2005/116077 A2 se refiere a anticuerpos u otros ligandos específicos para los complejos entre uPA y uPAR y a su uso en el tratamiento y el diagnóstico de cáncer.

El documento US 2004/265797 A1 se refiere a un péptido que se une a uPAR y que inhibe su unión a la integrina y la vitronectina.

El documento WO 2008/077958 A2 se refiere al uso de uPAR soluble como un marcador de la inflamación de bajo grado y el síndrome metabólico (SM) y las enfermedades relacionadas.

Sumario

25 Este Sumario se proporciona para presentar un resumen de la invención para indicar brevemente la naturaleza y la sustancia de la invención.

Las realizaciones de la invención se refieren a composiciones para el tratamiento de enfermedades o trastornos renales, caracterizados por la proteinuria.

30 En una realización, la invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de proteinuria en una enfermedad o un trastorno renal caracterizado por proteinuria, la composición que comprende un agente que inhibe la expresión o la actividad del receptor de uroquinasa soluble (suPAR), como se expone en la reivindicación 1.

35 En una realización, la invención proporciona un procedimiento de identificación de un agente para la actividad en el tratamiento de proteinuria en una enfermedad o trastorno renal caracterizado por la proteinuria, que comprende las etapas expuestas en la reivindicación 6.

En algunas realizaciones, la invención proporciona procedimientos para diagnosticar a un paciente que tiene o está en riesgo de desarrollar proteinuria, que comprende detectar suPAR o un biomarcador sanguíneo que comprende suPAR en una muestra de sangre retirada del paciente, como se expone en las reivindicaciones 9 y 11.

40 En una realización, la invención proporciona un ensayo para medir los niveles de receptor de uroquinasa soluble (suPAR) en una muestra de sangre retirada de un paciente que tiene proteinuria, comprendiendo el ensayo las etapas expuestas en la reivindicación 10.

Otros aspectos se describen más abajo.

Breve descripción de los dibujos

45 Las Figuras 1A a 1F muestran que suPAR activa la integrina $\alpha v \beta 3$ e induce la eliminación del procedimiento de pie y la proteinuria en ratones. Figura 1A: la proteína suPAR activa la integrina $\alpha v \beta 3$ en podocitos cultivados. Los podocitos de ratón completamente diferenciados se incubaron con proteína suPAR a 1-5 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ y se tiñeron con anticuerpo AP5. Figura 1B: La inyección de suPAR en ratones *Plaur*^{-/-} induce proteinuria. La proteína suPAR se inyectó a través de la vena de la cola en ratones *Plaur*^{-/-} a 1 mg/kg (n = 6), los ratones control recibieron la misma cantidad de BSA (n = 6). La orina se recogió antes y 8 h, 24 h después de la inyección para el ensayo Bradford. *P<0,03 durante 24 h después de la inyección frente a 0 h, y frente a todos los grupos BSA.

50

Figura 1C: se depositó suPAR en los podocitos después de la inyección de suPAR. Synpo, sinaptopodina. Figura 1D: la inyección de suPAR activó la integrina $\alpha_v\beta_3$ en los podocitos. Figuras 1E, 1F: Trasplante cruzado de riñón. Figura 1E: Los riñones derechos de ratones *Plaur*^{-/-} se trasplantaron en ratones 57BL/6 y después se trataron con LPS (panel derecho) o PBS (panel izquierdo). Figura 1F: Los riñones derechos de ratones 57BL/6 se trasplantaron en ratones *Plaur*^{-/-} y después se trataron con LPS o PBS.

Figuras 2A-2B: muestran que los sueros de pacientes recurrentes de GEFS tienen alto nivel de suPAR y activan la integrina $\alpha_v\beta_3$ en los podocitos. Figura 2A: Los pacientes recurrentes de GEFS tuvieron niveles más altos de suPAR en suero que los pacientes no recurrentes y que los sujetos normales. Figura 2B: Los sueros de GEFS recurrente activaron la integrina $\alpha_v\beta_3$ en los podocitos cultivados.

Figuras 3A-3C: Trasplante cruzado de riñón y suPAR en los podocitos. La Figura 3A es una ilustración esquemática de un trasplante cruzado. Figura 3B: suPAR se depositó en los podocitos en los ratones *Plaur*^{-/-} trasplantados. La inmunotinción se realizó en secciones de riñón después del trasplante y el tratamiento de LPS. Synpo, sinaptopodina. Figura 3C: muestra que en los ratones *Plaur*^{-/-} tratados con LPS, se encontró una expresión aumentada en el riñón 57BL/6 trasplantado, pero ningún uPAR en podocitos de riñón *Plaur*^{-/-} nativo.

Figura 4: es un gráfico que muestra que el transporte génico subcutáneo de suPAR por electroporación (EP) en ratones WT B6 induce proteinuria (la flecha indica cuándo se realizó la EP).

La Figura 5 es un gráfico que muestra que el transporte génico subcutáneo de suPAR por electroporación (EP) en ratones WT Balb/c induce proteinuria (la flecha indica cuándo se realizó la EP). Ambas Figuras 4 y 5 muestran el papel del receptor de uroquinasa soluble en el desarrollo de la proteinuria y la enfermedad renal glomerular. Las Figuras 4 y 5 muestran la expresión de uPAR soluble etiquetado con GFP en el tejido subcutáneo de ratones. Desde ahí, el uPAR soluble se produce y se secreta en el torrente sanguíneo, resultando en la proteinuria.

La Figura 6 es un gráfico que muestra que el transporte génico subcutáneo de suPAR por electroporación (EP) en ratones knockout uPAR induce proteinuria (la flecha indica cuándo se realizó la EP). 24 h después del transporte génico de suPAR-GFP (EP) en la piel subcutánea (SC) de ratón knockout uPAR, los ratones se examinaron al microscopio de IF. Los resultados mostraron que suPAR etiquetado con GFP se expresaba en áreas subcutáneas de ratones knockout uPAR.

Las Figuras 7A-7B muestran expresión sérica de uPAR soluble después de la electroporación génica en ratones WT y KO uPAR. La Figura 7A es una inmunotransferencia que muestra que el transporte génico de suPAR por EP en la piel aumenta el nivel de suPAR circulante en ratones WT. Los niveles se midieron 24 h después de la electroporación del vector génico suPAR en la piel. La Figura 7B muestra que el transporte génico de suPAR por EP en la piel genera suPAR circulante en ratones knockout uPAR. Los niveles se midieron 24 h después de la electroporación del vector génico suPAR en la piel.

Descripción detallada

Las realizaciones de la presente invención se refieren a descubrimientos que implican agentes que modulan y/o inhiben el receptor de uroquinasa (uPAR), en particular, el receptor de uroquinasa soluble (suPAR). En consecuencia, las composiciones para el uso de la presente invención proporcionan el tratamiento de enfermedades o trastornos renales, caracterizados por proteinuria.

Varios aspectos de la invención se describen a continuación con referencia a las aplicaciones de ejemplo para ilustración. Debe entenderse que se exponen numerosos detalles, relaciones y procedimientos específicos para proporcionar un completo entendimiento de la invención. Un experto en la materia relevante, sin embargo, reconocerá fácilmente que la invención puede practicarse sin uno o más de los detalles específicos o con otros procedimientos.

Todos los genes, nombres génicos y productos génicos desvelados en el presente documento se destinan a corresponder a homólogos de cualquier especie para la que son aplicables las composiciones y los procedimientos desvelados en el presente documento. De esta manera, los términos incluyen, pero no se limitan a genes y productos génicos de humanos y ratones. Se entiende que cuando se desvela un gen o producto génico de una especie particular, la divulgación se destina a ser solamente ejemplar y no ha de interpretarse como una limitación salvo que en el contexto en el que aparece lo indique claramente. De esta manera, por ejemplo, para los genes desvelados en el presente documento, que en algunas realizaciones se refieren a ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos de mamíferos se destinan a abarcar genes homólogos y/u ortólogos y productos génicos de otros animales que incluyen, pero no se limitan a otros mamíferos, peces, anfibios, reptiles y aves. En realizaciones preferidas, los genes o las secuencias de ácidos nucleicos son humanos.

Definiciones

La terminología usada en el presente documento es para el fin de describir solamente realizaciones particulares y no se destina a ser limitante de la invención. Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una"

y "el/la" se destinan a incluir asimismo las formas plurales, salvo que el contexto claramente indique lo contrario. Adicionalmente, en el grado en que los términos "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con" o variantes de los mismos se usen en la descripción detallada y/o las reivindicaciones, tales términos se destinan a ser inclusivos de una manera similar a la frase "que comprende".

5 El término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular según se determina por un experto en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o se determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 1 o más de 1 desviación estándar, por la práctica en la técnica. Alternativamente, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta el 20 %, preferentemente de hasta el 10%, más preferentemente hasta el 5 % y más preferentemente hasta el 1 % de un valor dado. Alternativamente, en particular con respecto a los sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de una orden de magnitud, preferentemente 5 veces y más preferentemente 2 veces más, de un valor. Donde se describen los valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, salvo que se indique de otra manera debe asumirse que el término "aproximadamente" signifique dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad segura y eficaz" o "cantidad terapéutica" se refiere a la cantidad de un componente que es suficiente para producir una respuesta terapéutica deseada sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica) acorde con una relación beneficio/riesgo razonable cuando se usa de la manera de la presente invención. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad de un compuesto eficaz para producir la respuesta terapéutica deseada. La cantidad segura y eficaz específica o la cantidad terapéuticamente eficaz variará con tales factores como la afección particular a tratarse, la condición física del paciente, el tipo de mamífero o animal a tratarse, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia simultánea (si la hay) y las formulaciones específicas empleadas y la estructura de los compuestos o sus derivados.

25 Como se usa en el presente documento "proteinuria" se refiere a cualquier cantidad de proteína que pasa a través de un podocito que ha sufrido daño de podocito o a través de una barrera mediada por podocito que normalmente no permitiría ningún paso de proteínas. En un sistema *in vivo* el término "proteinuria" se refiere a la presencia de cantidades excesivas de proteína sérica en la orina. La proteinuria es un síntoma característico de distrés renal (riñón), urinario, pancreático, síndromes nefróticos (es decir, proteinuria mayor de 3,5 gramos al día), eclampsia, lesiones tóxicas de los riñones y es frecuentemente un síntoma de la diabetes mellitus. Con la proteinuria grave puede desarrollarse hipoproteinemia general y resulta en presión oncótica disminuida (ascitis, edema, hidrotórax).

30 La frase "se une específicamente a", "es específico por" o "específicamente inmunorreactivo con", cuando se refiere a un anticuerpo se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en presencia de una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. De esta manera, en las condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína particular y no se unen en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a una proteína en tales condiciones puede requerir un anticuerpo que se seleccione por su especificidad por una proteína particular.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "aptámero" o "especie que se une al ácido nucleico seleccionado" puede incluir ARN o ADN no modificado o químicamente modificado. El procedimiento de selección puede ser por, pero no se limita a, cromatografía de afinidad y el procedimiento de amplificación por transcripción reversa (TR) o reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

40 Como se usa en el presente documento, "modulación" significa bien un aumento (estimulación) o bien una disminución (inhibición) en la expresión, las cantidades *in vivo* de un gen. Esto incluye cualquier cantidad *in vivo*, función y similares en comparación con los controles normales. El término incluye, por ejemplo, aumentado, potenciado, aumentado, agonizado, promovido, disminuido, reducido, suprimido, bloqueado o antagonizado. La modulación puede aumentar la actividad o las cantidades más de 1 vez, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 100 veces, etc., sobre los valores basales. La modulación también puede disminuir su actividad o cantidades por debajo de los valores basales.

45 El término "variante", cuando se usa en el contexto de una secuencia de polinucleótido, puede abarcar una secuencia de polinucleótido relacionada con un gen de tipo silvestre. Esta definición puede incluir también, por ejemplo, variantes "alélicas", "de corte y empalme", "especies" o "polimórficas". Una variante de corte y empalme puede tener identidad significativa con una molécula de referencia, pero generalmente tendrá mayor o menor número de polinucleótidos debido al corte y empalme alternativos de los exones durante el procesamiento del ARNm. El polipéptido correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Las variantes de especies son secuencias de polinucleótidos que varían de una especie a otra. De utilidad particular en la invención son las variantes de los productos génicos de tipo silvestre. Las variantes pueden resultar de al menos una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos y pueden resultar en ARNm alterados o en polipéptidos cuya estructura o función puede o puede no estar alterada. Cualquier gen natural o recombinante dado puede tener ninguna, una o muchas formas alélicas. Los cambios mutacionales comunes que dan lugar a variantes se adscriben generalmente a deleciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede ocurrir solo o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

Los polipéptidos resultantes generalmente tendrán identidad de aminoácidos significativa entre sí. Una variante polimorfa es una variación en la secuencia de polinucleótidos de un gen particular entre individuos de una especie dada. Las variantes polimorfas también pueden abarcar "polimorfismos de un único nucleótido" (SNP, por sus siglas en inglés) o mutaciones de una única base en las que la secuencia de polinucleótidos varía en una base. La presencia de SNO puede ser indicativa de, por ejemplo, Una cierta población con una propensión a un estado de enfermedad, que es susceptibilidad frente a resistencia.

Los polinucleótidos derivados incluyen ácidos nucleicos sometidos a modificación química, por ejemplo, reemplazamiento de hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino. Los derivados, por ejemplo, oligonucleótidos derivados, pueden comprender porciones de origen no natural, tales como restos de azúcares alterados u otros enlaces inter-azúcar. Son ejemplares entre estos el fosforotioato y otras especies que contienen azufre que se conocen en la técnica. Los ácidos nucleicos derivados pueden contener también etiquetas, incluyendo radionucleótidos, enzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromogénicos, sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Un polipéptido o péptido "derivado" es uno que está modificado, por ejemplo, por glucosilación, pegilación, fosforilación, sulfatación, reducción/alquilación, acilación, acoplamiento químico o tratamiento suave con formalina. Un derivado también puede modificarse para contener una etiqueta detectable, bien directa o indirectamente, incluyendo, pero no limitado a, un radioisótopo, una etiqueta fluorescente y una enzimática.

Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento o segmento", como se aplica a una secuencia de ácido nucleico, un gen o un polipéptido, tendrá ordinariamente al menos aproximadamente 5 bases de ácidos nucleicos (para secuencia de ácidos nucleicos o gen) o de aminoácidos (para polipéptidos) contiguos, típicamente al menos aproximadamente 10 bases de ácidos nucleicos o aminoácidos contiguos, más típicamente al menos aproximadamente 20 bases de ácidos nucleicos o aminoácidos contiguos, habitualmente al menos aproximadamente 30 bases de ácidos nucleicos o aminoácidos contiguos, preferentemente al menos aproximadamente 40 bases de ácidos nucleicos o aminoácidos contiguos, más preferentemente al menos aproximadamente 50 bases de ácidos nucleicos o aminoácidos contiguos e incluso más preferentemente al menos aproximadamente 60 a 80 bases de ácidos nucleicos o aminoácidos contiguos de longitud. "Fragmentos solapantes" como se usa en el presente documento, se refiere a fragmentos de ácidos nucleicos o péptidos contiguos que empiezan en el extremo amino terminal de un ácido nucleico o una proteína y acaban en el extremo carboxi terminal del ácido nucleico o la proteína. Cada ácido nucleico o fragmento peptídico tiene al menos aproximadamente una posición de un ácido nucleico o de aminoácidos contiguos en común con el siguiente ácido nucleico o fragmento peptídico, más preferentemente al menos aproximadamente tres bases de ácidos nucleicos o posiciones de aminoácidos en común, lo más preferentemente al menos aproximadamente diez bases de ácidos nucleicos o posiciones de aminoácidos en común.

Los términos "biomolécula" o "marcadores" se usan intercambiamente en el presente documento y se refieren a ADN, ARN (incluyendo ARNm, ARNr, ARNt y ARNtm), nucleótidos, nucleósidos, análogos, polinucleótidos, péptidos y cualquier combinación de los mismos.

"Expresión/cantidad" de un gen, biomolécula o biomarcador en una primera muestra es a un nivel "mayor que" el nivel en una segunda muestra si el nivel de expresión/cantidad de un gen o biomarcador en la primera muestra es al menos aproximadamente 1 vez, 1,2 veces, 1,5 veces, 1,75 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, el nivel de expresión/cantidad del gen o biomarcador en la segunda muestra o una muestra normal. Los niveles de expresión/cantidades pueden determinarse basándose en cualquier criterio adecuado conocido en la técnica, incluyendo pero no limitado a ARNm, ADNc, proteínas, fragmentos proteicos y/o genes copia. Los niveles/cantidades de expresión pueden determinarse cualitativa y/o cuantitativamente.

Los términos "detección", "detectar", "identificación", "cuantificación" incluyen el ensayo, la cuantificación, la formación de imágenes o de otra manera el establecimiento de la presencia o la ausencia del biomarcador transcriptómico o combinaciones de biomoléculas que comprenden el biomarcador y similares, o el ensayo de, la formación de imágenes, la comprobación, el establecimiento o de otra manera la determinación de la prognosis y/o el diagnóstico de enfermedades, trastornos o afecciones renales.

"Paciente" o "sujeto" se refiere a mamíferos e incluye sujetos humanos y veterinarios.

Como se usa en el presente documento, "un paciente en necesidad del mismo" se refiere a cualquier paciente que está afectado con un trastorno caracterizado por proteinuria. En un aspecto de la invención, "un paciente en necesidad del mismo" se refiere a cualquier paciente que puede tener, o está en riesgo de tener un trastorno caracterizado por proteinuria.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancia de prueba" o "agente terapéutico candidato" o "agente" se usan intercambiamente en el presente documento y las expresiones se entienden que abarcan cualquier molécula, entidad química, composición, fármaco, agente terapéutico, agente quimioterapéutico o agente biológico capaz de prevenir, aliviar o tratar una enfermedad u otra afección médica. La expresión incluye

compuestos de moléculas pequeñas, reactivos antisentido, reactivos ARNip, anticuerpos, enzimas, moléculas orgánicas o inorgánicas peptídicas, compuestos naturales o sintéticos y similares. Una sustancia o un agente de prueba pueden ensayarse de acuerdo con los procedimientos de la invención en cualquier fase durante las pruebas clínicas, durante el ensayo previo a las pruebas o después de la aprobación por la FDA.

5 Como se usa en el presente documento la frase "diagnóstico" significa identificar la presencia o la naturaleza de una afección patológica. Los procedimientos diagnósticos difieren en su sensibilidad y su especificidad. La "sensibilidad" de un ensayo diagnóstico es el porcentaje de individuos enfermos quienes prueban positivos (porcentajes de "positivos verdaderos"). Los individuos enfermos no detectados por el ensayo son "falsos negativos". Los sujetos quienes no están enfermos y quienes prueban negativo en el ensayo se denominan "verdaderos negativos". La
10 "especificidad" de un ensayo diagnóstico es 1 menos la tasa de falsos positivos, donde la tasa de "falsos positivos" se define como la proporción de aquellos sin la enfermedad quienes prueban positivo. Aunque un procedimiento diagnóstico particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, es suficiente si el procedimiento proporciona una indicación positiva que ayuda en el diagnóstico.

15 Como se usa en el presente documento la frase "diagnosticar" se refiere a clasificar una enfermedad o un síntoma, determinar una gravedad de la enfermedad, monitorizar un avance de la enfermedad, pronosticar una aparición de una enfermedad y/o prospectar la recuperación. El término "detección" puede abarcar opcionalmente cualquiera de lo anterior. El diagnóstico de una enfermedad de acuerdo con la presente invención puede realizarse determinando un nivel de un polinucleótido o un polipéptido en una muestra biológica obtenida del sujeto, en el que el nivel determinado puede correlacionarse con la predisposición a, o la presencia o la ausencia de la enfermedad. Nótese
20 que una "muestra biológica obtenida del sujeto" también puede comprender opcionalmente una muestra que no se ha retirado físicamente del sujeto, como se describe en mayor detalle a continuación.

25 Como se define en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto (es decir, una dosificación eficaz) significa una cantidad suficiente para producir un resultado terapéuticamente (por ejemplo, clínicamente) deseable. Las composiciones pueden administrarse una de una o más veces al día a una o más veces a la semana; incluyendo un día sí un día no. El experto en la materia apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y el tiempo requerido para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo pero no limitado a la gravedad de la enfermedad o el trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos puede incluir un único tratamiento o una serie de tratamientos.

30 El término "muestra" se entiende que se interpreta en su sentido más amplio. Una "muestra" se refiere a una muestra biológica, tal como, por ejemplo, una o más células, tejidos o fluidos (incluyendo, sin limitación, plasma, suero, sangre completa, fluido cerebroespinal, linfa, lágrimas, orina, saliva, leche, pus y exudados y secreciones tisulares) aislados de un individuo o de constituyentes de un cultivo celular, así como muestras obtenidas de, por ejemplo, un procedimiento de laboratorio. Una muestra biológica puede comprender cromosomas aislados de
35 células (por ejemplo, una extensión de cromosomas en metafase), orgánulos o membranas aisladas de células, células enteras o tejidos, ácido nucleico tal como ADN genómico en solución o unido a un soporte sólido tal como para análisis Southern, ARN en solución o unido a un soporte sólido tal como para análisis Northern, ADNc en solución o unido a un soporte sólido, oligonucleótidos en solución o unidos a un soporte sólido, polipéptidos o péptidos en solución o unidos a un soporte sólido, un tejido, una impresión de tejido y similares.

40 Pueden utilizarse numerosos procedimientos conocidos de colección de tejidos o fluidos para recoger la muestra biológica del sujeto para determinar el nivel de ADN, ARN y/o polipéptido de la variante de interés en el sujeto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, biopsia de aguja fina, biopsia de aguja, biopsia de aguja central y biopsia quirúrgica (por ejemplo, biopsia de cerebro) y lavado. Independientemente del procedimiento empleado, una vez que se obtiene una biopsia/muestra el nivel de la variante puede determinarse y de esta manera puede realizarse un
45 diagnóstico.

La expresión "molécula del receptor de uroquinasa", "uPAR" se entiende que incluye, soluble, unido a membrana, variantes, fragmentos, todos los miembros de la familia, isoformas, precursores, mutantes, alelos, fragmentos, especies, cepas de polinucleótidos sentido y antisentido, etc.

50 El término "neutralizante" cuando se refiere a un agente de unión marcado como diana tal como un anticuerpo se refiere a la capacidad de un anticuerpo de eliminar, o reducir significativamente, la actividad de un antígeno diana. En consecuencia, un anticuerpo anti-uPAR "neutralizante" es capaz de eliminar o reducir significativamente la actividad de uPAR. Un anticuerpo neutralizante uPAR puede, por ejemplo, actuar bloqueando la unión de uPA a su receptor uPAR. Bloqueando esta unión, la activación del plasminógeno mediada por uPA se elimina significativa o completamente.

55 "Activo" o "actividad" con respecto a un polipéptido uPAR se refiere a una porción de un polipéptido uPAR que tiene una actividad biológica o una inmunológica de un polipéptido uPAR nativo. "Biológico/a" cuando se usa en el presente documento se refiere a una función biológica que resulta de la actividad del polipéptido uPAR nativo.

Composiciones

La proteinuria puede provocarse principalmente por alteraciones de las proteínas estructurales implicadas en el mecanismo celular de la filtración. Las causas patofisiológicas de la proteinuria pueden dividirse en los siguientes grupos principales: (1) perturbaciones genéticamente determinadas de estructuras que forman la "unidad de filtración glomerular" como la membrana basal glomerular, los podocitos o el diafragma ranurado, (2) procesos inflamatorios, bien causados directamente por procesos autoinmunes o bien directamente inducidos por microbios, (3) daño de los glomérulos provocado por agentes o (4) como el resultado final de la lesión tubulointerstitial progresiva resultando finalmente en la pérdida de función de la nefrona entera.

La señalización del receptor de uroquinasa (uPAR) en los podocitos se ha mostrado recientemente que provoca la enfermedad glomerular. En los ejemplos que siguen, en un modelo de ratón de trasplante renal y en sueros de pacientes que la forma soluble del receptor de uroquinasa (suPAR) puede depositarse en el riñón y provocar enfermedad renal proteinúrica. Como el uPAR de podocitos endógeno, el suPAR activa la integrina $\alpha_v\beta_3$ fuera de forma dependiente. Estos estudios identifican el primer factor circulante de la enfermedad glomerular. La retirada o el bloqueo de esta proteína es una perspectiva prometedora para el mantenimiento de órganos nativos así como la supervivencia del trasplante.

uPAR es una proteína anclada a glucosilfosfatidilinositol (GPI) con tres dominios extracelulares. La escisión del ancla GPI genera suPAR. Se ha encontrado suPAR elevado en el suero de pacientes con VIH, enfermedades reumáticas o neurológicas, malignidades hematológicas y tumores epiteliales. Los resultados en el presente documento, entre otros, muestran que la forma soluble de uPAR también juega un papel en una enfermedad renal proteinúrica similar a su forma anclada a membrana.

uPAR se induce y se activa en podocitos en respuesta a estímulos proteinúricos, tales como LPS o PAN, dando lugar a motilidad de podocitos *in vitro* y borrado de FP y proteinuria *in vivo*. uPAR asociado a balsa lipídica forma un complejo con la integrina β_3 , provocando de esta manera la activación de la integrina β_3 . Esto a su vez promueve la señalización de Cdc42 y Rac1, provocando de esta manera borrado de FP de podocitos y proteinuria. La proteinuria provocada por la señalización uPAR-integrina β_3 puede prevenirse y reducirse por cicloRGDfV, un inhibidor selectivo de la integrina $\alpha_v\beta_3$. La activación de la señalización de Rac1 en los podocitos también contribuye a la proteinuria en la nefropatía asociada al virus de la inmunodeficiencia humana y los ratones knockout rhoGDIalfa. La proteinuria inducida por Rac1 puede bloquearse por la inhibición de Rac1 o bloqueando su diana corriente abajo aldosterona. De esta manera, la activación de la señalización promigratoria Cdc42 y Rac1 en los podocitos es una causa ampliamente extendida del borrado de FP y la proteinuria.

La fosforilación de la sinaptopodina por la PJA o CaMKII promueve la unión 14-3-3, que protege la sinaptopodina contra la escisión mediada por CatL, estabilizando de esta manera los niveles de sinaptopodina en estado estacionario. La sinaptopodina suprime los filopodios mediados por IRSp53:Mena bloqueando la unión de Cdc42 y Mena a IRSp53 e induce fibras de estrés por bloqueo competitivo de la ubiquitinación de RhoA mediada por Smurf-1. La sinaptopodina también previene la degradación mediada por CatL de la dinamina. La sinaptopodina estabiliza el filtrado renal bloqueando la reorganización del citoesqueleto de actina del podocito en un fenotipo migratorio. La desfosforilación de la sinaptopodina por la calcineurina anula la interacción con 14-3-3. Esto hace a los sitios de escisión de CatL de la sinaptopodina accesibles y promueve la degradación de la sinaptopodina. El LPS o diversas señales proximales distintas inducen la expresión de B7-1 y CatL en los podocitos, lo que provoca la proteinuria a través de la degradación aumentada de la sinaptopodina y la dinamina. En paralelo, el LPS u otras señales proximales pueden activar también Cdc42 y Rac1 a través de la señalización de uPAR-integrina β_3 , a través de la pérdida de la inhibición mediada por sinaptopodina de la señalización de Cdc42 o a través de la activación mediada por Nef-Src de Rac1. Como una consecuencia, el citoesqueleto de actina del podocito se desplaza de un fenotipo estacionario a uno de motilidad, provocando de esta manera el borrado de proceso de pies y proteinuria. CsA y E64 salvaguardan contra la proteinuria estabilizando los niveles proteicos en estado estacionario de la sinaptopodina y la dinamina en los podocitos, FP(4)-Mito bloqueando la señalización Cdc42:IRSp53:Mena, cicloRGDfV bloqueando la señalización uPAR:integrina β_3 , NSC23766 bloqueando Rac1 y epleronona bloqueando la señalización de aldosterona.

uPAR se activa en los podocitos en respuesta a los estímulos proteinúricos tales como LPS o PAN, dando lugar a una motilidad de podocitos aumentada *in vitro* así como borrado de FP y proteinuria *in vivo* y los ratones deficientes en uPAR están protegidos contra la proteinuria inducida por LPS. uPAR activado se asocia a la integrina β_3 en balsas lipídicas provocando de esta manera la activación de la integrina β_3 . La integrina β_3 activada a su vez induce la señalización pro-migratoria de Cdc42 y Rac1, provocando de esta manera borrado de FP de podocitos y proteinuria. La proteinuria iniciada por señalización de uPAR:integrina β_3 puede bloquearse por cicloRGDfV, un inhibidor selectivo de la integrina $\alpha_v\beta_3$. De manera interesante, la activación de la señalización de Rac1 en los podocitos también contribuye a la proteinuria en la nefropatía asociada al HIV y los ratones knockout rhoGDI. La proteinuria inducida por Rac1 puede bloquearse por la inhibición de Rac1 o bloqueando su diana corriente abajo aldosterona. De esta manera, la activación de la señalización promigratoria RhoGTPasas Cdc42 y Rac1 en los podocitos es una causa ampliamente extendida de proteinuria.

De esta manera, en una realización preferida, una composición modula la expresión y/o la actividad de las moléculas

del receptor de uroquinasa de membrana y/o soluble. Preferentemente, el agente modula las moléculas de receptor de uroquinasa solubles. El agente puede ser cualquier agente que module la expresión de las moléculas del receptor de uroquinasa o la actividad de las moléculas del receptor de uroquinasa, tales como por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, anticuerpos, moléculas pequeñas y similares.

5 En una realización preferida, el agente modula o inhibe la expresión, la función y/o la actividad de las moléculas de receptor de uroquinasa aproximadamente un 5 % en comparación con un control normal, de preferencia aproximadamente un 10 %, de preferencia aproximadamente un 50 %, de preferencia aproximadamente un 80 %, un 90 %, un 100 %. La modulación de, por ejemplo, la expresión o las cantidades de moléculas del receptor de uroquinasa soluble resulta en por ejemplo, una disminución en la activación de la integrina $\alpha v\beta 3$ y el tratamiento de
10 las enfermedades renales tales como proteinuria.

En otra realización preferida un agente inhibe o bloquea la señalización de uPAR activado-integrina $\beta 3$ y la hipermotilidad FP de los podocitos. Esto sería un ejemplo de una actividad uPAR.

En otra realización preferida, el agente modula la degradación y/o la tasa de degradación de las moléculas de uPAR en comparación a los controles normales aproximadamente un 5 %, de preferencia aproximadamente un 50 %, de preferencia aproximadamente un 80 %, un 90 %, un 100 %.

15 En otra realización preferida, los agentes que modulan la actividad y/o la expresión uPAR comprenden oligonucleótidos, polinucleótidos, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, aptámeros, moléculas pequeñas, moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas o combinaciones de los mismos.

En otra realización preferida, la composición comprende uno o más agentes que modulan la expresión uPAR, la actividad y/o la función *in vivo*. Por ejemplo, un agente inhibe directamente la actividad de las moléculas del receptor de uroquinasa. En otro ejemplo, un agente inhibe directamente la unión de uPAR a su ligando. En otra realización preferida, un imitador de un ligando uPAR se une a uPAR. En otra realización preferida, una composición comprende un agente que directamente marca como diana las moléculas del receptor de uroquinasa, mediante, por ejemplo, la unión a ellas, tales como, un anticuerpo, un oligonucleótido antisentido que inhibe la expresión de las moléculas del receptor de uroquinasa, un segundo agente que marca como diana otra molécula en la ruta de síntesis de las moléculas del receptor de uroquinasa o moléculas en las rutas que están asociadas a las moléculas del receptor de uroquinasa, tales como por ejemplo, GTPasa etc.

Otra realización preferida es un agente para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno asociados a la expresión y/o la actividad patológicas de las moléculas del receptor de uroquinasa que comprende administrarlo a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad eficaz de un agente que modula la actividad de las moléculas del receptor de uroquinasa, la función y/o la expresión *in vivo* para tratar los trastornos. Por ejemplo una enfermedad de los podocitos o un trastorno tal como proteinuria.

30 Por ejemplo, el agente puede ser un vector que expresa moléculas uPAR mutantes, un agente que marca como diana ácidos nucleicos de uPAR que disminuyen la producción *in vivo* de uPAR.

35 En otra realización preferida, una combinación de agentes que modulan la expresión de uPAR, la función y/o la actividad y/o modulan la degradación de uPAR se administra a un paciente, por ejemplo, en el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizados por proteinuria y/o enfermedades o trastornos de los podocitos.

En una realización preferida, una enfermedad o trastorno caracterizados por proteinuria comprenden: enfermedades glomerulares, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis segmental focal, enfermedad de cambio mínimo, síndromes nefróticos, pre-eclampsia, eclampsia, lesiones renales, enfermedades vasculares del colágeno, estrés, ejercicio agotador, proteinuria ortostática (postural) benigna, glomeruloesclerosis segmental focal (GEFS), nefropatía de IgA, nefropatía de IgM, glomerulonefritis membranoproliferativa, nefropatía membranosa, sarcoidosis, síndrome de Alport, diabetes mellitus, daño renal debido a fármacos, enfermedad de Fabry, infecciones, aminoaciduria, síndrome de Fanconi, nefroesclerosis hipertensiva, nefritis intersticial, enfermedad de células falciformes, hemoglobinuria, mieloma múltiple, mioglobinuria, cáncer, Granulomatosis de Wegener o Enfermedad de Almacenamiento de Glucógeno Tipo 1.

En otra realización preferida, la modulación de la expresión de uPAR, la función, la actividad, etc., se modula por un agente en el tratamiento de trastornos o enfermedades relacionadas con los podocitos. Para los fines de la presente divulgación, las expresiones "enfermedad o enfermedades de podocitos" y "trastorno o trastornos de podocitos" son intercambiables y pueden significar cualquier enfermedad, trastorno, síndrome, anomalía, patología o afección anormal de los podocitos o de la estructura o la función de sus partes constituyentes.

En otra realización preferida, un agente es para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno de podocitos asociados a la expresión y/o la actividad patológicas de las moléculas del receptor de uroquinasa que comprende administrarlo a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad eficaz de un agente que modula la actividad de las moléculas del receptor de uroquinasa, la función y/o la expresión *in vivo* para tratar los trastornos o enfermedades de los podocitos.

Tales trastornos o enfermedades incluyen pero no se limitan a la pérdida de podocitos (podocitopenia), mutación de podocitos, un aumento en la anchura del proceso de pies o una disminución en la longitud del diafragma ranurado. En un aspecto, la enfermedad o el trastorno relacionados con los podocitos pueden ser un barrido o una disminución de la densidad de podocitos. En un aspecto, la disminución de la densidad de podocitos podría deberse a una

5 disminución en el número de podocitos, por ejemplo, debido a apoptosis, separación, carencia de proliferación, daño del ADN o hipertrofia.

En una realización, la enfermedad o el trastorno relacionados con los podocitos pueden deberse a una lesión de los podocitos. En un aspecto, la lesión de los podocitos puede deberse a estrés mecánico tal como alta presión sanguínea, hipertensión o isquemia, carencia de suministro de oxígeno, una sustancia tóxica, un trastorno

10 endocrinológico, una infección, un agente de contraste, un traumatismo mecánico, un agente citotóxico (cis-platino, adriamicina, puromicina), inhibidores de la calcineurina, una inflamación (por ejemplo, debida a una infección, un traumatismo, anoxia, obstrucción o isquemia), radiación, una infección (por ejemplo, bacteriana, fúngica o vírica), una disfunción del sistema inmune (por ejemplo, una enfermedad autoinmune, una enfermedad sistémica o nefropatía de IgA), un trastorno genético, una medicación (por ejemplo, un agente antibacteriano, un agente antivírico, un agente antifúngico, un agente inmunosupresor, un agente antiinflamatorio, un analgésico o un agente anticáncer), un fallo orgánico, un trasplante de órgano o uropatía. En un aspecto, la isquemia puede ser anemia de

15 células falciformes, trombosis, trasplante, obstrucción, choque o pérdida de sangre. En un aspecto, los trastornos genéticos pueden incluir el síndrome nefrítico congénito del tipo Finnish, la nefropatía membranosa fetal o mutaciones en proteínas específicas de podocitos, tales como α -actina-4, podocina y TRPC6.

En un aspecto, la enfermedad o el trastorno relacionados con los podocitos puede ser la expresión o la función anormales de las proteínas del diafragma ranurado tales como podocina, nefrina, CD2AP, proteínas de la membrana celular tales como TRPC6 y proteínas implicadas en la organización del citoesqueleto tales como sinaptopodina,

20 proteínas de unión a actina, familias lamb y colágenos. En otro aspecto, la enfermedad o el trastorno relacionados con los podocitos pueden estar relacionados con una perturbación de GBM, con una perturbación de la función de las células mesangiales y con la deposición de complejos antígeno-anticuerpo y anticuerpos anti-podocitos. En otro

25 aspecto, la enfermedad o el trastorno relacionados con los podocitos pueden ser atrofia tubular.

En una realización preferida, la enfermedad o el trastorno relacionados con los podocitos comprenden proteinuria, tales como microalbuminuria o macroalbuminuria. De esta manera, En realizaciones particularmente preferidas, uno o más agentes que modulan la expresión de uPAR, la función, la actividad, la degradación, la tasa de degradación y/o

30 que inhiben la expresión de la actividad de las moléculas del receptor de uroquinasa pueden combinarse con uno o más compuestos quimioterapéuticos distintos que se usan para tratar cualquiera de las enfermedades o trastornos de podocitos.

Puede usarse una amplia diversidad de agentes para marcar como diana uPAR, especialmente moléculas del receptor de uroquinasa. Estos agentes pueden diseñarse para marcar como diana uPAR que tienen una actividad *in vivo* que reduzca la expresión y/o la actividad de las moléculas del receptor de uroquinasa.

35

Los agentes pueden regular las moléculas del receptor de uroquinasa basándose en el ADNc o las regiones reguladoras de las moléculas del receptor de uroquinasa. Por ejemplo, los agentes basados en ADN, tales como inhibidores antisentido y ribozimas, pueden utilizarse para marcar como diana tanto los intrones como los exones de los genes uPAR así como al nivel del ARN.

Alternativamente, los agentes pueden marcar como diana las moléculas del receptor de uroquinasa basándose en las secuencias de aminoácidos que incluyen las partes y/o las estructuras proteicas tridimensionales de las moléculas del receptor de uroquinasa. Los agentes basados en proteínas, tales como anticuerpos humanos, anticuerpos monoclonales no humanos y anticuerpos humanizados, pueden usarse para marcar como diana

40 específicamente epítopos diferentes en las moléculas del receptor de uroquinasa. Los péptidos o los peptidomiméticos pueden servir como inhibidores de alta afinidad para unirse específicamente al sitio activo de un uPAR particular, inhibiendo de esta manera la actividad *in vivo* del uPAR. Las moléculas pequeñas pueden emplearse también para marcar uPAR como diana, especialmente aquellas que tienen alta selectividad hacia las moléculas del receptor de uroquinasa.

45

Además de marcar como diana las moléculas del receptor de uroquinasa, también pueden usarse agentes que inhiben competitivamente las moléculas del receptor de uroquinasa compitiendo con los ligandos naturales del receptor de uroquinasa.

50

En otra realización, uno de los agentes puede ser un inhibidor de proteasa, específico para las moléculas del receptor de uroquinasa.

Anticuerpos: otras realizaciones se refieren a agentes de unión marcados que se unen a uPAR y afectan a la función de uPAR. Los ejemplos incluyen, anticuerpos monoclonales que se unen a uPAR y afectan a la función de uPAR. Otras realizaciones se refieren a anticuerpos anti-uPAR con alta afinidad de unión por uPAR, con la capacidad de neutralizar uPAR *in vitro* e *in vivo* y la capacidad de inhibir la expresión y/o la función de uPAR.

55

Otra realización preferida se refiere a anticuerpos anti-uPAR completamente humanos con propiedades deseables

desde una perspectiva terapéutica, incluyendo alta afinidad de unión por uPAR, la capacidad de neutralizar uPAR *in vitro* e *in vivo*.

5 En una realización, los anticuerpos se unen a uPAR con afinidades muy altas (Kd). Por ejemplo un anticuerpo humano, de conejo, de ratón, quimérico o humanizado que es capaz de unir uPAR con una Kd menor que, pero no limitada a, 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} o 10^{-11} M, o cualquier intervalo o valor en los mismos. Las mediciones de afinidad y/o avidéz pueden medirse por KinExA™ y/o BIACORE™.

10 Una realización incluye anticuerpos aislados, o fragmentos de aquellos anticuerpos, que se unen a uPAR. Como se sabe en la técnica, los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, policlonales, oligoclonales, monoclonales, quiméricos, humanizados y/o anticuerpos completamente humanos. Las realizaciones descritas en el presente documento también proporcionan células para producir estos anticuerpos.

15 Se apreciará que las realizaciones no se limitan a ninguna forma particular de un anticuerpo o procedimiento de generación o producción. Por ejemplo, el anticuerpo anti-uPAR puede ser un anticuerpo de longitud completa (por ejemplo, que tiene una región Fc humana intacta) o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o Dab (los Dab son las unidades de unión funcionales más pequeñas de los anticuerpos humanos). Además, el anticuerpo puede fabricarse a partir de un hibridoma que secreta el anticuerpo, o de una célula producida recombinantemente que se ha transformado o transfectado con un gen o genes que codifican el anticuerpo.

20 Otras realizaciones incluyen moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican cualquiera de los agentes de unión marcados como diana, anticuerpos o fragmentos de los mismos como se describe en el presente documento, vectores que tienen moléculas de ácidos nucleicos aislados que codifican anticuerpos anti-uPAR o una célula hospedadora transformada con cualquiera de tales moléculas de ácidos nucleicos. Además, una realización es un procedimiento para producir un anticuerpo anti-uPAR cultivando células hospedadoras en condiciones en las que una molécula de ácido nucleico se expresa para producir el anticuerpo seguido de la recuperación del anticuerpo. Nótese que las realizaciones también incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo que incluye secuencias de ácidos nucleicos optimizadas para aumentar rendimientos de anticuerpos o fragmentos de los mismos cuando se transfectan en células hospedadoras para la producción de anticuerpos.

30 Una realización adicional incluye un procedimiento para producir anticuerpos de alta afinidad a uPAR inmunizando a un mamífero con uPAR humano, o un fragmento del mismo, y una o más secuencias ortólogas o fragmentos de las mismas.

35 Otra realización incluye un procedimiento para diagnosticar enfermedades o afecciones en las que un anticuerpo preparado como se describe en el presente documento se utiliza para detectar el nivel de uPAR en una muestra de paciente. En una realización, la muestra del paciente es sangre o suero sanguíneo. En realizaciones adicionales, los procedimientos para la identificación de factores de riesgo, el diagnóstico de la enfermedad y la estadificación de la enfermedad se presentan implicando la identificación de la sobreexpresión de uPAR usando anticuerpos anti-uPAR.

40 1. Otra realización incluye un procedimiento para diagnosticar una afección asociada a la expresión de uPAR en una célula poniendo en contacto el suero o una célula con un agente de unión marcado como diana o un anticuerpo anti-uPAR y en lo sucesivo detectar la presencia de uPAR. Las afecciones preferidas incluyen enfermedad renal que comprende: enfermedades o trastornos de los podocitos, proteinuria, enfermedades glomerulares, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis segmental focal, enfermedad de cambio mínimo, síndromes nefróticos, pre-eclampsia, eclampsia, lesiones renales, enfermedades vasculares del colágeno, estrés, ejercicio agotador, proteinuria ortostática (postural) benigna, glomeruloesclerosis segmental focal (GEFS), nefropatía de IgA, nefropatía de IgM, glomerulonefritis membranoproliferativa, nefropatía membranosa, sarcoidosis, síndrome de Alport, diabetes mellitus, daño renal debido a fármacos, enfermedad de Fabry, infecciones, aminoaciduria, síndrome de Fanconi, nefroesclerosis hipertensa, nefritis intersticial, enfermedad de células falciformes, hemoglobinuria, mieloma múltiple, mioglobinuria, nefropatía diabética (ND), nefritis por lupus, Granulomatosis de Wegener o Enfermedad de Almacenamiento de Glucógeno Tipo 1.

50 En otra realización, la divulgación proporciona un kit de ensayo para detectar uPAR en tejidos de mamíferos, células o fluidos corporales para explorar enfermedades relacionadas con uPAR. El kit incluye un agente de unión marcado como diana o un anticuerpo que se une a uPAR y un medio para indicar la reacción del anticuerpo con uPAR, si está presente. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otra realización, el anticuerpo que se une a uPAR está marcado. En aún otra realización el anticuerpo es un anticuerpo primario sin marcar y el kit incluye además un medio para detectar el anticuerpo primario. En una realización, el medio para la detección incluye un segundo anticuerpo marcado que es una anti-iminoglobulina. El anticuerpo puede marcarse con un marcador seleccionado del grupo que consiste en un fluorocromo, una enzima, un radionúclido y un material radiopaco.

55 Otras realizaciones incluyen composiciones farmacéuticas que tienen una cantidad eficaz de un agente de unión marcado como diana o un anticuerpo anti-uPAR mezclado con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables. Aún en otras realizaciones, el agente de unión marcado como diana o el anticuerpo anti-uPAR, o un

fragmento del mismo, se conjuga a un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser, por ejemplo, una toxina o un radioisótopo.

1. Aún otra realización incluye un agente de unión marcado como diana o un anticuerpo anti-uPAR para tratar afecciones o enfermedades asociadas a la expresión de uPAR en un paciente, administrando al paciente una cantidad eficaz de un agente de unión marcado como diana o un anticuerpo anti-uPAR. El agente de unión marcado como diana o un anticuerpo anti-uPAR pueden administrarse solos, o pueden administrarse en combinación con anticuerpos adicionales o terapia de fármacos quimioterapéuticos o de radiación. Por ejemplo, puede administrarse una mezcla de anticuerpos uPAR monoclonales, oligoclonales o policlonales en combinación con un fármaco que muestra inhibir un estado de la enfermedad o síntomas asociados a la misma. El procedimiento puede realizarse *in vivo* y el paciente es preferentemente un paciente humano. En una realización preferida, el procedimiento se refiere al tratamiento de una enfermedad renal que comprende: enfermedades o trastornos de los podocitos, proteinuria, enfermedades glomerulares, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis segmental focal, enfermedad de cambio mínimo, síndromes nefróticos, pre-eclampsia, eclampsia, lesiones renales, enfermedades vasculares del colágeno, estrés, ejercicio agotador, proteinuria ortostática (postural) benigna, glomeruloesclerosis segmental focal (GEFS), nefropatía de IgA, nefropatía de IgM, glomerulonefritis membranoproliferativa, nefropatía membranosa, sarcoidosis, síndrome de Alport, diabetes mellitus, daño renal debido a fármacos, enfermedad de Fabry, infecciones, aminoaciduria, síndrome de Fanconi, nefroesclerosis hipertensa, nefritis intersticial, enfermedad de células falciformes, hemoglobinuria, mieloma múltiple, mioglobinuria, nefropatía diabética (ND), nefritis por lupus, Granulomatosis de Wegener o Enfermedad de Almacenamiento de Glucógeno Tipo 1.

En algunas realizaciones, el agente de unión marcado como diana o el anticuerpo anti-uPAR se administra a un paciente, seguido de la administración de un agente de limpieza para retirar el anticuerpo circulante en exceso de la sangre.

Agentes basados en ácidos nucleicos: Los agentes basados en ácidos nucleicos tales como las moléculas antisentido y las ribozimas pueden utilizarse para marcar como diana tanto los intrones como los exones de los genes uPAR así como al nivel del ARN para inhibir la expresión génica de los mismos, inhibiendo de esta manera la actividad del uPAR marcado como diana. Además, también pueden utilizarse moléculas de triple hélice para inhibir la actividad génica de uPAR. Tales moléculas pueden diseñarse para reducir o inhibir bien el gen uPAR tipo silvestre o bien, si es apropiado, la actividad génica uPAR mutante. Las técnicas para la producción y el uso de tales moléculas son bien conocidas por los expertos en la materia y se describen sucintamente a continuación.

En otra realización preferida, los genes uPAR se modulan marcando como diana secuencias de ácidos nucleicos implicadas en la expresión y/o la actividad de moléculas uPAR. Por ejemplo, las regiones reguladoras serían una diana para disminuir la expresión de uPAR.

Las moléculas de ARN y ADN antisentido actúan bloqueando directamente la traducción del ARNm hibridándose al ARN marcado como diana y previniendo la traducción proteica. Los enfoques antisentido implican el diseño de oligonucleótidos que son complementarios a un ARNm de un gen diana. Los oligonucleótidos antisentido se unirán a los transcritos de ARNm del gen diana complementario y prevendrán la traducción. La complementariedad absoluta, aunque preferida, no se requiere.

Una secuencia "complementaria" a una porción de un ARN, como se denomina en el presente documento, significa una secuencia que tiene suficiente complementariedad para ser capaz de hibridar con el ARN, formando un dúplex estable; en el caso de los ácidos nucleicos antisentido de doble cadena, puede ensayarse de esta manera una cadena sencilla del dúplex de ADN o puede ensayarse una formación de tríplex. La capacidad de hibridar dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto más largo es el ácido nucleico que hibrida, más desapareamientos de bases con un ARN contendrá y todavía formará un dúplex estable (o tríplex, según sea el caso). Un experto en la materia puede comprobar un grado tolerable de desapareamiento mediante el uso de procedimientos convencionales para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

Los oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' del mensaje, por ejemplo, la secuencia sin traducir 5' y que incluye el codón de iniciación AUG, debe trabajar más eficazmente inhibiendo la traducción. Sin embargo, las secuencias complementarias a las secuencias sin traducir 3' de los ARNm se han demostrado ser eficaces igualmente inhibiendo la traducción de los ARNm. Wagner (1994) Nature 372:333-335. Por ejemplo, los oligonucleótidos complementarios bien a las regiones 5' o 3' no traducidas no codificantes del gen humano o de ratón de las moléculas del receptor de uroquinasa podrían usarse en un enfoque antisentido para inhibir la traducción de los ARNm de las moléculas del receptor de uroquinasa endógenas.

En otra realización preferida, el enfoque antisentido puede usarse para marcar reguladores negativos diana de la expresión y/o la función de uPAR.

Los oligonucleótidos complementarios a la región 5' sin traducir del ARNm deben incluir el complemento del codón de inicio AUG. Los oligonucleótidos antisentido complementarios a las regiones que codifican ARNm son inhibidores

menos eficaces de la traducción pero podrían usarse de acuerdo con la divulgación. Ya se diseñen para hibridar a la región 5', 3' o codificante del ARNm del gen diana, los ácidos nucleicos antisentido son preferentemente al menos de seis nucleótidos de longitud y son más preferentemente oligonucleótidos que varían de 6 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En aspectos específicos el oligonucleótido tiene al menos 10 nucleótidos, preferentemente al menos 17 nucleótidos, más preferentemente al menos 25 nucleótidos y más preferentemente al menos 50 nucleótidos.

Alternativamente, las moléculas antisentido pueden diseñarse para marcar como diana la región traducida, es decir, el ADNc del gen uPAR. Por ejemplo, las moléculas de ARN antisentido que marcan como diana la secuencia de codificación completa o una porción de las moléculas del receptor de uroquinasa murino maduro (Kirschke y col. (2000) Euro. J. Cancer 36:787-795) pueden utilizarse para inhibir la expresión de las moléculas del receptor de uroquinasa y de esta manera reducir la actividad de su actividad enzimática. Además, un ADNc de las moléculas del receptor de uroquinasa de longitud completa o parcial puede subclonarse en un vector de expresión pcADN-3 en orientación inversa y una construcción tal puede transfectarse en células para producir poliARN antisentido para bloquear los transcritos endógenos de un uPAR, tales como moléculas del receptor de uroquinasa y de esta manera inhibir la expresión de uPAR.

Los estudios *in vitro* pueden realizarse para cuantificar la capacidad del oligonucleótido antisentido de inhibir la expresión génica. Se prefiere que estos estudios utilicen controles que distingan entre la inhibición del gen antisentido y los efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. También se prefiere que estos estudios comparen niveles del ARN diana o la proteína con aquellos de un ARN control o proteína internos. Adicionalmente, se prevé que los resultados obtenidos usando el oligonucleótido antisentido se comparen con aquellos obtenidos usando un oligonucleótido control. Se prefiere que el oligonucleótido control sea de aproximadamente la misma longitud que el oligonucleótido de prueba y que la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido difiera de la secuencia antisentido no más de lo necesario para prevenir la hibridación específica a la secuencia diana.

Los oligonucleótidos pueden ser ADN o ARN o mezclas químicas o derivados o versiones modificadas de los mismos, de cadena sencilla o de doble cadena. El oligonucleótido puede modificarse en el resto de base, el resto de azúcar o el esqueleto fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, la hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos adjuntos tales como péptidos o agentes que faciliten el transporte a través de las membranas celulares (Véase, por ejemplo, Letsinger (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86:6553-6556) o la barrera hematoencefálica, agentes de escisión activada por hibridación. Véase, por ejemplo, Krol (1988) Bio Techniques 6:958-976 o agentes intercalantes. Véase, por ejemplo, Zon (1988) Pharm. Res. 5:539-549. El oligonucleótido puede conjugarse con otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente de reticulado activado por hibridación, agente de transporte, agente de escisión activada por hibridación, etc.

El oligonucleótido antisentido puede comprender al menos un resto de base modificada que se selecciona del grupo que consiste en, pero no estando limitado a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, β -D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, β -D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina.

El oligonucleótido antisentido puede comprender al menos un resto de azúcar modificado que se selecciona del grupo que consiste en, pero no estando limitado a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

En otra realización más, el oligonucleótido antisentido comprende al menos un esqueleto fosfato modificado seleccionado del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforoamidotioato, un fosforoamidato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un fosfotriéster de alquilo y un formacetal o un análogo de los mismos.

Las moléculas de ribozima diseñadas para escindir catalíticamente los transcritos de ARNm del gen diana pueden usarse también para prevenir la traducción del ARNm del gen diana y, por lo tanto, la expresión del producto génico diana. Véase, por ejemplo Sarver y col. (1990) Science 247:1222-1225.

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica del ARN. El mecanismo de la acción de las ribozimas implica la hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima al ARN diana complementario, seguido de un evento de escisión endonucleolítica. La composición de las moléculas de ribozima debe incluir una o más secuencias complementarias al ARNm del gen diana y debe incluir la secuencia catalítica bien conocida responsable de la escisión del ARNm.

Aunque las ribozimas que escinden ARNm en las secuencias de reconocimiento específicas de sitio pueden usarse para destruir el ARNm del gen diana, se prefiere el uso de ribozimas cabeza de martillo. Las ribozimas cabeza de martillo escinden ARNm en localizaciones dictadas por regiones que flanquean que forman pares de bases

complementarios al ARNm diana. El único requisito es que el ARNm diana tenga la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y la producción de ribozimas cabeza de martillo se conoce bien en la técnica.

5 La expresión génica de uPAR endógeno también puede reducirse inactivando o "desactivando genes" del gen uPAR marcado como diana o su promotor usando recombinación homóloga marcada como diana. Smithies y col. (1985) Nature 317:230-234; Thomas y Capecchi, (1987) Cell 51:503-512; y Thompson y col. (1989) Cell 5:313-321.

10 Alternativamente, la expresión génica de uPAR endógeno puede reducirse marcando como diana secuencias de desoxirribonucleótido complementarias a la región reguladora del gen uPAR (es decir, el promotor del gen diana y/o los potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que prevengan la transcripción del gen diana en las células diana en el cuerpo. Véase generalmente, Helene (1991) Anticancer Drug Des. 6:569-584; Helene y col. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:27-36; y Maher (1992) Bioassays 14:807-815.

15 Las moléculas de ácidos nucleicos a usarse en la formación de triple hélice para la inhibición de la transcripción deben ser de cadena sencilla y compuestas por desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos debe diseñarse para promover la formación de la triple hélice a través de reglas de apareamiento de bases de Hoogsteen, que generalmente requieren que estén presentes extensiones considerables bien de purinas o bien de pirimidinas en una hebra de un dúplex. Las secuencias de nucleótidos pueden estar basadas en pirimidinas, que resultarán en tripletes TAT y CGC a través de las tres hebras asociadas de la triple hélice resultante. Las moléculas ricas en pirimidina proporcionan complementariedad de bases a una región rica en purina de una única hebra del dúplex en una orientación paralela a esa hebra. Además, pueden elegirse moléculas de ácido nucleico que son ricas en purina, por ejemplo, contienen una extensión de restos de G. Estas moléculas formarán una triple hélice con un dúplex de ADN que es rico en pares GC, en los que la mayoría de restos purina se localizan en una única hebra del dúplex marcado como diana, dando como resultado tripletes GGC a través de las tres cadenas en el triplex.

Biomarcadores

25 En una realización preferida, un biomarcador para el diagnóstico de una enfermedad o trastorno caracterizados por proteinuria y/o la identificación de individuos en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno caracterizados por proteinuria comprende: uPAR, dinamina, sinaptopodina, variantes, mutantes o fragmentos de los mismos.

Los biomarcadores pueden aumentar o disminuir la expresión entre sí. El panel de perfiles de expresión de biomarcadores se compara con los controles normales. En otros casos, la localización intra-celular cambia con el avance de la enfermedad.

30 En otra realización preferida, la identificación de un individuo en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno caracterizados por proteinuria detecta al menos un biomarcador o fragmentos del mismo.

En otra realización preferida, el avance de la enfermedad o trastorno caracterizados por proteinuria se correlaciona con un aumento en uPAR.

Agentes terapéuticos candidatos:

35 En una realización preferida, los procedimientos (también denominados en el presente documento "ensayos de exploración") se proporcionan para identificar moduladores, es decir, compuestos o agentes candidatos o de prueba (por ejemplo, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, peptoides, moléculas pequeñas, análogos u otros fármacos) que modulan la expresión de uPAR, la degradación de la función y/o directamente sobre la actividad o la expresión de las moléculas del receptor de uroquinasa o las rutas de síntesis de las mismas. Los compuestos identificados de esta manera pueden usarse para modular la actividad de productos génicos diana, prolongar la vida media de una proteína o péptido, regular la división celular, etc., en un protocolo terapéutico, para elaborar la función biológica del producto génico diana o para identificar los compuestos que interrumpen las interacciones génicas diana normales.

40 En otra realización preferida, se usa un ensayo de detección de alto rendimiento (HTS) para detectar una biblioteca diversa de compuestos miembros. Los "compuestos" o "agentes terapéuticos candidatos" o "agentes candidatos" pueden ser cualquier molécula orgánica, inorgánica, pequeña, proteína, anticuerpo, aptámero, molécula de ácido nucleico o compuesto sintético.

50 En otra realización preferida, los agentes candidatos modulan enzimas uPAR, precursores o moléculas implicados en las rutas. Preferentemente, la enzima son moléculas del receptor de uroquinasa. Estas enzimas pueden estar implicadas en diversas rutas bioquímicas tales como rutas sintéticas, rutas de degradación, por ejemplo ubiquitina, rutas enzimáticas, rutas de tráfico de proteínas, rutas metabólicas, rutas de transducción de señales y similares.

En otra realización preferida, el ensayo de detección de alto rendimiento identifica agentes candidatos que marcan como diana y modulan las rutas implicadas en la expresión patológica o la actividad de las moléculas del receptor de uroquinasa. Los agentes candidatos serían útiles en el desarrollo y la identificación de agentes novedosos para el tratamiento de enfermedades o trastornos de los podocitos, tales como, por ejemplo, proteinuria.

En una realización, la divulgación proporciona ensayos para detectar compuestos candidatos o de ensayo que modulan la degradación, la tasa de degradación, la actividad, la expresión y/o la función de moléculas uPAR, incluyendo por ejemplo uPAR circulante.

5 En otra realización, la divulgación proporciona ensayos para detectar compuestos candidatos o de ensayo que se unen a o modulan una actividad de la proteína o el polipéptido de moléculas del receptor de uroquinasa o una porción biológicamente activa de los mismos, mutantes o fragmentos o proteínas de fusión de los mismos.

10 Los agentes candidatos incluyen numerosas clases químicas, aunque típicamente son compuestos orgánicos que incluyen compuestos orgánicos pequeños, ácidos nucleicos que incluyen oligonucleótidos y péptidos. Los compuestos orgánicos pequeños pueden tener adecuadamente por ejemplo un peso molecular de más de aproximadamente 40 o 50 aunque menos de aproximadamente 2.500. Los agentes candidatos pueden comprender grupos químicos funcionales que interactúan con proteínas y/o ADN.

15 Los compuestos de ensayo pueden obtenerse usando cualquiera de los enfoques numerosos en los procedimientos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, incluyendo, bibliotecas biológicas; bibliotecas peptoides (bibliotecas de moléculas que tienen las funcionalidades de péptidos, pero con un novedoso esqueleto no peptídico que es resistente a la degradación enzimática pero sin embargo se mantienen bioactivos; véase, por ejemplo, Zuckermann, R. N. y col. (1994) J. Med. Chem. 37:2678-85); bibliotecas de fase sólida o de fase en solución paralelas espacialmente direccionables; procedimientos de bibliotecas sintéticas que requieren desconvolución; el procedimiento de biblioteca de una perla un compuesto; y procedimientos de bibliotecas sintéticas que usan selección por cromatografía de afinidad. Los enfoques de biblioteca biológica y de biblioteca peptoides se limitan a bibliotecas peptídicas, mientras que los otras cuatro enfoques son aplicables a péptidos, bibliotecas de oligómeros no peptídicos o de pequeñas moléculas de compuestos (Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12:145).

20 Los ejemplos de procedimientos para la síntesis de bibliotecas moleculares pueden encontrarse en la técnica, por ejemplo en: DeWitt y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:6909; Erb y col. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91:11422; Zuckermann y col. (1994). J. Med. Chem. 37:2678; Cho y col. (1993) Science 261:1303; Carrell y col. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carrell y col. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; y Gallop y col. (1994) J. Med. Chem. 37:1233).

25 Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (por ejemplo, Houghten (1992) Biotechniques 13:412-421), o sobre perlas (Lam (1991) Nature 354:82-84), chips (Fodor (1993) Nature 364:555-556), bacterias (Ladner, Pat. de EE.UU. N.º 5.223.409), esporas (Ladner Pat. de EE.UU. N.º 5.223.409), plásmidos (Cull y col. (1992) Proc Nat'l Acad Sci USA 89:1865-1869) o en fagos (Scott and Smith (1990) Science 249:386-390; Devlin (1990) Science 249:404-406; Cwirla y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6378-6382; Felici (1991) J. Mol. Biol. 222:301-310; Ladner *supra*).

35 En otra realización preferida, el agente terapéutico candidato comprende, proteínas, péptidos, moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas, moléculas de ácidos nucleicos y similares. Estas moléculas pueden ser naturales, por ejemplo de plantas, hongos, bacterias etc., o pueden sintetizarse o ser sintéticas.

40 Un compuesto prototipo puede esperarse que tenga actividad terapéutica basado en cualquier información disponible para el experto. Por ejemplo, un compuesto prototipo puede esperarse que tenga actividad terapéutica basado en la información contenida en la Physician's Desk Reference. Además, a modo de ejemplo no limitante, un compuesto puede esperarse que tenga actividad terapéutica basado en la experiencia de un clínico, la estructura del compuesto, los datos de relación de actividad estructural, CE₅₀, datos de ensayos, datos de ensayos de CI₅₀, estudios animales o clínicos o cualquier otra base o combinación de tales bases.

45 Un compuesto terapéuticamente activo es un compuesto que tiene actividad terapéutica, incluyendo por ejemplo, la capacidad de un compuesto para inducir una respuesta especificada cuando se administra a un sujeto o se ensaya *in vitro*. La actividad terapéutica incluye el tratamiento de una enfermedad o afección, incluyendo tanto el tratamiento profiláctico como el paliativo. El tratamiento de una enfermedad o afección puede incluir la mejora de una enfermedad o afección en cualquier cantidad, incluyendo la prevención, la paliación y la eliminación de la enfermedad o afección. La actividad terapéutica puede llevarse a cabo contra cualquier enfermedad o afección, incluyendo en una realización preferida contra cualquier enfermedad o trastorno asociados a la proteinuria. Para determinar la actividad terapéutica puede usarse cualquier procedimiento por el que pueda evaluarse la actividad terapéutica de un compuesto. Por ejemplo, pueden usarse procedimientos tanto *in vivo* como *in vitro*, incluyendo por ejemplo, evaluación clínica, ensayos de CE₅₀ y CI₅₀ y curvas de respuesta a dosis.

50 Los compuestos candidatos para su uso con un ensayo o identificados por ensayos como agentes farmacológicos útiles pueden ser agentes farmacológicos ya conocidos en la técnica o variaciones de los mismos o pueden ser compuestos previamente desconocidos que tengan cualquier actividad farmacológica. Los compuestos candidatos pueden ser de origen natural o diseñarse en el laboratorio. Los compuestos candidatos pueden comprender un diastereómero único, más de un diastereómero o un único enantiómero, o más de un enantiómero.

Los compuestos candidatos pueden aislarse, de microorganismos, animales o plantas, por ejemplo, y pueden producirse recombinantemente o sintetizarse por procedimientos químicos conocidos en la técnica. Si se desea, los

compuestos candidatos pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos procedimientos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitado a, bibliotecas biológicas, bibliotecas de fase sólida o de fase en solución paralelas espacialmente direccionables, procedimientos de bibliotecas sintéticas que requieren desconvolución, el procedimiento de biblioteca de "una perla un compuesto" y procedimientos de bibliotecas sintéticas que usan selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de biblioteca biológica se limita a bibliotecas peptídicas. Los otros cuatro enfoques son aplicables a polipéptidos, bibliotecas de oligómeros no peptídicos o de pequeñas moléculas de compuestos son enfoques preferidos. Véase Lam, *Anticancer Drug Des.* 12: 145-167 (1997).

En una realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento para identificar un compuesto candidato como un profármaco adecuado. Un profármaco adecuado incluye cualquier pro-fármaco que pueda identificarse por el procedimiento. Cualquier procedimiento evidente al experto puede usarse para identificar un compuesto candidato como un profármaco adecuado.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos para detectar compuestos candidatos para la adecuabilidad como agentes terapéuticos. La detección de la adecuabilidad de los agentes terapéuticos puede incluir la evaluación de uno, algunos o muchos criterios con respecto al compuesto que puede afectar la capacidad del compuesto como agente terapéutico. Los factores tales como, por ejemplo, eficiencia, seguridad, eficacia, retención, localización, selectividad del tejido, degradación o persistencia intracelular pueden considerarse. En una realización, se proporciona un procedimiento de detección de compuestos candidatos para su adecuación como agentes terapéuticos, donde el procedimiento comprende proporcionar un compuesto candidato identificado como un profármaco adecuado, determinar la actividad terapéutica del compuesto candidato y determinar la persistencia intracelular del compuesto candidato. La persistencia intracelular puede medirse por cualquier técnica evidente al experto en la materia, tal como por ejemplo por trazador radiactivo, marcaje de isótopos pesados o CLEM.

Al detectar compuestos para su adecuación como agentes terapéuticos, se evalúa la persistencia intracelular del compuesto candidato. En una realización preferida, los agentes se evalúan para su capacidad de modular el pH intracelular pueden comprender, por ejemplo, la evaluación del pH intracelular durante un periodo de tiempo en respuesta a un agente terapéutico candidato. En una realización preferida, se determina el pH intra-podocito en presencia o ausencia del compuesto terapéutico candidato en un tejido humano. Puede usarse cualquier técnica conocida por el experto en la materia para determinar el pH intracelular en la presente invención. Véase, también, los detalles experimentales en la sección de ejemplos que sigue.

Un aspecto adicional se refiere a procedimientos para inhibir la actividad de una afección o enfermedad asociadas a la proteinuria que comprende la etapa de tratar una muestra o un sujeto que se creen que tiene una enfermedad o afección con un profármaco identificado por un compuesto de la divulgación. Las composiciones de la divulgación actúan como identificadores de profármacos que tienen actividad terapéutica contra una enfermedad o afección. En un aspecto preferido, las composiciones de la divulgación actúan como identificadores para fármacos que muestran actividad terapéutica contra afecciones que incluyen por ejemplo asociadas a proteinuria.

En una realización, un ensayo de detección es un ensayo a base de células en el que se mide la actividad de las moléculas del receptor de uroquinasa contra un aumento o disminución de los valores de pH en las células. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular el pH y determinar la actividad de las moléculas del receptor de uroquinasa, por diversos procedimientos, incluyendo por ejemplo, fluorescencia, ensayos proteicos, transferencias y similares. La célula, por ejemplo, puede ser de origen mamífero, por ejemplo, humano.

En otra realización preferida, el ensayo de detección es un ensayo de detección de alto rendimiento. La capacidad de un compuesto para modular la degradación de uPAR, la expresión, la función etc. y/o modular la expresión de las moléculas del receptor de uroquinasa y/o la actividad pueden evaluarse como se describe en detalle en los ejemplos que siguen.

En otra realización preferida, las formas solubles y/o unidas a membrana de proteínas aisladas, mutantes o porciones biológicamente activas de las mismas, pueden usarse en los ensayos si se desea. Cuando se usan formas unidas a membrana de la proteína, puede ser deseable utilizar un agente solubilizante. Los ejemplos de agentes solubilizantes incluyen detergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, TRITON™ X-100, TRITON™ X-114, THESIT™, Isotridecilo(éter de etilenglicol)_n, sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilaminio]-1-propano (CHAPS), sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilaminio]-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO) o sulfonato de N-dodecil=N,N-dimetil-3-amonio-1-propano.

Los ensayos libres de células también pueden usarse e implican una mezcla de reacción que incluye moléculas del receptor de uroquinasa y el compuesto de ensayo en condiciones y periodos de tiempo para permitir la medición de la actividad de las moléculas del receptor de uroquinasa en el tiempo, etc., en un intervalo de valores y concentraciones de agentes de ensayo.

La actividad enzimática también puede detectarse, por ejemplo, usando transferencia de energía de fluorescencia (FET) (véase, por ejemplo, Lakowicz y col., Pat. de EE.UU. N.º 5.631.169; Stavrianopoulos, y col., Pat. de EE.UU.

N.º 4.868.103). Una etiqueta de fluoróforo en la primera molécula "donadora" se selecciona de tal manera que su energía de fluorescencia emitida se absorberá por una etiqueta fluorescente en una segunda molécula "aceptora", que a su vez es capaz de fluorescer debido a la energía absorbida. Alternativamente, la molécula de proteína "donadora" puede utilizar simplemente la energía fluorescente natural de los restos de triptófano. Las etiquetas se eligen de manera que emitan diferentes longitudes de onda, de tal manera que la etiqueta de la molécula "aceptora" pueda diferenciarse de aquella de la "donadora". Ya que la eficacia de la transferencia de energía entre las etiquetas se relaciona con la distancia que separa las moléculas, puede evaluarse la relación espacial entre las moléculas. En una situación en la que se da la unión entre las moléculas, la emisión fluorescente de la etiqueta de la molécula "aceptora" en el ensayo debe ser máxima. Un caso de unión FET puede medirse adecuadamente a través de medios de detección fluorométricos convencionales bien conocidos en la técnica (por ejemplo, usando un fluorímetro).

En otra realización, la determinación de la capacidad de la enzima (por ejemplo moléculas del receptor de uroquinasa) a unirse o "acoplarse" a su sitio de unión en una molécula diana (uPAR) puede lograrse usando Análisis de Interacción Biomolecular (BIA) a tiempo real (véase, por ejemplo, Sjolander, S. y Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345 y Szabo y col. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705). La "resonancia de plasmón de superficie" o "BIA" detecta las interacciones bioespecíficas a tiempo real, sin marcar ninguno de los que interactúan (por ejemplo, BLAcore). Los cambios en la masa en la superficie de unión (indicativos de un caso de unión) resultan en alteraciones del índice refractario de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de la resonancia de plasmón de superficie (RPS)), dando como resultado una señal detectable que puede usarse como una indicación de reacciones a tiempo real entre moléculas biológicas.

En una realización, el producto diana o la sustancia de ensayo se ancla en una fase sólida. El producto diana/compuesto de ensayo anclado en la fase sólida puede detectarse al final de la reacción. Preferentemente, el producto diana puede anclarse sobre una superficie sólida y el compuesto de ensayo, (que no está anclado), puede etiquetarse, bien directa o indirectamente, con etiquetas detectables analizadas en el presente documento.

Los agentes candidatos pueden obtenerse a partir de una amplia diversidad de fuentes incluyendo bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, numerosos medios están disponibles para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia diversidad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos aleatorizados. Alternativamente, las bibliotecas de compuestos naturales en forma de por ejemplo extractos bacterianos, fúngicos y animales están disponibles o se producen fácilmente.

Bibliotecas químicas: Los desarrollos en la química combinatoria permiten la síntesis rápida y económica de cientos a miles de compuestos discretos. Estos compuestos se disponen típicamente en bibliotecas de tamaños moderados de pequeñas moléculas diseñadas para la detección eficaz. Los procedimientos combinatorios pueden usarse para generar bibliotecas sin sesgar adecuadas para la identificación de nuevos compuestos. Además, pueden generarse bibliotecas más pequeñas menos diversas que descenden de un único compuesto parental con una actividad biológica previamente determinada. En cada caso, la carencia de sistemas de detección eficaces para marcar como diana específicamente las moléculas biológicas terapéuticamente relevantes producidas por química de combinación tales como inhibidores de enzimas importantes obstaculiza el uso óptimo de estos recursos.

Una biblioteca química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados bien por síntesis química o síntesis biológica, combinando un número de "bloques de construcción" químicos, tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal, tal como una biblioteca de polipéptidos, se forma combinando un conjunto de bloques de construcción químicos (aminoácidos) en un gran número de combinaciones y potencialmente de cualquier forma posible, para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico). Pueden sintetizarse millones de compuestos químicos a través de tal mezcla combinatoria de bloques de construcción químicos.

Una "biblioteca" puede comprender de 2 a 50.000.000 diversos compuestos miembros. Preferentemente, una biblioteca comprende al menos 48 compuestos diversos, preferentemente 96 o más compuestos diversos, más preferentemente 384 o más compuestos diversos, más preferentemente, 10.000 o más compuestos diversos, preferentemente más de 100.000 miembros diversos y lo más preferentemente más de 1.000.000 compuestos miembros diversos. Por "diverso" se entiende que más del 50 % de los compuestos en una biblioteca tienen estructuras químicas que no son idénticas a ningún otro miembro de la biblioteca. Preferentemente, más del 75 % de los compuestos en una biblioteca tienen estructuras químicas que no son idénticas a ningún otro miembro de la colección, más preferentemente más del 90 % y lo más preferentemente más de aproximadamente el 99 %.

La preparación de bibliotecas químicas combinatorias se conoce bien por aquellos expertos en la materia. Para revisiones, véase Thompson y col., Synthesis and application of small molecule libraries, Chem Rev 96:555-600, 1996; Kenan y col., Exploring molecular diversity with combinatorial shape libraries, Trends Biochem Sci 19:57-64, 1994; Janda, Tagged versus untagged libraries: methods for the generation and screening of combinatorial chemical libraries, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 91:10779-85, 1994; Lebl y col., One-bead-one-structure combinatorial libraries, Biopolymers 37:177-98, 1995; Eichler y col., Peptide, peptidomimetic, and organic synthetic combinatorial libraries, Med Res Rev. 15:481-96, 1995; Chabala, Solid-phase combinatorial chemistry and novel tagging methods for identifying leads, Curr Opin Biotechnol. 6:632-9, 1995; Dolle, Discovery of enzyme inhibitors through combinatorial

chemistry, *Mol Divers.* 2:223-36, 1997; Fauchere y col., Peptide and nonpeptide lead discovery using robotically synthesized soluble libraries, *Can J. Physiol Pharmacol.* 75:683-9, 1997; Eichler y col., Generation and utilization of synthetic combinatorial libraries, *Mol Med Today* 1: 174-80, 1995; y Kay y col., Identification of enzyme inhibitors from phage-displayed combinatorial peptide libraries, *Comb Chem High Throughput Screen* 4:535-43, 2001.

- 5 Pueden usarse también otras químicas para generar bibliotecas de diversidad química. Tales químicas incluyen, pero no se limitan a, peptoides (Publicación PCT N.º WO 91/19735); péptidos codificados (Publicación PCT WO 93/20242); bio-oligómeros aleatorios (Publicación PCT N.º WO 92/00091); benzodiazepinas (Pat. de EE.UU. N.º 5.288.514); diversómeros, tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs, y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.*, 90:6909-6913 (1993)); polipéptidos vinílogos (Hagihara, y col., *J. Amer. Chem. Soc.* 114:6568 (1992));
 10 peptidomiméticos no peptídicos con armazón de β -D-glucosa (Hirschmann, y col., *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:9217-9218 (1992)); síntesis orgánicas análogas de pequeñas bibliotecas de compuestos (Chen, y col., *J. Amer. Chem. Soc.*, 116:2661 (1994)); oligocarbamatos (Cho, y col., *Science*, 261:1303 (1993)); y/o peptidil fosfonatos (Campbell, y col., *J. Org. Chem.* 59:658 (1994)); bibliotecas de ácidos nucleicos (véase, Ausubel, Berger y Sambrook, todos *supra*); bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (véase, por ejemplo, Pat. de EE.UU. N.º 5.539.083); bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn, y col., *Nature Biotechnology*, 14(3):309-314 (1996) y PCT/US96/10287);
 15 bibliotecas de carbohidratos (véase, por ejemplo, Liang, y col., *Science*, 274:1520-1522 (1996) y Pat. de EE.UU. N.º 5.593.853); bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véase, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum C&E News, 18 de enero, página 33 (1993); isoprenoides (Pat. de EE.UU. N.º 5.569.588); tiazolidinonas y metatiazanonas (Pat. de EE.UU. N.º 5.549.974); pirrolidinas (Pat. de EE.UU. N.º 5.525.735 y 5.519.134); compuestos morfolino (Pat. de EE.UU. N.º 5.506.337); benzodiazepinas (Pat. de EE.UU. N.º 5.288.514); y similares.

Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias están disponibles en el mercado (véase, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem. Tech, Louisville Ky., Symphony, Rainin, Woburn, Mass., 433A Applied Biosystems, Foster City, Calif., 9050 Plus, Millipore, Bedford, Mass.). Además, numerosas bibliotecas combinatorias están en sí mismas disponibles en el mercado (véase, por ejemplo, ComGenex, Princeton, N.J., Asinex, Moscú, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, Mo., ChemStar, Ltd., Moscú, RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa., Martek Bio sciences, Columbia, Md., etc.).

Moléculas Pequeñas: Los compuestos de ensayo de moléculas pequeñas pueden ser inicialmente miembros de una biblioteca química orgánica o inorgánica. Como se usa en el presente documento, "moléculas pequeñas" se refiere a pequeñas moléculas orgánicas o inorgánicas de peso molecular por debajo de aproximadamente 3.000 Daltons. Las moléculas pequeñas pueden ser productos naturales o miembros de una biblioteca química combinatoria. Debe usarse un conjunto de moléculas diversas para cubrir una diversidad de funciones tales como carga, aromaticidad, enlaces de hidrógeno, flexibilidad, tamaño, longitud de cadena lateral, hidrofobicidad y rigidez. Las técnicas combinatorias adecuadas para sintetizar pequeñas moléculas se conocen en la técnica, por ejemplo, como se ejemplifica por Obrecht y Villalgorido, *Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries*, Pergamon-Elsevier Science Limited (1998), e incluyen todas aquellas tales como las técnicas de "dividir y poner en conjunto" o síntesis "paralela", técnicas de fase sólida y fase en solución y técnicas codificantes (véase, por ejemplo, Czarnik, *Curr. Opin. Chem. Bio.*, 1:60 (1997)). Además, un número de bibliotecas de moléculas pequeñas está disponible en el mercado.

El procedimiento entero puede estar completamente automatizado. Por ejemplo, el muestreo de los materiales de muestra puede lograrse con una pluralidad de etapas, que incluyen extraer una muestra de un envase sencillo y transportar al menos una porción de la muestra extraída a la plataforma de prueba. El muestreo también puede incluir etapas adicionales, en particular y preferentemente, etapas de preparación de la muestra. En un enfoque, solamente una muestra se extrae en la sonda auto-muestreadora en un momento y solamente una muestra reside en la sonda en un momento. En otras realizaciones, pueden meterse múltiples muestras en la sonda auto-muestreadora separadas por disolventes. Aún en otras realizaciones, pueden usarse múltiples sondas en paralelo para el auto-muestreo.

En el caso general, el muestreo puede efectuarse manualmente, de forma semi-automática o de forma automática. Una muestra puede extraerse de un envase de muestras manualmente, por ejemplo, con una pipeta o una sonda manual tipo jeringa y después se transporta manualmente a un puerto de carga o un puerto de inyección de un sistema de caracterización. En un protocolo semi-automático, algún aspecto del protocolo se efectúa automáticamente (por ejemplo, transporte), pero algunos otros aspectos requieren la intervención manual (por ejemplo, la extracción de las muestras de una línea de control del procedimiento). Preferentemente, sin embargo, la muestra o muestras se extraen de un envase de muestras y se transportan al sistema de caracterización, de forma completamente automatizada - por ejemplo, con un auto-muestreador.

En una realización, el auto-muestreo puede realizarse usando un microprocesador que controla un sistema automatizado (por ejemplo, un brazo de robot). Preferentemente, el microprocesador es programable por el usuario para acomodar bibliotecas de muestras que tienen disposiciones variables de muestras (por ejemplo, matrices cuadradas con "n-filas" por "n-columnas", matrices rectangulares con "n-filas" por "m-columnas", matrices redondas, matrices triangulares con lados equiláteros "r" por "r", matrices triangulares con lados isósceles "r" por "s" por "s", etc., donde n, m, r y s son números enteros).

El muestreo automatizado de los materiales de muestra puede efectuarse opcionalmente con un auto-muestreador que tiene una sonda de inyección calentada (punta). Un ejemplo de un auto-muestreador tal se desvela en la Pat. de EE.UU. N.º 6.175.409 B1.

5 De acuerdo con la presente divulgación, uno o más sistemas, procedimientos o ambos se usan para identificar una pluralidad de materiales de muestra. Aunque son posibles sistemas y procedimientos manuales o semiautomatizados, se emplea preferentemente un sistema o procedimiento automatizado. Está disponible una diversidad de sistemas robóticos o automáticos para proporcionar mociones predeterminadas automática o programable para el manejo, poner en contacto, dispensar o manipular de otra manera los materiales en forma sólida, fluida líquida o gaseosa de acuerdo con un protocolo predeterminado. Tales sistemas pueden adaptarse o 10 aumentarse para incluir una diversidad de hardware, software o ambos para ayudar a los sistemas en la determinación de las propiedades mecánicas de los materiales. El hardware y el software para aumentar los sistemas robóticos puede incluir, pero no se limitan a, sensores, transductores, hardware de adquisición y manipulación de datos, software de adquisición y manipulación de datos y similares. Los sistemas robóticos ejemplares están disponibles en el mercado de CAVRO Scientific Instruments (por ejemplo, N.º de Modelo RSP9652) o BioDot (Microdrop Modelo 3000). 15

Generalmente, el sistema automatizado incluye un diseño de protocolo adecuado y un software de ejecución que puede programarse con información tal como síntesis, composición, información de localización u otra información con respecto a una biblioteca de materiales posicionada con respecto a un sustrato. El diseño de protocolo y el software de ejecución está típicamente en comunicación con el software de control del robot para controlar un robot u otro aparato o sistema automatizado. El diseño de protocolo y el software de ejecución está también en comunicación con el hardware/software para recoger datos de hardware de medición de respuesta. Una vez que los datos se recogen en la base de datos, el software analítico puede usarse para analizar los datos y más específicamente, para determinar las propiedades de los fármacos candidatos, o los datos pueden analizarse manualmente. 20

25 *Datos y análisis:* La práctica de la presente invención puede emplear también procedimientos de biología convencionales, software y sistemas. Los productos de software de ordenador incluyen típicamente medios legibles por ordenador que tienen instrucciones ejecutables en el ordenador para realizar las etapas lógicas del procedimiento. Los medios legibles por ordenador adecuados incluyen disquetes, CD-ROM/DVD/DVD-ROM, unidad de disco duro, memoria flash, ROM/RAM, cintas magnéticas y etc. Las instrucciones ejecutables por ordenador pueden escribirse en un lenguaje de ordenador adecuado o una combinación de varias lenguas. Los procedimientos de biología computacional básicos se describen en, por ejemplo Setubal y Meidanis y col., Introduction to Computational Biology Methods (PWS Publishing Company, Boston, 1997); Salzberg, Searles, Kasif, (Ed.), Computational Methods in Molecular Biology, (Elsevier, Amsterdam, 1998); Rashidi y Buehler, Bio-informatics Basics: Application in Biological Science and Medicine (CRC Press, London, 2000) y Ouelette and Bzevanis Bioinformatics: A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins (Wiley & Sons, Inc., 2a ed., 2001). Véase Pat. de EE.UU. N.º 6.420.108. 30 35

La presente invención puede hacer uso también de diversos productos de programas de ordenador y software para una diversidad de fines, tales como diseño de sondas, gestión de datos, análisis y funcionamiento de instrumentos. Véanse, las Pat. de EE.UU. N.º 5.593.839, 5.795.716, 5.733.729, 5.974.164, 6.066.454, 6.090.555, 6.185.561, 6.188.783, 6.223.127, 6.229.911 y 6.308.170. 40

Adicionalmente, la presente divulgación se refiere a realizaciones que incluyen procedimientos para proporcionar información genética sobre las redes tales como Internet.

Administración de composiciones a pacientes

45 Las composiciones o los agentes identificados por los procedimientos descritos en el presente documento pueden administrarse a animales incluyendo seres humanos en cualquier formulación adecuada. Por ejemplo, las composiciones para modular la degradación proteica pueden formularse en vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables tales como un suero salino fisiológico o una solución salina tamponada. Los vehículos y diluyentes adecuados pueden seleccionarse a base del modo y la vía de administración y la práctica farmacéutica convencional. Una descripción de vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables ejemplares, así como formulaciones farmacéuticas, puede encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto normativo en este campo, y en USP/NF. Pueden añadirse otras sustancias a las composiciones para estabilizar y/o conservar las composiciones. 50

Las composiciones para el uso de la invención pueden administrarse a animales por cualquier técnica convencional. Las composiciones pueden administrarse directamente a un sitio diana mediante, por ejemplo, transporte quirúrgico a un sitio diana interno o externo, o por catéter a un sitio accesible por un vaso sanguíneo. Otros procedimientos de transporte, por ejemplo, transporte liposómico o difusión desde un dispositivo impregnado con la composición, se conocen en la técnica. Las composiciones pueden administrarse en un único bolo, inyecciones múltiples o por infusión continua (por ejemplo, intravenosamente). Para administración parenteral, las composiciones se formulan preferentemente en una forma libre de pirógenos esterilizada. 55

Los compuestos pueden administrarse con una o más terapias. Los agentes quimioterapéuticos pueden administrarse en un régimen metronómico. Como se usa en el presente documento, terapia "metronómica" se refiere a la administración de dosis bajas continuas de un agente terapéutico.

5 La dosificación, la toxicidad y la eficiencia terapéutica de tales compuestos pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal al 50 % de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y los efectos terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren los compuestos que exhiben índices terapéuticos altos. Aunque pueden usarse compuestos que exhiben efectos secundarios tóxicos, debe llevarse cuidado diseñando un sistema de
10 transporte que marque como diana tales compuestos al sitio o el tejido afectado para minimizar el daño potencial a células no infectadas y, de esta manera, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en humanos. La dosificación de tales compuestos cae preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE_{50} con poca o sin toxicidad. La dosificación
15 puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el procedimiento de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente en ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye la CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición semi-máxima de los síntomas) como se determina en el cultivo
20 celular. Tal información puede usarse para determinar más precisamente las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento.

Como se define en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto (es decir, una dosificación eficaz) significa una cantidad suficiente para producir un resultado terapéuticamente (por ejemplo, clínicamente) deseable. Las composiciones pueden administrarse una de una o más veces al día a una o más veces
25 a la semana; incluyendo un día sí un día no. El experto en la materia apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y el tiempo requerido para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo pero no limitado a la gravedad de la enfermedad o el trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos puede incluir un único tratamiento o una serie de tratamientos.

30 *Formulación*

Donde sea posible que una composición se administre sola, es preferible presentarla como una formulación farmacéutica. El principio activo puede comprender, para administración tópica, del 0,001 % al 10 % p/p, por ejemplo, del 1 % al 2 % en peso de la formulación, aunque puede comprender como mucho un 10 % p/p pero preferentemente no en exceso del 5 % p/p y más preferentemente del 0,1 % al 1 % p/p de la formulación. Las
35 formulaciones tópicas de la presente invención, comprenden un principio activo junto con uno o más vehículo o vehículos aceptables para los mismos y opcionalmente cualquier otro principio o principios terapéuticos. El vehículo o vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la formulación y no deletéreos al receptor de los mismos.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semi-líquidas adecuadas para penetrar a través de la piel al sitio donde el tratamiento se requiere, tales como linimentos, lociones, cremas, pomadas o pastas y gotas adecuadas para la administración al ojo, el oído o la nariz. Las gotas de acuerdo con la presente invención pueden comprender soluciones o suspensiones acuosas u oleaginosas estériles y pueden prepararse disolviendo el principio activo en una solución acuosa adecuada de un agente bactericida y/o fungicida y/o cualquier otro conservante adecuado e incluyendo preferentemente un agente de superficie activa. La solución
45 resultante puede clarificarse y esterilizarse después por filtración y transferirse al recipiente por una técnica aséptica. Los ejemplos de agentes bactericidas y fungicidas adecuados para la inclusión en las gotas son nitrato o acetato fenilmercúrico (0,002 %), cloruro de benzalconio (0,01 %) y acetato de clorhexidina (0,01 %). Los disolventes adecuados para la preparación de una solución oleaginosa incluyen glicerol, alcohol diluido y propilenglicol.

Las lociones de acuerdo con la presente invención incluyen aquellas adecuadas para la aplicación a la piel o al ojo. Una loción ocular puede comprender una solución acuosa estéril que contiene opcionalmente un bactericida y puede prepararse por procedimientos similares a aquellos para la preparación de gotas. Las lociones o los linimentos para la aplicación a la piel pueden incluir también una gente para acelerar el secado y enfriar la piel, tales como un alcohol o una acetona y/o un humectador tal como glicerol o un aceite tal como aceite de ricino o aceite de araquís.

Las cremas, las pomadas o las pastas de acuerdo con la presente invención son formulaciones semi-sólidas del principio activo para aplicación externa. Pueden fabricarse mezclando el principio activo en forma finamente dividida o en polvo, solo o en solución o suspensión en un fluido acuoso o no acuoso, con la ayuda de una maquinaria adecuada, con una base grasa o no grasa. La base puede comprender hidrocarburos tales como parafina dura, blanda o líquida, glicerol, cera de abeja, un jabón metálico; un mucílago; un aceite de origen natural tal como almendra, maíz, araquís, aceite de ricino o de oliva; grasa de lana o sus derivados, o un ácido graso tal como ácido

esteárico u oleico, junto con un alcohol tal como propilenglicol o macrogeles. La formulación puede incorporar cualquier agente tensioactivo tal como un tensioactivo aniónico, catiónico o no iónico tal como ésteres de sorbitán o derivados de polioxietileno de los mismos. Pueden incluirse también agentes de suspensión tales como gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos tales como sílices silíceas y otros ingredientes tales como lanolina.

Las realizaciones de las composiciones y los procedimientos de la invención se ilustran en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Los siguientes Ejemplos no limitantes sirven para ilustrar realizaciones seleccionadas de la invención.

Ejemplo 1: uPAR soluble es un factor de recurrencia de la enfermedad glomerular

10 *Materiales y procedimientos:*

Anticuerpos: Anticuerpo integrina β_3 activo (AP5), (GTI); uPAR (FL-290) (Santa Cruz Biotechnology); anticuerpo monoclonal de ratón de sinaptopodina (G1), sinaptopodina de conejo policlonal (NT); kit de inmunoensayo uPAR humano Quantikina (R&D Systems); proteína suPAR.

15 *Animales y tratamientos:* Todos los estudios animales se aprobaron por el Subcommittee on Research Animal Care of the Massachusetts General Hospital, número de protocolo: 2004N000289/2. Los ratones *Plaur*^{-/-} se obtuvieron de la Universidad de Leuven, Bélgica; los ratones 57BL/6 se obtuvieron del Jackson Laboratory. Los modelos de ratón LPS se utilizaron como se ha descrito previamente (Reiser, J. y col., J. Clin Invest. 113, 1390-7 (2004)). El transporte de proteína suPAR *in vivo* se realizó con ratones hembra *Plaur*^{-/-} (n = 6) a través de la vena de la cola a 1 mg/kg de peso corporal. Los controles (n = 6) recibieron la misma cantidad de BSA. La orina se recogió antes y 8 h, 24 h
20 después de la inyección de suPAR o BSA. La concentración de proteína en la orina se determinó por ensayo Bradford (Sigma).

25 *Trasplante cruzado de riñón derecho:* Seis ratones hembra 57BL/6 y 6 ratones hembra *Plaur*^{-/-} de los mismos intervalos de edad y peso corporal (7-8 semanas, 15-18 g) se reclutaron aleatoriamente en este estudio. El riñón derecho de ratones *Plaur* se trasplantó en ratones 57BL/6 en el lado derecho y viceversa. El trasplante de riñón se realizó como se ha descrito previamente (Coffman, T. y col., J. Immunol. 151.425-435 (1993); Han, W.R., Murray-Segal, L.J. y Mottram, P.L. Microsurgery. 19, 272-274 (1999)). Después de recuperarse de la cirugía, los ratones se trataron aleatoriamente con LPS a 10 mg/kg de peso corporal, i.p. o la misma cantidad de PBS para el control. 24 h después de la inyección, los ratones se sacrificaron y el riñón se sacó para análisis adicionales.

30 *Pacientes:* Los pacientes recurrentes y no recurrentes de GEFS fueron del Centro de Trasplantes de Riñón en el Hospital General de Massachusetts y del Hospital Jackson Memorial. Se obtuvo el informe del consentimiento de los padres antes de reclutar y este estudio se aprobó por el Institutional Review Board respectivo.

Determinación de suPAR en suero: La concentración de suPAR en suero se midió por el kit de inmunoensayo de uPAR humano Quantikina siguiendo el protocolo del fabricante.

35 *Inmunocitoquímica:* Los podocitos se cultivaron como se ha informado previamente (Sever, S. y col. J Clin. Invest. 117,2095-2104 (2007)). Después del tratamiento, los podocitos completamente diferenciados se fijaron e inmunomarcaron como se describe.

Microscopio electrónico de transmisión (MET): El MET se realizó de acuerdo con los protocolos convencionales (Sever, S. y col., J Clin. Invest. 117, 2095-2104 (2007)).

40 *Análisis estadístico:* Los análisis estadísticos se realizaron usando un ensayo de la t de Student pareado o no pareado. La hipótesis nula se rechazó al nivel de 0,05. Los valores se presentan como Media \pm SD.

Resultados:

45 Se investigó el papel de la forma soluble de uPAR en la enfermedad renal proteinúrica. Primero se examinaron los efectos de la proteína suPAR purificada en podocitos cultivados. Los podocitos de ratón completamente diferenciados se trataron con suPAR humano durante 24 h a 1-5 μ g/ml y se tiñeron las células con AP5, un anticuerpo probado para la integrina $\alpha_v\beta_3$ activa. En contraste con las células control tratadas con PBS, que tenían tinción de AP5 despreciable, las células tratadas con proteína suPAR humana tenían una fuerte tinción de AP5 en la membrana, particularmente en el borde delantero (Figura 1A) indicando que la proteína suPAR activa la integrina $\alpha_v\beta_3$, similar a uPAR anclado a membrana.

50 A continuación se examinó el efecto de la proteína suPAR en el desarrollo de proteinuria. La proteína suPAR se transportó a ratones *Plaur*^{-/-} a través de la vena de la cola a 1 mg/kg de peso corporal. La orina se recogió antes de la inyección de suPAR (0 h), 8 h y 24 h después de la inyección y se midió la proteína total por el ensayo de Bradford. Como se ve en la Figura 1B, se observó un nivel aumentado de proteína en orina 8 h después de la inyección de suPAR y en las 24 h después del transporte de proteína suPAR, los ratones desarrollaron marcada

proteínuria. Por el contrario, los ratones control quienes recibieron la misma cantidad de albúmina de suero bovino (BSA) no desarrollaron ninguna proteínuria (Figura 1B). Para ver si se depositó algo de suPAR en el riñón, los ratones *Plaur^{-/-}* se sacrificaron y el riñón se sacó para criosección y se procesaron a inmunohistoquímica. Se encontró una expresión extensa de uPAR en los riñones tratados con transporte de proteína suPAR. La doble inmunotinción con sinaptopodina, un marcador de podocitos ampliamente usado, mostró que suPAR se localizó principalmente en los podocitos (Figura 1E). No hubo expresión de uPAR o depósito en los riñones control tratados con BSA (Figura 1E). Estos resultados evidencian que el transporte de la proteína suPAR podría depositarse en los podocitos y más importante podrían inducir la proteínuria en ratones *Plaur^{-/-}*. También se examinó la actividad de la integrina $\alpha_v\beta_3$ en podocitos de ratones 32837 a los que se había transportado proteína suPAR por doble inmunotinción con AP5 y anticuerpos de sinaptopodina y se descubrió que aumentó significativamente, en comparación con el control tratado con BSA, donde solo se observó integrina $\alpha_v\beta_3$ activa mínima en el riñón e incluso menos en los podocitos (Figura 1D). Este descubrimiento es coherente con el trabajo *in vitro* anterior, evidenciando que suPAR, como su forma de membrana, activa la integrina $\alpha_v\beta_3$ y después la GT-Pasa pequeña, Rac, posiblemente a través de una ruta que implica DOC180.

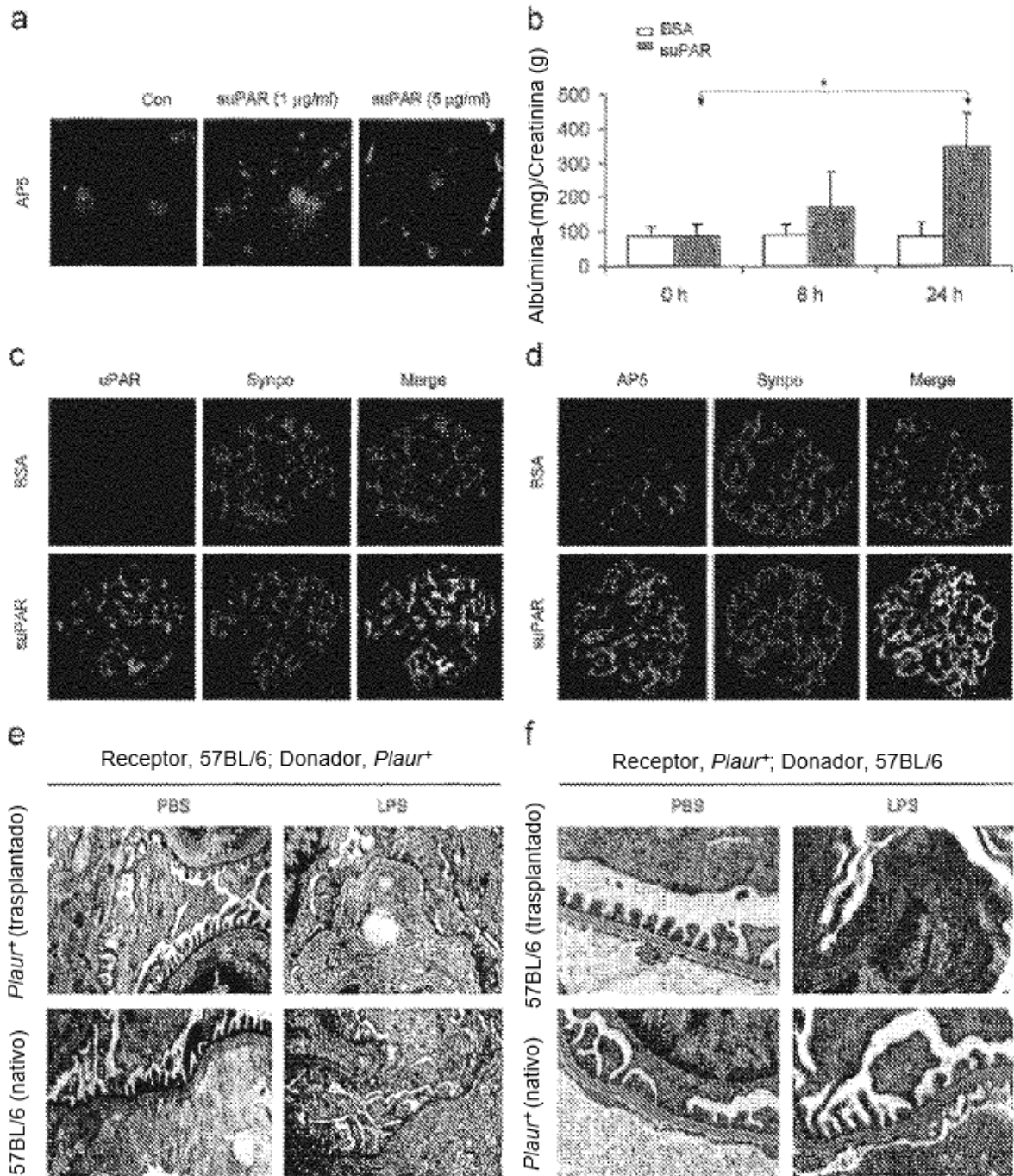
Para confirmar además el papel de suPAR en el desarrollo de proteínuria y la enfermedad renal, se realizó un trasplante cruzado y se examinó el efecto de la forma soluble endógena de uPAR. El riñón derecho se escindió de ratones 57BL/6 normales y se trasplantó en *Plaur^{-/-}* en el lado derecho y viceversa (Figura 3A). Los ratones se eligieron aleatoriamente para recibir lipopolisacárido (LPS) para inducir proteínuria o PBS para el control después de recuperarse de la cirugía. Para los ratones 57BL/6 tratados con LPS, se encontró borrado de proceso de pies significativo en el riñón nativo de 57BL/6 (Figura 1E) y más interesantemente, se observó un borrado de proceso de pies masivo cuando se observó en el riñón *Plaur^{-/-}* trasplantado igualmente (Figura 1E). Para los ratones 57BL/6 tratados con PBS sin embargo, no fue remarcable el borrado de proceso de pies bien en riñón trasplantado *Plaur^{-/-}* o riñón nativo 57BL/6 (Figura 1E). Para los ratones *Plaur^{-/-}* tratados con LPS, el borrado de proceso de pies se observó fácilmente en el riñón 57BL/6 trasplantado pero no en el riñón *Plaur^{-/-}* nativo (Figura 1F). Por el contrario, no fue remarcable el borrado de proceso de pies bien en riñón nativo *Plaur^{-/-}* o riñón Trasplantado 57BL/6 de ratones control PBS (Figura 1F). Estos datos puestos juntos evidencian que el borrado de proceso de pies observado en el riñón trasplantado *Plaur^{-/-}* en los ratones 57BL/6 tratados con LPS no se debió al efecto mismo de la cirugía, ni se debió al efecto directo del LPS, sino a algunos factores extra-renales circulantes. Para determinar si suPAR es responsable de los fenómenos, las secciones se inmunotifieron tanto de riñón nativo como trasplantado con anticuerpo uPAR. Se descubrió una expresión de uPAR mínima en podocitos de riñón 57BL/6 tratado con PBS pero no en aquellos de riñón *Plaur^{-/-}* tratado con PBS. Con ratones 57BL/6 tratados con LPS, se observó expresión de uPAR aumentada en podocitos en el riñón 57BL/6 nativo y de forma interesante, también se observó la clara expresión de uPAR o el depósito en los podocitos de riñón *Plaur^{-/-}* trasplantado (Figura 3B). Con ratones *Plaur^{-/-}* tratados con LPS, se encontró una expresión aumentada de uPAR en el riñón 57BL/6 trasplantado, pero ningún uPAR en podocitos de riñón *Plaur^{-/-}* nativo (Figura 3E). Combinado con el análisis de microscopio electrónico, estos resultados indican que además de uPAR unido a membrana, el LPS también podría inducir la generación de suPAR, que después va al riñón, se deposita en los podocitos y más importante induce el borrado del proceso de pies.

Las últimas décadas atestiguaron mucho progreso en la biología de los podocitos, sin embargo, la patogenia exacta que subyace a la mayoría de enfermedades renales proteinúricas era hasta este momento, lejos de estar clara. Esto es cierto con la glomeruloesclerosis segmental focal (GEFS). Aunque las mutaciones a ciertas moléculas que incluyen podocina, nefrina, α -actinina 4, TRPC6 se han reivindicado ser responsables de algunas formas familiares de GEFS, se conocía poco acerca de la patogenia de la forma de GEFS adquirida. La GEFS frecuentemente da lugar a un fallo renal de fase final y recurriendo significativamente en un 30-60 % de los riñones trasplantados. Se encontró en el presente documento, que suPAR podría inducir el borrado de procesos de pies y proteínuria en ratones 57BL/6 y *Plaur^{-/-}*. Esto dio lugar al siguiente conjunto de experimentos para evaluar suPAR en pacientes de GEFS. El nivel de suero de suPAR de GEFS se midió en pacientes antes de trasplante y se descubrió que los pacientes recurrentes de GEFS ($n = 14$, 5469 ± 1837 pg/ml) tuvieron un nivel significativo mayor de suPAR que aquellos pacientes no recurrentes ($n = 4$, 3586 ± 976 pg/ml, $P < 0,022$ frente a recurrente), y que aquellos sujetos normales ($n = 8$, 1673 ± 395 pg/ml, $P < 0,001$ frente a recurrente) (Figura 2A), evidenciando que suPAR es un factor causante en GEFS recurrente. Para explorar adicionalmente el efecto de los sueros de GEFS ricos en suPAR, los sueros se incubaron con podocitos cultivados y se descubrió que los sueros de GEFS de pacientes recurrentes pero no los sueros de sujetos normales, activaron la integrina $\alpha_v\beta_3$ (Figura 2B), un descubrimiento observado con suPAR purificado (Figura 1A).

Sumario: suPAR podría inducir el borrado de procesos de pies y proteínuria en ratones 57BL/6 o *Plaur^{-/-}*, a través de la activación de la ruta de la integrina $\alpha_v\beta_3$. El nivel de suPAR es mucho mayor en GEFS recurrente, en comparación con GEFS no recurrente y sujetos normales. Como con la proteína suPAR purificada, los sueros de GEFS ricos en suPAR podrían activar la integrina $\alpha_v\beta_3$. Considerando la pequeña masa molecular de suPAR, estos descubrimientos evidencian que suPAR es un factor recurrente de GEFS. Ya que es posible retirar o bloquear uPAR, garantiza una estrategia prometedora para potenciar la supervivencia del trasplante.

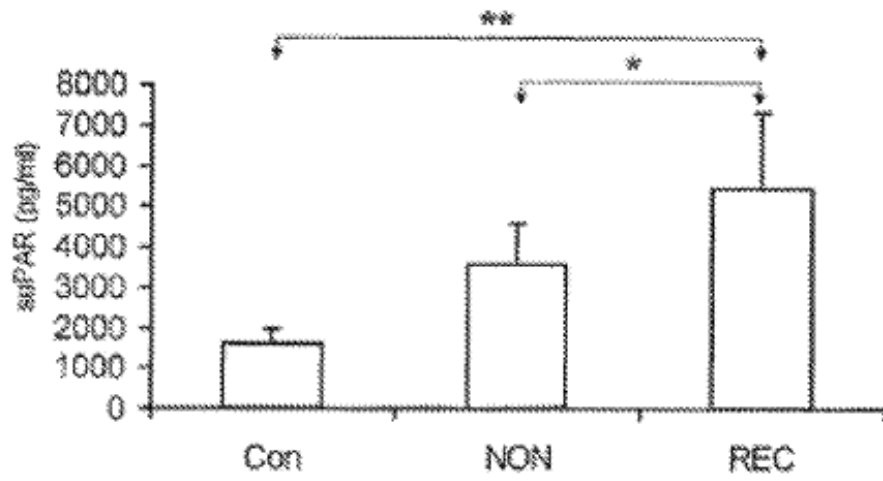
REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento de proteinuria en una enfermedad o trastorno renal **caracterizado por** proteinuria, comprendiendo la composición un agente que inhibe la expresión o la actividad del receptor de uroquinasa soluble (suPAR).
- 5 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente comprende un oligonucleótido antisentido, un polipéptido o una molécula pequeña.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente es un polipéptido del receptor de uroquinasa (uPAR) mutante que bloquea la expresión o la actividad de suPAR.
- 10 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente es un anticuerpo específico de suPAR.
5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, composición que es una composición farmacéutica que comprende un vehículo.
6. Un procedimiento de identificación de un agente para la actividad en el tratamiento de proteinuria en una enfermedad o trastorno renal **caracterizado por** proteinuria, que comprende:
- 15 cultivar una célula de riñón o una línea celular de riñón;
poner en contacto dicha célula de riñón o línea celular de riñón con uno o más agentes; y
medir la expresión o actividad de suPAR;
en el que una reducción en la expresión o actividad de suPAR indica que el agente tendrá actividad en el tratamiento de proteinuria en una enfermedad o trastorno renal **caracterizados por** proteinuria.
- 20 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la expresión o actividad de suPAR se inhibe al menos en un 10 % en comparación con un control normal.
8. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la expresión o actividad de suPAR se inhibe al menos en un 50 % en comparación con un control normal.
- 25 9. Un procedimiento de diagnóstico de un paciente que tiene o está en riesgo de desarrollar proteinuria, en el que el procedimiento comprende detectar un biomarcador sanguíneo en una muestra de sangre retirada del paciente, comprendiendo el biomarcador sanguíneo un polipéptido de suPAR.
10. Un ensayo para medir los niveles de receptor de uroquinasa soluble (suPAR) en una muestra de sangre de un paciente que tiene proteinuria, que comprende:
- 30 poner en contacto una muestra de sangre del paciente con un anticuerpo anti-suPAR marcado detectablemente y medir el receptor de uroquinasa soluble (suPAR) en la muestra de sangre.
11. Un procedimiento de diagnóstico de un paciente que tiene o está en riesgo de desarrollar proteinuria, que comprende:
- 35 detectar suPAR en una muestra de sangre retirada del paciente,
correlacionar las cantidades de suPAR en la muestra del paciente con proteinuria y diagnosticar al paciente que tiene o está en riesgo de desarrollar proteinuria.
- 40 12. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en el que la enfermedad o trastorno renal **caracterizado por** proteinuria es: enfermedades o trastornos de los podocitos, enfermedades glomerulares, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis segmental focal, enfermedad de cambio mínimo, síndromes nefróticos, pre-eclampsia, eclampsia, lesiones renales, enfermedades vasculares del colágeno, estrés, ejercicio agotador, proteinuria ortostática (postural) benigna, glomeruloesclerosis segmental focal (GEFS), nefropatía de IgA, nefropatía de IgM, glomerulonefritis membranoproliferativa, nefropatía membranosa, sarcoidosis, síndrome de Alport, diabetes mellitus, daño renal debido a fármacos, enfermedad de Fabry, infecciones, aminoaciduria, síndrome de Fanconi, nefroesclerosis hipertensiva, nefritis intersticial, enfermedad de células falciformes, hemoglobinuria, mieloma múltiple, mioglobinuria, nefropatía diabética (ND), nefritis por lupus, Granulomatosis de Wegener o Enfermedad de Almacenamiento de Glucógeno Tipo 1.
- 45

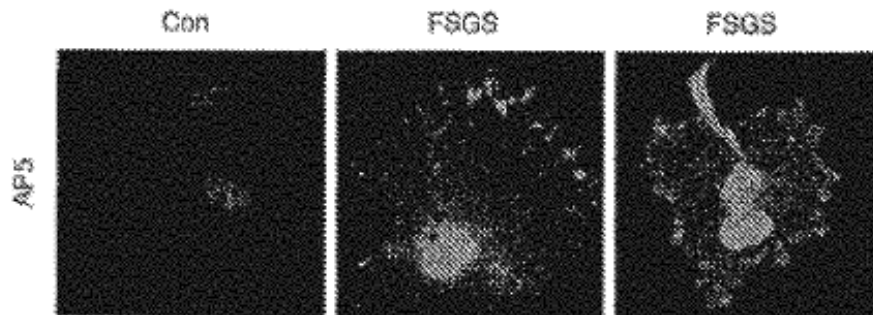


FIGURAS 1A-1F

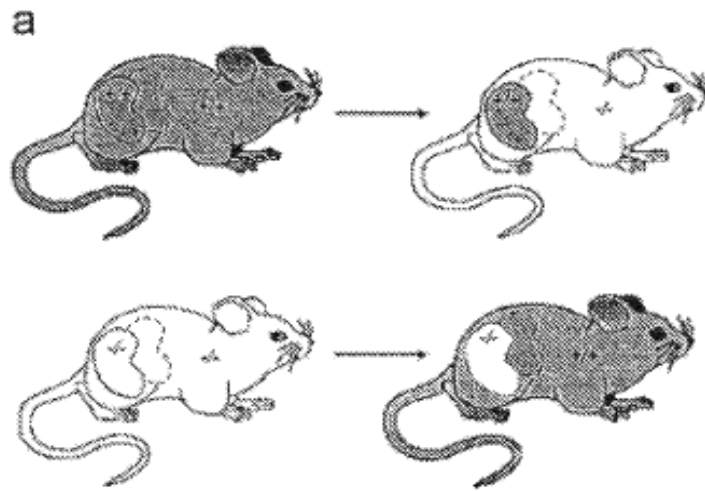
a



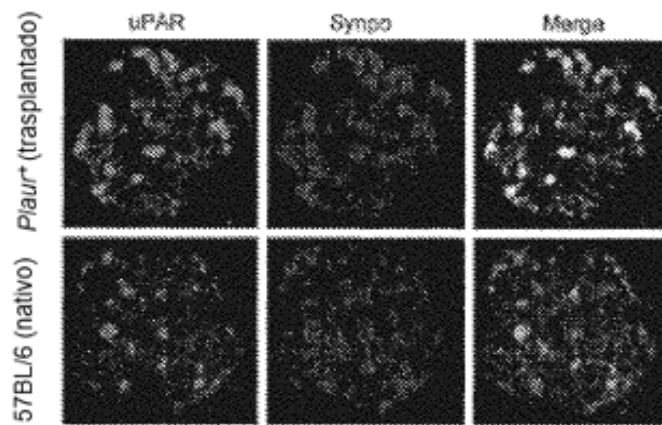
b



FIGURAS 2A-2B

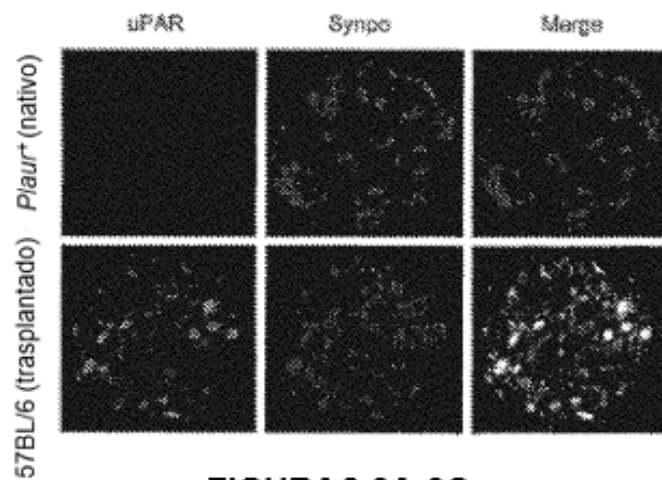


Receptor, 57BL/6; Donador, *Plaur*⁺



c

Receptor, *Plaur*⁺; Donador, 57BL/6



FIGURAS 3A-3C

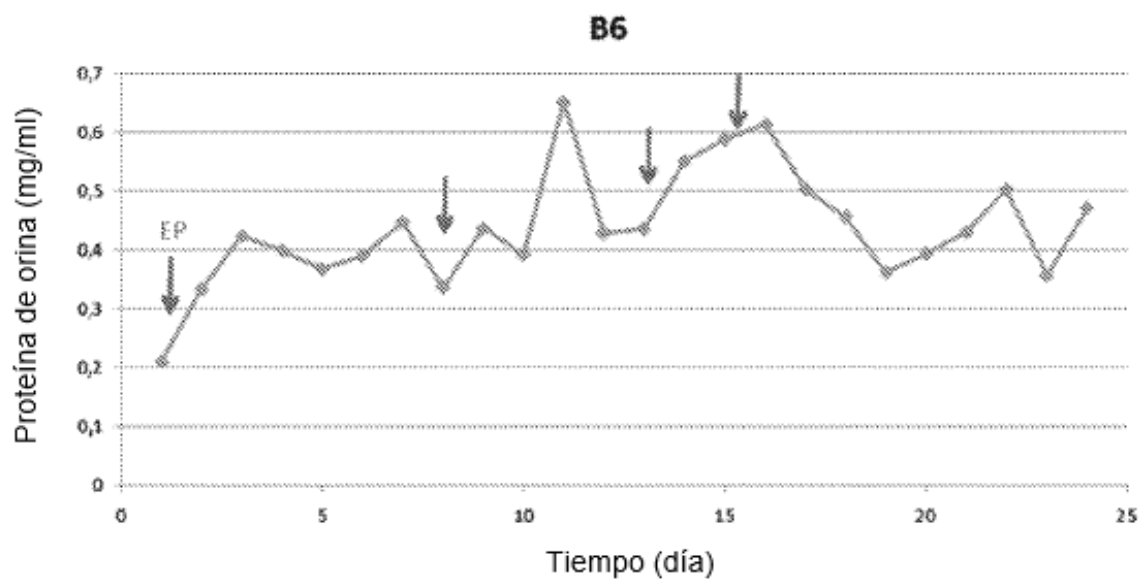


FIGURA 4

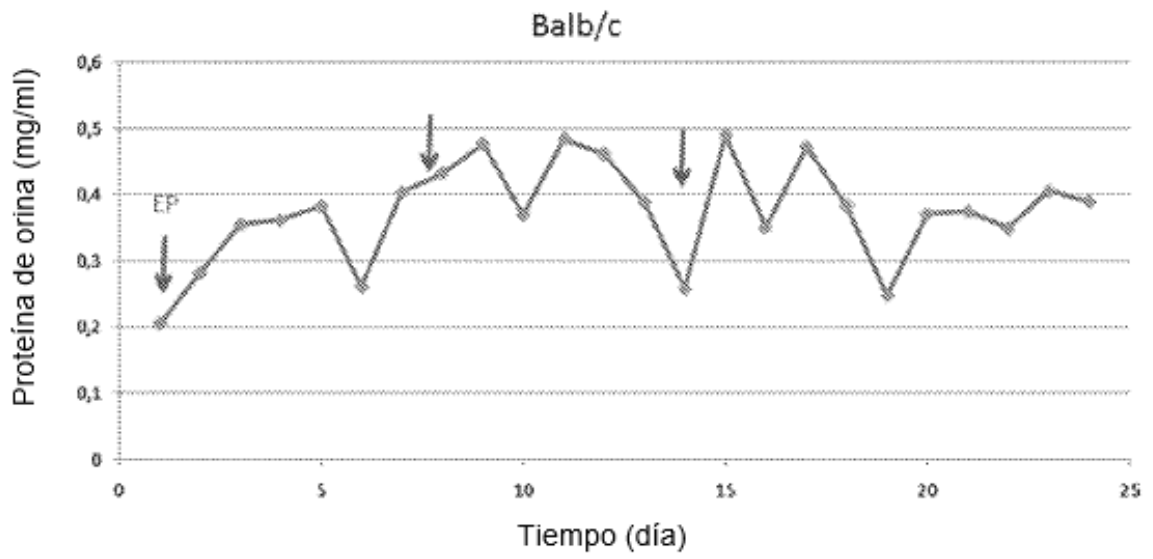


FIGURA 5

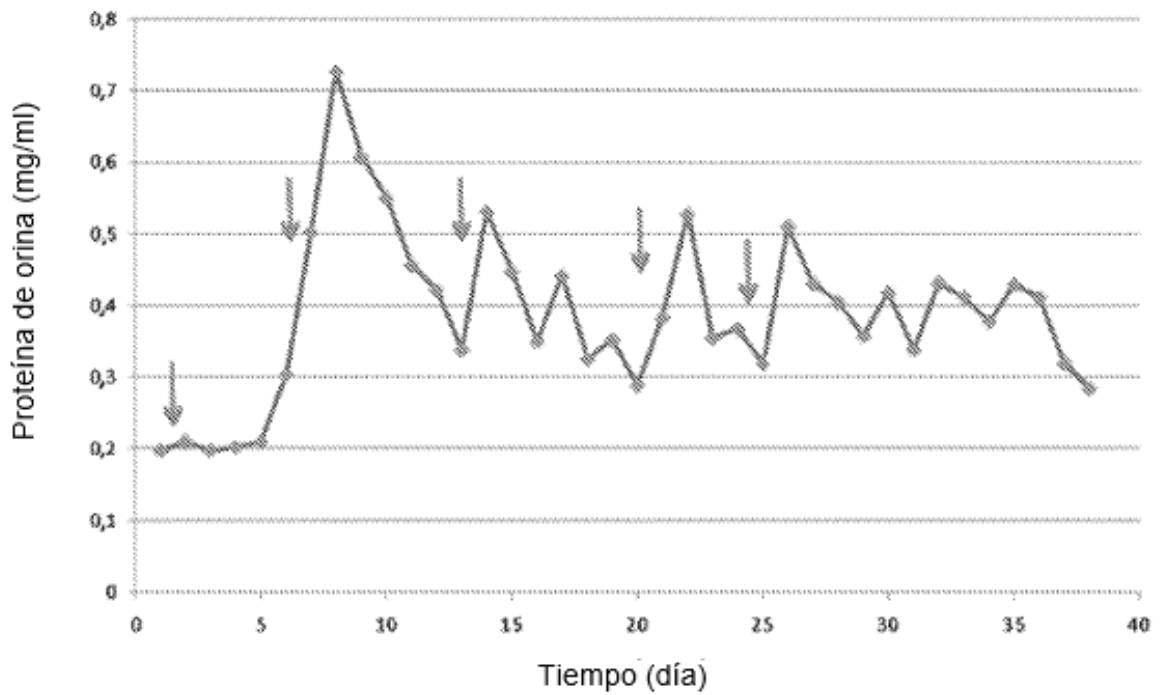


FIGURA 6

RATONES WT B6

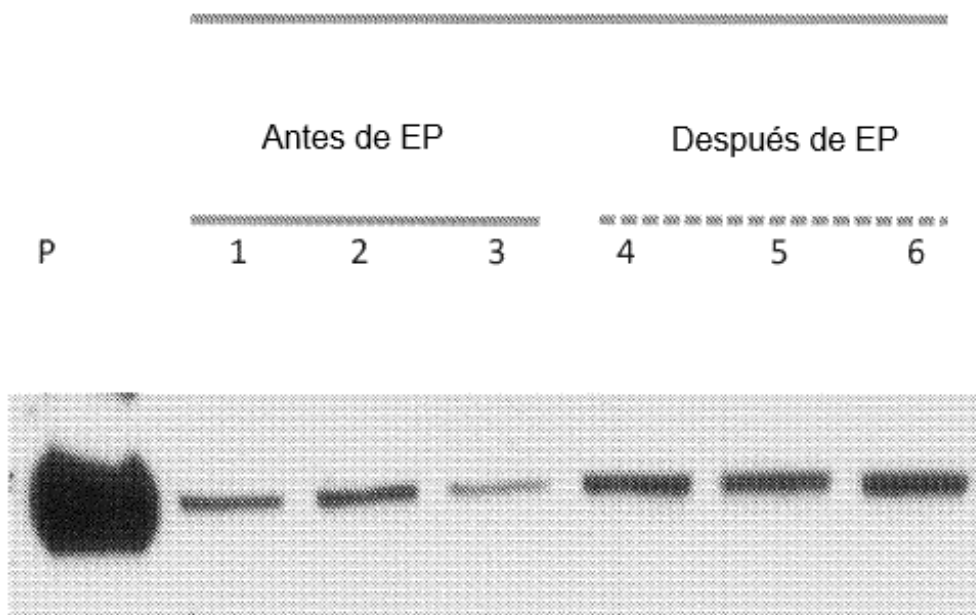


FIGURA 7A

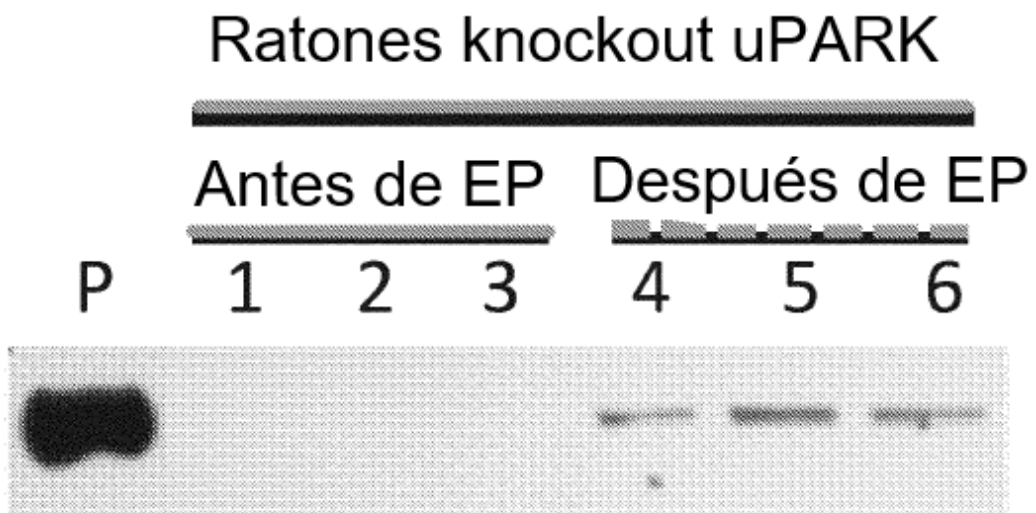


FIGURA 7B