

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 882**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2014 PCT/AU2014/050387**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2015 WO15077845**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2014 E 14865202 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 3074038**

54 Título: **Método de tratamiento de la nefropatía diabética**

30 Prioridad:

28.11.2013 AU 2013904595

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

08.05.2019

73 Titular/es:

B-CREATIVE SWEDEN AB (50.0%)

556906-5740, Hågervägen 27

746 34 Bålsta, SE y

CSL LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

ERIKSSON, ULF;

FALKEVALL, ANNELIE y

MEHLEM, ANNIKA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 711 882 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).

DESCRIPCION

Método de tratamiento de la nefropatía diabética

5 CAMPO

La presente invención se refiere al tratamiento o prevención de la nefropatía diabética.

10 INTRODUCCIÓN**Nefropatía**

La nefropatía es una clase de trastornos caracterizados por daño a un riñón y abarca la nefritis (enfermedad renal inflamatoria) y la nefrosis (enfermedad renal no inflamatoria). Las causas de la nefropatía incluyen afecciones crónicas (incluyendo lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus y presión arterial alta (hipertensión), depósitos de anticuerpos IgA en el glomérulo, administración de analgésicos, deficiencia de xantina oxidasa, toxicidad de agentes quimioterapéuticos y exposición prolongada a plomo o sus sales.

La nefropatía asociada con la diabetes (es decir, la "nefropatía diabética") es la causa más común de enfermedad renal en etapa terminal en los Estados Unidos y en varios otros países desarrollados. Por ejemplo, la nefropatía diabética representa casi el 35% de la enfermedad renal terminal en los Estados Unidos hoy en día y cuesta aproximadamente de 50.000\$-65.000\$ por paciente al año, superando los 2 billones \$ al año para todos los pacientes de los Estados Unidos. Aproximadamente el 40% de los pacientes con diabetes tipo 1 y el 5-15% de los pacientes con diabetes tipo 2 desarrollan eventualmente enfermedad renal en etapa terminal.

Los mecanismos fisiopatológicos de la nefropatía diabética no se entienden completamente. Las anomalías demostrables más tempranas incluyen hipertensión intrarrenal, hiperfiltración (aumento de la tasa de filtración glomerular) y microalbuminuria. Clínicamente, la herramienta de detección más importante para identificar la nefropatía temprana es la detección de la microalbuminuria. Los factores de riesgo para el desarrollo de la nefropatía diabética incluyen hiperglucemia, hipertensión, historial familiar positivo de nefropatía y tabaquismo. La nefropatía diabética se considera generalmente un resultado de la hipertensión y la hiperglucemia en la diabetes, y muchos investigadores consideran que la hiperglucemia es un factor significativo que contribuye al desarrollo de esta enfermedad.

Las intervenciones médicas hasta ahora no son lo suficientemente eficaces para tratar o prevenir la progresión de la nefropatía diabética y el desarrollo de enfermedad renal en etapa terminal. A este respecto, los tratamientos actuales están dirigidos principalmente a mejorar las complicaciones de las enfermedades de la siguiente manera: 1) controlar la presión arterial (inhibidores de inhibidores de ECA o bloqueadores de los receptores de la angiotensina (ARB); 2) controlar los valores glucémicos; y 3) modificaciones en la dieta lipoproteica, ejercicio u otros estilos de vida. Sin embargo, el tratamiento actual tiene un impacto limitado en la disminución progresiva de la función renal y los pacientes aún progresan a la terapia de reemplazo renal, ya sea diálisis o trasplante renal.

Otras estrategias de tratamiento se han centrado en uno o más factores de crecimiento como objetivos terapéuticos, a menudo aquellos identificados como regulados por incremento en los modelos de nefropatía. Por ejemplo, se han examinado terapias dirigidas a inhibir el TGF β , ya sea solo o en combinación con inhibidores de ACE. También se han estudiado el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) y otros factores implicados en la angiogénesis como objetivos en el tratamiento de la nefropatía. Sung et al. (2006) JAMSN. 17:3093-3104 trata el bloqueo de VEGFR para mejorar la albuminuria diabética en ratones. La WO 2013/101954 trata el uso de los inhibidores de la proteína tirosina quinasa en el tratamiento de trastornos múltiples, incluyendo la nefropatía diabética. La WO 2005/077413 trata métodos y compuestos para tratar aspectos de la etapa temprana y aspectos de la etapa final específicos de la nefropatía diabética dirigiéndose a CTGF. Hagberg et al. (2012) Nature 490: 426-430 trata el objetivo VEGF-B en el tratamiento de la diabetes tipo 2.

55 VEGF y nefropatía

La familia de factores de crecimiento VEGF incorpora cinco ligandos (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento de la placenta (PlGF)) que pueden unirse diferencialmente a tres tirosina quinasa receptoras (VEGFR-1, -2, y -3) y los receptores de semoforinas (neuropilina 1 y 2). La familia VEGF de factores de crecimiento está implicada en la angiogénesis y la linfangiogenesis normales y patológicas. El VEGF-A se une a VEGFR-1, VEGFR-2, NP-1 y NP-2; el VEGF-B se une a VEGFR-1 y NP-1. El VEGF-C y la VEGF-D están implicados principalmente en la linfangiogenesis y se unen a VEGFR-2, VEGFR-3 y NP-2.

El VEGF-A es el miembro mejor estudiado de la familia VEGF, y el papel del VEGF-A y las investigaciones de la inhibición del VEGF-A en relación con el riñón y la nefropatía han proporcionado resultados mixtos, que a

menudo dan como resultado efectos perjudiciales en el riñón. Algunos de estos estudios han implicado la administración del receptor 1 de VEGF soluble (también conocido como sFlt-1), que puede actuar como un antagonista de VEGF-A pero también de VEGF-B y PlGF, y han llevado a proteinuria e hipertensión (Nakagawa et al, Diabetes, 58, p1471-8, 2009). Kosugi et al (Am J Physiol Renal Physiol 298: F609-F616, 2010) concluyeron que es poco probable que el tratamiento con sFlt-1 sea beneficioso en la nefropatía diabética y que se necesitan enfoques alternativos para tratar la enfermedad renal diabética. Un estudio reciente que implicó un antagonista de VEGFR-1 (Yang et al, PLOS ONE, 9(4), e94540, 2014) en ratones *db/db* concluyó que la inhibición de VEGFR-1 agrava la nefropatía diabética, y sugirió realmente que la activación de VEGFR-1 puede proporcionar una modalidad terapéutica en la nefropatía diabética tipo 2. Como se ha tratado anteriormente, el VEGF-B es uno de los ligandos que señalizan a través de VEGFR-1, y estos estudios que implican a sFlt-1 o el antagonista de VEGFR-1 habrían bloqueado la señalización de VEGF-B, aunque de una manera no específica.

SUMARIO

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Al producir la presente invención, los inventores procedieron en contra del conocimiento en la técnica en relación con la señalización de VEGF en la nefropatía y estudiaron los efectos de inhibir la señalización de VEGF-B en modelos de nefropatía de ratón aceptados, por ejemplo, ratones alimentados con alto contenido de grasa y modelos de diabéticos nefropatía, incluyendo la nefropatía asociada a diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2. Los inventores estudiaron el efecto de este factor de crecimiento previniendo la expresión de VEGF-B (por ejemplo, usando ratones genéticamente modificados en los que la expresión de VEGF-B se reduce o evita) o administrando un antagonista de VEGF-B (por ejemplo, un anticuerpo antagonista). Los presentes inventores han descubierto que, sorprendentemente, la inhibición de la señalización de VEGF-B tiene un efecto beneficioso en una variedad de modelos animales de nefropatía. Por ejemplo, los inventores fueron capaces de evitar el desarrollo de la nefropatía, por ejemplo, nefropatía diabética, y tratar (por ejemplo, retrasar la progresión) la nefropatía, por ejemplo, nefropatía diabética dependiendo del régimen de tratamiento usado.

Los inventores descubrieron que el antagonismo de la señalización de VEGF-B disminuye o previene por lo menos la expansión mesangial glomerular, la esclerosis glomerular y tubular, el depósito de matriz extracelular mesangial, el engrosamiento anormal de la membrana basal glomerular y la acumulación de lípidos renales, por ejemplo, en glomérulos renales, pérdida de podocito, hipertensión, reorganizaciones vasculares glomerulares y preserva la estructura de los podocitos en sujetos diabéticos. En algunos casos (por ejemplo, en un experimento descrito en la presente), los cambios en el riñón tuvieron lugar a pesar de un efecto moderado en los niveles de glucosa en sangre en sujetos diabéticos, lo que indica que la inhibición de VEGF-B proporciona un beneficio terapéutico/profiláctico en la nefropatía a través de una vía adicional al o aparte del control glucémico.

Los descubrimientos de los inventores proporcionan la base para los métodos para tratar o prevenir la nefropatía en un sujeto inhibiendo la señalización de VEGF-B. Por ejemplo, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir la nefropatía en un sujeto, el método comprendiendo administrar al sujeto un compuesto que inhibe la señalización de VEGF-B.

En un ejemplo, la nefropatía es nefritis, es decir, enfermedad renal inflamatoria. Por ejemplo, la nefropatía es nefropatía por IgA o está provocada por el uso de fármacos (por ejemplo, analgésicos o quimioterapia), deficiencia de xantina oxidasa, enfermedad poliquística del riñón o está provocada por una enfermedad crónica, por ejemplo, una enfermedad inflamatoria o autoinmune o diabetes.

Por ejemplo, la nefropatía es glomerulonefritis y/o glomeruloesclerosis. Por ejemplo, la glomerulonefritis y/o glomeruloesclerosis es una glomerulonefritis y/o glomeruloesclerosis proliferativa.

En un ejemplo, la nefropatía o nefritis está asociada o provocada por otra enfermedad. Por ejemplo, la nefropatía está provocada por una enfermedad inflamatoria o autoinmune (por ejemplo, crispematosi de lupus sistémico, síndrome de Goodpasture), vasculitis (por ejemplo, granulomatoso de Wegener o poliangitis microscópica) o diabetes.

En un ejemplo, la nefropatía o nefritis está asociada o provocada por prediabetes.

En un ejemplo, la nefropatía o nefritis está asociada o provocada por diabetes tipo 1.

En un ejemplo, la nefropatía o nefritis está asociada o provocada por diabetes tipo 2.

Por ejemplo, la presente divulgación proporciona un método para tratar o prevenir la nefropatía diabética en un sujeto que padece de diabetes, el método comprendiendo administrar al sujeto un compuesto que inhibe la señalización de VEGF-B.

Como se ejemplifica en la presente, los presentes inventores han mostrado que la administración de un inhibidor de la señalización de VEGF-B a un sujeto que padece de nefropatía diabética es eficaz en el tratamiento de esta afección. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona adicionalmente un método para tratar la nefropatía diabética, el método comprendiendo administrar a un sujeto que padece de nefropatía diabética un inhibidor de la señalización de VEGF-B.

En un ejemplo, el sujeto está en riesgo de desarrollar nefropatía o está desarrollando nefropatía (por ejemplo, nefropatía diabética). Por ejemplo, el sujeto padece de microalbuminuria o macroalbuminuria. En otro ejemplo, el sujeto padece de hipertensión.

En un ejemplo, la presente divulgación proporciona un método para prevenir o retrasar el desarrollo de nefropatía (por ejemplo, nefropatía diabética), el método comprendiendo administrar a un sujeto que padece de microalbuminuria o macroalbuminuria (por ejemplo, un sujeto que padece de diabetes y microalbuminuria o macroalbuminuria) un compuesto que inhibe la señalización de VEGF-B. En un ejemplo, el sujeto padece de microalbuminuria.

En un ejemplo, la presente divulgación proporciona un método para prevenir o retrasar el desarrollo de nefropatía (por ejemplo, nefropatía diabética), el método comprendiendo administrar a un sujeto que padece de hipertensión (por ejemplo, un sujeto que padece de diabetes e hipertensión) un compuesto que inhibe la señalización de VEGF -B.

En un ejemplo, el compuesto se administra en una cantidad eficaz para tener uno o más de los siguientes efectos:

- Reducir o prevenir la hipertensión;
- Reducir o prevenir la esclerosis glomerular y/o tubular;
- Reducir o prevenir el depósito de matriz extracelular mesangial y/o el engrosamiento anormal de la membrana basal glomerular;
- Reducir o prevenir la expansión mesangial glomerular;
- Reducir o prevenir los reordenamientos vasculares glomerulares;
- Reducir o prevenir la acumulación de lípidos renales;
- Reducir o prevenir la acumulación de lípidos glomerulares;
- Reducir o prevenir los depósitos de colágeno glomerular y/o hialiosis arteriolar; y/o
- Reducir o prevenir la macroalbuminuria.

En un ejemplo, el compuesto que inhibe la señalización de VEGF-B inhibe específicamente la señalización de VEGF-B. Esto no significa que un método de la presente divulgación no abarque la inhibición de la señalización de múltiples proteínas de VEGF, solo que el compuesto (o parte del mismo) que inhibe la señalización de VEGF-B es específico para VEGF-B, por ejemplo, no es un inhibidor general de proteínas de VEGF. Este término tampoco excluye, por ejemplo, un anticuerpo o proteína biespecífica que comprende los dominios de unión de la misma, que puede inhibir específicamente la señalización de VEGF-B con uno (o más) dominios de unión y puede inhibir específicamente la señalización de otra proteína con otro dominio de unión.

En un ejemplo, un compuesto que inhibe la señalización de VEGF-B se une a VEGF-B. Por ejemplo, el compuesto es una proteína que comprende una región variable de anticuerpo que se une a o se une específicamente a VEGF-B y neutraliza la señalización de VEGF-B.

En un ejemplo, el compuesto es un anticuerpo mimético. Por ejemplo, el compuesto es una proteína que comprende un dominio de unión a antígeno de una inmunoglobulina, por ejemplo, una IgNAR, un anticuerpo camélido o un receptor de células T.

En un ejemplo, un compuesto es un anticuerpo de dominio (por ejemplo, que comprende solo una región variable de la cadena pesada o solo una región variable de la cadena ligera que se une a VEGF-B) o un anticuerpo sólo de cadena pesada (por ejemplo, un anticuerpo camélido o una IgNAR) o región variable del mismo.

En un ejemplo, un compuesto es una proteína que comprende un Fv. Por ejemplo, la proteína se selecciona del grupo que consiste de:

- (i) un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv);
- (ii) un scFv dimérico (di-scFv); o
- (iv) un diacuerpo;
- (v) un triacuerpo;
- (vi) un tetracuerpo;
- (vii) un Fab;
- (viii) un F(ab')₂;

(ix) un Fv; o

(x) uno de (i) a (ix) ligado a una región constante de un anticuerpo. Fc o un dominio constante de cadena pesada (C_H)₂ y/o C_H3.

5 En otro ejemplo, un compuesto es un anticuerpo. Los anticuerpos ejemplares son anticuerpos de longitud completa y/o desnudos.

10 En un ejemplo, el compuesto es una proteína que es recombinante, quimérica, CDR injertada, humanizada, sinhumanizada, primatizada, desinmunizada o humana.

15 En un ejemplo, el compuesto es una proteína que comprende una región variable de anticuerpo que inhibe competitivamente la unión del anticuerpo 2H10 para VEGF-B. En un ejemplo, la proteína comprende una región variable de la cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera (V_L) que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4.

20 En un ejemplo, el compuesto es una proteína que comprende una región variable humanizada del anticuerpo 2H10. Por ejemplo, la proteína comprende una región variable que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la V_H y/o la V_L del anticuerpo 2H10. Por ejemplo, la proteína comprende:

(i) una V_H que comprende:

25 (a) una CDR1 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 25-34 de la SEQ ID NO: 3;
 (b) una CDR2 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 49-65 de la SEQ ID NO: 3; y
 (c) una CDR3 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 98-108 de la SEQ ID NO: 3;
 y/o

(ii) una V_L que comprende:

30 (a) una CDR1 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 23-33 de la SEQ ID NO: 4;
 (b) una CDR2 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 49-55 de la SEQ ID NO: 4; y
 (c) una CDR3 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 88-96 de la SEQ ID NO: 4.

35 En un ejemplo, el compuesto es una proteína que comprende una V_H y una V_L, siendo V_H y V_L regiones variables humanizadas del anticuerpo 2H10. Por ejemplo, la proteína comprende:

(i) una V_H que comprende:

40 (a) una CDR1 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 25-34 de la SEQ ID NO: 3;
 (b) una CDR2 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 49-65 de la SEQ ID NO: 3; y
 (c) una CDR3 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 98-108 de la SEQ ID NO: 3; y

(ii) una V_L que comprende:

45 (a) una CDR1 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 23-33 de la SEQ ID NO: 4;
 (b) una CDR2 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 49-55 de la SEQ ID NO: 4; y
 (c) una CDR3 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 88-96 de la SEQ ID NO: 4.

50 En un ejemplo, la región variable o V_H en cualquiera de los párrafos anteriores comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 5.

En un ejemplo, la región variable o V_L en cualquiera de los párrafos anteriores comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 6.

55 En un ejemplo, el compuesto es un anticuerpo.

En un ejemplo, el compuesto es un anticuerpo que comprende una V_H que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 5 y una V_L que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 6.

60 En un ejemplo, la proteína o anticuerpo es cualquier forma de la proteína o anticuerpo codificado por un ácido nucleico que codifica cualquiera de las proteínas o anticuerpos anteriores.

En un ejemplo, la proteína o anticuerpo comprende:

65 (i) una V_H que comprende:

- (a) una CDR1 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 11 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17;
 (b) una CDR2 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 12 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18; y
 (c) una CDR3 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 13 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; y/o

(ii) una V_L que comprende:

- (a) una CDR1 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 14 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20;
 (b) una CDR2 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 15 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21; y
 (c) una CDR3 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 16 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

En un ejemplo, la proteína o anticuerpo comprende:

(i) una V_H que comprende:

- (a) una CDR1 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 23 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29;
 (b) una CDR2 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 24 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30; y
 (c) una CDR3 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 25 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31; y/o

(ii) una V_L que comprende:

- (a) una CDR1 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 26 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32;
 (b) una CDR2 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 27 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33; y
 (c) una CDR3 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 28 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34.

En un ejemplo, la proteína o anticuerpo comprende:

(i) una V_H que comprende:

- (a) una CDR1 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 35 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41;
 (b) una CDR2 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 36 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42; y
 (c) una CDR3 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 37 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43; y/o

(ii) una V_L que comprende:

- (a) una CDR1 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 38 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44;
 (b) una CDR2 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 39 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 45; y
 (c) una CDR3 que comprende una secuencia codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 40 o que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 46.

En un ejemplo, el compuesto está dentro de una composición. Por ejemplo, la composición comprende una proteína que comprende una región variable del anticuerpo o una V_H o una V_L o un anticuerpo como se describe en la presente. En un ejemplo, la composición comprende adicionalmente una o más variantes de la proteína o anticuerpo. Por ejemplo, que comprende una variante que carece de un residuo de lisina C-terminal codificado, una variante desamidada y/o una variante glicosilada y/o una variante que comprende un piroglutamato, por ejemplo, en el extremo N terminal de una proteína y/o un variante que carece de un residuo N-terminal, por ejemplo, una glutamina N-terminal en un anticuerpo o región V y/o una variante que comprende toda o parte de una señal de secreción. Las variantes desamidadas de los residuos de asparagina codificados pueden dar como resultado isoaspártico, y se generan isoformas de ácido aspártico o incluso una succinamida que implica un residuo de

aminoácido adyacente. Las variantes desamidadas de los residuos de glutamina codificados pueden dar como resultado ácido glutámico. Se pretende que las composiciones que comprenden una mezcla heterogénea de tales secuencias y variantes estén incluidas cuando se hace referencia a una secuencia de aminoácidos particular.

5 En un ejemplo, el compuesto que inhibe la señalización de VEGF-B inhibe o evita la expresión de VEGF-B. Por ejemplo, el compuesto se selecciona del grupo un antisentido, un ARNip, un ARNi, una ribozima y una ADNzima.

10 En un ejemplo, el VEGF-B es VEGF-B de mamífero, por ejemplo, VEGF-B humano.

En un ejemplo, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un primate, como un humano.

15 Los métodos de tratamiento descritos en la presente pueden comprender adicionalmente administrar un compuesto adicional para tratar o prevenir la nefropatía.

Los métodos de tratamiento de la nefropatía diabética descritos en la presente pueden comprender adicionalmente administrar un compuesto adicional para tratar o prevenir (o retrasar la progresión de) la diabetes. En la presente se describen compuestos ejemplares.

20 La presente divulgación también proporciona un compuesto que inhibe la señalización de VEGF-B para su uso en el tratamiento o prevención de la nefropatía.

La presente divulgación también proporciona el uso de un compuesto que inhibe la señalización de VEGF-B en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la nefropatía.

25 La presente divulgación también proporciona un kit que comprende un compuesto que inhibe la señalización de VEGF-B envasado con instrucciones para su uso en el tratamiento o prevención de la nefropatía.

30 En la presente se describen nefropatías y compuestos ejemplares y deben tomarse para aplicarse *mutatis mutandis* a los ejemplos de la divulgación establecidos en los tres párrafos anteriores.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 La Figura 1A comprende dos representaciones gráficas que muestran la proporción de albúmina/creatinina en orina (ACR) medida por ELISA para ratones *db/db*, *db/db//Vegfb^{+/-}* y *db/db//Vegfb^{-/-}* (n=5 grupo, gráfico de la izquierda) y ratones magros de tipo salvaje (*wt*) y magros *Vegfb^{-/-}* (n=4-6/grupo, gráfico de la derecha). Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 en comparación con los controles *db/db*.

40 La Figura 1B es una representación gráfica que muestra la presión arterial del manguito de la cola (presión arterial sistólica y diastólica; como se indica) en ratones *db/db* y *db/db//Vegfb^{+/-}* (n=5/grupo). Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05, **P<0,01 en comparación con los controles *db/db*.

45 La Figura 2A es una representación gráfica que muestra la cuantificación de las anomalías en los compartimentos de los túbulos medidos como engrosamiento de la membrana basal (BM) de los túbulos en las secciones renales de ratones *db/db*, *db/db//Vegfb^{+/-}* y *db/db//Vegfb^{-/-}*. Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05, **P<0,01 en comparación con los controles *db/db*. ## P<0,01 en comparación con los ratones de tipo salvaje magros de 28 semanas de edad.

La Figura 2B es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la esclerosis glomerular medida como la expansión mesangial en secciones de riñón de ratones *db/db*, *db/db//Vegfb^{+/-}* y *db/db//Vegfb^{-/-}*. Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 en comparación con los controles *db/db*.

50 La Figura 2C es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la apoptosis glomerular medida como glomérulos apoptóticos por cuadro (n=4/grupo) en secciones de riñón de ratones *db/db*, *db/db//Vegfb^{+/-}* y *db/db//Vegfb^{-/-}*. Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 en comparación con los controles *db/db*.

55 La Figura 3A es una representación gráfica que muestra la cuantificación del grosor de la membrana basal glomerular medido usando análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las secciones del riñón de animales *wt*, *db/db*, *db/db//Vegfb^{+/-}* y *db/db//Vegfb^{-/-}* magros (como se indica). n=3-4/grupo. Los valores son medias \pm s.e.m. ####P<0,001 en comparación con los controles *db⁺* magro y **P<0,01 en comparación con los controles *db/db*.

60 La Figura 3B es una representación gráfica que muestra la cuantificación del número de cortes medida usando análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las secciones de riñón de animales *wt*, *db/db*, *db/db//Vegfb^{+/-}* y *db/db//Vegfb^{-/-}* magros (como se indica). n=3-4/grupo. Los valores son medias \pm s.e.m. ####P<0,001 en comparación con los controles *db⁺* magro y **P<0,01 en comparación con los controles *db/db*.

65 La Figura 4A es una representación gráfica que muestra la cuantificación del análisis de aceite rojo O (ORO) de secciones del riñón de animales *db/db*, *db/db//Vegfb^{+/-}* y *db/db//Vegfb^{-/-}*. Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05 en comparación con los controles *db/db*.

- La Figura 4B es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con aceite rojo O en glomérulos y compartimentos tubulares (como se indica). Animales *db/db*, *db/db//Vegfb^{+/-}*, *db/db//Vegfb^{-/-}* y de tipo salvaje. Los valores son medias \pm s.e.m. #*P*<0,05 y ####*P*<0,001 en comparación con los controles magros. ****P*<0,001 en comparación con los controles *db/db*.
- 5 La Figura 5A es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con sinaptopodina en glomérulos de *db/db*, *db/db//Vegfb^{+/-}* y *db/db//Vegfb^{-/-}*. Los valores son medias \pm s.e.m. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0,.001 en comparación con los controles *db/db*.
- La Figura 5B es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con pccam en glomérulos de *db/db*, *db/db//Vegfb^{+/-}* y *db/db//Vegfb^{-/-}*. Los valores son medias \pm s.e.m. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 en comparación con los controles *db/db*.
- 10 La Figura 6A es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con colágeno IV en glomérulos en secciones de riñón de ratones *db/db*, *db/db//Vegfb^{+/-}* y *db/db//Vegfb^{-/-}*. Los valores son medias \pm s.e.m. **P*<0,05, ***P*<0,01, ****P*<0,001 en comparación con los controles *db/db*.
- La Figura 6B es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con α -SMA en glomérulos en secciones de riñón de ratones *db/db*, *db/db//Vegfb^{+/-}* y *db/db//Vegfb^{-/-}*. Los valores son medias \pm s.e.m. **P*<0,05, ***P*<0,01, ****P*<0,001 en comparación con los controles *db/db*.
- 15 La Figura 6C es una representación gráfica que muestra el grosor arteriolar en secciones de riñón de ratones *db/db*, *db/db//Vegfb^{+/-}* y *db/db//Vegfb^{-/-}*. Los valores son medias \pm s.e.m. **P*<0,5 en comparación con los controles *db/db*.
- 20 La Figura 7es una representación gráfica que muestra los resultados de la cuantificación de la tinción con ORO tanto en los glomérulos como en el compartimento tubular de los ratones de tipo salvaje, *db/db//BKS* de 6 semanas y *db/db//BKS* de 21 semanas magros. n=5-7. Los valores son medias \pm s.e.m. #*P*<0,05 y ##*P*<0,01, túbulos comparados con los glomérulos. **P*<0,05 glomérulos de *db/db//BKS* de 6 semanas en comparación con glomérulos de *db/db//BKS* de 21 semanas.
- 25 La Figura 8 incluye dos representaciones gráficas que muestran que la acumulación de lípidos glomerulares se correlaciona con la pérdida de podocitos en la progresión de DN en ratones *db/db//BKS*. El gráfico de la izquierda muestra la cuantificación de la tinción con adipofilina y el gráfico de la derecha muestra la cuantificación de la tinción con sinaptopodina. n=3-5/grupo Los valores son medias \pm s.e.m. #*P*<0,05, ##*P*<0,01, en comparación con los controles *db⁺* magros. **P*<0,05 *db/db//BKS* de 6 semanas en comparación con los glomérulos de *db/db//BKS* de 21 semanas.
- 30 La Figura 9 es una representación gráfica que muestra la expresión de ARNm renal relativa de *Vegfb*, *VEGFR1*, *Fatp4* y *Fatp3* en *db⁺*, y *db/db//BKS* de 6, 12 y 21 semanas de edad (como se indica)magros. Los valores son medias \pm s.e.m. **P*<0,05, ***P*<0,1, en comparación con los animales de control magros. *Vegfb*, factor de crecimiento endotelial vascular B; *Vegfr1*, receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular; *Fatp3*, transportador de ácidos grasos 3; *Fatp4*, transportador de ácidos grasos 4.
- 35 La Figura 10A es una representación gráfica que muestra el análisis de la proporción de albúmina/creatinina en la orina en WT alimentados con una dieta alta en grasas (HFD). Ratones *Vegfb^{+/-}* alimentados con HFD, *Vegfb^{-/-}* alimentados con HFD y animales de control magro. Los valores son medias \pm s.e.m. #*P*<0,05, ##*P*<0,01, ### *P*<0,001 en comparación con los animales magros de control. **P*<0,05, ***P*<0,01 en comparación con wt alimentados con HFD.
- 40 La Figura 10B es una representación gráfica que muestra el análisis de la albúmina en orina en ratones WT alimentados con HFD, *Vegfb^{+/-}* alimentados con HFD, ratones *Vegfb^{-/-}* alimentados con HFD y animales de control magro. Los valores son medias \pm s.e.m. #*P*<0,05, ## *P*<0,01, ### *P*<0,001 en comparación con los animales de control magros. **P*<0,05, ***P*<0,01 en comparación con wt alimentados con HFD.
- 45 La Figura 11A es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la expansión mesangial glomerular en ratones *Vegf-b^{+/-}* y *Vegf-b^{-/-}* alimentados con HFD. Análisis de ratones WT, *Vegfb^{+/-}*, *Vegfb^{-/-}* alimentados con HFD y animales de control magro. n=5-10/grupo. Los valores son medias \pm s.e.m. barras de escala, 50 mm. #*P*<0,05, ### *P*<0,001 en comparación con los animales de control magro. ***P*<0,01 en comparación con wt alimentado alimentados con HFD.
- 50 La Figura 11B es una representación gráfica que muestra la cuantificación del área glomerular en ratones *Vegf-b^{+/-}* y *Vegf-b^{-/-}* alimentados con HFD. Análisis de ratones WT. *Vegfb^{+/-}*, *Vegfb^{-/-}* alimentados con HFD y animales magros de control. n=5-10/grupo. Los valores son medias \pm s.e.m. barras de escala, 50 mm. #*P*<0,05, ####*P*<0,001 en comparación con los animales de control magro. ***P*<0,01 en comparación con wt alimentados con HFD.
- 55 La Figura 12 es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con ORO de secciones de riñón de ratones WT alimentados con HFD, *Vegfb^{+/-}* alimentados con HFD, *Vegfb^{-/-}* alimentados con HFD y animales de control magro. n=5-10/grupo. Los valores son medias \pm s.e.m. ##*P*<0,01 en comparación con los animales de control magros. **P*<0.5 en comparación con wt alimentados con HFD.
- La Figura 13 es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con adipofilina en glomérulos de secciones de riñón de ratones WT alimentados con HFD, *Vegfb^{+/-}* alimentados con HFD, *Vegfb^{-/-}* alimentados con HFD y animales de control magros. Los valores son medias \pm s.e.m. #*P*<0,05 en comparación con los animales de control magros. **P*<0,05 en comparación con wt alimentados con HFD.
- 60 La Figura 14A es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con colágeno IV en secciones de riñón de ratones WT alimentados con HFD, *Vegfb^{+/-}* alimentados con HFD, *Vegfb^{-/-}* alimentados con HFD y animales de control magros. n=5-10/grupo. Los valores son medias \pm s.e.m. #*P*<0,05, ##*P*<0,01
- 65

en comparación con los animales de control magros. *P<0,05, **P<0,01 en comparación con wt alimentados con HFD.

La Figura 14B es una representación gráfica que muestra la cuantificación del grosor arteriolar en secciones de riñón de ratones WT alimentados con HFD, *Vegfb*^{+/+} alimentados con HFD, *Vegfb*^{-/-} alimentados con HFD y animales de control magros. n=5-10/grupo. Los valores son medias ± s.e.m. #P<0,05, ###P<0,01 en comparación con los animales de control magros. *P<0,05, **P<0,01 en comparación con wt alimentados con HFD.

Las Figuras 15A-F son representaciones gráficas que muestran el análisis de ratones *db/db//BKS* que fueron tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control (marcado como "C") durante 8 semanas. La Figura 15A muestra los niveles de glucosa en sangre posprandiales en animales no tratados. Las flechas indican los niveles de glucosa al inicio del ensayo profiláctico o terapéutico. La Figura 15B muestra ACR en animales *db/db//BKS* no tratados. Las flechas indican ACR al inicio del ensayo profiláctico o terapéutico. Las Figuras 15C y 15D muestran los niveles de glucosa en sangre posprandiales del tratamiento anti-VEGF-B preventivo en *db/db//BKS* mostrados por separado para ratones macho (6C n=5/grupo) y hembra (6D, n=5-6/grupo). Las Figuras 15E y 15F muestran los niveles de glucosa en sangre posprandiales del tratamiento anti-VEGF-B terapéutico en ratones *dh/db//BKS* mostrados por separado para ratones macho (15E, n=5/grupo) y hembra (15F, n=5-6/grupo). El período de administración del tratamiento anti-VEGF-B (2H10) se indica en los gráficos respectivos.

La Figura 16A es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la esclerosis glomerular medida por la expansión mesangial en la sección de riñón de los ratones *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control durante 8 semanas (como se indica). Los valores son medias ± s.e.m. *P<0,05, **P<0,01 en comparación con los ratones *db/db//BKS* tratados con control.

La Figura 16B es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la esclerosis tubular medida por el tamaño de los glomérulos en secciones de riñón de ratones *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control durante 8 semanas (como se indica) de una manera profiláctica. Los valores son medias ± s.e.m. *P<0,05, **P<0,01 en comparación con los ratones *db/db//BKS* tratados con control.

La Figura 17A es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con podocina glomerular en secciones de riñón de ratones *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control de manera profiláctica o ratones de control *db+*. Los valores son medias ± s.e.m. ###P<0,01, en comparación con los controles *db+* magros. **P<0,01, ***P<0,001 en comparación con el control de *db/db* tratado. n=3-7/grupo.

La Figura 17B es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con pecam glomerular en secciones de riñón de ratones *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control de manera profiláctica. Los valores son medias ± s.e.m. *P<0,05, **P<0,01 en comparación con los controles.

La Figura 18A es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con adipofilina glomerular en cortes de riñón de ratones *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control de manera profiláctica. Los valores son medias ± s.e.m. #P<0,05, en comparación con los controles *db+* magros. (n=3-7/grupo).

La Figura 18B es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con sinaptopodina glomerular en cortes de riñón de ratones *db/dh//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control de manera profiláctica. Los valores son medias ± s.e.m. *P<0,05. **P<0,01 en comparación con los controles. (n=3-5/grupo).

La Figura 19 es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con colágeno IV glomerular en cortes de riñón de ratones *BKS dh/db//* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control de manera profiláctica. Los valores son medias ± s.e.m. *P<0,05. **P<0,01 en comparación con los controles. (n=3-5/grupo).

Las Figuras 20A-C son una serie de representaciones gráficas que muestran la inhibición farmacológica de VEGF-B, usando 2H10 de manera profiláctica, mejora el perfil de lípidos en plasma en ratones *db/db//BKS* diabéticos. Análisis de ratones *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control (n=8/grupo) y animales *db+* magros (n=3). Los gráficos representan niveles plasmáticos de la (Figura 11A) HDL-c y LDL-c, (Figura 11B) FA esterificados (NEFA) y (Figura 11B) cetonas. #/**P<0,05. ###/***P<0,01, en comparación con *db+* magros o en comparación con control de *db/db* tratado. Los valores son medias ± s.e.m.

La Figura 21A es una representación gráfica que muestra la cuantificación del grosor de GBM en secciones de riñón de ratones *db+* y *db/dh//BKS* magros tratados profilácticamente con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control. n=3-4/grupo. Los valores son medias ± s.e.m. ###P<0,01 en comparación con los controles *db+* magros y **P<0,01 en comparación con el control *dh/db* tratado.

La Figura 21B es una representación gráfica que muestra la cuantificación del número de cortes en secciones de riñón de ratones *db+* y *db/db//BKS* tratados profilácticamente con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control. n=3-4/grupo. Los valores son medias ± s.e.m. ###P<0,01 en comparación con los controles *db+* magros y **P<0,01 en comparación con el control de *db/db* tratado.

La Figura 22 es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con aceite rojo O tanto en glomérulos como en el compartimento tubular en las secciones de riñón de ratones *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control y animales *db+* magros. n=3-7/grupo. Los valores son medias ± s.e.m. ###P<0,001, en comparación con los controles *Db+* magros. **P<0,01 en comparación con el

control de *db/db* tratado.

La Figura 23A es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la esclerosis glomerular medida por la expansión mesangial en secciones de riñón de ratones *db/db//BKS* hembra tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control durante 8 semanas (según se indique) de manera terapéutica. Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 en comparación con los controles.

La Figura 23B es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la esclerosis glomerular medida por la expansión mesangial en secciones de riñón de ratones *db/db//BKS* macho tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control durante 8 semanas (según se indique) de manera terapéutica. Los valores son medias \pm s.e.m.

La Figura 24 es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con aceite rojo O en secciones de riñón de ratones *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control durante 8 semanas (según se indique) de manera terapéutica. Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 en comparación con los controles.

La Figura 25A es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con pecan glomerular en secciones de riñón de ratones *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control de manera terapéutica. Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05, **P<0,01 en comparación con los controles.

La Figura 25B es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con sinaptopodina glomerular en secciones de riñón de ratones *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control de una manera terapéutica. Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05, **P<0,01 en comparación con los controles. (n=4-5/grupo).

La Figura 26A es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con colágeno IV glomerular en secciones de riñón de ratones *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control de una manera terapéutica. Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05 en comparación con los controles.

La Figura 26B es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con α -SMA glomerular en secciones de riñón de ratones *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2S10) o de control de una manera terapéutica. Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05, **P<0,01 en comparación con los controles. (n=4-5/grupo).

La Figura 26C es una representación gráfica que muestra la cuantificación del grosor arteriolar glomerular en secciones de riñón de ratones *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control de manera terapéutica. Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05, **P<0,01 en comparación con los controles. (n=4-5/grupo).

La Figura 27A es una representación gráfica que muestra la ACR de la orina medida por ELISA en ratones *db/dh//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control durante 8 semanas o animales magros (n=grupo 3-7). Los valores son medias \pm s.e.m. El punto de inicio y el punto final muestran la ACR antes y después del período de tratamiento, respectivamente. *P<0,05, **P<0,01 en comparación con los animales tratados control.

La Figura 27B es una representación gráfica que muestra la tasa de filtración glomerular medida como la depuración de creatinina en ratones *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control durante 8 semanas o animales magros (n=grupo 3-7). Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 en comparación con los animales tratados con control *db/db*.

La Figura 27C es una representación gráfica que muestra la presión arterial del manguito de la cola (presión arterial sistólica y diastólica) en ratones *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control durante 8 semanas o animales magros (n=3-7 grupo). Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 en comparación con los animales tratados con control *db/db*.

La Figura 27D es una serie de tres representaciones gráficas que muestran el peso corporal (gráfico de la izquierda), el peso de los riñones (gráfico del centro) y la relación entre el peso corporal y el peso de los riñones (gráfico de la derecha) en ratones *db/dh//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control durante 8 semanas o animales magros (n=grupo 4). Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 en comparación con los animales tratados con control *db/db*.

La Figura 28 es una representación gráfica que muestra los niveles de glucosa en sangre en ratones alimentados con HFD tratados terapéuticamente con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control, y animales de control magros. Niveles de glucosa en sangre posprandiales al final del período de tratamiento. Los valores son medias \pm s.e.m. ##P<0,01 en comparación con los animales de control magros.

La Figura 29A es una representación gráfica que muestra los niveles de albúmina en orina en ratones alimentados con HFD tratados terapéuticamente con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control, y animales de control magros (n=5-10/grupo). ACR, proporción albúmina/creatinina. Los valores son medias \pm s.e.m. #P<0,05, ###P<0,001 en comparación con los animales de control magros. ***P<0,001 en comparación con el control tratado alimentado con HFD.

La Figura 29B es una representación gráfica que muestra la proporción de albúmina/creatinina en la orina medida por ELISA en ratones alimentados con HFD tratados terapéuticamente con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control, y animales de control magros (n=5-10/grupo). Los valores son medias \pm s.e.m. #P<0,05, ###P<0,001 en comparación con los animales de control magros. ***P<0,001 en comparación con el control tratado alimentado con HFD.

La Figura 30A es una representación gráfica que muestra los niveles en plasma de triglicéridos en ratones

alimentados con HFD tratados terapéuticamente con anticuerpos anti-VEGF-B (2H10) o de control y animales de peso magros (n=5-10/grupo). #P<0,05, ## P<0,01, en comparación con los animales de control magros. Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05. En comparación con el control tratado alimentado con HFD.

5 La Figura 30B es una representación gráfica que muestra los niveles en plasma de FA no esterificados (NFFA) en ratones alimentados con HFD tratados terapéuticamente con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control y animales de peso magros (n=5-10/grupo). #P<0,05, ## P<0,01, en comparación con los animales de control magros. Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05, en comparación con el control tratado alimentado con HFD.

10 La Figura 30C es una representación gráfica que muestra los niveles en plasma de cetonas en ratones alimentados con HFD tratados terapéuticamente con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control y animales wt magros (n=5-10/grupo). #P<0,05, ## P<0,01, en comparación con los animales de control magros. Los valores son medias \pm s.e.m. *P<0,05, en comparación con el control tratado alimentado con HFD

15 La Figura 31A es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la expansión mesangial glomerular en ratones alimentados con HFD tratados terapéuticamente con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control y animales wt magros. n=5-10/grupo. Los valores son medias \pm s.e.m. #P<0,05, ### P<0,001 en comparación con los animales de control magros. ***P<0,001 en comparación con el control tratado alimentado con HFD.

20 La Figura 31B es una representación gráfica que muestra la cuantificación del área de glomérulos en ratones alimentados con HFD tratados terapéuticamente con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control y animales wt magros. n=5-10/grupo. Los valores son medias \pm s.e.m. #P<0,05, ### P<0,001 en comparación con los animales de control magros. ***P<0,001 en comparación con el control tratado alimentado con HFD.

25 La Figura 32 es una representación gráfica que muestra la tinción con aceite rojo O de glomérulos de secciones de riñón de ratones alimentados con HFD tratados terapéuticamente con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control, y animales de control magros. ###P<0,01 en comparación con el control magro y **P<0,01 en comparación con los animales tratados de control con HFD.

30 La Figura 33A es una representación gráfica que muestra la cuantificación de la tinción con colágeno IV de secciones de riñón de ratones alimentados con HFD tratados terapéuticamente con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control, y animales de control magros. #P<0,05 en comparación con los animales de control magros. *P<0,05 en comparación con el control tratado alimentado con HFD.

35 La Figura 33B es una representación gráfica que muestra la cuantificación del grosor arteriolar en secciones de riñón de ratones alimentados con HFD tratados terapéuticamente con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control, y animales de control magros. #P<0,05 en comparación con los animales de control magros. *P<0,05 en comparación con el control tratado alimentado con HFD.

40 La Figura 34A es una representación gráfica que muestra los niveles de glucosa en la sangre antes y después de las inyecciones de estreptozotocina (STZ). Los animales de control magros no fueron inyectados con STZ. Después de las inyecciones de STZ. a los animales con hiperglucemia establecida (niveles de glucosa en sangre por encima de 12 mM) se les dosificó anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control. (n=3-7/grupo). Los valores son medias \pm s.e.m. ## P<0,01, ### P<0,001 en comparación con los animales de control magros. STZ, estreptozotocina

45 La Figura 34B es una representación gráfica que muestra los niveles de glucosa en sangre en ratones tratados con STZ (que no sean animales de control magros) y tratados con anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o anticuerpo de control, y animales de control magros. A los animales de control magro no se les inyectó STZ. (n=3-7/grupo). Los valores son medias \pm s.e.m. ###P<0,01, ### P<0,001 en comparación con los animales de control magros. STZ, estreptozotocina

50 La Figura 35A es una representación gráfica que muestra la proporción de albúmina/creatinina (ACR) en ratones antes de la administración de STZ y después de la administración de STZ con dosificación de anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control durante 1 semana. A los animales de control magros y los animales *db/db* no se les inyectó STZ. La proporción de albúmina/creatinina en orina se midió mediante ELISA (n=3-6/grupo). ACR, proporción albúmina/creatinina. Los valores son medias \pm s.e.m. ###P<0,01 en comparación con animales pre STZ. *P<0,05 en comparación con los animales tratados con control STZ. STZ, estreptozotocina.

55 La Figura 35B es una representación gráfica que muestra los niveles de albúmina en ratones antes de la administración de STZ y después de la administración de STZ con dosificación de anticuerpo anti-VEGF-B (2H10) o de control durante 1 semana. A los animales de control magro no se les inyectó STZ. Los niveles de albúmina en orina se midieron por ELISA (n=3-6/grupo). Los valores son medias \pm s.e.m. ###P<0,01 en comparación con animales pre STZ. *P<0,05 en comparación con los animales tratados con control STZ. STZ, estreptozotocina.

CLAVE PARA EL LISTADO DE SECUENCIAS

60 La SEQ ID NO: 1 es una secuencia de aminoácidos de una isoforma de VEGF-B₁₈₆ humana que contiene una secuencia de señal N-terminal de 21 aminoácidos

La SEQ ID NO: 2 es una secuencia de aminoácidos de una isoforma de VEGF-B₁₆₇ humana que contiene una secuencia de señal N-terminal de 21 aminoácidos

65 La SEQ ID NO: 3 es una secuencia de aminoácidos de una V_H del anticuerpo 2H10.

- La SEQ ID NO: 4 es una secuencia de aminoácidos de una V_L del anticuerpo 2H10.
 La SEQ ID NO: 5 es una secuencia de aminoácidos de una V_H de una forma humanizada del anticuerpo 2H10.
 5 La SEQ ID NO: 6 es una secuencia de aminoácidos de una V_L de una forma humanizada del anticuerpo 2H10.
 La SEQ ID NO: 7 es una secuencia de aminoácidos de una V_a del anticuerpo 4E12.
 La SEQ ID NO: 8 es una secuencia de aminoácidos de una V_L del anticuerpo 4E12.
 La SEQ ID NO: 9 es una secuencia de aminoácidos de una V_H del anticuerpo 2F5.
 10 La SEQ ID NO: 10 es una secuencia de aminoácidos de una V_L del anticuerpo 2F5.
 La SEQ ID NO: 11 es una secuencia de nucleótidos de una CDR1 de V_L del anticuerpo 2H10
 La SEQ ID NO: 12 es una secuencia de nucleótidos de una CDR2 de V_L del anticuerpo 2H10
 La SEQ ID NO: 13 es una secuencia de nucleótidos de una CDR3 de V_L del anticuerpo 2H10
 La SEQ ID NO: 14 es una secuencia de nucleótidos de una CDR1 de V_H del anticuerpo 2H10
 La SEQ ID NO: 15 es una secuencia de nucleótidos de una CDR2 de V_H del anticuerpo 2H10
 15 La SEQ ID NO: 16 es una secuencia de nucleótidos de una CDR3 de V_H del anticuerpo 2H10
 La SEQ ID NO: 17 es una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de V_L del anticuerpo 2H10
 La SEQ ID NO: 18 es una secuencia de aminoácidos de una CDR2 de V_L del anticuerpo 2H10
 La SEQ ID NO: 19 es una secuencia de aminoácidos de una CDR3 de V_L del anticuerpo 2H10
 20 La SEQ ID NO: 20 es una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de V_H del anticuerpo 2H10
 La SEQ ID NO: 21 es una secuencia de aminoácidos de una CDR2 de V_H del anticuerpo 2H10
 La SEQ ID NO: 22 es una secuencia de aminoácidos de una CDR3 de V_H del anticuerpo 2H10
 La SEQ ID NO: 23 es una secuencia de nucleótidos de una CDR1 de V_L del anticuerpo 2F5
 La SEQ ID NO: 24 es una secuencia de nucleótidos de una CDR2 de V_L del anticuerpo 2F5
 25 La SEQ ID NO: 25 es una secuencia de nucleótidos de una CDR3 de V_L del anticuerpo 2F5
 La SEQ ID NO: 26 es una secuencia de nucleótidos de una CDR1 de V_H del anticuerpo 2F5
 La SEQ ID NO: 27 es una secuencia de nucleótidos de una CDR2 de V_H del anticuerpo 2F5
 La SEQ ID NO: 28 es una secuencia de nucleótidos de una CDR3 de V_H del anticuerpo 2F5
 La SEQ ID NO: 29 es una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de V_L del anticuerpo 2F5
 30 La SEQ ID NO: 30 es una secuencia de aminoácidos de una CDR2 de V_L del anticuerpo 2F5
 La SEQ ID NO: 31 es una secuencia de aminoácidos de una CDR3 de V_L del anticuerpo 2F5
 La SEQ ID NO: 32 es una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de V_H del anticuerpo 2F5
 La SEQ ID NO: 33 es una secuencia de aminoácidos de una CDR2 de V_H del anticuerpo 2F5
 La SEQ ID NO: 34 es una secuencia de aminoácidos de una CDR3 de V_H del anticuerpo 2F5
 35 La SEQ ID NO: 35 es una secuencia de nucleótidos de una CDR1 de V_L del anticuerpo 4E12
 La SEQ ID NO: 36 es una secuencia de nucleótidos de una CDR2 de V_L del anticuerpo 4E12
 La SEQ ID NO: 37 es una secuencia de nucleótidos de una CDR3 de V_L del anticuerpo 4E12
 La SEQ ID NO: 38 es una secuencia de nucleótidos de una CDR1 de V_H del anticuerpo 4E12
 La SEQ ID NO: 39 es una secuencia de nucleótidos de una CDR2 de V_H del anticuerpo 4E12
 40 La SEQ ID NO: 40 es una secuencia de nucleótidos de una CDR3 de V_H del anticuerpo 4E12
 La SEQ ID NO: 41 es una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de V_L del anticuerpo 4E12
 La SEQ ID NO: 42 es una secuencia de aminoácidos de una CDR2 de V_L del anticuerpo 4E12
 La SEQ ID NO: 43 es una secuencia de aminoácidos de una CDR3 de V_L del anticuerpo 4E12
 La SEQ ID NO: 44 es una secuencia de aminoácidos de una CDR1 de V_H del anticuerpo 4E12
 45 La SEQ ID NO: 45 es una secuencia de aminoácidos de una CDR2 de V_H del anticuerpo 4E12
 La SEQ ID NO: 46 es una secuencia de aminoácidos de una CDR3 de V_H del anticuerpo 4E12

DESCRIPCIÓN DETALLADA

General

50 A lo largo de esta especificación, a menos que se afirme específicamente lo contrario o que el contexto requiera lo contrario, se debe considerar que la referencia a un solo paso, la composición de la materia, grupo de pasos o grupo de composiciones de la materia engloban uno y una pluralidad (es decir, uno o más) de esos pasos, composiciones de materia, grupos de pasos o grupos de composiciones de materia.

55 Los expertos en la técnica apreciarán que la presente divulgación es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Debe entenderse que la divulgación incluye todas estas variaciones y modificaciones. La divulgación también incluye todos los pasos, características, composiciones y compuestos referidos o indicados en esta especificación, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones o dos cualquiera o más de dichos pasos o características.

60 La presente divulgación no debe estar limitada en su alcance por los ejemplos específicos descritos en la presente, que se pretende sean únicamente con fines de ejemplificación. Los productos, composiciones y métodos funcionalmente equivalentes están claramente dentro del alcance de la presente divulgación.

65

Se entenderá que cualquier ejemplo de la presente divulgación se aplicará *mutatis mutandis* a cualquier otro ejemplo de la divulgación, a menos que se indique específicamente lo contrario.

5 Se entenderá que cualquier ejemplo de la presente divulgación en relación con el tratamiento o la prevención de una nefropatía se aplicará *mutatis mutandis* a la inhibición o prevención de una respuesta inmune innata (por ejemplo, una respuesta inmune innata en el sistema digestivo y/o una respuesta inmune innata sistémica) En un sujeto que padece una nefropatía.

10 A menos que se defina específicamente lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente deben entenderse con el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, inmunología, inmunohistoquímica, química de proteínas y bioquímica).

15 A menos que se indique lo contrario, la proteína recombinante, el cultivo celular y las técnicas inmunológicas usadas en la presente divulgación son procedimientos estándar, bien conocidos por los expertos en la materia. Tales técnicas se describen y explican a lo largo de la bibliografía en fuentes tales como, J. Pcrhal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984). J. Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M. Glover y B.D. Hames (editores), DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes 1-4. IRL Press (1995 y 1996), y F.M. Ausubel et al. (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta ahora), Ed Harlow y David Lane (editores) Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, (1988), y J.E. Coligan et al. (editores) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta ahora).

25 La descripción y definiciones de las regiones variables y partes de las mismas, las inmunoglobulinas, anticuerpos y fragmentos de los mismos en la presente pueden aclararse aún más por la exposición en Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health. Bethesda, Md., 1987 y 1991, Bork et al., J Mol. Biol. 242, 309-320, 1994, Chothia y Lesk J. Mol Biol. 196:901 -917, 1987, Chothia et al Nature 342, 877-883, 1989 y/o Al-Lazikani et al., J Mol Biol 273, 927-948.1997..

35 Se entenderá que cualquier exposición de una proteína o anticuerpo en la presente incluye cualquier variante de la proteína o anticuerpo producida durante la fabricación y/o el almacenamiento. Por ejemplo, durante la fabricación o el almacenamiento, un anticuerpo puede desaminarse (por ejemplo, en un residuo de asparagina o de glutamina) y/o puede tener glicosilación alterada y/o tener un residuo de glutamina convertido en piroglutamina y/o tener residuo N-terminal o C-terminal eliminado o "recortado" y/o tener parte o la totalidad de una secuencia de señal procesada incompletamente y, como consecuencia, permanecer en el extremo terminal del anticuerpo. Se entiende que una composición que comprende una secuencia de aminoácidos particular puede ser una mezcla heterogénea de la secuencia expuesta o codificada y/o variantes de la secuencia expuesta o codificada.

40 El término "y/o", por ejemplo, "X y/o Y" se entenderá que significa "X e Y" o "X o Y" y se entenderá para proporcionar soporte explícito para ambos significados o para cualquiera de ambos significados.

45 A lo largo de esta especificación, se entenderá que la palabra "comprender", o variaciones como "comprende" o "comprendiendo", implican la inclusión de un elemento, entero o paso expuesto, o grupo de elementos, enteros o pasos, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o paso, o grupo de elementos, enteros o pasos.

50 Como se usa en la presente, el término "derivado de" se entenderá que indica que un entero especificado puede obtenerse de una fuente particular, aunque no necesariamente de esa fuente.

Definiciones Seleccionadas

55 Se sabe que VEGF-B existe en dos isoformas principales, denominadas VEGF-B₁₈₆ y VEGF-B₁₆₇. Para propósitos de nomenclatura solamente y no de limitación, las secuencias ejemplares de VEGF-B₁₈₆ humano se establecen en la Secuencia de Referencia NCBI: NP_003368.1, en los números de acceso de proteínas NCBI NP_003368, P49765 y AAL79001 y en la SEQ ID NO: 1. En el contexto de la presente divulgación, la secuencia de VEGF-B₁₈₆ puede carecer de la secuencia de señal N-terminal de 21 aminoácidos (por ejemplo, como se expone en los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID NO: 1. Para propósitos de nomenclatura solamente y no de limitación de secuencias ejemplares de VEGF-B₁₆₇ humano se establecen en la Secuencia de Referencia NCBI: NP_001230662.1, en los números de acceso de proteínas NCBI AAL79000 y AAB06274 y en la SEQ ID NO: 2. En el contexto de la presente descripción, la secuencia de VEGF-B₁₆₇ puede carecer de la secuencia de señal N-terminal de 21 aminoácidos (por ejemplo, como se expone en los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID NO: 2. La secuencia adicional de VEGF-B puede determinarse usando las secuencias proporcionadas en la presente y/o en bases de datos disponibles al público y/o determinarse usando técnicas estándar (por ejemplo, como se describe en Ausubel

65

et al., (editores). Current Protocols in Molecular Biology. Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience (1988. incluyendo todas las actualizaciones hasta ahora) o Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). La referencia a VEGF-B humano puede abreviarse a hVEGF-B. En un ejemplo, la referencia en la presente a VEGF-B es a la isoforma VEGF-B₁₆₇.

5 La referencia en la presente a VEGF-B también abarca el péptido VEGF-B₁₀₋₁₀₈ como se describe en la WO2006/012688.

10 El término "nefropatía" debe entenderse como daño o enfermedad de un riñón. Este término abarca todos los cambios clínico-patológicos que afectan al riñón que pueden dar como resultado fibrosis renal y/o enfermedades glomerulares (por ejemplo, glomerulosclerosis, glomerulonefritis) y/o insuficiencia renal crónica, y pueden provocar enfermedad renal en etapa terminal y/o insuficiencia renal. Las nefropatías ejemplares incluyen nefropatía hipertensiva, nefropatía diabética y otros tipos de nefropatía como nefropatía analgésica, glomerulopatías mediadas por el sistema inmune (por ejemplo, nefropatía por IgA o enfermedad de Berger, nefritis por lupus), nefropatía isquémica, nefropatía asociada al VIH, nefropatía membranosa, glomerulonefritis, glomerulosclerosis, nefropatía inducida por medio de radiocontraste, nefropatía tóxica, nefrotoxicidad inducida por analgésicos, nefropatía por cisplatino, nefropatía por trasplante y otras formas de anomalías lesión glomerular: lesión capilar glomerular (fibrosis tubular). En algunos ejemplos. los términos "nefropatía" o "nefropatías" se refieren específicamente a un trastorno o enfermedad en la que hay presencia de proteínas (es decir, proteinuria), como la albúmina, en la orina de un sujeto y/o la presencia de insuficiencia renal. La nefropatía se diagnostica a menudo en base a la presencia de albúmina en la orina (microalbuminuria o macroalbuminuria), niveles de nitrógeno ureico en sangre aumentados (por ejemplo, niveles por encima de 20 mg/dl) y/o niveles de creatinina en suero aumentados (por ejemplo, niveles por encima de 1,3 mg/dl para machos y 1,1mg/dl para hembras).

25 El término "fibrosis" se refiere al procesamiento anormal de tejido fibroso, o degeneración fibroide o fibrosa. La fibrosis puede ser el resultado de varias lesiones o enfermedades. La fibrosis implica típicamente la producción, acumulación o depósito anormal de componentes de la matriz extracelular, incluyendo la sobreproducción y el depósito aumentado, por ejemplo, de colágeno y fibronectina. Como se usa en la presente, los términos "fibrosis de riñón" o "fibrosis renal" o "fibrosis del riñón" se refieren a enfermedades o trastornos asociados con la sobreproducción o depósito anormal de componentes de la matriz extracelular, particularmente colágeno, que lleva a la degradación o deterioro de la función del riñón.

30 El término "nefritis" se entenderá que significa la inflamación de un riñón. En el contexto de la presente divulgación, la nefritis abarca un subconjunto de nefropatía caracterizada por inflamación en un riñón. La inflamación puede involucrar glomérulos, túbulos o tejido intersticial que rodea los glomérulos y túbulos. Generalmente, la nefritis es o una glomerulonefritis (es decir, inflamación de los glomérulos) o nefritis intersticial (es decir, inflamación de los espacios intersticiales entre los túbulos renales).

35 El término "glomerulonefritis" abarca una clase de enfermedades renales, que pueden dividirse en las subclases de enfermedades proliferativas y enfermedades no proliferativas. Como lo sugieren los nombres, las enfermedades "proliferativas" incluyen formas de glomerulonefritis en las que hay un aumento significativo en el número de células en el glomérulo, mientras que las enfermedades "no proliferativas" incluyen formas de glomerulonefritis en las que no hay tal aumento en el número de células. Las enfermedades proliferativas ejemplares incluyen nefropatía por TgA, glomerulonefritis postinfecciosa, glomerulonefritis membranoproliferativa y glomerulonefritis rápidamente progresiva. Las enfermedades no proliferativas ejemplares incluyen enfermedad de cambio mínimo, glomerulosclerosis del segmento focal, enfermedad de la membrana basal delgada y glomerulonefritis membranosa.

40 La "nefropatía diabética" es una patología clínicamente bien definida caracterizada por proteinuria, hipertensión, edema e insuficiencia renal. Los aspectos característicos de la nefropatía diabética incluyen glomerulosclerosis, modificación de la estructura vascular, y enfermedad tubulointersticial. La primera evidencia clínica de nefropatía diabética es a menudo la presencia de albuminuria en la orina, por ejemplo, microalbuminuria o macroalbuminuria. La nefropatía diabética se caracteriza típicamente por lo siguiente: 1) glomerulosclerosis. 2) modificación de la estructura vascular, principalmente en las arteriolas pequeñas y 3) enfermedad tubulointersticial. El aspecto más característico de la nefropatía diabética es la lesión glomerular, detectable por el agrandamiento del mesangio y por el engrosamiento de la membrana basal. que a menudo parece una cicatrización difusa de toda la glomérula. La primera evidencia clínica de nefropatía diabética es la presencia de albuminuria o proteinuria.

45 Por "microalbuminuria" se entiende la presencia de 30-300 mg de albúmina por 24 horas de recolección de orina y/o 30-300 mg/l de albúmina en una sola muestra. Generalmente, ambos de los anteriores deben medirse en por lo menos dos de las tres muestras durante un período de dos a tres meses. La microalbuminuria también puede definirse por una proporción de albúmina a creatinina (ACR) de $\geq 3,5$ mg/mmol para mujeres o $\geq 2,5$ mg/mmol para hombres o entre 30-300 μ g de albúmina/mg de creatinina. Los niveles de albúmina pueden evaluarse usando, por ejemplo, tiras reactivas comercialmente disponibles (por ejemplo, que comprenden azul de bromofenol como indicador).

El término "macroalbuminuria" significa la presencia de cantidades de albúmina más altas (o ACR más alta) que las observadas en la microalbuminuria.

5 El término "proteinuria" significa que la cantidad de proteína total en la orina es de aproximadamente ≥ 30 mg/dl o una proporción de proteína/creatinina superior a 45 mg/mmol.

10 "Hipertensión" se refiere a un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) que tiene una presión sistólica de 140 mm Hg o más y/o una presión diastólica de 90 mm Hg o más. En algunos ejemplos de un método o uso descrito en la presente, un sujeto es prehipertensivo, por ejemplo, tiene una presión sistólica de aproximadamente 120-139 mm Hg o más y/o una presión diastólica de 80-89 mm Hg o más.

15 Se entenderá que el término "recombinante" significa el producto de la recombinación genética artificial. Por consiguiente, en el contexto de una proteína recombinante que comprende una región variable de anticuerpo, este término no abarca un anticuerpo de origen natural dentro del cuerpo de un sujeto que es el producto de la recombinación natural que tiene lugar durante la maduración de las células B. Sin embargo, si tal anticuerpo está aislado, debe considerarse una proteína aislada que comprende una región variable de anticuerpo. De manera similar, si el ácido nucleico que codifica la proteína está aislado y se expresa usando medios recombinantes, la proteína resultante es una proteína recombinante que comprende una región variable de anticuerpo. Una proteína recombinante también abarca una proteína expresada por medios recombinantes artificiales cuando está dentro de una célula, tejido o sujeto, por ejemplo, en el que se expresa.

25 Se entenderá que el término "proteína" incluye una cadena polipeptídica sencilla, es decir, una serie de aminoácidos contiguos ligados por enlaces peptídicos o una serie de cadenas polipeptídicas unidas entre sí covalente o no covalentemente (es decir, un complejo de polipéptidos). Por ejemplo, la serie de cadenas polipeptídicas puede ligarse covalentemente usando un enlace químico o disulfuro adecuado. Ejemplos de enlaces no covalentes incluyen enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, fuerzas de Van der Waals, e interacciones hidrófobas.

30 A partir del párrafo anterior se entenderá que el término "polipéptido" o "cadena polipeptídica" significa una serie de aminoácidos contiguos unidos por enlaces peptídicos.

35 El experto en la técnica sabrá que un "anticuerpo" se considera generalmente como una proteína que comprende una región variable compuesta por una pluralidad de cadenas polipeptídicas, por ejemplo, un polipéptido que comprende una región variable de la cadena ligera (V_L) y un polipéptido que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H). Un anticuerpo también comprende generalmente dominios constantes, algunos de los cuales pueden estar dispuestos en una región constante, que incluye un fragmento constante o fragmento cristalizante (Fc). En el caso de una cadena pesada, una V_H y una V_L interactúan para formar un Fv que comprende una región de unión al antígeno que es capaz de unirse específicamente a uno o unos pocos antígenos estrechamente relacionados. Generalmente, una cadena ligera de mamíferos es uno a cadena ligera κ o una cadena ligera λ y una cadena pesada de mamífero es α , δ , ϵ , γ o μ . Los anticuerpos pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase. El término "anticuerpo" también abarca anticuerpos humanizados, anticuerpos primatizados, anticuerpos humanos, anticuerpos deshumanizados y anticuerpos quiméricos.

45 Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" o "anticuerpo completo" se usan indistintamente para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, a diferencia de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo. Específicamente, los anticuerpos completos incluyen aquellos con cadenas pesadas y ligeras que incluyen una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia de tipo salvaje (por ejemplo, dominios constantes de secuencia de tipo salvaje humanos) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos.

50 Como se usa en la presente, "región variable" se refiere a las porciones de las cadenas ligeras y/o pesadas de un anticuerpo como se define en la presente que es capaz de unirse específicamente a un antígeno e incluye secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de la complementariedad (CDR); es decir, CDR1, CDR2 y CDR3, y regiones de marco (FR). Las regiones variables ejemplares comprenden tres o cuatro FR (por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y opcionalmente FR4) junto con tres CDR. En el caso de una proteína derivada de un IgNAR, la proteína puede carecer de una CDR2. V_H se refiere a la región variable de la cadena pesada. V_L se refiere a la región variable de la cadena ligera.

□ [0084]

60 Como se usa en la presente, el término "regiones determinantes de la complementariedad" (*sin*, CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3) se refiere a los residuos de aminoácidos de un dominio variable de anticuerpo, cuya presencia es necesaria para la unión al antígeno. Cada dominio variable tiene típicamente tres regiones CDR identificadas como CDR1, CDR2 y CDR3. Las posiciones de aminoácidos asignadas a las CDR y las FR pueden definirse de acuerdo con Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991 u otros sistemas de numeración en el desempeño de esta divulgación, por ejemplo, el

sistema de numeración canónico de Chothia y Lesk J. Mol Biol. 196: 901~917, 1987; Chothia et al. Nature 342, 877-883, 1989; y/o Al-Lazikani et al.. J Mol Biol 273: 927-948, 1997; el sistema de numeración IMGT de Lefranc et al., Devel. y Compar. Immunol., 27: 55-77, 2003; o el sistema de numeración AHO de Honnegher y Plückthun J. Mol. Biol., 309: 657-670, 2001..

5

Las "regiones marco" (FR) son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de CDR.

Como se usa en la presente, el término "Fv" debe entenderse como cualquier proteína, ya sea compuesta de múltiples polipéptidos o un único polipéptido, en el que una V_L y una V_H se asocian y forman un complejo que tiene un sitio de unión al antígeno, es decir, capaz de unirse específicamente a un antígeno. La V_H y la V_L que forman el sitio de unión al antígeno pueden estar en una única cadena polipeptídica o en diferentes cadenas polipeptídicas. Además, un Fv de la divulgación (así como cualquier proteína de la divulgación) puede tener múltiples sitios de unión al antígeno que pueden o no unirse al mismo antígeno. Se entenderá que este término abarca fragmentos derivados directamente de un anticuerpo así como proteínas correspondientes a dicho fragmento producido usando medios recombinantes. En algunos ejemplos, la V_H no está ligada a un dominio constante de la cadena pesada (C_H) 1 y/o la V_L no está ligada a un dominio constante de la cadena ligera (C_L). Los polipéptidos o proteínas que contienen Fv ejemplares incluyen un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab'), un scFv, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo o un complejo de orden superior, o cualquiera de los anteriores ligados a una región constante o dominio de la misma, por ejemplo, dominio C_{H2} o C_{H3} , por ejemplo, un minicuerpo. Un "fragmento Fab" consiste de un fragmento de unión al antígeno monovalente de un anticuerpo, y puede producirse por digestión de un anticuerpo completo con la enzima papaína, para producir un fragmento que consiste de una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada o puede producirse usando medios recombinantes. Un fragmento "Fab" puede obtenerse de un anticuerpo tratando un anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una molécula que consiste de una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada que comprende una V_H y un único dominio constante. Se obtienen dos fragmentos Fab' por anticuerpo tratado de esta manera. Un fragmento Fab' también puede producirse por medios recombinantes. Un "fragmento F(ab')₂" de un anticuerpo consiste de un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos por dos enlaces disulfuro, y se obtiene tratando una molécula de anticuerpo completa con la enzima pepsina, sin reducción posterior. Un fragmento "Fab₂" es un fragmento recombinante que comprende dos fragmentos Fab ligados usando, por ejemplo, una cremallera de leucina o un dominio C_{H3} . Un "Fv de cadena sencilla" o "scFv" es una molécula recombinante que contiene el fragmento de la región variable (Fv) de un anticuerpo en el que la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada están enlazados covalentemente por un conector polipeptídico flexible adecuado.

Como se usa en la presente, el término "se une" en referencia a la interacción de una proteína o un sitio de unión al antígeno del mismo con un antígeno significa que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo) en el antígeno. Por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína específica en lugar de a proteínas en general. Si un anticuerpo se une al epítipo "A", la presencia de una molécula que contenga el epítipo "A" (o "A" libre, no marcado), en una reacción que contenga "A" marcado y la proteína, reducirá la cantidad de "A" marcado unido al anticuerpo.

Como se usa en la presente, debe entenderse que el término "se une específicamente" o "específicamente se une" significa que una proteína de la divulgación reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con un antígeno o célula particular que expresa el mismo que lo que hace con antígenos o células alternativas. Por ejemplo, una proteína se une a VEGF-B con una afinidad materialmente mayor (por ejemplo, 20 veces o 40 veces o 60 veces o 80 veces a 100 veces o 150 veces o 200 veces) que a otro factor de crecimiento (por ejemplo, VEGF-A) o a antígenos comúnmente reconocidos por anticuerpos naturales reactivos polirreactivos (es decir, por anticuerpos de origen natural que se sabe que se unen a una variedad de antígenos que se encuentran de manera natural en humanos). Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa unión específica, y debe entenderse que cada término proporciona un soporte específico al otro término.

Como se usa en la presente, debe entenderse que el término "neutralizar" significa que una proteína es capaz de bloquear, reducir o prevenir la señalización de VEGF-B en una célula a través del VEGF-R1. Los métodos para determinar la neutralización son conocidos en la técnica y/o se describen en la presente.

Como se usa en la presente, se entenderá que el término "inhibe específicamente la señalización de VEGF-B" significa que el compuesto inhibe la señalización de VEGF-B y no inhibe de manera significativa o detectable la señalización por una o más proteínas de VEGF, por ejemplo, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y/o PIGF.

Como se usa en la presente, debe entenderse que el término "no inhibe significativamente" significa que el nivel de inhibición de la señalización por una proteína de VEGF distinta de VEGF-B (por ejemplo, la señalización por VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y/o PIGF) en presencia de un compuesto descrito en la presente no es estadísticamente significativamente más bajo que en ausencia del compuesto descrito en la presente (por ejemplo, en un ensayo de control que puede realizarse en presencia de un anticuerpo de control de isotipo).

65

Como se usa en la presente, se entenderá que el término "no inhibe de manera detectable" significa que un compuesto como se describe en la presente inhibe la señalización de una proteína de VEGF distinta de VEGF-B (por ejemplo, la señalización por VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y/o PIGF) en no más del 10% o 8% o 6% o 5% o 4% o 3% o 2% o 1% del nivel de señalización detectado en ausencia del compuesto descrito en la presente (por ejemplo, en un ensayo de control que puede realizarse en presencia de un anticuerpo de control de isotipo).

Como se usa en la presente, los términos "previniendo", "prevenir" o "prevención" incluyen administrar un compuesto de la divulgación para detener u obstaculizar de este modo el desarrollo de por lo menos un síntoma de una afección.

Como se usa en la presente, los términos "tratando", "tratar" o "tratamiento" incluyen administrar una proteína descrita en la presente para reducir o eliminar de este modo por lo menos un síntoma de una enfermedad o afección específica o para ralentizar la progresión de la enfermedad o afección.

Como se usa en la presente, debe entenderse que el término "sujeto" significa cualquier animal, incluyendo los humanos, por ejemplo un mamífero. Los sujetos ejemplares incluyen, pero no están limitados a humanos y primates no humanos. Por ejemplo, el sujeto es un humano.

Tratamiento de la nefropatía.

La divulgación en la presente proporciona, por ejemplo, un método para tratar o prevenir la nefropatía en un sujeto que comprende administrar al sujeto un compuesto que inhibe la señalización de VEGF-B.

En un ejemplo, el sujeto padece de diabetes. Por ejemplo, un sujeto que padece de diabetes tiene un marcador de diabetes clínicamente aceptado, como:

- Glucosa en plasma en ayunas mayor o igual a 7 nmol/l o 126 mg/dl;
- Glucosa en plasma ocasional (tomada en cualquier momento del día) mayor o igual a 11,1 nmol/l o 200 mg/dl con los síntomas de la diabetes.
- Valor de prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) mayor o igual a 11,1 nmol/l o 200 mg/dl medido en un intervalo de dos horas. La OGTT se administra durante un lapso de tiempo de dos o tres horas.

En un ejemplo, el sujeto padece de diabetes tipo 1.

En un ejemplo, el sujeto padece de diabetes tipo 2.

En un ejemplo, el sujeto padece de nefropatía diabética. Por ejemplo, el sujeto padece de nefropatía asociada con diabetes tipo 1. Por ejemplo, el sujeto padece de nefropatía asociada con diabetes tipo 2.

En un ejemplo, el sujeto está en riesgo de desarrollar nefropatía diabética. Por ejemplo, el sujeto está en riesgo de desarrollar nefropatía asociada con diabetes tipo 1. Por ejemplo, el sujeto está en riesgo de desarrollar nefropatía asociada con diabetes tipo 2.

En un ejemplo, el sujeto padece de microalbuminuria. De acuerdo con este ejemplo, el tratamiento de acuerdo con la presente divulgación puede reducir la microalbuminuria (por ejemplo, a menos de aproximadamente 30 mg de albúmina por 24 horas de recolección de orina y/o 30 mg/l de albúmina en una única muestra y/o una ACR de menos de 3,5 mg/mmol para mujeres o menos de 2,5 mg/mmol para hombres o menos de aproximadamente 30 µg de albúmina/mg de creatinina).

En otro ejemplo, el tratamiento de acuerdo con la presente divulgación previene o ralentiza la progresión de la microalbuminuria a macroalbuminuria.

En un ejemplo, el sujeto padece de tasa de filtración glomerular reducida, por ejemplo, como se mide por la tasa de depuración de creatinina reducida (por ejemplo, por debajo de 90 ml/min/1,73 m²). En un ejemplo, un método de la divulgación mejora la tasa de filtración glomerular.

En un ejemplo adicional, el sujeto padece de hipertensión o prehipertensión. En un ejemplo, un método de la divulgación es eficaz para disminuir la presión sanguínea sistólica y/o diastólica de un sujeto por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mm Hg o más.

En un ejemplo, la realización de un método descrito en la presente de acuerdo con cualquier ejemplo de la divulgación da como resultado la mejora de una respuesta clínica y/o una progresión de la enfermedad retardada.

Por "respuesta clínica" se entiende una mejora en los síntomas de la enfermedad. La respuesta clínica

puede lograrse dentro de un cierto marco temporal, por ejemplo, dentro de o aproximadamente 8 semanas desde el comienzo del tratamiento con, o desde la administración inicial. La respuesta clínica también puede mantenerse durante un período de tiempo, por ejemplo, durante >24 semanas, o ≥48 semanas.

5 La evaluación cuantitativa de la función renal y los parámetros de la disfunción renal son bien conocidos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en Levey (Am J Kidney Dis. 22(1):207-214, 1993). Ejemplos de ensayos para la determinación de la función/disfunción renal son: nivel de creatinina en suero; tasa de depuración de creatinina; tasa de depuración de cistatina C, depuración de creatinina en orina en 24 horas, secreción de proteínas en orina en 24 horas; tasa de filtración glomerular (GFR); proporción de albúmina creatinina en orina (ACR); tasa de excreción de albúmina (AER); y biopsia renal.

Inhibidores de la Señalización de VEGF-B

Proteínas que Comprenden Regiones Variables de Anticuerpos

15 Un ejemplo de inhibidor de la señalización de VEGF-B comprende una región variable del anticuerpo, por ejemplo, es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une a VEGF-B y neutraliza la señalización de VEGF-B.

20 En un ejemplo, la región variable del anticuerpo se une específicamente a VEGF-B.

Los anticuerpos y proteínas adecuados que comprenden regiones variables de los mismos son conocidos en la técnica.

25 Por ejemplo, los anticuerpos anti-VEGF-B y fragmentos de los mismos se describen en la WO20061012688.

30 En un ejemplo, el anticuerpo anti-VEGF-B o fragmento del mismo es un anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de 2H10 a VEGF-B o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En un ejemplo, el anticuerpo anti-VEGF-B o fragmento del mismo es el anticuerpo 2H10 o una versión quimérica, CDR injertada o humanizada del mismo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. A este respecto, el anticuerpo 2H10 comprende una V_H que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3 y una V_L que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4. Las versiones quiméricas y humanizadas ejemplares de este anticuerpo se describen en la WO2006/012688.

35 En un ejemplo, el anticuerpo anti-VEGF-B o fragmento del mismo comprende una V_H que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 5 y una V_L que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 6.

40 En un ejemplo, el anticuerpo anti-VEGF-B o fragmento del mismo es un anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de 4E12 a VEGF-B o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En un ejemplo, el anticuerpo anti-VEGF-B o fragmento del mismo es el anticuerpo 4E12 o una versión quimérica, CDR injertada o humanizada del mismo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. A este respecto, el anticuerpo 4E12 comprende una V_H que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 7 y una V_L que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 8.

45 En un ejemplo, el compuesto es una proteína que comprende una región variable humanizada del anticuerpo 4E12. Por ejemplo, la proteína comprende una región variable que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la V_H y/o la V_L del anticuerpo 4E12. Por ejemplo, la proteína comprende:

50 (i) una V_H que comprende:

55 (a) una CDR1 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 25-34 de la SEQ ID NO: 7;
 (b) una CDR2 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 49-65 de la SEQ ID NO: 7; y
 (c) una CDR3 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 98-105 de la SEQ ID NO: 7;
 y/o

(ii) una V_L que comprende:

60 (a) una CDR1 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 24-34 de la SEQ ID NO: 8;
 (b) una CDR2 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 50-56 de la SEQ ID NO: 8; y
 (c) una CDR3 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 89-97 de la SEQ ID NO: 8.

65 En un ejemplo, el anticuerpo anti-VEGF-B o fragmento del mismo es un anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de 2F5 a VEGF-B o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En un ejemplo, el

anticuerpo anti-VEGF-B o fragmento del mismo es el anticuerpo 2F5 o una versión quimérica, CDR injertada o humanizada del mismo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. A este respecto, el anticuerpo 2E5 comprende una V_H que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9 y una V_L que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 10.

5 En un ejemplo, el compuesto es una proteína que comprende una región variable humanizada del anticuerpo 2F5. Por ejemplo, la proteína comprende una región variable que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la V_H y/o la V_L del anticuerpo 2F5. Por ejemplo, la proteína comprende:

10 (i) una V_H que comprende:

- (a) una CDR1 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 25-34 de la SEQ ID NO: 9;
 (b) una CDR2 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 49-65 de la SEQ ID NO: 9; y
 15 (c) una CDR3 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 98-107 de la SEQ ID NO: 9; y/o

(ii) una V_L que comprende:

- (a) una CDR1 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 24-34 de la SEQ ID NO: 10;
 20 (b) una CDR2 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 50-56 de la SEQ ID NO: 10; y
 (c) una CDR3 que comprende una secuencia expuesta en los aminoácidos 89-96 de la SEQ ID NO: 10.

En otro ejemplo, un anticuerpo o proteína que comprende una región variable del mismo se produce usando un método estándar, por ejemplo, como se conoce en la técnica o se describe brevemente en la presente.

25 *Métodos basados en la inmunización*

Para generar anticuerpos, el VEGF-B o un fragmento portador de epítipo o una porción del mismo o una forma modificada del mismo o un ácido nucleico que lo codifique (un "inmunógeno"), opcionalmente formulado con cualquier adyuvante adecuado o deseado y/o portador farmacéuticamente aceptable, se administra a un sujeto (por ejemplo, un sujeto animal no humano, como un ratón, una rata, un pollo, etc.) en forma de composición inyectable. Los animales no humanos ejemplares son mamíferos, como animales murinos (por ejemplo, ratas o ratones). La inyección puede ser intranasal, intramuscular, subcutánea, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal o por otra vía conocida. Opcionalmente, el inmunógeno se administra numerosas veces. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son conocidos en la técnica (Ver, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Los métodos para producir anticuerpos anti-VEGF-B en ratones se describen en la WO2006/012688.

La producción de anticuerpos policlonales puede monitorizarse muestreando de sangre del animal inmunizado en varios puntos después de la inmunización. Se puede administrar una segunda inyección de refuerzo, si se requiere, para lograr un título de anticuerpo deseado. El proceso de refuerzo y titulación se repite hasta lograr un título adecuado. Cuando se obtiene un nivel deseado de inmunogenicidad, se extrae una muestra de sangre del animal inmunizado el suero se aísla y almacena, y/o el animal se utiliza para generar anticuerpos monoclonales (mAbs).

Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos ejemplares contemplados por la presente divulgación. Generalmente, la producción de anticuerpos monoclonales implica, inmunizar un sujeto (por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón o una rata) con el inmunógeno bajo condiciones suficientes para estimular las células productoras de anticuerpos. En algunos ejemplos, un ratón diseñado genéticamente para expresar anticuerpos humanos y no expresar proteínas de anticuerpos murinos, se inmuniza para producir un anticuerpo (por ejemplo, como se describe en el PCT/US2007/008231 y/o Lonberg et al., *Nature* 368 (1994):856-859). Después de la inmunización, las células somáticas productoras de anticuerpos (por ejemplo, linfocitos B) se fusionan con células inmortales, por ejemplo, células de mieloma inmortales. Varios métodos para producir tales células fusionadas (hibridomas) son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Kohler y Milstein, *Nature* 256, 495-497, 1975. Las células del hibridoma se pueden cultivar luego bajo condiciones suficientes para la producción de anticuerpos.

La presente divulgación contempla otros métodos para producir anticuerpos, por ejemplo, tecnología ABL-MYC (como se describe, por ejemplo, en Largaespada et al, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 166. 91-96. 1990).

60 *Métodos basados en Bibliotecas*

La presente divulgación también abarca la selección de bibliotecas de anticuerpos o proteínas que comprenden dominios de unión al antígeno de los mismos (por ejemplo, que comprenden regiones variables de los mismos) para identificar un anticuerpo o proteína de unión a VEGF-B que comprende una región variable de los mismos.

Los ejemplos de bibliotecas contempladas por esta divulgación incluyen bibliotecas sin tratamiento previo (de sujetos no expuestos), bibliotecas inmunizadas (de sujetos inmunizados con un antígeno) o bibliotecas sintéticas. Los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o regiones de los mismos (por ejemplo, regiones variables) se clonan mediante técnicas convencionales (por ejemplo, como se describe en Sambrook y Russell, eds, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Ed, vols. 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) y se usan para codificar y mostrar proteínas usando un método conocido en la técnica. Otras técnicas para producir bibliotecas de proteínas se describen en, por ejemplo, la US6300064 (por ejemplo, una biblioteca HuCAL de Morphosys AG); la US5885793; US6204023; US6291158; o US6248516.

Las proteínas de acuerdo con la divulgación pueden ser proteínas secretadas solubles o pueden presentarse como una proteína de fusión en la superficie de una célula, o partícula (por ejemplo, un fago u otro virus, un ribosoma o una espora). En la técnica se conocen varios formatos de biblioteca de presentación. Por ejemplo, la biblioteca es una biblioteca de presentación *in vitro* (por ejemplo, una biblioteca de presentación de ribosomas, una biblioteca de presentación covalente o una biblioteca de presentación de ARNm, por ejemplo, como se describe en la US7270969). En otro ejemplo más, la biblioteca de presentación es una biblioteca de presentación de fagos en la que las proteínas que comprenden dominios de unión a antígeno de anticuerpos se expresan en fagos, por ejemplo, como se describe en la US6300064; US5885793; US6204023; US6291158; o US6248516. Otros métodos de presentación de fagos son conocidos en la técnica y se contemplan en la presente divulgación. De manera similar, los métodos de presentación celular se contemplan por la divulgación, por ejemplo, bibliotecas de presentación bacteriana, por ejemplo, como se describe en la US5516637; bibliotecas de presentación de levadura, por ejemplo, como se describe en la US6423538 o una biblioteca de presentación de mamíferos.

Los métodos para seleccionar bibliotecas de presentación son conocidos en la técnica. En un ejemplo, una biblioteca de presentación de la presente divulgación se selecciona usando purificación por afinidad, por ejemplo, como se describe en Scopes (en: Protein purification: principles and practice, Tercera edición. Springer Verlag, 1994). Los métodos de purificación por afinidad típicamente implican poner en contacto proteínas que comprenden dominios de unión al antígeno presentados por la biblioteca con un antígeno objetivo (por ejemplo, VEGF-B) y, después del lavado, agrupar aquellos dominios que permanecen unidos al antígeno.

Cualquier región variable o scFv identificados por selección se modifican fácilmente en un anticuerpo completo, si se desea. Los métodos ejemplares para modificar o reformatear regiones variables o scFv en un anticuerpo completo se describen, por ejemplo, en Jones et al., J. Immunol Methods. 354:85-90, 2010; o Jostock et al., J. Immunol Methods, 289: 65-80. 2004. Alternativamente, o adicionalmente, se usan métodos de clonación estándar, por ejemplo, como se describe en Ausubel et al (En: Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, ISBN 047 150338, 1987), y/o (Sambrook et al (En: Molecular Cloning : Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Tercera edición 2001).

Proteínas desinmunizadas, quiméricas, humanizadas, sinhumanizadas, primatizadas y humanas

Las proteínas de la presente divulgación pueden ser una proteína humanizada.

Se entenderá que el término "proteína humanizada" se refiere a una proteína que comprende una región variable de tipo humano, que incluye CDR de un anticuerpo de una especie no humana (por ejemplo, ratón o rata o primate no humano) injertadas o insertadas en FR de un anticuerpo humano (este tipo de anticuerpo también se refiere a un "anticuerpo injertado en CDR"). Las proteínas humanizadas también incluyen proteínas en las que uno o más residuos de la proteína humana están modificados por una o más sustituciones de aminoácidos y/o uno o más residuos de FR de la proteína humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Las proteínas humanizadas también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo humano ni en el anticuerpo no humano. Cualquier región adicional de la proteína (por ejemplo, región Fc) es generalmente humana. La humanización puede realizarse usando un método conocido en la técnica, por ejemplo, US5225539, US6054297, US7566771 o US5585089. El término "proteína humanizada" también abarca una proteína super-humanizada, por ejemplo, como se describe en la US7732578.

Las proteínas de la presente divulgación pueden ser proteínas humanas. El término "proteína humana", como se usa en la presente, se refiere a proteínas que tienen regiones de anticuerpos variables y, opcionalmente, constantes encontradas en humanos, por ejemplo, en la línea germinal humana o en células somáticas o de bibliotecas producidas usando tales regiones. Los anticuerpos "humanos" pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas, por ejemplo, mutaciones introducidas por mutaciones aleatorias o dirigidas al sitio *in vitro* (en particular, mutaciones que implican sustituciones conservadoras o mutaciones en un pequeño número de residuos de la proteína, por ejemplo, en 1, 2, 3, 4 o 5 de los residuos de la proteína). Estos "anticuerpos humanos" no necesariamente necesitan ser generados como resultado de una respuesta inmune de un humano, sino que pueden generarse usando medios recombinantes (por ejemplo, seleccionando una biblioteca de presentación de fagos) y/o por un animal transgénico (por ejemplo, un ratón) que comprende ácido nucleico que codifica regiones constantes y/o variables de anticuerpos humanos y/o que usa selección guiada (por ejemplo, como

se describe en la US5565332). Este término también abarca formas maduras por afinidad de tales anticuerpos. Para los propósitos de la presente divulgación, también se considerará que una proteína humana incluye una proteína que comprende las FR de un anticuerpo humano o FR que comprenden secuencias de una secuencia de consenso de FR humanas y en la que una o más de las CDR son aleatorias o semi-aleatorias, por ejemplo, como se describe en la US6300064 y/o la US6248516.

Las proteínas de la presente divulgación pueden ser proteínas sinhumanizadas. El término "proteína sinhumanizada" se refiere a una proteína preparada por un método descrito en la WO2007/019620. Una proteína sinhumanizada incluye una región variable de un anticuerpo, en donde la región variable comprende FR de una región variable de anticuerpo de primate del Nuevo Mundo y CDR de una región variable de anticuerpo de primate no del Nuevo Mundo. Por ejemplo, una proteína sinhumanizada incluye una región variable de un anticuerpo, en donde la región variable comprende FR de una región variable de anticuerpo de primate del Nuevo Mundo y CDR de un anticuerpo de ratón o rata.

Las proteínas de la presente divulgación pueden ser proteínas primatizadas. Una "proteína primatizada" comprende región(es) de un anticuerpo generada después de la inmunización de un primate no humano (por ejemplo, un macaco cynomolgus). Opcionalmente, las regiones variables del anticuerpo de primate no humano se enlazan a regiones constantes humanas para producir un anticuerpo primatizado. Los métodos ejemplares para producir anticuerpos primatizados se describen en la US6113898.

En un ejemplo, una proteína de la divulgación es una proteína quimérica. El término "proteínas quiméricas" se refiere a proteínas en las que un dominio de unión al antígeno es de una especie particular (por ejemplo, murina, como de ratón o rata) o pertenece a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la proteína es de proteína derivada de otra especie (como, por ejemplo, primate humano o no humano) o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpos. En un ejemplo, una proteína quimérica es un anticuerpo quimérico que comprende una V_H y/o una V_L de un anticuerpo no humano (por ejemplo, un anticuerpo murino) y las regiones restantes del anticuerpo son de un anticuerpo humano. La producción de tales proteínas quiméricas es conocida en la técnica, y puede lograrse por medios estándar (como se describe, por ejemplo, en la US6331415; US5807715; US4816567 y US4816397).

La presente descripción también contempla una proteína desinmunizada, por ejemplo, como se describe en la WO2000/34317 y la WO2004/108158. Los anticuerpos y proteínas desinmunizados tienen uno o más epítopos, por ejemplo, epítopos de células B o epítopos de células T eliminados (es decir, mutados) para reducir de este modo la probabilidad de que un sujeto genere una respuesta inmune contra el anticuerpo o la proteína.

Otras proteínas que comprenden regiones variables de anticuerpos

La presente divulgación también contempla otras proteínas que comprenden una región variable o un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo, como:

- (i) un anticuerpo de un solo dominio, que es una cadena polipeptídica sencilla que comprende todo o una parte de la V_H o una V_L de un anticuerpo (ver, por ejemplo, la US6248516);
- (ii) diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, por ejemplo, como se describe en la US5844094 y/o la US2008152586;
- (iii) scFv, por ejemplo, como se describe en la US5260203;
- (iv) minicuerpos, por ejemplo, como se describe en la US5837821;
- (v) proteínas biespecíficas de "llave y agujero" como se describe en la US5731168 ;
- (vi) proteínas heteroconjugadas, por ejemplo, como se describe en la US4676980;
- (vii) proteínas heteroconjugadas producidas usando un reticulador químico, por ejemplo, como se describe en la US4676980;
- (viii) fragmentos Fab'-SH, por ejemplo, como se describe en Shalaby et al, J. Exp. Med., 175: 217-225, 1992; o
- (ix) Fab₃ (por ejemplo, como se describe en la EP19930302894).

Fusiones de Dominio Constantes

La presente divulgación abarca una proteína que comprende una región variable de un anticuerpo y una región constante o Fc o un dominio del mismo, por ejemplo, el dominio C_{H2} y/o C_{H3} . Las regiones y/o dominios constantes adecuados serán evidentes para el experto en la técnica y/o las secuencias de tales polipéptidos están fácilmente disponibles en bases de datos públicamente disponibles. Kabat *et al* también proporcionan una descripción de algunas regiones/dominios constantes adecuados.

Las regiones constantes y/o dominios de las mismas son útiles para proporcionar actividades biológicas como, dimerización, semivida sérica prolongada, por ejemplo, mediante la unión a FcRn (receptor de Fc neonatal), citotoxicidad celular dependiente de antígeno (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), fagocitosis

celular dependiente del antígeno (ADCP).

La presente divulgación también contempla proteínas que comprenden regiones o dominios constantes mutantes, por ejemplo, como se describe en la US7217797; LTS72171Y8; o US20090041770 (teniendo vida media aumentada) o LTS2005037000 (ADCC aumentada).

Proteínas Estabilizadas

Las proteínas neutralizantes de la presente divulgación pueden comprender una región constante de IgG4 o una región constante de IgG4 estabilizada. Se entenderá que la expresión "región constante de IgG4 estabilizada" significa una región constante de IgG4 que se ha modificado para reducir el intercambio de brazos Fab o la propensión a sufrir un intercambio de brazos Fab o la formación de un medio-anticuerpo o una propensión a formar un medio anticuerpo. "Intercambio de brazo Fab" se refiere a un tipo de modificación de proteínas para la IgG4 humana, en la que una cadena pesada de IgG4 y una cadena ligera unida (media-molécula) se intercambian por un par de cadenas pesada-ligera de otra molécula de IgG4. Por tanto, las moléculas de IgG4 pueden adquirir dos brazos Fab distintos que reconocen dos antígenos distintos (dando como resultado moléculas biespecíficas). El intercambio de brazos Fab tiene lugar naturalmente *in vivo* y puede inducirse *in vitro* por células sanguíneas purificadas o agentes reductores como glutatión reducido. Un "medio anticuerpo" se forma cuando un anticuerpo IgG4 se disocia para formar dos moléculas, cada una de las cuales contiene una única cadena pesada y una única cadena ligera.

En un ejemplo, una región constante de IgG4 estabilizada comprende una prolina en la posición 241 de la región bisagra según el sistema de Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services. 1987 y/o 1991). Esta posición corresponde a la posición 228 de la región bisagra de acuerdo con el sistema de numeración de la UE (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 2001 and Edelman et al., Proc. Natl. Acad USA, 63, 78-85, 1969). En la IgG4 humana, este residuo es generalmente una serina. Después de la sustitución de la serina por prolina, la región bisagra de IgG4 comprende una secuencia CPPC. A este respecto, el experto en la técnica sabrá que la "región bisagra" es una porción rica en prolina de una región constante de la cadena pesada del anticuerpo que une las regiones Fc y Fab que confiere movilidad en los dos brazos Fab de un anticuerpo. La región bisagra incluye residuos de cisteína que están implicados en enlaces disulfuro de cadena inter-pesada. Generalmente se define como el estiramiento de Glu226 a Pro243 de IgG1 humana de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 colocando el primer y el último residuo de cisteína que forman enlaces disulfuro de cadena inter-pesada (S-S) en las mismas posiciones (ver, por ejemplo la WO20101080538).

Inhibidores de la Señalización de VEGF-B Basados en Proteínas Adicionales

Otras proteínas que pueden interferir con la interacción productiva de VEGF-B con su receptor incluyen proteínas VEGF-B mutantes.

En un ejemplo, el inhibidor es una proteína soluble que comprende uno o más dominios de un VEGF-R1 que se encuentran detrás de VEGF-B (y, por ejemplo, no se unen sustancialmente a VEGF-A). En un ejemplo, la proteína soluble comprende adicionalmente una región constante de un anticuerpo, tal como un anticuerpo IgG1. Por ejemplo, la proteína soluble comprende adicionalmente una región Fc y, opcionalmente, una región bisagra de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo IgG1.

En un ejemplo, el inhibidor de proteínas es un mimético de anticuerpos, por ejemplo, un andamiaje de proteínas que comprende regiones variables que se unen a una proteína objetivo de una manera análoga a un anticuerpo. A continuación se proporciona una descripción de miméticos de anticuerpos ejemplares.

Inmunoglobulinas y Fragmentos de Inmunoglobulinas

Un ejemplo de un compuesto de la presente divulgación es una proteína que comprende una región variable de una inmunoglobulina, como un receptor de células T o una inmunoglobulina de cadena pesada (por ejemplo, una IgNAR, un anticuerpo camélido).

Inmunoglobulinas de Cadena Pesada

Las inmunoglobulinas de cadena pesada difieren estructuralmente de muchas otras formas de inmunoglobulina (por ejemplo, anticuerpos) en la medida en que comprenden una cadena pesada, pero no comprenden una cadena ligera. Por consiguiente, estas inmunoglobulinas también son referidas como "anticuerpos de cadena pesada solamente". Las inmunoglobulinas de cadena pesada se encuentran, por ejemplo, en camélidos y peces cartilagosos (también denominadas IgNAR).

Las regiones variables presentes en inmunoglobulinas de cadena pesada de origen natural son referidas generalmente como " dominios V_{HH} " en Ig de camélidos y V-NAR en IgNAR, con el fin de distinguirlos de las regiones variables de cadena pesada que están presentes en los anticuerpos de 4 cadenas convencionales (que son referidos como " dominios V_H ") y de las regiones variables de cadena ligera que están presentes en los anticuerpos de 4 cadenas convencionales (que son referidos como " dominios V_L ").

Las inmunoglobulinas de cadena pesada no requieren la presencia de cadenas ligeras para unirse con alta afinidad y con alta especificidad a un antígeno relevante. Esto significa que los fragmentos de unión a un único dominio pueden derivarse de inmunoglobulinas de cadena pesada, que son fáciles de expresar y son generalmente estables y solubles.

Una descripción general de las inmunoglobulinas de cadena pesada de los camélidos y las regiones variables de las mismas y los métodos para su producción y/o aislamiento y/o uso se encuentran, entre otros, en las referencias siguientes; WO94/04678, WO/49805 y WO 97/49805.

Una descripción general de las inmunoglobulinas de cadena pesada de peces cartilaginosos y las regiones variables de las mismas y los métodos para su producción y/o aislamiento y/o uso se encuentran, entre otros, en la WO2005/118629.

Proteínas Tipo V

Un ejemplo de un compuesto de la divulgación es un receptor de células T. Los receptores de células T tienen dos dominios V que se combinan en una estructura similar al módulo Fv de un anticuerpo. Novotny et al., Proc Natl Acad Sci USA 88: 8646-8650, 1991 describe cómo los dos dominios V del receptor de células T (denominados alfa y beta) pueden fusionarse y expresarse como un polipéptido de cadena sencilla y, además, cómo alterar los residuos de superficie para reducir la hidrofobicidad directamente análoga a un anticuerpo scFv. Otras publicaciones que describen la producción de receptores de células T de cadena sencilla o receptores de células T multiméricos que comprenden dos dominios V-alfa y V-beta incluyen la WO1999/045110 o la WO2011/107595.

Otras proteínas no de anticuerpos que comprenden dominios de unión a antígeno incluyen proteínas con dominios de tipo V, que son generalmente monoméricas. Los ejemplos de proteínas que comprenden dichos dominios tipo V incluyen CTLA-4, CD28 e ICOS. La divulgación adicional de proteínas que comprenden dichos dominios tipo V se incluye en la WO1999/045110.

Adnectinas

En un ejemplo, un compuesto de la divulgación es una adnectina. Las adnectinas se basan en el décimo dominio de fibronectina tipo III ($^{10}Fn3$) de la fibronectina humana en la que las regiones de giro se alteran para conferir la unión al antígeno. Por ejemplo, se pueden diseñar tres giros en un extremo del sándwich β del dominio $^{10}Fn3$ para permitir que una adnectina reconozca específicamente un antígeno. Para más detalles ver la US20080139791 o la WO2005/056764.

Anticalinas

En un ejemplo adicional, un compuesto de la divulgación es una anticalina. Las anticalinas se derivan de lipocalinas, que son una familia de proteínas extracelulares que transportan moléculas hidrófobas pequeñas como esteroides, bilinas, retinoides y lípidos. Las lipocalinas tienen una estructura secundaria de lámina β rígida con una pluralidad de giros en el extremo abierto de la estructura cónica que puede diseñarse para unirse a un antígeno. Estas lipocalinas diseñadas son conocidas como anticalinas. Para una descripción más detallada de las anticalinas ver la US7250297B1 o la US20070224633.

Afficuerpos

En un ejemplo adicional, un compuesto de la divulgación es un afficuero. Un afficuero es un andamiaje derivado del dominio Z (dominio de unión al antígeno) de la proteína A de *Staphylococcus aureus* que puede diseñarse para unirse al antígeno. El dominio Z consiste de un haz de tres hélices de aproximadamente 58 aminoácidos. Se han generado bibliotecas por aleatorización de residuos superficiales. Para más detalles ver la EP1641818.

Avímeros

En un ejemplo adicional, un compuesto de la divulgación es un Avímero. Los avímeros son proteínas multidominio derivadas de la familia de andamiaje de dominio A. Los dominios nativos de aproximadamente 35 aminoácidos adoptan una estructura unida por disulfuro definida. La diversidad se genera transponiendo la variación natural mostrada por la familia de dominios A. Para más detalles ver la WO2002088171.

DARPin

En un ejemplo adicional, un compuesto de la descripción es una proteína de repetición de anquirina diseñada (DARPin). Las DARPins se derivan de la anquirina, que es una familia de proteínas que median la unión de proteínas de membrana integrales al citoesqueleto. Una única repetición de anquirina es un motivo de 33 residuos que consiste de dos hélices α y un giro β . Pueden diseñarse para unirse a diferentes antígenos objetivo aleatorizando los residuos en la primera hélice α y un giro β de cada repetición. Su interfaz de unión puede aumentarse aumentando el número de módulos (un método de maduración de afinidad). Para detalles adicionales ver la US20040132028.

Métodos para producir proteínas*Expresión Recombinante*

En el caso de una proteína recombinante, los ácidos nucleicos que codifican la misma se pueden clonar en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped, como células de *E. coli*, células de levadura, células de insecto, o células de mamíferos, como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano (HEK) o células de mieloma que de otro modo no producen un anticuerpo. Las células ejemplares usadas para expresar una proteína de la divulgación son células CHO, células de mieloma o células HEK. Las técnicas de clonación molecular para lograr estos fines son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ausubel et al., (editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates y Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta ahora) o Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Una amplia variedad de métodos de clonación y amplificación *in vitro* son adecuados para la construcción de ácidos nucleicos recombinantes. Los métodos para producir anticuerpos recombinantes también se conocen en la técnica. Ver la US4816567 o la US5530101.

Tras el aislamiento, el ácido nucleico se inserta operativamente ligado a un promotor en un constructo de expresión o vector de expresión para clonación adicional (amplificación del ADN) o para la expresión en un sistema libre de células o en células.

Como se usa en la presente, el término "promotor" debe tomarse en su contexto más amplio e incluye las secuencias reguladoras transcripcionales de un gen genómico, incluyendo la caja TATA o el elemento iniciador, que se requiere para el inicio preciso de la transcripción, con o sin elementos reguladores adicionales. (por ejemplo, secuencias activadoras en sentido ascendente, sitios de unión al factor de transcripción, potenciadores y silenciadores) que alteran la expresión de un ácido nucleico, por ejemplo, en respuesta a un estímulo de desarrollo y/o externo, o de una manera específica del tejido. En el presente contexto, el término "promotor" también se usa para describir un ácido nucleico recombinante, sintético o de fusión, o derivado que confiere, activa o mejora la expresión de un ácido nucleico al que está ligado operativamente. Los promotores ejemplares pueden contener copias adicionales de uno o más elementos reguladores específicos para mejorar aún más la expresión y/o alterar la expresión espacial y/o la expresión temporal de dicho ácido nucleico.

Como se usa en la presente, el término "ligado operativamente a" significa posicionar un promotor en relación a un ácido nucleico de tal manera que la expresión del ácido nucleico esté controlada por el promotor.

Hay disponibles muchos vectores para la expresión en las células. Los componentes de vectores generalmente incluyen, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, una secuencia que codifica un anticuerpo (por ejemplo, derivada de la información proporcionada en la presente), un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción. El experto en la materia conocerá secuencias adecuadas para la expresión de un anticuerpo. Las secuencias de señales ejemplares incluyen señales de secreción procarionota (por ejemplo, PelB, fosfatasa alcalina, penicilinasasa. Ipp o enterotoxina II estable al calor), señales de secreción de levadura (por ejemplo, líder de invertasa, líder de factor α , o líder de fosfatasa ácida) o señales de secreción de mamíferos (por ejemplo, señal gD de herpes simplex).

Los promotores ejemplares activos en células de mamíferos incluyen promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV-IE), promotor del factor de alargamiento humano 1- α (EF1), promotores de ARN nuclear pequeños (U 1a y U 1b), promotor de la cadena pesada de α -miosina, promotor de virus 40 de simio (SV40), promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotor tardío principal del adenovirus, promotor de β -actina, elemento regulador híbrido que comprende un potenciador de CMV/promotor de β -actina o un promotor de inmunoglobulina o un fragmento activo del mismo. Ejemplos de líneas celulares huésped mamíferas útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión; células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10) o células de ovario de hámster chino (CHO).

Los promotores típicos adecuados para la expresión en células de levadura como, por ejemplo, una célula de levadura seleccionada del grupo que comprende *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* y *S. pombe*,

incluyen, pero no están limitados a, el promotor *ADH1*, el promotor *GAL1*, el promotor *GAL4*, el promotor *CUP1*, el promotor *PHO5*, el promotor *nmt*, el promotor *RPR1*, o el promotor *TEF1*.

5 Los medios para introducir el ácido nucleico aislado o el constructo de expresión que comprende el mismo en una célula para la expresión son conocidos por los expertos en la técnica. La técnica usada para una célula dada depende de las técnicas exitosas conocidas. Los medios para introducir ADN recombinante en las células incluyen la microinyección, la transfección mediada por DEAE-dextrano, la transfección mediada por liposomas como el uso de lipofectamina (Gibco, MD, USA) y/o la celfectina (Gibco, MD, USA), la captación de ADN mediada por PEG, la electroporación y bombardeo de micropartículas, como el uso de partículas de tungsteno u oro recubiertas con ADN
10 (Agracetus Inc., WI, USA), entre otras.

Las células huésped usadas para producir el anticuerpo pueden cultivarse en una variedad de medios, dependiendo del tipo de célula usado. Los medios disponibles comercialmente como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), (Sigma) son adecuados para el cultivo de células de mamíferos. Los medios para cultivar otros tipos de células tratados en la presente son conocidos en la técnica.
15

Purificación De Proteínas

20 Después de la producción/expresión, una proteína de la divulgación se purifica usando un método conocido en la técnica. Dicha purificación proporciona la proteína de la divulgación sustancialmente libre de proteínas, ácidos, lípidos, carbohidratos y similares no específicos. En un ejemplo, la proteína estará en una preparación en la que más de aproximadamente el 90% (por ejemplo, 95%, 98% o 99%) de la proteína en la preparación es una proteína de la divulgación.
25

Se emplean métodos estándar de purificación de péptidos para obtener una proteína aislada de la divulgación, incluyendo, pero no limitados a, varios protocolos de aislamiento de polipéptidos de cromatografía líquida (HPLC) y no HPLC de alta presión (o rendimiento), como cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de modo mixto, métodos de separación de fases, separaciones electroforéticas, métodos de precipitación, métodos de salado de entrada/salida, inmunocromatografía y/o otros métodos.
30

En un ejemplo, la purificación por afinidad es útil para aislar una proteína de fusión que comprende un marcador. Los métodos para aislar una proteína mediante cromatografía por afinidad son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Scopes (en: Protein purification: principles and practice, Tercera edición, Springer Verlag, 1994). Por ejemplo, un anticuerpo o compuesto que se une al marcador (en el caso de un marcador de polihistidina puede ser, por ejemplo, níquel-NTA) se inmoviliza sobre un soporte sólido. Una muestra que comprende una proteína se pone luego en contacto con el anticuerpo o compuesto inmovilizado durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para que se produzca la unión. Después del lavado, se eluye la proteína para eliminar cualquier proteína no unida o unida no específicamente.
35
40

En el caso de una proteína que comprende una región Fc de un anticuerpo, pueden usarse la proteína A o proteína G o formas modificadas de las mismas para purificación por afinidad. La proteína A es útil para aislar proteínas purificadas que comprenden una región Fc de cadena pesada $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humana. La proteína G se recomienda para todos los isotipos de Fc de ratón y para $\gamma 3$ humana.
45

Inhibidores de la Señalización de VEGF-B Basados en Ácidos Nucleicos

50 En un ejemplo de la divulgación, los métodos terapéuticos y/o profilácticos como se describen en la presente de acuerdo con cualquier ejemplo de la divulgación implican reducir la expresión de VEGF-B. Por ejemplo, tal método implica administrar un compuesto que reduce la transcripción y/o la traducción del ácido nucleico. En un ejemplo, el compuesto es un ácido nucleico, por ejemplo, un polinucleótido antisentido, una ribozima, un PNA, un ARN interferente, un ARNip, un microARN

55 Ácidos Nucleicos Antisentido

Se entenderá que el término "ácido nucleico antisentido" significa un ADN o ARN o un derivado de los mismos (por ejemplo, LNA o PNA), o una combinación de los mismos que sea complementaria a por lo menos una porción de una molécula de ARNm específica que codifica un polipéptido como se describe en la presente en
60 Cualquier ejemplo de la divulgación y sea capaz de interferir con un evento pos-transcripcional como la traducción de ARNm. El uso de métodos antisentido es conocido en la técnica (ver, por ejemplo, Hartmann y Endres (editores). Manual of Antisense Methodology, Kluwer (1999)).

Un ácido nucleico antisentido de la divulgación hibridará con un ácido nucleico objetivo bajo condiciones
65 fisiológicas. Los ácidos nucleicos antisentido incluyen secuencias que corresponden a genes estructurales o

regiones codificantes o secuencias que efectúan el control sobre la expresión o el corte y empalme de genes. Por ejemplo, el ácido nucleico antisentido puede corresponder a la región codificante objetivo de un ácido nucleico que codifica VEGF-B, o la región 5' no traducida (UTR) o la 3'-UTR o una combinación de éstas. Puede ser complementario en parte a las secuencias de intrones, que pueden cortarse y empalmarse durante o después de la transcripción, por ejemplo solo a las secuencias de exones del gen objetivo. La longitud de la secuencia antisentido debe ser por lo menos de 19 nucleótidos contiguos, por ejemplo, por lo menos 50 nucleótidos, como por lo menos 100, 200, 500 o 1000 nucleótidos de un ácido nucleico que codifica VEGF-B. Se puede usar la secuencia de longitud completa complementaria a la transcripción del gen completo. La longitud puede ser de 100-2000 nucleótidos. El grado de identidad de la secuencia antisentido para el transcrito objetivo debe ser por lo menos del 90%, por ejemplo, del 95-100%.

Los ácidos nucleicos antisentido ejemplares contra VEGF-B se describen, por ejemplo, en la WO2003/105754.

15 Ácido Nucleico Catalítico

El término "ácido nucleico catalítico" se refiere a una molécula de ADN o molécula que contiene ADN (también conocida en la técnica como una "desoxirribosima" o "ADNzima") o un ARN o a molécula que contiene ARN (también conocida como una "ribozima" o "ARNzima") que reconoce específicamente un sustrato distinto y cataliza la modificación química de este sustrato. Las bases de ácido nucleico en el ácido nucleico catalítico pueden ser bases A, C, G, T (y U para ARN).

Típicamente, el ácido nucleico catalítico contiene una secuencia antisentido para el reconocimiento específico de un ácido nucleico objetivo y una actividad enzimática de escisión del ácido nucleico (también referida en la presente como el "dominio catalítico"). Los tipos de ribozimas que son útiles en esta divulgación son una ribozima de cabeza de martillo y una ribozima de horquilla.

Interferencia de ARN

La interferencia de ARN (ARNi) es útil para inhibir específicamente la producción de una proteína particular. Sin querer estar limitados por la teoría, esta tecnología se basa en la presencia de moléculas de ARNdc que contienen una secuencia que es esencialmente idéntica al ARNm del gen de interés o parte del mismo, en este caso un ARNm que codifica un VEGF-B. Convenientemente, el ARNdc puede producirse a partir de un único promotor en una célula huésped de vector recombinante, donde las secuencias de sentido y antisentido están flanqueadas por una secuencia no relacionada que permite que las secuencias de sentido y antisentido hibriden para formar la molécula de ARNdc con el secuencia no relacionada que forma una estructura de giro. El diseño y la producción de moléculas de ARNdc adecuadas para la presente divulgación están dentro de la capacidad de un experto en la técnica, considerando particularmente las WO99/32619, WO99/53050, WO99/49029 y WO01/34815.

La longitud de las secuencias de sentido y antisentido que hibridan debe ser cada una de por lo menos 19 nucleótidos contiguos, como por lo menos 30 o 50 nucleótidos, por ejemplo, por lo menos 100, 200, 500 o 1000 nucleótidos. Se puede usar la secuencia de longitud completa correspondiente a la transcripción del gen completo. Las longitudes pueden ser de 100-2000 nucleótidos. El grado de identidad de las secuencias de sentido y antisentido para la transcripción dirigida debe ser por lo menos del 85%, por ejemplo, por lo menos del 90%, tal como el 95-100%.

Las moléculas de ARN interferente pequeñas ("ARNip") ejemplares comprenden una secuencia de nucleótidos que es idéntica a aproximadamente 19-21 nucleótidos contiguos del ARNm objetivo. Por ejemplo, la secuencia de ARNip comienza con el dinucleótido AA, comprende un contenido de GC de aproximadamente el 30-70% (por ejemplo, 30-60%, como 40-60% por ejemplo aproximadamente 45%-55%), y no tiene un alto porcentaje de identidad con ninguna secuencia de nucleótidos distinta del objetivo en el genoma del mamífero en el que se va a introducir, por ejemplo, según lo determinado por la búsqueda BLAST estándar. Un ARNip ejemplar que reduce la expresión de VEGF-B está disponible comercialmente de Santa Cruz Biotechnology o Novus Biologicals.

El RNA de horquilla corta (ARNhc) que reduce la expresión de VEGF-B también se conoce en la técnica y está disponible comercialmente de Santa Cruz Biotechnology.

Ensayos de Selección

Los compuestos que inhiben la señalización de VEGF-B pueden identificarse usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, como se describe a continuación. De manera similar, las cantidades de inhibidores de señalización de VEGF-B adecuados para su uso en un método descrito en la presente pueden determinarse o estimarse utilizando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, como se describe a continuación.

65 Ensayos de Neutralización

Para los compuestos que se unen a VEGF-B e inhiben la señalización, puede usarse un ensayo de neutralización.

5 En un ejemplo, un ensayo de neutralización implica poner en contacto VEGF-B con un compuesto en presencia o ausencia de VEGF-R1 soluble detectablemente marcado o poner en contacto VEGF-B soluble detectablemente marcado con un compuesto en presencia o ausencia de una célula que expresa VEGF-R1 o un VEGF-R1 soluble. Luego se evalúa el nivel de VEGF-B unido a VEGF-R1. Un nivel reducido de VEGF-B unido en presencia del compuesto en comparación con en ausencia del compuesto indica que el compuesto inhibe la unión de VEGF-B a VEGF-R1 y, como consecuencia, la señalización de VEGF-B.

15 Otro ensayo de neutralización se describe en la WO2006/012688 e implica poner en contacto un fragmento de VEGF-R1 que comprende el segundo dominio tipo Ig inmovilizado en un soporte sólido con una concentración de subsaturación de VEGF-B recombinante preincubado con un compuesto. Después del lavado para eliminar la proteína no unida, la proteína inmovilizada se pone en contacto con el anticuerpo anti-VEGF-B y se determina la cantidad de anticuerpo unido (indicativo de VEGF-B inmovilizado). Un compuesto que reduce el nivel de anticuerpo unido en comparación con el nivel en ausencia del compuesto se considera un inhibidor de la señalización de VEGF-B.

20 En otro ejemplo, un compuesto que inhibe la señalización de VEGF-B se identifica usando una célula dependiente de la señalización de VEGF-B para la proliferación, por ejemplo, una célula BaF3 modificada como se describe en la WO2006/012688 para expresar un receptor quimérico que incorpora el dominio intracelular del receptor de eritropoyetina humana y el dominio extracelular de VEGF-R1. Las células se cultivan en presencia de VEGF-B y en presencia o ausencia de un compuesto. Luego se evalúa la proliferación celular usando métodos estándar, por ejemplo, ensayos de formación de colonias, incorporación de timidina o captación de otro marcador adecuado de la proliferación celular (por ejemplo, un ensayo de reducción de colorante MTS). Un compuesto que reduce el nivel de proliferación en presencia de VEGF-B se considera un inhibidor de la señalización de VEGF-B.

30 Los compuestos también pueden evaluarse por su capacidad para unirse a VEGF-B usando métodos estándar. Los métodos para evaluar la unión a una proteína son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Scopes (En: Protein purification: principles and practice, Tercera edición, Springer Verlag, 1994). Dicho método generalmente implica marcar el compuesto y ponerlo en contacto con VEGF-B inmovilizado. Después del lavado para eliminar el compuesto unido no específico, se detecta la cantidad de marcador y, como consecuencia, el compuesto unido. Por supuesto, el compuesto puede inmovilizarse y el VEGF-B puede marcarse. También se pueden usar ensayos tipo adsorción. Alternativa, o adicionalmente, pueden usarse ensayos de resonancia de plasmones de superficie.

Ensayos de Expresión

40 Un compuesto que reduce o evita la expresión de VEGF-B se identifica poniendo en contacto una célula con el compuesto y determinando el nivel de expresión de VEGF-B. Los métodos adecuados para determinar la expresión génica a nivel de ácido nucleico son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) o ensayos de micromatrices. Los métodos adecuados para determinar la expresión a nivel de proteína también se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ensayo inmunoabsorbente ligado a fluorescencia (ELISA), inmunofluorescencia o transferencia Western.

Ensayos in vivo

50 Los compuestos descritos en la presente pueden probarse para determinar su actividad en modelos animales. Los ejemplos de modelos animales de diabetes tipo II y obesidad incluyen: el ratón Ob/Ob (modelo monogénico de obesidad, deficiente de leptina), el ratón db/db (modelo monogénico de obesidad, resistente a la leptina), la rata Zucker (fa/fa) (modelo monogénico de obesidad, resistente a la leptina), la rata Goto-Kakizaki, el ratón KK, el ratón NSY, la rata OLETF, la rata de la arena israelí, la rata tratada con estreptozotocina de alimentación lejana, el ratón CBA/Ca, la rata Torri diabética, el ratón obeso de Nueva Zelanda (ver Recs y Alcolado Diabet. Med. 22, 359-370. 2005).

60 Los modelos animales conocidos de nefropatía diabética tipo 2 espontánea incluyen: la rata espontáneamente hipertensiva/NIH-corpulenta (SHR/N-cp) (modelo de obesidad, diabetes tipo 2 y nefropatía), la rata SHR/N-cp magra y la rata Wistar-Kyoto/NIH-corpulenta (WKY/N-cp). Ambos modelos permiten la evaluación del papel de la hipertensión y la obesidad en la patogénesis de la nefropatía diabética: las ratas SHR/N-cp tienen una tolerancia a la glucosa anormal, hipertensión y desarrollan una enfermedad renal reminiscente de la nefropatía diabética humana, mientras que las ratas WKY/N-cp también son obesas y tienen hiperlipidemia, pero su control de la glucosa es menos controlado que el de la rata SHR/N-cp). Un modelo adicional es la rata LA/N-cp (también lleva el gen de la obesidad y muestra hiperlipidemia) (ver Kimmel et al. Acta Diabetologica, 29, 142-148, 1992). Como se

ejemplifica en la presente, el ratón db/db también es un modelo eficaz de la nefropatía diabética.

Composiciones Farmacéuticas y Métodos de Tratamiento

5 Un compuesto que inhibe la señalización de VEGF-B (*sin*. ingrediente activo) es útil para la administración parenteral, tópica, oral o local, la administración en aerosol, o la administración transdérmica, para tratamiento profiláctico o terapéutico. En un ejemplo, el compuesto se administra parenteralmente, como subcutánea o intravenosamente.

10 La formulación de un compuesto a administrar variará de acuerdo con la vía de administración y formulación (por ejemplo, solución, emulsión, cápsula) seleccionada. Una composición farmacéutica apropiada que comprende el compuesto a administrar puede prepararse en un portador fisiológicamente aceptable. Para soluciones o emulsiones, los portadores adecuados incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales pueden incluir solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactado o aceites fijos. Los expertos en la materia conocen una variedad de portadores acuosos apropiados, incluyendo agua, agua tamponada, solución salina tamponada, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido), solución de dextrosa y glicina. Los vehículos intravenosos pueden incluir varios aditivos, conservantes, o fluido, reponedores de nutrientes o electrolitos (ver, generalmente, Remington's Pharmaceutical Science. 16ª edición, Mack, Ed. 1980). Las composiciones pueden contener opcionalmente sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste de pH y de tamponamiento y agentes de ajuste de la toxicidad, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y lactato de sodio. El compuesto puede liofilizarse para su almacenamiento y reconstituirse en un portador adecuado antes de su uso de acuerdo con las técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica.

25 La concentración óptima del ingrediente(s) activo en el medio elegido puede determinarse empíricamente, de acuerdo con procedimientos conocidos por el experto en la técnica, y dependerá de la formulación farmacéutica final deseada.

30 Los intervalos de dosificación para la administración del compuesto de la divulgación son lo suficientemente grandes para producir el efecto deseado. Por ejemplo, la composición comprende una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz del compuesto.

35 Como se usa en la presente, debe entenderse que el término "cantidad eficaz" significa una cantidad suficiente del compuesto para inhibir/reducir/prevenir la señalización de VEGF-B en un sujeto. El experto en la técnica sabrá que dicha cantidad variará dependiendo de, por ejemplo, el compuesto y/o el sujeto particular y/o el tipo y/o la gravedad de la nefropatía que se está tratando. Por consiguiente, no debe interpretarse que este término limita la divulgación a una cantidad específica, por ejemplo, peso o número de compuestos.

40 Como se usa en la presente, debe entenderse que el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente de compuesto para reducir o inhibir uno o más síntomas de la nefropatía.

45 Como se usa en la presente, debe entenderse que el término "cantidad profilácticamente eficaz" significa una cantidad suficiente de compuesto para prevenir o inhibir o retrasar la aparición de uno o más síntomas detectables de la nefropatía.

En un ejemplo, el compuesto se administra en una cantidad eficaz para tener uno o más de los siguientes efectos:

- 50
- Reducir o prevenir la hipertensión;
 - Reducir o prevenir la esclerosis glomerular y/o tubular;
 - Reducir o prevenir el depósito de la matriz extracelular mesangial y/o el engrosamiento anormal de la membrana basal glomerular;
 - Reducir o prevenir la expansión mesangial glomerular;

55

 - Reducir o prevenir los reordenamientos vasculares glomerulares;
 - Reducir o prevenir la acumulación de lípidos renales;
 - Reducir o prevenir la acumulación de lípidos glomerulares;
 - Reducir o prevenir los depósitos de colágeno glomerular y/o la hialiosis arteriolar; y/o
 - Reducir o prevenir la macroalbuminuria.

60

La dosis no debe ser tan grande como para provocar efectos secundarios adversos, como síndromes de hiper viscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva, y similares. Generalmente, la dosificación variará con la edad, la condición, el sexo y la extensión de la enfermedad en el paciente y puede determinarse por un experto en la técnica. La dosis puede ajustarse por el médico individual en caso de cualquier complicación.

65

La dosificación puede variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, como, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, en uno o más administraciones de dosis diarias, durante uno o varios días.

5 En algunos ejemplos, el compuesto se administra a una dosis inicial (o carga) que es más alta que la posterior (dosis de mantenimiento). Por ejemplo, el compuesto se administra a una dosis inicial de entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg. El compuesto se administra luego a una dosis de mantenimiento de entre aproximadamente 0,0001 mg/kg y aproximadamente 1 mg/kg. Las dosis de mantenimiento pueden administrarse cada 7-35 días, como cada 14 o 21 o 28 días.

10 En algunos ejemplos, se usa un régimen de incremento de dosis, en el que un compuesto se administra inicialmente a una dosis más baja que la usada en dosis posteriores. Este régimen de dosificación es útil en el caso de que los sujetos sufran inicialmente eventos adversos.

15 En el caso de un sujeto que no esté respondiendo adecuadamente al tratamiento, se pueden administrar múltiples dosis en una semana. Alternativamente, o adicionalmente, pueden administrarse dosis crecientes.

20 Un sujeto puede volver a tratarse con el compuesto, dándole más de una exposición o un conjunto de dosis, como por lo menos aproximadamente dos exposiciones del compuesto, por ejemplo, de aproximadamente 2 a 60 exposiciones, y más particularmente de aproximadamente 2 a 40 exposiciones, más particularmente, de aproximadamente 2 a 20 exposiciones.

25 En un ejemplo, puede darse cualquier retratamiento cuando vuelven los signos o síntomas de la enfermedad, por ejemplo, cuando progresa la microalbuminuria.

30 En otro ejemplo, cualquier retratamiento puede darse a intervalos definidos. Por ejemplo, las exposiciones posteriores pueden administrarse a varios intervalos, como, por ejemplo, aproximadamente 24-28 semanas o 48-56 semanas o más. Por ejemplo, tales exposiciones se administran a intervalos de aproximadamente 24-26 semanas o aproximadamente 38-42 semanas, o aproximadamente 50-54 semanas.

35 Un método de la presente divulgación también puede incluir la co-administración de por lo menos un compuesto de acuerdo con la divulgación junto con la administración de otro agente terapéuticamente eficaz para la prevención o el tratamiento de un trastorno o complicación renal, nefropatía (por ejemplo, nefropatía diabética), diabetes, dislipidemia, hipertensión y/o obesidad.

40 En un ejemplo, el compuesto(s) de la divulgación se usa en combinación con por lo menos un compuesto conocido adicional que se está usando actualmente o está en desarrollo para prevenir o tratar la diabetes. Ejemplos de tales compuestos conocidos incluyen, pero no están limitados a, medicamentos antidiabéticos comunes, como las sulfonilureas (por ejemplo, glicazida, glipizida), metformina, glitazonas (por ejemplo, rosiglitazona, pioglitazona), agentes liberadores de glucosa prandial (por ejemplo, repaglinida, nateglinida), acarbosa e insulina (incluyendo todas las formas de insulina de origen natural, sintéticas y modificadas, como la insulina de origen humano, bovino o porcino; insulina suspendida en, por ejemplo, isofano o zinc y derivados como la insulina glulisina, insulina lispro, insulina lispro protamina, insulina glargina, insulina detemir o insulina aspart).

45 En un ejemplo, el compuesto(s) de la divulgación se usa en combinación con por lo menos un compuesto conocido adicional que se está usando actualmente o está en desarrollo para prevenir o tratar un trastorno renal como la nefropatía, o un trastorno o complicación asociado. Los ejemplos de tales compuestos conocidos incluyen, pero no están limitados a: fármacos inhibidores de ECA (por ejemplo, captopril (Capoten™), enalapril (Innovace™), fosinopril (Staril™), lisinopril (Zestril™), perindopril (Coversyl™), quinapril (Accupro™), trandanalopril (Gopten™), lotensin, moexipril, ramipril); bloqueadores RAS; bloqueadores de los receptores de angiotensina (ARB) (por ejemplo, Olmesartán, Irbesartán, Losartán, Valsartán, candesartán, eprosartán, telmisartán, etc.); inhibidores de la proteína quinasa C (PKC) (por ejemplo, ruboxistaurina); inhibidores de las vías dependientes de AGE (por ejemplo, aminoguanidina, ALT-946, pirodoxamina (pirododorina), OPB-9295 alagebri); agentes antiinflamatorios (por ejemplo, inhibidores de la ciclooxigenasa-2, micofenolato mofetil, mizoribina, pentoxifilina), GAG (por ejemplo, sulodexida (Patente de Estados Unidos N° 5.496.807)); piridoxamina Patente de Estados Unidos N° 7.030.146); antagonistas de la endotelina (por ejemplo, SPP 301), inhibidores de COX-2, antagonistas de PPAR-gamma y otros compuestos como la amifostina (usada para la nefropatía del cisplatino), captopril (usado para la nefropatía diabética), ciclofosfamida (usada para la nefropatía idiopática de la membrana), tiosulfato de sodio (usado para la nefropatía por cisplatino).

60 Adicionalmente, los métodos de la divulgación también pueden incluir la co-administración de por lo menos otro agente terapéutico para el tratamiento de otra enfermedad directa o indirectamente relacionada con la diabetes y/o la nefropatía, incluyendo, pero no limitados a, dislipidemia, hipertensión, obesidad, neuropatía y/o retinopatía, etc. Ejemplos adicionales de agentes que pueden co-administrarse con el compuesto(s) de acuerdo con la invención son los corticosteroides; medicamentos inmunosupresores: antibióticos; medicamentos antihipertensivos y diuréticos

65

(como inhibidores de ECA); agentes reductores de lípidos como resinas secuestrantes biliares, colestiramina, colestipol, ácido nicotínico y más particularmente fármacos y medicamentos usados para reducir el colesterol y los triglicéridos (por ejemplo, fibratos (por ejemplo, Gemfibrozil™) e inhibidores de HMG-CoA como Lovastatin™, Atorvastatin™, Fluvastatin™, Lescol™), Lipitor™, Mevacor™, Pravachol™, Pravastatin™, Simvastatin™, Zocor™, Cerivastatin™), etc); compuestos que inhiben la absorción intestinal de lípidos (por ejemplo, ezetimiba); ácido nicotínico; y vitamina D.

Como será evidente a partir de lo anterior, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento terapéutico concomitante de un sujeto, que comprenden administrar a un sujeto con necesidad de ello una cantidad eficaz de un primer compuesto y un segundo compuesto, en donde dicho agente es un compuesto de la divulgación. (es decir, un inhibidor de la señalización de VEGF-B), y el segundo agente es para la prevención o el tratamiento de la nefropatía, la nefropatía diabética, la diabetes, la hipertensión, la hiperlipidemia o la obesidad.

Como se usa en la presente, el término "concomitante" como en la frase "tratamiento terapéutico concomitante" incluye administrar un primer agente en presencia de un segundo agente. Un método de tratamiento terapéutico concomitante incluye métodos en los que se co-administran el primer, segundo, tercer o agentes adicionales. Un método de tratamiento terapéutico concomitante también incluye métodos en los que el primero o los agentes adicionales se administran en presencia de un segundo o agentes adicionales, en donde el segundo o agentes adicionales, por ejemplo, pueden haberse administrado anteriormente. Un método de tratamiento terapéutico concomitante puede ser ejecutado paso a paso por diferentes actores. Por ejemplo, un actor puede administrar a un sujeto un primer agente y como un segundo actor puede administrar al sujeto un segundo agente y los pasos de administración pueden ejecutarse al mismo tiempo, o casi al mismo tiempo, o en momentos distantes, siempre y cuando el primer agente (y/o agentes adicionales) sean después de la administración en presencia del segundo agente (y/o agentes adicionales). El actor y el sujeto pueden ser la misma entidad (por ejemplo, un humano).

En un ejemplo, la divulgación también proporciona un método para tratar o prevenir la nefropatía en un sujeto, el método comprendiendo administrar al sujeto una primera composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto de la divulgación y una segunda composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos adicionales.

En un ejemplo, un método de la divulgación comprende administrar un inhibidor de la señalización de VEGF-B a un sujeto que padece de nefropatía (por ejemplo, nefropatía diabética) y recibir otro tratamiento (por ejemplo, para la diabetes).

Kits

Otro ejemplo de la divulgación proporciona kits que contienen compuestos útiles para el tratamiento de la nefropatía como se ha descrito anteriormente.

En un ejemplo, el kit comprende (a) un recipiente que comprende un compuesto que inhibe la señalización de VEGF-B como se describe en la presente, opcionalmente en un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable; y (b) un prospecto con instrucciones para tratar la nefropatía en un sujeto.

De acuerdo con este ejemplo de la divulgación, el prospecto está en o está asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente mantiene o contiene una composición que es eficaz para tratar la nefropatía y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es el compuesto que inhibe la señalización de VEGF-B. La etiqueta o el prospecto indican que la composición se usa para tratar a un sujeto elegible para el tratamiento, por ejemplo, uno que tiene o tiene predisposición a la nefropatía, con una guía específica con respecto a las cantidades e intervalos de dosificación del compuesto y cualquier otro medicamento que se proporcione. El kit puede comprender además un recipiente adicional que comprende un tampón diluyente farmacéuticamente aceptable, como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y/o solución de dextrosa. El kit puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

El kit comprende además opcionalmente un recipiente que comprende un segundo medicamento, en el que el compuesto que inhibe la señalización de VEGF-B es un primer medicamento, y cuyo artículo comprende además instrucciones en el prospecto para tratar al sujeto con el segundo medicamento, en una cantidad eficaz. El segundo medicamento puede ser cualquiera de los expuestos anteriormente.

La presente divulgación incluye los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1: los ratones deficientes en VEGF-B son resistentes al desarrollo de nefropatía diabéticaLos ratones diabéticos deficientes en VEGF-B han mejorado la función renal y han reducido la hipertensión

5 Se obtuvieron ratones C57BKS/Lepr^{db} (*db/db//BKS*) de Jackson Laboratory (como modelo de diabetes y nefropatía diabética) y se criaron con ratones C57BL/6-*Vegfb*^{-/-}. Los ratones *Db/db//Vegfb*^{-/-} se criaron apareando ratones *db/+//Vegfb*^{+/-} heterocigotos entre sí, creando *db/db*, *dh/db//Vegfb*^{+/-} y *db/db//Vegfb*^{+/-}. Se usaron *db/db*, *db/db//Vegfb*^{+/-} y *dh/db//Vegfb*^{+/-} hembra de 42 semanas de edad en el estudio. La producción de orina se midió fotografiando jaulas que albergan un animal/genotipo. Para medir la glucosuria y la proteinuria mediante análisis de tiras reactivas, los ratones se privaron de alimento durante 1 hora, luego se recolectó la orina y la concentración de glucosa y proteína se midió directamente usando tiras reactivas de acuerdo con los fabricantes (Uristix, Siemens). Para la detección de ACR, se recogieron de cada ratón de 20 µl a 200 µl volúmenes de orina. La albúmina urinaria se detectó usando el kit Albuwell M, y la creatinina urinaria se midió usando el kit de ELISA murino de Creatinine Companion (Exocell, Filadelfia, PA). La presión sanguínea sistólica y diastólica se midió mediante un método de manguito de la cola usando la configuración CODA (Kent Scientific). Todos los animales se habituaron al dispositivo de medición de la presión sanguínea durante 2 semanas. Se sometieron todos a 1-2 ciclos de 20 mediciones reordenadas por día durante un mínimo de 3 días.

10 Estos análisis mostraron que la eliminación de *Vegfb* en ratones *db/db BKS* diabéticos mejora la fisiología renal y reduce la hipertensión. Por ejemplo, los animales *db/db//Vegfb*^{-/-} produjeron menos orina que los animales *db/db*, y *db/db//Vegfb*^{+/-}. Los animales *db/db//Vegfb*^{-/-} también tenían menos glucosa y proteínas en su orina que los animales *db/db*, y *db/dh//Vegfb*^{+/-}.

15 La Figura 1A muestra la proporción de albúmina/creatinina en la orina medida por ELISA para ratones *db/db*, *db/db//Vegfb*^{+/-} y *db/db//Vegfb*^{-/-} (n=5 grupo, gráfico de la izquierda) y tipo salvaje magros y ratones *Vegfb*^{-/-} magros (n=4-6/grupo, gráfico de la derecha). Estos datos muestran que los animales *db/db//Vegfb*^{-/-} tienen una proporción de albúmina/creatinina mejor en la orina en comparación con los animales *db/db//Vegfb*^{+/-}. Se observó un efecto similar en animales magros deficientes para *Vegfb* en comparación con animales de tipo salvaje magros.

20 La Figura 1B muestra la presión sanguínea del manguito de la cola (presión sanguínea sistólica y diastólica) en ratones *db/db* y *db/db//Vegfb*^{+/-} (n=5/grupo). Estos datos demuestran que los animales *db/db//Vegfb*^{-/-} han reducido la presión sanguínea sistólica y diastólica en comparación con los animales *db/db*.

25 Estos datos muestran que los ratones *db/db* diabéticos y los ratones magros con expresión reducida de VEGF-B tienen una función renal mejorada con mejor capacidad de filtración medida mediante la concentración reducida de albúmina urinaria y la proporción albúmina/creatinina urinaria. La expresión reducida de VEGF-B también disminuyó tanto la presión sanguínea sistólica como la diastólica en animales *db/db*.

La esclerosis glomerular y tubular disminuye tras la delección de *Vegfb* en ratones *db/db BKS*

30 Se sacrificaron ratones *db/db*, *db/db//Vegfb*^{+/-} y *db/dh//Vegfb*^{-/-} hembra de 42 semanas y se aislaron los riñones, se fijaron, se embebieron, se seccionaron y se tiñeron con ácido periódico-Schiff (PAS) para evaluar la expansión mesangial glomerular y la esclerosis tubular de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma). Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos o túbulos por animal, se tiñeron por PAS dentro de cada sección con microscopía de campo claro (microscopio Axio Vision, Carl Zeiss) con un aumento de 20x. Los glomérulos se cuantificaron usando el programa de asistente Axio Vision Run para i) tinción con PAS glomerular (pixel²/µm²) ii) nr de glomérulos apoptóticos por cuadro. Un glomérulo se designó como apoptótico tras la tinción intensa con PAS y un diámetro inferior a 25 µm. Los túbulos se cuantificaron usando el programa de asistente Axio Vision Run para i) el grosor de la membrana basal tubular (µm²).

35 Como se muestra en la Figura 2A los ratones *db/db* desarrollaron esclerosis tubular, mientras que este defecto no se observó en los ratones *db/db//Vegfb*^{+/-} y *db/db//Vegfb*^{-/-}. Además, los ratones *db/db* desarrollaron esclerosis glomerular, mientras que los ratones *db/db//Vegfb*^{+/-} y *db/db//Vegfb*^{-/-} no lo hicieron (Figura 2B). Estos cambios en los ratones *db/db* se asociaron con niveles elevados de glomérulos apoptóticos en comparación con los ratones *db/db//Vegfb*^{+/-} y *db/db//Vegfb*^{-/-} (Figura 2C).

40 Estos datos muestran que la esclerosis glomerular y tubular disminuyeron en los riñones de animales *db/db* diabéticos con una expresión reducida de VEGF-B en comparación con los animales *db/db*.

El depósito de la matriz extracelular mesangial y engrosamiento anormal de la membrana basal glomerular (GBND) están disminuidos en ratones *db/db BKS Vegfb* deficientes

45 Se usaron biopsias renales de ratones *db/db*, *db/db//Vegfb*^{+/-} y *db/db//Vegfb*^{-/-} de 42 semanas de edad hembra para el análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de acuerdo con procedimientos estándar. Brevemente, los tejidos se fijaron en un tampón de solución de fijación (glutaraldehído al 2%, paraformaldehído al

0,5%, cacodilato 0,1 M, sacarosa 0,1 M, CaCl_2 3 mM y se lavaron en tampón de cacodilato 0,1 M a pH 7,4 antes de tinción en OsO_4 al 2% en tampón de cacodilato durante 1 hora a temperatura ambiente, las muestras se deshidrataron y la tinción *en bloque* se realizó en acetato de uranilo al 2% en etanol absoluto durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se tomaron muestras a través de una serie Epon 812/acetona y se embebieron a 60° C en Epon 812 puro. Se cortaron secciones finas de espesores de 70 nm en un ultratomo Leica EM UC6 y se montaron en rejillas de ranura de cobre revestidas con formvar. La tinción posterior se realizó con acetato acuoso al 2% pH 3.5 y citrato de plomo Venable y Cogglesall. Las rejillas se analizaron en un microscopio electrónico FEI TECNAI.

El análisis de TEM de gran aumento mostró que las anomalías renales asociadas con la nefropatía diabética, como la expansión mesangial y el engrosamiento de GBM, se reducen en ratones *db/db* con expresión reducida de VEGF-B en comparación con ratones *db/db* (Figura 3A). El engrosamiento de GBM es una característica común en la nefropatía diabética. La Figura 3B muestra que la formación de hendiduras se conserva en ratones *db/db* con expresión reducida de VEGF-B. También se descubrió que la formación de podocitos se conserva en ratones *db/db* con expresión reducida de VEGF-B.

La eliminación de *Vegfb* reduce la acumulación de lípidos renales en ratones *db/db* BKS

El análisis de aceite rojo O (ORO) se realizó usando riñones de ratones *db/db*, *db/db/Vegfb^{+/-}*, *db/db/Vegfb^{-/-}* y de tipo salvaje magros hembra de 42 semanas de edad. Brevemente, los riñones se diseccionaron y se congelaron instantáneamente en hielo seco y se embebieron en Tissue-Tek® (Sakura) directamente en el molde de criostato. Las criosecciones (12 μm) se sumergieron 5-15 minutos en una solución de trabajo ORO (2,5 g de aceite rojo O (Sigma-Aldrich), se disolvieron en 400 ml de isopropanol al 99%, se diluyeron adicionalmente 6:10 en H_2O , se filtraron a través de un filtro de 22 μm (Corning)) y enjuagaron 10 min con agua corriente del grifo antes de montarse. Las secciones teñidas se examinaron con microscopía de campo brillante (microscopio Axio Vision, Carl Zeiss) con un aumento de 20x y se capturó un mínimo de 10 cuadros por sección. Para la cuantificación de las gotitas de lípidos, la cantidad de píxeles rojos en cada cuadro se cuantificó usando el programa asistente Axio Vision Run para la tinción total con ORO (píxel, a.u.).

La acumulación y estructura de las gotitas de lípidos renales se mejoran en ratones *db/db* con expresión reducida de VEGF-B (Figura 4A). En particular, las gotitas de lípidos son menores y más pequeñas en las secciones de riñón de ratones *db/db* deficientes en *Vegfb*. La Figura 4B muestra que reducir la expresión de VEGF-B en ratones *db/db* disminuye la acumulación de lípidos en los glomérulos y presenta gotitas de lípidos menores y más pequeñas.

Los reordenamientos glomerulares se evitan en ratones *db/db* BKS deficientes en *Vegfb*

La morfología glomerular se evaluó en riñones de ratones *db/db*, *db/db/Vegfb^{+/-}* y *db/db/Vegfb^{-/-}* hembra de 42 semanas de edad. Brevemente, se sacrificaron los animales y se recogieron los riñones, se fijaron en PFA al 4% durante 48 horas, se embebieron y prepararon secciones de 3 μm y posteriormente se inmunotifieron por sinaptopodina y/o pecam. La recuperación del antígeno se realizó en secciones de 3 μm usando la solución de recuperación de antígeno Ph6 (Dako) y se calentó a 98° C durante 10 minutos. Las secciones se incubaron a 4° C durante 12 horas con anticuerpos primarios de conejo anti-sinaptopodina (Santa Cruz), cabra anti-pecam (Abcam). Se aplicaron anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia apropiados (Invitrogen, Alexa fluor) y las secciones se incubaron adicionalmente durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual se prepararon para microscopía. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñidos por sinaptopodina y pecam dentro de cada sección con un microscopio Axio Vision (Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando el programa asistente AXio Vision Run para *i*) tinción con sinaptopodina (píxel²/ μm^2) glomerular y *ii*) tinción con pecam (píxel ²/ μm^2) glomerular.

Las Figuras 5Ay SB muestran una expresión aumentada de sinaptopodina y pecam en glomérulos de ratones *db/db/Vegfb^{+/-}* y *db/db/Neg^{-/-}*. Estos datos y análisis de glomérulos teñidos indican que la morfología global de los glomérulos se mejora en ratones *db/db* deficientes en *Vegfb*. La expresión y la estructura de los podocitos y las células endoteliales, es decir, los tipos celulares que son cruciales para el proceso de filtración, se conservan en ratones *db/db* con una expresión reducida de VEGF-B.

Los depósitos de colágeno glomerular y la hialinosis arteriolar se reducen en ratones *db/db* BKS deficientes en *Vegfb*

Los depósitos de colágeno glomerular y la hialinosis arteriolar se evaluaron en riñones de ratones *db/db*, *db/db/Vegfb^{+/-}* y *db/db/Vegfb^{-/-}* hembra de 42 semanas de edad. Brevemente, se sacrificaron los animales y se recogieron los riñones, se fijaron en PFA al 4% durante 48 horas, se embebieron y se prepararon secciones de 3 μm y posteriormente se inmunotifieron por colágeno IV, pecam y/o α -SMA. Brevemente, la recuperación de antígenos se realizó en secciones de 3 μm usando la solución de recuperación de antígeno Ph6 (Dako N° S2367) y se calentó a 98° C durante 10 minutos. Las secciones se incubaron a 4° C durante 12 horas con anticuerpos primarios de conejo anti-colágeno IV (abcam), cabra anti-pecam (abcam) o α -SMA (Sigma). Se aplicaron los anticuerpos

secundarios fluorescentemente marcados (Invitrogen, Alexa fluor) y las secciones se incubaron adicionalmente durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual se prepararon para microscopía. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñido por colágeno IV, pecam o α -SMA dentro de cada sección con un microscopio Axio Vision (Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando el programa asistente Axio Vision Run para i) tinción con colágeno IV (píxel²/μm²) glomerular ii) tinción con α -SMA (píxel²/μm²) glomerular iii) grosor de las arteriolas glomerulares (μm²).

La Figura 6 muestra que los niveles de colágeno IV (Figura 6A) y α -SMA (Figura 6B) se redujeron en ratones *db/db//Vegfb*^{+/-} y *db/db//Vegfb*^{-/-} en comparación con los ratones *db/db*. Además, el grosor arteriolar se redujo en ratones *db/db//Vegfb*^{+/-} y *db/db//Vegfb*^{-/-} en comparación con los ratones *db/db* (Figura 6C). Estos datos indican que la formación de depósitos de colágeno intra-glomerular patológica (también conocida como depósitos de la matriz extracelular glomerular (ECM)) y la hialinosis arteriolar se reducen en ratones *db/db* con expresión reducida de VEGF-B. Estos datos muestran que las patologías histológicas comunes de la nefropatía diabética, como los depósitos de ECM glomerulares y la hialinosis arteriolar se reducen en ratones *db/db* con una expresión reducida de VEGF-B.

Los lípidos se acumulan preferentemente en los glomérulos del riñón durante la progresión de la nefropatía diabética en ratones *db/db//BKS*

Se usaron ratones *db*⁺ magros, *db/db* de 6 semanas de edad y *db/db//BKS* de 21 semanas de edad para el análisis de Aceite rojo O (ORO). Los riñones se diseccionaron y se congelaron instantáneamente en hielo seco y se embebieron en Tissue-Tek® (Sakura) directamente en el molde del criostato. Las criosecciones (12 μm) se sumergieron 5-15 minutos en una solución de trabajo de aceite rojo O (2,5 g de aceite rojo O (Sigma-Aldrich), se disolvieron en 400 ml de isopropanol al 99%, se diluyeron adicionalmente 6:10 en H₂O, se filtró a través de un filtro de 22 μm (Coming) y se enjuagó 10 min con agua corriente del grifo antes de montarse. Las secciones teñidas se examinaron con microscopía de campo brillante (microscopio Axio Vision, Carl Zeiss) con un aumento de 20x y se capturaron un mínimo de 10 cuadros por sección. Para la cuantificación de las gotitas de lípidos, la cantidad de píxeles rojos en cada cuadro se cuantificó usando el programa asistente Axio Vision Run para la tinción total con ORO (píxel. a.u.).

La Figura 7 muestra que a medida que la macroalbuminuria se desarrolla en ratones *db/db//BKS*, los lípidos se acumulan preferentemente en los glomérulos.

La acumulación de lípidos glomerulares se correlaciona con la pérdida de podocitos en la progresión de la nefropatía diabética en ratones *db/db//BKS*

Se usaron ratones *db*⁺ magros, *db/db* de 6 semanas de edad y *db/db//BKS* de 21 semanas de edad para el análisis. Los riñones se diseccionaron, se fijaron en PFA al 4% durante 48 horas y posteriormente se procesaron para embeber en parafina usando procedimientos estándar. Después de embeber, se prepararon secciones de 3 μm y posteriormente se inmunotifieron por sinaptopodina y/o pecam. Brevemente, la recuperación de antígenos se realizó en secciones de 3 μm usando una solución de recuperación de antígenos de pH 6 (Dako) y se calentó a 98° C durante 10 minutos. Las secciones se incubaron a 4° C durante 12 h con anticuerpos primarios de cobayas anti-adipofilina (Fitzgerald) y anti-sinaptopodina de conejo (Santa Cruz). Se aplicaron anticuerpos secundarios fluorescentemente marcados apropiados (Invitrogen, Alexa fluor) y las secciones se incubaron adicionalmente durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual se prepararon por microscopía. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñidos por adipofilina y sinaptopodina dentro de cada sección con un microscopio Axio Vision (Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando el programa asistente Axio Vision Run para i) tinción con adipofilina (píxel²/μm²) glomerular y ii) tinción con sinaptopodina (píxel²/μm²).

La Figura 8 muestra que durante el desarrollo de la nefropatía diabética, los lípidos se acumulan en los glomérulos y el número de podocitos disminuye en paralelo.

La vía de señalización de *Vegfb* se regula por incremento durante la progresión de la nefropatía diabética

Se diseccionaron riñones de ratones *db*⁺ magros, y *db/db//BKS* de 6, 12 y 21 semanas de edad y se congelaron instantáneamente en hielo seco. El ARN total se extrajo y se purificó de los riñones usando el kit RNeasy Mini (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La primera cadena de ADNc se sintetizó a partir de 0,5~1 μg de ARN total usando el kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad). La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó con el KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2x) Universal (KAPA Biosystems) en el termociclador de PCR en tiempo real Rotor-Gene Q (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los niveles de expresión se normalizaron a la expresión de L19 y β -2 microglobulina.

Como se muestra en la Figura 9, en la nefropatía diabética, la expresión renal de *Vegfb*, los objetivos en sentido descendente de VEGF-B. *Fatp3* y *Fatp4*, y el principal de VEGF-B receptor, *Vegfr1* están regulados por incremento. Estos datos indican que la vía de señalización del VEGF-B renal es un objetivo adecuado para tratar la

nefropatía diabética.

La función renal se mejora en ratones *Vegf-b^{+/-}* alimentados con alto contenido en grasa y ratones *Vegf-b^{-/-}*

5 Se alimentaron ratones *Vegf^{+/-}* y *Vegfb^{-/-}* del tipo salvaje macho mentaron con dieta alta en grasas (HFD) al 60% (Research Diets, USA) durante 30 semanas, comenzando a la edad de 5 semanas. El estudio incluyó también animales de control de tipo salvaje magros. Para la detección de ACR, se recogieron de cada ratón de 20 µl a 200 µl de volumen de orina. La albúmina urinaria se detectó con el kit Albuwell M, y la creatinina urinaria se midió usando el

10 kit de ELISA murino de Creatinine Companion (Exocell, Filadelfia, PA).
La Figura 10 muestra que la pérdida de proteína urinaria mediada por HFD se redujo en ratones alimentados con HFD con expresión reducida de VEGF-B. Por tanto, se mejoró la capacidad de filtración del riñón, medida tanto por la excreción de albúmina (Figura 10B) como por ACR (Figura 10A).

15 La expansión y la hipertrofia mesangial glomerular se disminuyen en ratones *Vegf-b^{+/-}* y *Vegf-b^{-/-}* alimentados con HFD

20 Se alimentó a ratones *Vegf^{+/-}* y *Vegfb^{-/-}* de tipo salvaje macho con HFD al 60% (Research Diets. USA) para HFD durante 30 semanas, comenzando a la edad de 5 semanas. El estudio también incluyó animales de control magros. Los animales se sacrificaron con anestesia de isoflurano y la sangre total se extrajo mediante punción cardíaca. Los riñones se diseccionaron, se fijaron en PFA al 4% durante 48 horas y posteriormente se procesaron para embeberlos en parafina usando procedimientos estándar. Después de embeberlos, se prepararon secciones de 3 µm y se tiñeron con PAS (Sigma) de acuerdo con el fabricante. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñido por PAS dentro de cada sección con microscopía de campo brillante (microscopio Axio Vision, Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando el programa asistente Axio Vision Run para tinción glomerular con PAS (pixel²/µm²).

25 La Figura 11 muestra que la expansión (Figura 11A) y la hipertrofia (Figura 11B) mesangial glomerular renal inducida por HFD se previenen en ratones alimentados con HFD con expresión reducida de VEGF-B.

30 La acumulación de lípidos glomerular se reduce en ratones *Vegf-b^{+/-}* y *Vegf-b^{-/-}* alimentados con HFD

35 Se alimentaron ratones, *Vegf^{+/-}* y *Vegfb^{-/-}* de tipo salvaje macho con HFD al 60% (Research Diets. USA) para HFD durante 30 semanas, comenzando a la edad de 5 semanas. El estudio también incluyó animales de control de tipo salvaje magros. Los animales se sacrificaron con anestesia de isoflurano y la sangre total se extrajo mediante punción cardíaca. Los riñones se diseccionaron y se congelaron instantáneamente en hielo seco y se embebieron en Tissue-Tek® (Sakura) directamente en el molde del criostato. Las criosecciones (12 µm) se sumergieron 5-15 minutos en una solución de trabajo de aceite rojo O (2,5 g de aceite rojo O (Sigma-Aldrich), se disolvieron en 400 ml de isopropanol al 99%, se diluyeron adicionalmente 6:10 en H₂O, se filtraron a través de un filtro de 22 µm (Corning) y se enjuagaron durante 10 minutos con agua corriente. Posteriormente las secciones se sumergieron durante 3 s en solución de hematoxilina y se enjuagaron con agua corriente antes de montarlas. Las secciones teñidas se examinaron con microscopía de campo brillante. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñido por ORO y hematoxilina en cada sección con un microscopio Axio Vision (Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando el programa asistente Axio Vision Run para la tinción glomerular con ORO (pixel²/µm²).

45 La Figura 12 y el análisis de las secciones de riñón teñidas muestra que la HFD aumenta la acumulación de lípidos renal mayoritariamente en los glomérulos. Sin embargo, esta acumulación de lípidos ectópica se reduce en ratones alimentados con HFD con expresión reducida de VEGF-B. Las gotitas de lípidos se redujeron tanto en número como en tamaño.

50 La acumulación de lípidos glomerular se reduce, y la integridad de podocitos se conserva en ratones *Vegf-b^{+/-}* y *Vegf-b^{-/-}* alimentados con HFD

55 Se alimentaron ratones, *Vegf^{+/-}* y *Vegfb^{-/-}* de tipo salvaje macho con HFD al 60% (Research Diets. USA) para HFD durante 30 semanas, comenzando a la edad de 5 semanas. El estudio incluyó adicionalmente animales de control de tipo salvaje magros. Los animales se sacrificaron con anestesia de isoflurano y la sangre total se extrajo mediante punción cardíaca. Los riñones se diseccionaron, se fijaron en PFA al 4% durante 48 horas y posteriormente se procesaron para embeberlos en parafina usando procedimientos estándar. Después de embeberlos, se prepararon secciones de 3 µm y, a continuación, se inmunotiñeron por sinaptopodina y/o pccam. Brevemente, la recuperación del antígeno se realizó en secciones de 3 µm usando la solución de recuperación de antígeno Ph6 (Dako) y se calentó a 98° C durante 10 minutos. Las secciones se incubaron a 4° C durante 12 h con anticuerpos primarios de cobaya anti-adipofilina (Fitzgerald) y antipodocina de conejo (Sigma). Se aplicaron anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia apropiados (Invitrogen, Alexa fluor) y las secciones se incubaron adicionalmente durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual se prepararon para

microscopía. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñido por adipofilina y sinaptopodina dentro de cada sección con un microscopio Axio Vision (Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando el programa asistente Axio Vision Run para *i*) tinción con adipofilina ($\text{pixel}^2/\mu\text{m}^3$) glomerular y *ii*) tinción con podocina ($\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2$).

5 La Figura 13 y el análisis de las secciones teñidas muestra que la acumulación de lípidos renales ectópica impulsada por HFD se reduce en ratones con expresión reducida de VEGF-B. En paralelo, la integridad estructural y el número de podocitos se aumentan.

10 Los depósitos de ECM glomerulares y hialinosis arteriolar se reducen en ratones *Vegf-b^{+/-}* y *Vegf-b^{-/-}* alimentados con HFD

15 Se alimentaron ratones, *Vegf^{+/-}* y *Vegfb^{-/-}* de tipo salvaje macho con HFD al 60% (Research Diets. USA) para HFD durante 30 semanas, comenzando a la edad de 5 semanas. El estudio incluyó también animales de tipo salvaje de control magros. Los animales se sacrificaron con anestesia de isofluorano y la sangre total se extrajo mediante punción cardíaca. Los riñones se diseccionaron, se fijaron en PFA al 4% durante 48 horas y posteriormente se procesaron para embeberlos en parafina usando procedimientos estándar. Después de embeberlos, se prepararon secciones de 3 μm y, a continuación, se inmunizaron por colágeno IV, pecam y/o α -SMA. Brevemente, la recuperación de antígenos se realizó en secciones de 3 μm usando solución de recuperación de antígenos Ph6 (Dako N° S2367) y se calentó a 98° C durante 10 minutos. Las secciones se incubaron a 4° C durante 20 12 h con anticuerpos primarios de conejo anti-colágeno IV (abcam), de cabra anti-pccam (abcam) o α -SMA (sigma). Sea aplicaron anticuerpos secundarios marcados fluorescentemente apropiados (Invitrogen, Alexa fluor) y las secciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual se prepararon para microscopía. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñido por colágeno IV, pecam o α -SMA en cada sección con un microscopio Axio Vision (Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando el programa asistente Axio Vision Run para *i*) tinción de colágeno IV ($\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2$) glomerular y *ii*) grosor de las arteriolas glomerulares (μm^2).

30 La Figura 14 y el análisis de las secciones teñidas muestra que las patologías histológicas clave en la nefropatía diabética como la acumulación de ECM glomerular aumentada (Figura 14A) y la hialinosis arteriolar. (Figura 14B) se reducen en ratones alimentados con HFD con expresión reducida de VEGF-B.

Ejemplo 2: Un anticuerpo neutralizante anti-VEGF-B trata o previene la progresión de la nefropatía diabética

35 La inhibición mediada por anticuerpos de VEGF-B influye moderadamente en los niveles de glucosa en sangre en ratones *db/db//BKS* diabéticos

40 Se adquirieron ratones C57BKS/Leprdb (*db/db/BKS*) de Jackson Laboratory y se inyectaron por vía intraperitoneal dos veces por semana, comenzando a las 6 semanas (prueba preventiva) o 12 (prueba terapéutica) y continuaron durante 8 semanas con 400 μg de o 2H10 (anticuerpo anti-VEGF-B neutralizante) o anticuerpo de control emparejado de isotipo. En la prueba preventiva, los valores iniciales de ACR y glucosa en sangre fueron <50 μg de albúmina/mg de creatinina y <15 mM, respectivamente. En la prueba terapéutica, los valores iniciales de ACR y glucosa en sangre fueron >150 μg de albúmina/mg de creatinina y >15 mM, respectivamente. Los niveles de glucosa en sangre posprandiales de los ratones se monitorizaron dos veces por semana después de la eliminación del alimento durante 2 horas. Las mediciones de glucosa se realizaron en sangre extraída de la vena de la cola usando un medidor de glucosa Bayer Contour. Para la detección de ACR, se recogieron de cada ratón de 20 μl a 200 μl de volumen de orina. La albúmina urinaria se detectó usando el kit Albuwell M y la creatinina urinaria se midió usando el kit de ELISA murino Creatinine Companion (Exocell, Filadelfia, PA).

50 Las Figuras 15A y la C-F muestran los niveles de glucosa en sangre de ratones *db/db/BKS* tratados terapéuticamente o profilácticamente con el anticuerpo 2H10. Como se muestra, la administración del anticuerpo después de que la diabetes hubiera progresado en los experimentos descritos en la presente (como en los modelos agresivos de diabetes usados en la presente) no redujo sustancialmente los niveles de glucosa en sangre.

55 La Figura 15B muestra los niveles de ACR en ratones *db/db/BKS* tratados terapéuticamente o profilácticamente con el anticuerpo 2H10.

60 Estos datos muestran que los ratones *db/db//BKS* desarrollan microalbuminuria a las 6 semanas de edad y la macroalbuminuria se establece a las 12 semanas. Ni la administración de anticuerpos anti-VEGF-B preventiva ni la terapéutica a ratones *db/db//BKS* en estas pruebas disminuyó de forma detectable los niveles de glucosa en sangre.

El tratamiento profiláctico anti-VEGF-B (usando 2H10) disminuye la esclerosis glomerular y tubular en ratones *db/db//BKS*

65

Se recogieron riñones de *db/db/BKS* de 6-8 semanas de edad tratados con 2H10 o anticuerpo de control de emparejado con isotipo durante 8 semanas como se ha descrito anteriormente, se fijaron en PFA al 4% durante 48 h, se embebieron y se prepararon secciones de 3 μm y se tiñeron con PAS (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñido por PAS dentro de cada sección con microscopía de campo brillante (microscopio Axio Vision, Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando el programa asistente Axio Vision Run para la tinción con PAS glomerular ($\text{píxel}^2/\mu\text{m}^2$).

Como se muestra en la Figuras 16A y 16B los ratones tratados con 2H10 muestran niveles reducidos de esclerosis glomerular y esclerosis tubular. Estos datos demuestran que el tratamiento anti-VEGF-B en ratones *db/db//BKS* reduce tanto la esclerosis glomerular como la esclerosis tubular, a pesar de no haber diferencias detectables en los niveles de glucosa en sangre.

El tratamiento anti-VEGF-B profiláctico (usando 2H10) dificulta los reordenamientos vasculares en ratones *db/db//BKS*

Se recogieron riñones de *db/db/BKS* de 6-8 semanas de edad tratados con 2H10 o anticuerpo de control emparejado con isotipo durante 8 semanas como se ha descrito anteriormente o animales *db/+* magros emparejados por edad y sexo, se fijaron en PFA al 4% durante 48 horas, se embebieron y se prepararon secciones de 3 μm y se inmunotiñeron por pecam o podocina. Brevemente, la recuperación de antígeno se realizó en secciones de 3 μm usando la solución de recuperación de antígeno Ph6 (Dako N° S2367) y se calentó a 98° C durante 10 minutos. Las secciones se incubaron a 4° C durante 12 horas con anticuerpos primarios anti-pecam de cabra (abcam) y anti-podocina de conejo (sigma). Se aplicaron anticuerpos secundarios fluorescentemente marcados apropiados (Invitrogen, Alexa fluor) y las secciones se incubaron adicionalmente durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual se prepararon para microscopía. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñido por pecam dentro de cada sección con un microscopio Axio Vision (Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando el programa asistente Axio Vision Run para *i*) pecam glomerular ($\text{píxel}^2/\mu\text{m}^2$) y *ii*) tinción de podocina ($\text{píxel}^2/\mu\text{m}^2$).

Como se muestra en la Figura 17A, el nivel de tinción con podocina se conservó en ratones tratados con 2H10. El nivel de tinción con pecam aumentó en ratones tratados con 2H10 (Figura 17B). Estos datos y análisis de las secciones teñidas indican que la morfología de los vasos sanguíneos en los glomérulos se mejora en ratones *db/db//BKS* tratados con anti-VEGF-B y que la inhibición de VEGF-B conserva la densidad y la estructura vascular. Estos datos también muestran que la inhibición de VEGF-B conserva la densidad y la estructura vascular. Por tanto, tanto la estructura como la integridad de los tipos de células que componen la barrera de filtración glomerular, los podocitos y las células endoteliales se conservan en ratones *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B.

El tratamiento profiláctico anti-VEGF-B (usando 2H10) conserva la estructura de los podocitos en ratones *db/db//BKS*

Se recogieron riñones de *db/db/BKS* de 6-8 semanas de edad tratados con 2H10 o con anticuerpo de control emparejado con isotipo durante 8 semanas como se ha descrito anteriormente, se fijaron en PFA al 4% durante 48 horas, se embebieron y se prepararon secciones de 3 μm y se inmunotiñeron para sinaptodina y/o pecam. Brevemente, la recuperación de antígeno se realizó en secciones de 3 μm usando la solución de recuperación de antígeno Ph6 (Dako N° S2367) y se calentó a 98° C durante 10 minutos. Las secciones se incubaron a 4° C durante 12 horas con anticuerpos primarios de conejo anti-sinaptopodina (Santa Cruz). Se aplicaron anticuerpos secundarios fluorescentemente marcados apropiados (Invitrogen, Alexa fluor) y las secciones se incubaron adicionalmente durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual se prepararon para microscopía. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñido para pecam dentro de cada sección con un microscopio Axio Vision (Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando el programa asistente Axio Vision Run *i*) tinción con adipofilina ($\text{píxel}^2/\mu\text{m}^2$) y *ii*) tinción con sinaptopodina ($\text{píxel}^2/\mu\text{m}^2$).

Como se muestra en la Figura 18A, el nivel de tinción con adipofilina se redujo en ratones tratados con 2H10. La Figura 18B muestra que la tinción con sinaptopodina se aumentó en ratones tratados con 2H10. Estos datos y análisis de las secciones teñidas indican que la estructura y la integridad de los tipos de células que componen la barrera de filtración glomerular, los podocitos y las células endoteliales, se conservan en ratones *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B. Estos datos también muestran que el tratamiento con anticuerpo anti-VEGF-B redujo drásticamente la acumulación de lípidos glomerulares ectópica y conserva la expresión y morfología de los podocitos.

El tratamiento profiláctico anti-VEGF-B (usando 2H10) reduce la acumulación de colágeno glomerular (depósitos de la matriz extracelular) en ratones *db/db//BKS*

Se recogieron riñones de *db/db/BKS* de 6 semanas edad de tratados con 2H10 o con anticuerpo de control emparejado con isotipo durante 8 semanas como se ha descrito anteriormente, se fijaron en PFA al 4% durante 48 horas, se embebieron y prepararon secciones de 3 μm y se inmunotiñeron para colágeno glomerular IV.

Brevemente, la recuperación de antígenos se realizó en secciones de 3 μm usando la solución de recuperación de antígeno Ph6 (Dako N° S2367) y se calentó a 98° C durante 10 minutos. Las secciones se incubaron a 4° C durante 12 horas con anticuerpos primarios de conejo anti-sinaptopodina (Santa Cruz). Se aplicaron anticuerpos secundarios marcados fluorescentemente (Invitrogen, Alexa fluor) y las secciones se incubaron adicionalmente durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual se prepararon para microscopía. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñido para pecam dentro de cada sección con un microscopio Axio Vision (Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando el programa asistente Axio Vision Run para tinción con colágeno IV glomerular ($\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2$).

10 Como se muestra en la Figura 19, el nivel de tinción con colágeno IV glomerular se incrementó en ratones tratados con 2H10. Estos datos y análisis de las secciones teñidas indican que la inhibición mediada por anticuerpos de VEGF-B reduce la acumulación de colágeno patológico intraglomerular (acumulación de la matriz extracelular) en ratones *db/db//BKS*, una característica histológica en la nefropatía diabética.

15 El tratamiento profiláctico anti-VEGF-B (usando 2H10) mejora el perfil de lípidos en plasma en ratones *db/db//BKS*

20 Se extrajo sangre de ratones *db/db/BKS* de 6-8 semanas de edad hembra y *db/+* magros de edad y sexo emparejados por punción cardíaca que se habían tratado anteriormente con 2H10 o anticuerpo de control emparejado con isotipo durante 8 semanas. La sangre se centrifugó a 14000 rpm, a 4° C durante 10 minutos, posteriormente se separó el plasma y se congeló en partes alícuotas a -80° C. Se usaron kits disponibles comercialmente para la determinación enzimática de NEFA (Wako Chemicals, Neuss, Alemania), beta-hidroxibutirato (Stanbio Laboratories, Boerne, TX, USA) y HDL-c y LDL-c (BioVision, Mountain View, CA, USA).

25 Como se muestra en la Figura 20, la administración de 2H10 protegió a los ratones *db/db/BKS* contra niveles elevados de cetonas, un signo característico clave de la diabetes tipo 2. El tratamiento anti-VEGF-B incrementó los niveles de HDL-c en plasma, también conocido comúnmente como el portador de colesterol "bueno". La reducción de la señalización de VEGF-B en el 2S10 no tuvo efecto sobre los niveles en plasma de LDL-c o NEFA.

30 El tratamiento profiláctico anti-VEGF-B (usando 2H10) previene el engrosamiento de GBM y las anomalías de los podocitos.

35 Se recolectaron riñones de *db/db/BKS* de 6-8 semanas de edad hembra que se habían tratado con 2H10 o un anticuerpo de control emparejado con isotipo durante 8 semanas y se usaron para el análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM). La preparación de las biopsias renales para TEM se realizó de acuerdo con los procedimientos estándar. Los tejidos se fijaron en el tampón de solución de fijación (glutaraldehído al 2%, paraformaldehído al 0,5%, cacodilato 0,1 M, sacarosa 0,1 M, CaCl_2 3 mM) y se lavaron en tampón de cacodilato 0,1 M a pH 7,4 antes de la tinción en OsO_4 al 2% en tampón de cacodilato durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras se deshidrataron y la tinción *en bloque* se realizó en acetato de uranilo al 2% en etanol absoluto durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se tomaron muestras a través de una serie Epon 812/acetona y se embebieron a 60° C en Epon 812 puro. Se cortaron secciones finas de 70 nm de espesor en un ultratomo Leica EM UC6 y se montaron en rejillas de ranura de cobre revestidas con formvar. La tinción posterior se realizó con acetato acuoso al 2% pH 3,5 y citrato de plomo Venable y Cogglesall. Las rejillas se analizaron en un microscopio electrónico FEI TECNAI.

45 El análisis de TEM de gran aumento mostró que el engrosamiento de GBM, la primera patología renal en ratones *db/db*, cuando se trata con 2H10, se disminuye (Figura 21A). Además, el tratamiento anti-VEGF-B en ratones *db/db//BKS* conserva la morfología de los podocitos, medida como el número de formaciones de hendiduras (Figura 21B).

50 El tratamiento profiláctico anti-VEGF-B (usando 2H10) reduce la acumulación de lípidos glomerular en ratones *db/db//BKS*

55 Se recolectó sangre y riñones de ratones *db/db/BKS* de 6-8 semanas de edad tratados con 2H10 o anticuerpo de control emparejado con isotipo durante 8 semanas o ratones *db/+* magros. Los riñones se diseccionaron y se congelaron instantáneamente en hielo seco y se embebieron en Tissue-Tek® (Sakura) directamente en el molde del criostato. Las criosecciones (12 μm) se sumergieron 5-15 minutos en una solución de trabajo de aceite rojo O (2,5 g de aceite rojo O (Sigma-Aldrich), se disolvieron en 400 ml de isopropanol al 99%, se diluyeron adicionalmente 6:10 en H_2O , se filtraron a través de un filtro de 22 μm (Corning) y se enjuagaron durante 10 minutos con agua corriente. Posteriormente, las secciones se sumergieron durante 3 s en una solución de hematoxilina y se enjuagaron con agua corriente antes de montarse. Las secciones teñidas se examinaron con microscopía de campo brillante. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñido para ORO y hematoxilina en cada sección con un microscopio Axio Vision (Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando el programa asistente Axio Vision Run para la tinción glomerular de ORO ($\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2$).

65 Se detectó un aumento específico en la acumulación de lípidos en los glomérulos de los animales

diabéticos en comparación con los animales no diabéticos magros (Figura 22). La inhibición de VEGF-B en *db/db//BKS* redujo drásticamente esta acumulación de lípidos glomerulares ectópica. Las gotitas de lípidos se redujeron tanto en número como en tamaño. El análisis indicó que las gotitas se acumularon predominantemente en las células endoteliales y en los podocitos.

5 El tratamiento terapéutico anti-VEGF-B (usando 2H10) disminuye la esclerosis glomerular y tubular en ratones *db/db// BKS* diabéticos graves

10 Se recogieron riñones de *db/db//BKS* de 12 semanas de edad macho y hembra tratados con 2H10 o con anticuerpo de control emparejado con isotipo durante 8 semanas, se fijaron en PFA al 4% durante 48 horas, se embebieron y se prepararon secciones de 3 μm y se tiñeron con PAS (Sigma) según las instrucciones del fabricante. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñido para PAS dentro de cada sección con microscopía de campo brillante (microscopio Axio Vision, Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando el programa asistente Axio Vision Run para la tinción glomerular con PAS ($\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2$).

15 Los resultados mostrados en las Figuras 23A y 23By del análisis de las secciones teñidas indica que la inhibición terapéutica de VEGF-B en ratones *db/db//BKS* reduce la esclerosis glomerular y tubular. El efecto solo se detecta en animales hembra, más probablemente porque la enfermedad es más agresiva en ratones *db/db//BKS* macho (un efecto observado comúnmente).

20 El tratamiento anti-VEGF-B terapéutico (usando 2H10) reduce la acumulación de lípidos renal en ratones *db/db//BKS* diabéticos graves

25 Se recogieron riñones de *db/db//BKS* de 12 semanas de edad macho y hembra tratados con 2H10 o con un anticuerpo control emparejado con isotipo durante 8 semanas y se congelaron instantáneamente en hielo seco y se embebieron en Tissue-Tek® (Sakura) directamente en el molde del criostato. Las criosecciones (12 μm) se sumergieron 5-15 minutos en una solución de trabajo ORO (2,5 g ORO (Sigma-Aldrich), se disolvieron en 400 ml de isopropanol al 99%, se diluyeron adicionalmente 6:10 en H_2O , se filtraron a través de un filtro de 22 μm (Corning)) y se enjuagaron 10 min con agua corriente del grifo antes de montarse. Las secciones teñidas se examinaron con microscopía de campo brillante (microscopio Axio Vision, Carl Zeiss) con un aumento de 20x y se capturó un mínimo de 10 cuadros por sección. Para la cuantificación de las gotitas de lípidos, la cantidad de píxeles rojos en cada cuadro se cuantificó usando el programa asistente Axio Vision Run para la tinción total con ORO (pixel , a.u.).

35 Como se muestra en la Figura 24, la cantidad de tinción con ORO se redujo en ratones *db/db//BKS* hembra que habían recibido tratamiento con anticuerpos. Estos datos y el análisis de las secciones teñidas indican que tanto el número como el tamaño de las gotitas de lípidos se redujeron en ratones *db/db//BKS* hembra tratados con anticuerpo anti-VEGF-B. El tratamiento con anticuerpos anti-VEGF-B no redujo la acumulación de lípidos renal en ratones *db/db//BKS* macho, probablemente como resultado del desarrollo más agresivo de la enfermedad en animales macho.

40 El tratamiento terapéutico anti-VEGF-B (usando 2H10) previene los reordenamientos glomerulares en ratones *db/db// BKS* diabéticos graves

45 Se recogieron riñones de *db/db//BKS* de 12 semanas de edad hembra tratados con 2H10 o con anticuerpo de control emparejado con isotipo durante 8 semanas, se fijaron en PFA al 4% durante 48 horas, se embebieron y se prepararon secciones de 3 μm y se inmunotiñeron para sinaptodina o pecam. Brevemente, la recuperación de antígenos se realizó en secciones de 3 μm usando la solución de recuperación de antígeno Ph6 (Dako N° S2367) y se calentó a 98° C durante 10 minutos. Las secciones se incubaron a 4° C durante 12 horas con anticuerpos primarios de ratón anti-sinapsopodina (Santa Cruz). Se aplicaron anticuerpos secundarios marcados fluorescentemente (Invitrogen, Alexa fluor) y las secciones se incubaron adicionalmente durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual se prepararon para microscopía. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñido para pecam dentro de cada sección con un microscopio Axio Vision (Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando un programa asistente Axio Vision Run para tinción con sinaptopodina o pecam glomerular ($\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2$).

55 La Figura 25A y 25B muestran niveles aumentados de pecam y de sinaptopodina en glomérulos de ratones tratados terapéuticamente con anticuerpo anti-VEGF. Estos datos y el análisis de las secciones teñidas indican que la morfología de los glomérulos se mejora en *db/db//BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B. La expresión y la estructura de podocitos y las células endoteliales, es decir, los tipos de células que son cruciales para el proceso de filtración glomerular, se conservan en los ratones *db/db//BKS* tratados. Por tanto, estos datos también indican que el tratamiento terapéutico con un anticuerpo anti-VEGF también previene la pérdida vascular y de podocitos de los ratones *db/db//BKS*.

60 El tratamiento terapéutico anti-VEGF-B (usando 2H10) reduce la acumulación de colágeno glomerular y la hialinosis arteriolar en ratones *db/db//BKS* diabéticos graves

65

Se recogieron riñones de *db/db/BKS* de 12 semanas de edad hembra tratados con 2H10 o con un anticuerpo de control emparejado con isotipo durante 8 semanas, se fijaron en PFA al 4% durante 48 horas, se embebieron y se prepararon secciones de 3 μm y se inmunotifieron para colágeno IV, pecam y/o α -SMA. Brevemente, la recuperación de antígeno se realizó en secciones de 3 μm usando la solución de recuperación de antígeno Ph6 (Dako N° S2367) y se calentó a 98° C durante 10 minutos. Las secciones se incubaron a 4° C durante 12 horas con anticuerpos primarios de conejo anti-sinaptodina (Santa Cruz). Se aplicaron anticuerpos secundarios marcados fluorescentemente (Invitrogen, Alexa fluor) y las secciones se incubaron adicionalmente durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual se prepararon para microscopía. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñido para pccam dentro de cada sección con un microscopio Axio Vision (Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando un programa asistente Axio Vision Run para tinción con colágeno IV, pecam, y/o α -SMA ($\text{píxel}^2/\mu\text{m}^2$).

Las Figuras 26A-C muestran niveles reducidos de colágeno IV, α -SMA y grosor arteriolar en ratones *db/db/BKS* tratados con 2H10. Estos datos y análisis de las secciones teñidas muestran un depósito de colágeno intra glomerular patológico (deposición de la matriz extracelular) y la hialinosis arteriolar se reduce en ratones *db/db/BKS* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B.

El tratamiento terapéutico anti-VEGF-B (usando 2H10) previene el desarrollo de macroalbuminuria en ratones *db/db/BKS* diabéticos con microalbuminuria establecida

Se inyectó a ratones *db/db/BKS* i.p. dos veces por semana, comenzando a las 6-8 semanas de edad, y se continuó durante 8 semanas con 400 μg de o 2H10 o anticuerpo de control emparejado con isotipo. Para la detección de ACR, se recogieron de 20 μl a 200 μl de volumen de orina de cada ratón. La albúmina urinaria se detectó con el kit Albuwell M, y la creatinina urinaria se midió con el kit de ELISA murino de Creatinine Companion (Exocell, Filadelfia, PA). La presión sanguínea sistólica y diastólica se midió usando un método de manguito de la cola usando la configuración CODA (Kent Scientific). Todos los animales se habituaron al dispositivo de medición de presión sanguínea durante 2 semanas. Los animales se sometieron a 1-2 ciclos de 20 mediciones reordenadas por día durante un mínimo de 3 días. Para los estudios de la función renal, los ratones individuales se alojaron en jaulas metabólicas. Se monitorizaron el peso corporal y el volumen de orina en 24 h durante 2 días consecutivos. Se usaron muestras de orina de las últimas 24 h para medir la creatinina en orina. Después de alojarlos en jaulas metabólicas, los animales se sacrificaron con anestesia con isoflurano y la sangre total se extrajo mediante punción cardíaca, y se usó para medir la creatina en plasma. Los riñones se disecaron y pesaron a microescala. La depuración de creatinina se calculó mediante $(\text{orina } [\text{Cr}] \times \text{volumen de orina}) / (\text{plasma } [\text{Cr}] \times 24 \text{ h})$.

La Figura 27A muestra que el tratamiento de ratones *db/db/BKS* con 2H10 evita la progresión de la microalbuminuria a la macroalbuminuria, en particular, la ACR no cambió significativamente durante el curso del estudio en ratones tratados. La Figura 27B muestra que la tasa de filtración glomerular (medida como la depuración de creatinina) también se redujo en los ratones *db/db/BKS* tratados con 2H10. La Figura 27C muestra que el desarrollo de la hipertensión se evitó mediante la inhibición de VEGF-B. La Figura 27D muestra que reducir la expresión de VEGF-B no tuvo ningún efecto sobre el peso corporal o renal. Estos datos indican que los ratones *db/db* tratados con anticuerpo anti-VEGF-B tienen una función renal mejorada con mejor capacidad de filtración medida por la concentración reducida de albúmina urinaria, la proporción albúmina/creatinina urinaria y la depuración de creatinina.

El tratamiento anti-VEGF-B terapéutico (usando 2H10) en ratones alimentados con HFD tiene un efecto menor sobre los niveles de glucosa en sangre

Los ratones se alimentaron con 60% de HFD (Research Diets, USA) para HFD durante 30 semanas, comenzando a las 5 semanas de edad. El tratamiento con anticuerpos comenzó en la semana 11 y los ratones se trataron con 2H10 o un anticuerpo de control emparejado con isotipo durante 20 semanas. Los niveles de BG posprandiales de ratones se registraron al final del ensayo, después de la eliminación del alimento durante 2 h. Las mediciones de glucosa se realizaron en sangre extraída de la vena de la cola usando un medidor de glucosa Bayer Contour.

La Figura 28 muestra que la HFD aumenta los niveles de glucosa en sangre; sin embargo, el tratamiento con anti-VEGF-B no previene el desarrollo de la hiperglucemia.

El tratamiento terapéutico con VEGF-B (usando 2H10) en ratones alimentados con HFD mejora la función renal sin disminuir los niveles de glucosa en sangre

Los ratones fueron se alimentaron con 60% de HFD (Research Diets, USA) para HFD durante 30 semanas, comenzando a las 5 semanas de edad. El estudio también incluyó animales de control de tipo salvaje magros. El tratamiento con anticuerpos comenzó en la semana 11 y los ratones se trataron con 2H10 o anticuerpo de control emparejados con isotipo durante 20 semanas. Para la detección de albúmina y ACR se recogieron de 20 μl a 200 μl

de volumen de orina de cada ratón en el punto final del ensayo. La albúmina urinaria se detectó usando el kit Albuwell M, y la creatinina urinaria se midió utilizando el kit ELISA murino de Creatinine Companion Murine (Exocell, Filadelfia, PA).

5 Aunque el tratamiento con anti-VEGF-B en ratones alimentados con HFD no redujo los niveles de glucosa en sangre, el tratamiento tuvo un impacto significativo en la fisiología renal diabética (Figura 29). La capacidad de filtración del riñón se mejoró según lo medido por la excreción de albúmina reducida (Figura 29A). ACR (Figura 29B) y GFR, el tratamiento con Anti-VEGF-B en ratones alimentados con HFD no tuvo ningún efecto sobre el peso corporal o renal, en comparación con los ratones tratados con control.

10 El tratamiento anti-VEGF-B terapéutico (usando 2H10) en ratones alimentados con HFD mejora el perfil de lípidos en plasma

15 Se alimentaron ratones con 60% de HFD (Research Diets, USA) para HFD durante 30 semanas, comenzando a las 5 semanas de edad. El estudio también incluyó animales de control de tipo salvaje magros. El tratamiento con anticuerpos comenzó en la semana 11 y los ratones se trataron con 2H10 o un anticuerpo de control emparejado con isotipo durante 20 semanas. Los animales se sacrificaron con anestesia de isoflurano y la sangre total se extrajo mediante punción cardíaca. La sangre se centrifugó a 14000 rpm, a 4° C durante 10 minutos, luego se separó el plasma y se congeló en alícuotas a -80° C. Se usaron kits comercialmente disponibles para la determinación enzimática de NEFA (Wako Chemicals, Neuss, Alemania), beta-hidroxibutirato (Stanbio Laboratories, Boerne, TX, USA) y triglicéridos (Sigma-Aldrich).

20 La Figura 30 muestra que la administración de 2H10 en ratones alimentados con HFD protegió contra niveles elevados de especies de lípidos asociadas con T2D. Por ejemplo, el tratamiento con anticuerpos anti-VEGF-B disminuyó los niveles en plasma de triglicéridos (Figura 30A), NEFAo (Figura 30B) y cetonas (Figura 30C).

25 El tratamiento anti-VEGF-B terapéutico (usando 2H10) en ratones alimentados con HFD previene la expansión mesangial glomerular y la esclerosis

30 Se alimentaron ratones con 60% de HFD (Research Diets, USA) para HFD durante 30 semanas, comenzando a las 5 semanas de edad. El estudio también incluyó animales de control de tipo salvaje magros. El tratamiento con anticuerpos comenzó en la semana 11 y los ratones se trataron con 2H10 o un anticuerpo de control emparejado con isotipo durante 20 semanas. Los animales se sacrificaron con anestesia de isoflurano y la sangre total se extrajo mediante punción cardíaca. Los riñones se diseccionaron, se fijaron posteriormente en PFA al 4% durante 48 horas y posteriormente se procesaron para embeberlos en parafina usando procedimientos estándar. Después de embeberlos, se prepararon secciones de 3 μm y se tiñeron con PAS (Sigma) de acuerdo con el fabricante. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñido para PAS dentro de cada sección con microscopía de campo brillante (microscopio Axio Vision, Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando el programa asistente Axio Vision Run para tinción con PAS glomerular ($\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2$).

40 Los datos presentados en la Figura 31 y el análisis de las secciones teñidas muestra que la administración de 2H10 en ratones alimentados con HFD protegió contra la expansión mesangial glomerular (Figura 31A) y la hipertrofia glomerular (Figura 31B).

45 El tratamiento anti-VEGF-B terapéutico (usando 2H10) en ratones alimentados con HFD previene la acumulación de lípidos glomerular

50 Se alimentaron ratones con 60% de HFD (Research Diets, USA) para HFD durante 30 semanas, comenzando a las 5 semanas de edad. El estudio también incluyó animales de control de tipo salvaje magros. El tratamiento con anticuerpos comenzó en la semana 11 y los ratones se trataron con 2H10 o anticuerpo de control emparejado con isotipo durante 20 semanas. Los animales se sacrificaron con anestesia de isoflurano y la sangre total se extrajo mediante punción cardíaca. Los riñones se diseccionaron y se congelaron instantáneamente en hielo seco y se embebieron en Tissue-Tek® (Sakura) directamente en el molde del criostato. Las criosecciones (12 μm) se sumergieron 5-15 minutos en una solución de trabajo de aceite rojo O (2,5 g de aceite rojo O (Sigma-Aldrich), se disolvieron en 400 ml de isopropanol al 99, se diluyeron adicionalmente 6:0 en H_2O , Se filtraron a través de un filtro de 22 μm (Venir) y se enjuagaron durante 10 minutos con agua corriente. Posteriormente, las secciones se sumergieron durante 3 s en una solución de hematoxilina y se enjuagaron con agua corriente antes de montarlas. Las secciones teñidas se examinaron con microscopía de campo brillante. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñido para ORO y hematoxilina dentro cada sección con un microscopio Axio Vision (Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando el programa asistente Axio Vision Run para la tinción glomerular con ORO ($\text{pixel}^2/\mu\text{m}^2$).

60 Los datos presentados en Figura 32y el análisis de las secciones teñidas muestra que la administración de 2H10 en ratones alimentados con HFD protege contra la acumulación de lípidos renales ectópica. Las gotitas de lípidos se reducen tanto en número como en tamaño.

65

El tratamiento anti-VEGF-B terapéutico (con 2H10) en ratones alimentados con HFD previene la acumulación de lípidos glomerular y preserva la integridad de los podocitos

5 Se alimentaron ratones con 60% de HFD (Research Diets, USA) para HFD durante 30 semanas, comenzando a las 5 semanas de edad. El estudio también incluyó animales de control de tipo salvaje magros. El tratamiento con anticuerpos comenzó en la semana 11 y los ratones se trataron con 2H10 o anticuerpo de control emparejado con isotipo durante 20 semanas. Los animales se sacrificaron con anestesia de isofluorano y la sangre total se extrajo mediante punción cardíaca. Los riñones se diseccionaron, se fijaron posteriormente en PFA al 4% durante 48 horas y posteriormente se procesaron para embeberlos en parafina usando procedimientos estándar. Después de embeberlos, se prepararon secciones de 3 μm y, posteriormente se inmunotifieron para colágeno IV, pecam y/o α -SMA. Brevemente, la recuperación de antígenos se realizó en secciones de 3 μm usando solución de recuperación de antígeno Ph6 (Dako N° S2367) y se calentó a 98° C durante 10 minutos. Las secciones se incubaron a 4° C durante 12 h con anticuerpos primarios de conejo anti-colágeno IV (abcam), anti-pecam de cabra (Abcam) o α -SMA (Sigma). Se aplicaron anticuerpos secundarios marcados fluorescentemente (Invitrogen, Alexa fluor) y las secciones se incubaron adicionalmente durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual se prepararon para microscopía. Se fotografiaron por lo menos 10 glomérulos por animal teñido para colágeno IV, pecam o α -SMA en cada sección con un microscopio Axio Vision (Carl Zeiss) con un aumento de 40x. Los glomérulos se cuantificaron usando el programa asistente Axio Vision Run para i) tinción con colágeno IV glomerular (píxel²/ μm^2) y ii) grosor de las arteriolas glomerulares (μm).

Los datos presentados en la Figura 33 y el análisis de las secciones teñidas muestra que la administración de 2H10 en ratones alimentados con HFD protege contra patologías histológicas asociadas con la nefropatía diabética, como la acumulación de ECM glomerular aumentada (Figura 33A) y la hialinosis arteriolar (Figura 33B).

El tratamiento anti-VEGF-B terapéutico (con 2H10) en animales inyectados con STZ no tiene efecto sobre los niveles de glucosa en sangre

30 Para la inducción de diabetes tipo I, se empleó un modelo de estreptozotocina (STZ). Los experimentos se realizaron con ratones B1/6 macho de Charles River. Los ratones se privaron de alimento durante 4 horas antes de las inyecciones de STZ, y recibieron 50 mg/kg de peso corporal de estreptozotocina (Sigma-Aldrich) en citrato de sodio 50 mM (pH 4.5) o tampón de citrato de sodio por vía intraperitoneal los días 1, 2, 3, 4 y 5. Los niveles de BG de los ratones se registraron antes y 1 semana después de la administración de STZ. Los animales con niveles de glucosa en sangre superiores a 12 mmol/l se consideraron hiperglucémicos. Los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos y se trataron con 2H10 o un anticuerpo de control emparejado con isotipo dos veces por semana. Los niveles de BG postprandiales de los ratones tratados con anti-VEGF-B (2H10) o anticuerpo de control, y los animales de control magros se registraron dos veces por semana después de la eliminación de los alimentos durante 2 h. Las mediciones de glucosa se realizaron en sangre extraída de la vena de la cola usando un medidor de glucosa Bayer Contour.

40 Como se muestra en Figura la 34A, la inyección de STZ en ratones macho induce hiperglucemia. Sin embargo, el tratamiento anti-VEGF-B después de las inyecciones de STZ no tiene un efecto importante en los niveles de glucosa en sangre (Figura 34B).

El tratamiento anti-VEGF-B terapéutico en animales inyectados con STZ, usando 2H10, mejora la función renal

50 Para la inducción de diabetes tipo 1, se empleó el modelo de estreptozotocina (STZ). Los experimentos se realizaron con ratones B1/6 macho de Scanbur. Los ratones se privaron de alimento durante 4 horas antes de las inyecciones de STZ, y recibieron 50 mg/kg de peso corporal de STZ (Sigma-Aldrich) en tampón de citrato de sodio 50 mM (pH 4.5) por vía intraperitoneal en el día 1-5. Los niveles de BG de los ratones se registraron antes y 1 semana después de la administración de STZ. Los animales con niveles de glucosa superiores a 12 mmol/l se consideraron hiperglucémicos. Los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos y se trataron con 2H10 o con un anticuerpo de control emparejado con isotipo dos veces por semana como antes. Para la detección de albúmina y ACR, se recogieron de 20 μl a 200 μl de volumen de orina de cada ratón en el punto final del ensayo (experimento en curso, solo informada 1 semana de tratamiento. La albúmina urinaria se detectó usando el kit Albuwell M, y la creatinina urinaria se midió usando el kit ELISA murino Creatinine Companion (Exocell, Filadelfia, PA).

60 A pesar de efectos menores sobre los niveles de glucosa en sangre en los ratones dosificados con el anticuerpo anti-VEGF-B 2H10 después de las inyecciones de STZ, la función renal de los ratones diabéticos mejoró significativamente con el tratamiento con anticuerpos. La capacidad de filtración del riñón mejoró según se midió por la excreción de albúmina reducida (Figura 35A) y ACR (Figura 35B).

65

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CSL Limited
B Creative Sweden AB

<120> Método para tratar la nefropatía

<130> 516049

<160> 46

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(21)

<223> Secuencia de señal

<400> 1

25 Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu
1 5 10 15

30 Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
20 25 30

35 Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
35 40 45

40 Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
50 55 60

45 Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
65 70 75 80

50 Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
85 90 95

55 Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
100 105 110

60 Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
115 120 125

65 Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Arg Ala Ala Thr Pro His His Arg
130 135 140

Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro Gly Trp Asp Ser Ala Pro Gly Ala Pro

65

ES 2 711 882 T3

	145				150					155				160		
5	Ser	Pro	Ala	Asp	Ile	Thr	His	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Gly	Pro	Ser	Ala
					165					170					175	
10	His	Ala	Ala	Pro	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Leu	Thr	Pro	Gly	Pro	Ala	Ala
				180					185					190		
15	Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Ser	Ser	Val	Ala	Lys	Gly	Gly	Ala	
			195					200					205			
20	<210>	2														
	<211>	188														
	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
25	<220>															
	<221>	SEÑAL														
	<222>	(1)..(21)														
	<223>	Secuencia de señal														
30	<400>	2														
	Met	Ser	Pro	Leu	Leu	Arg	Arg	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Gln	Leu
	1				5					10					15	
35	Ala	Pro	Ala	Gln	Ala	Pro	Val	Ser	Gln	Pro	Asp	Ala	Pro	Gly	His	Gln
				20					25					30		
40	Arg	Lys	Val	Val	Ser	Trp	Ile	Asp	Val	Tyr	Thr	Arg	Ala	Thr	Cys	Gln
			35					40					45			
45	Pro	Arg	Glu	Val	Val	Val	Pro	Leu	Thr	Val	Glu	Leu	Met	Gly	Thr	Val
		50					55					60				
50	Ala	Lys	Gln	Leu	Val	Pro	Ser	Cys	Val	Thr	Val	Gln	Arg	Cys	Gly	Gly
	65					70					75					80
55	Cys	Cys	Pro	Asp	Asp	Gly	Leu	Glu	Cys	Val	Pro	Thr	Gly	Gln	His	Gln
				85						90					95	
60	Val	Arg	Met	Gln	Ile	Leu	Met	Ile	Arg	Tyr	Pro	Ser	Ser	Gln	Leu	Gly
				100					105					110		
65	Glu	Met	Ser	Leu	Glu	Glu	His	Ser	Gln	Cys	Glu	Cys	Arg	Pro	Lys	Lys
			115					120					125			
70	Lys	Asp	Ser	Ala	Val	Lys	Pro	Asp	Ser	Pro	Arg	Pro	Leu	Cys	Pro	Arg
		130					135					140				

ES 2 711 882 T3

Cys Thr Gln His His Gln Arg Pro Asp Pro Arg Thr Cys Arg Arg Arg
 145 150 155 160

5 Cys Arg Arg Arg Ser Phe Leu Arg Cys Gln Gly Arg Gly Leu Glu Leu
 165 170 175

10 Asn Pro Asp Thr Cys Arg Cys Arg Lys Leu Arg Arg
 180 185

<210> 3
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de una VH del anticuerpo 2H10

20 <400> 3

Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15

25 Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Phe Trp
 20 25 30

30 Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

35 His Ile Asn Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 50 55 60

40 Arg Met Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80

45 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

50 Arg Ser Tyr Ser Asn Tyr Val Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

55 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> artificial

60 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de una VL del anticuerpo 2H10

65 <400> 4

ES 2 711 882 T3

1 Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp
 5 Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe Leu
 10 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr
 15 Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 20 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu
 25 Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Pro Thr
 30 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 35 <210> 5
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> artificial
 40 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de una VH de una forma humanizada del anticuerpo 2H10
 <400> 5
 45 Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser
 50 Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Phe Trp
 55 Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 60 His Ile Asn Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 65 Arg Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met
 70 Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 75 80 85 90 95

ES 2 711 882 T3

Arg Ser Tyr Ser Asn Tyr Val Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

5 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 6
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

15 <220>
<223> secuencia de aminoácidos de una VL de una forma humanizada del anticuerpo 2H10
<400> 6

20 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

25 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe
20 25 30

30 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

35 Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

40 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

45 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Pro
85 90 95

50 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

55 <210> 7
<211> 116
<212> PRT
<213> artificial

60 <220>
<223> secuencia de aminoácidos de una VH del anticuerpo 4E12
<400> 7

65 Val Gln Pro Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
1 5 10 15

70 Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp Thr Phe Thr Asn Ser Trp

ES 2 711 882 T3

5	Ile	Gly	Trp	Val	Thr	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly			
			35					40					45						
10	Asp	Ile	Phe	Pro	Gly	Ser	Gly	His	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	Lys			
		50					55					60							
15	Asn	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met			
							70					75				80			
20	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val			
					85					90					95				
25	Ile	Glu	Asn	Tyr	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val			
				100					105					110					
30	Thr	Val	Ser	Ala															
				115															
35	<210> 8 <211> 107 <212> PRT <213> artificial <220> <223> secuencia de aminoácidos de una VL del anticuerpo 4E12 <400> 8																		
40	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Gln	Lys	Phe	Met	Ser	Ser	Ser	Val	Gly			
	1				5					10					15				
45	Asp	Arg	Val	Ser	Val	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asn	Val	Asn	Thr	Asn			
				20					25					30					
50	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Gln	Ser	Pro	Arg	Pro	Leu	Ile			
			35					40						45					
55	Tyr	Ser	Ala	Ser	Ser	Arg	Cys	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly			
		50					55					60							
60	Ser	Gly	Phe	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Val	Gln	Ser			
	65					70					75					80			
65	Glu	Asp	Leu	Ala	Glu	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	His	Ser	Phe	Pro	Leu			
					85					90					95				
70	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Ala	Lys	Leu	Asp	Leu	Lys								
				100					105										

ES 2 711 882 T3

<210> 9
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de una VH del anticuerpo 2F5

<400> 9

10

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr Ser
 1 5 10 15

15

Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Phe Tyr
 20 25 30

20

Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

25

Trp Phe Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Leu Lys
 50 55 60

30

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Leu
 65 70 75 80

35

Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr
 85 90 95

40

Arg Ser Pro Tyr Tyr Gly Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

45

<210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de una VL del anticuerpo 2F5

<400> 10

55

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

60

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30

65

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

ES 2 711 882 T3

		35		40		45												
5		Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	His	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	
		50						55					60					
10		Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Val	Gln	Ser	
		65					70					75					80	
15		Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Ser	Ser	Ser	Leu	Thr	
						85					90					95		
20		Phe	Gly	Ala	Gly	Ala	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys						
					100						105							
20	<210> 11																	
	<211> 33																	
	<212> ADN																	
	<213> Secuencia artificial																	
25	<220>																	
	<223> Secuencia de nucleótidos de 2H10 VL CDR1																	
	<400> 11																	
	agggcaagtc aggacattag caattttta aac 33																	
30	<210> 12																	
	<211> 21																	
	<212> ADN																	
	<213> Secuencia artificial																	
35	<220>																	
	<223> Secuencia de nucleótidos de 2H10 VL CDR2																	
	<400> 12																	
	tacacatcaa cattacactc a 21																	
40	<210> 13																	
	<211> 27																	
	<212> ADN																	
	<213> Secuencia artificial																	
45	<220>																	
	<223> Secuencia de nucleótidos de 2H10 VL CDR3																	
	<400> 13																	
50	caacagggta aaacgcttc tcccacg 27																	
	<210> 14																	
	<211> 30																	
	<212> ADN																	
55	<213> Secuencia artificial																	
	<220>																	
	<223> Secuencia de nucleótidos de 2H10 VH CDR1																	
60	<400> 14																	
	ggctacactt tcaactggctt ctggatacac 30																	
	<210> 15																	
	<211> 51																	
65	<212> ADN																	

ES 2 711 882 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos de 2H10 VH CDR2

5 <400> 15
catattaatc ctggcaatgg tggcactaac tacaatgaga agttcaagag a 51

<210> 16

10 <211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de nucleótidos de 2H10 VH CDR3

<400> 16
tcctatagta actacgtgcg ggctatggac tac 33

<210> 17

20 <211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia de aminoácidos de 2H10 VL CDR1

<400> 17

30 **Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe Leu Asn**
 1 5 10

<210> 18

<211> 7

35 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de 2H10 VL CDR2

40 <400> 18

Tyr Thr Ser Thr Leu His Ser
 1 5

45 <210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> secuencia de aminoácidos de 2H10 VL CDR3

<400> 19

55 **Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Pro Thr**
 1 5

<210> 20

60 <211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> secuencia de aminoácidos de 2H10 VH CDR1

ES 2 711 882 T3

<400> 20

5 Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Phe Trp Ile His
1 5 10

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de 2H10 VH CDR2

15 <400> 21

His Ile Asn Pro Gly Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

20 Arg

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de 2H10 VH CDR3

30 <400> 22

Ser Tyr Ser Asn Tyr Val Arg Ala Met Asp Tyr
1 5 10

35 <210> 23
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos de 2F5 VL CDR1

<400> 23
aaggccagtc aggatgtggg tactgctgta gcc 33

45 <210> 24
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Secuencia de nucleótidos de 2F5 VL CDR2

<400> 24
55 tgggcatcca cccggcacac t 21

<210> 25
<211> 24
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos de 2F5 VL CDR3

65 <400> 25

ES 2 711 882 T3

caacaatata gcagctctct cacg 24

5 <210> 26
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de 2F5 VH CDR1

<400> 26
 ggctacacct tcacaacct ctatacac 30

15 <210> 27
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de 2F5 VH CDR2

<400> 27
 tggttttatc ctggaaatgt taataccaac tacaatgaga agctcaaggg c 51

25 <210> 28
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de 2F5 VH CDR3

<400> 28
 tccccttact acggctacgt tttgactac 30

35 <210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de 2F5 VL CDR1

45 <400> 29

Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Gly	Thr	Ala	Val	Ala
1				5					10	

50 <210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de 2F5 VL CDR2

<400> 30

60

Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	His	Thr
1				5		

65 <210> 31
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de 2F5 VL CDR3

5 <400> 31

Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Leu Thr
 1 5

10 <210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de 2F5 VH CDR1

<400> 32

20 Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Phe Tyr Ile His
 1 5 10

<210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de 2F5 VH CDR2

30 <400> 33

Trp Phe Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Leu Lys
 1 5 10 15

35 Gly

<210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de 2F5 VH CDR3

45 <400> 34

Ser Pro Tyr Tyr Gly Tyr Val Phe Asp Tyr
 1 5 10

50 <210> 35
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de 4E12 VL CDR1

<400> 35
 60 aagccagtc agaatgtaa cactaatgta gcc 33

<210> 36
 <211> 21
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de 4E12 VL CDR2

5 <400> 36
 tcggcatcct cccggtgcag t 21

<210> 37
 <211> 27
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de 4E12 VL CDR3

15 <400> 37
 cagcaatc acagcttcc gctcacg 27

<210> 38
 <211> 30
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de 4E12 VH CDR1

25 <400> 38
 ggcgacacct tcaccaactc ctggataggc 30

<210> 39
 <211> 51
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de 4E12 VH CDR2

35 <400> 39
 gatattttc ctgggagtg tcactaac tacaatgaga agtcaagaa c 51

40 <210> 40
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de 4E12 VH CDR3

<400> 40
 50 gagaattatg cctggttgc ttat 24

<210> 41
 <211> 11
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de 4E12 VL CDR1

60 <400> 41

Lys Ala Ser Gln Asn Val Asn Thr Asn Val Ala
 1 5 10

65 <210> 42

ES 2 711 882 T3

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de 4E12 VL CDR2

<400> 42

10 Ser Ala Ser Ser Arg Cys Ser
 1 5

<210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de 4E12 VL CDR3

20 <400> 43

Gln Gln Tyr His Ser Phe Pro Leu Thr
 1 5

25 <210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de 4E12 VH CDR1

<400> 44

35 Gly Asp Thr Phe Thr Asn Ser Trp Ile Gly
 1 5 10

40 <210> 45
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de aminoácidos de 4E12 VH CDR2

45 <400> 45

Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Asn

<210> 46
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de 4E12 VH CDR3

60 <400> 46

Glu Asn Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un compuesto que inhibe la señalización de VEGF-B para su uso en el tratamiento de la nefropatía diabética en un sujeto que padece de nefropatía diabética, en donde el compuesto que inhibe la señalización de VEGF-B es:
- (i) una proteína que comprende una región variable de anticuerpo que se une o se une específicamente a VEGF-B y neutraliza la señalización de VEGF-B; o
- (ii) un ácido nucleico que inhibe o evita la expresión de VEGF-B.
- 10 **2.** Un compuesto para el uso de la reivindicación 1, en el que el sujeto padece de diabetes y microalbuminuria o macroalbuminuria.
- 3.** El compuesto para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el compuesto se administra en una cantidad eficaz para tener uno o más de los efectos siguientes:
- 15
- Reducir o prevenir la hipertensión;
 - Reducir o prevenir la esclerosis glomerular y/o tubular;
 - Reducir o prevenir el depósito de la matriz extracelular mesangial y/o el engrosamiento anormal de la membrana basal glomerular;

20

 - Reducir o prevenir la expansión mesangial glomerular;
 - Reducir o prevenir los reordenamientos vasculares glomerulares;
 - Reducir o prevenir la acumulación de lípidos renal;
 - Reducir o prevenir la acumulación de lípidos glomerular;
 - Reducir o prevenir los depósitos de colágeno glomerular y/o la hialiosis arteriolar; y/o

25

 - Reducir o prevenir la macroalbuminuria.
- 4.** El compuesto para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto es una proteína que comprende un Fv.
- 30 **5.** El compuesto para el uso de la reivindicación 4, en el que la proteína se selecciona del grupo que consiste de:
- (i) un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv);
- (ii) un scFv dimérico (di-scFv); o
- 35 (iii) un diacuerpo;
- (iv) un triacuerpo;
- (v) un tetracuerpo;
- (vi) un Fab;
- (vii) un F(ab')₂;
- (viii) un Fv;
- 40 (ix) uno de (i) a (viii) enlazado a una región constante de un anticuerpo, Fc o un dominio constante de cadena pesada (C_H)₂ y/o C_H3; o
- (x) un anticuerpo.
- 6.** El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en donde el compuesto es una proteína que comprende una región variable de anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera (V_L) que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4 a VEGF-B.
- 45 **7.** El compuesto para el uso de la reivindicación 6, en donde el compuesto es una proteína que comprende una forma humanizada de la región V_H como se expone en SEQ ID NO: 3 o la región V_L como se expone en la SEQ ID NO: 4 o el compuesto es una forma humanizada de un anticuerpo que comprende la región V_H expuesta en la SEQ ID NO: 3 y la región V_L expuesta en la SEQ ID NO: 4.
- 50 **8.** El compuesto para el uso de la reivindicación 7, en donde el compuesto es un anticuerpo que comprende una V_H que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 5 y una V_L que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 6.
- 55 **9.** El compuesto para el uso de las reivindicaciones 1-3, en donde el compuesto es un ácido nucleico seleccionado del grupo de un antisentido, un ARNip, un ARNi, una ribozima y una ADNzima.
- 60 **10.** El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que se formula para la administración con un compuesto adicional, en el que el compuesto adicional trata o previene la nefropatía o trata, previene o retrasa la progresión de la diabetes.
- 65

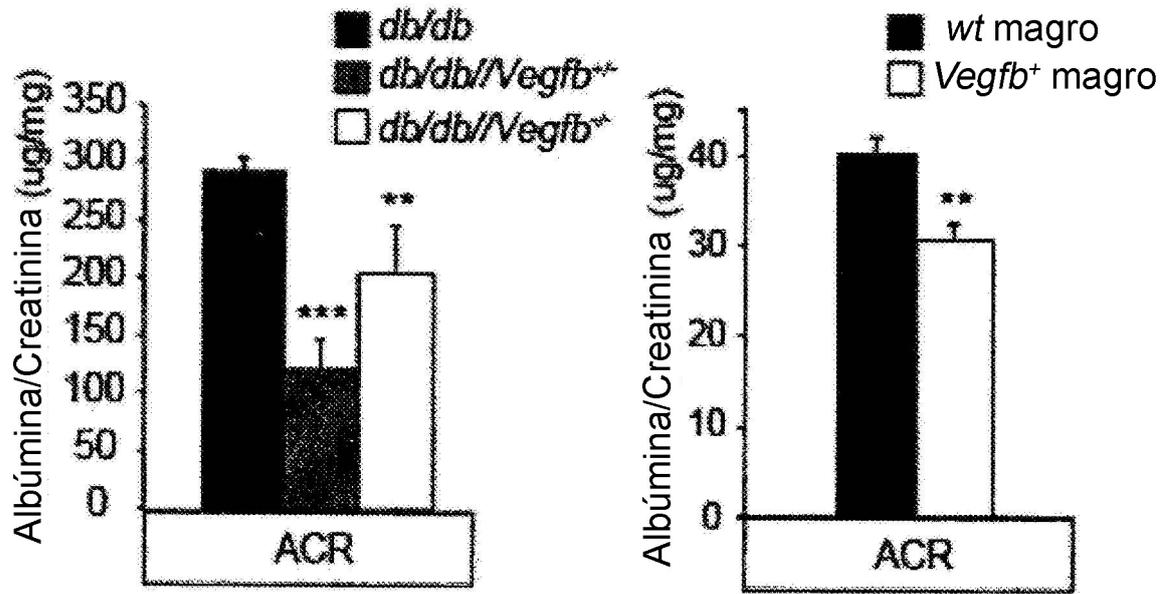


FIGURA 1A

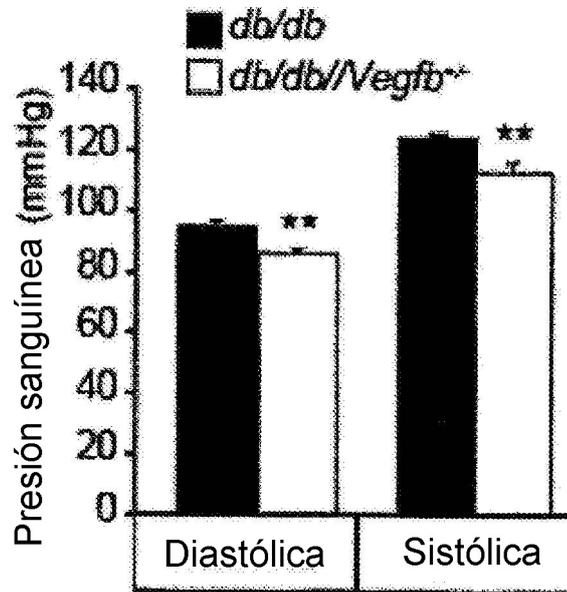


FIGURA 1B

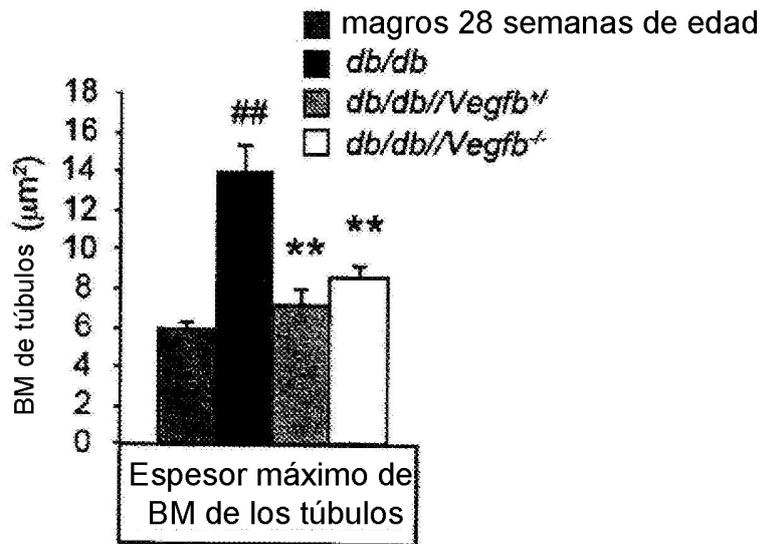


FIGURA 2A

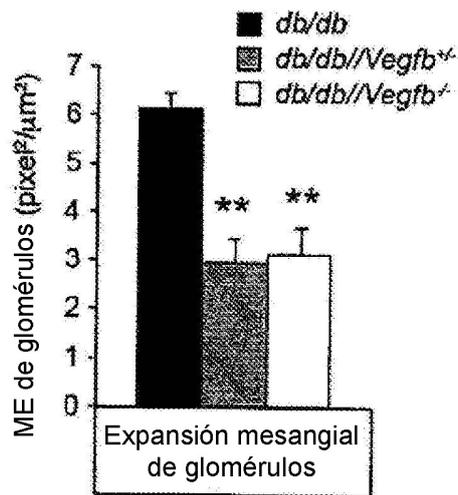


FIGURA 2B

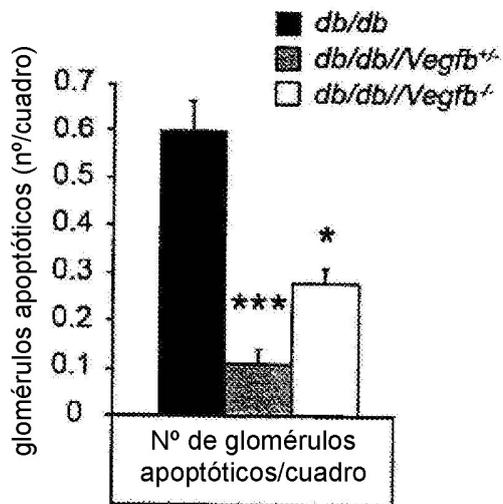


FIGURA 2C

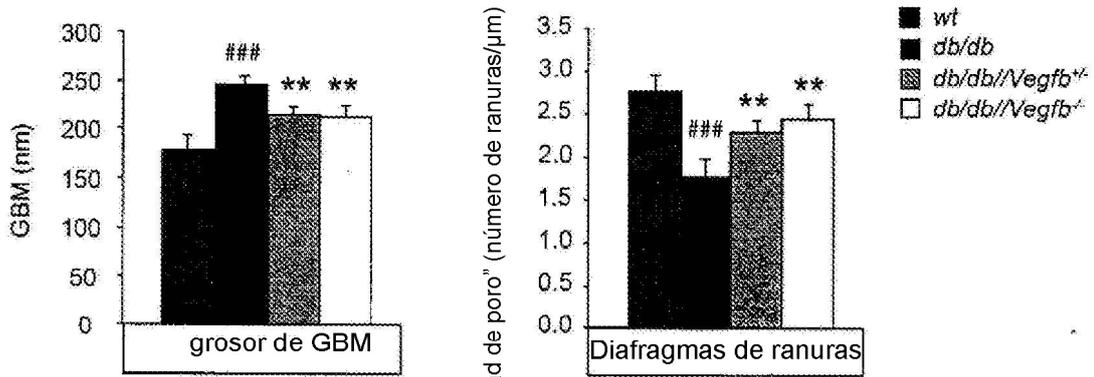


FIGURA 3A

FIGURA 3B

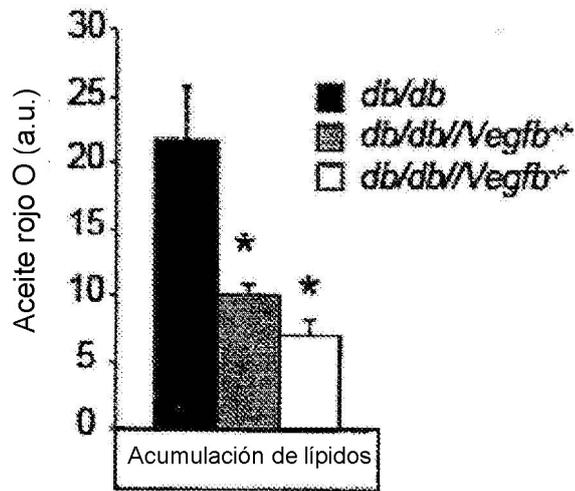


FIGURA 4A

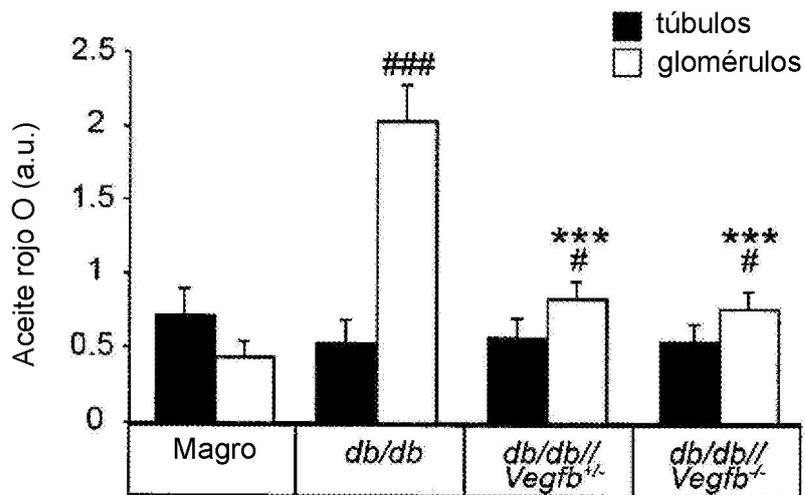


FIGURA 4B

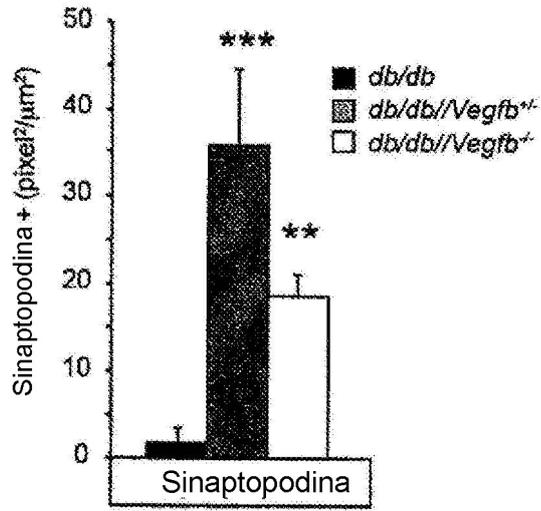


FIGURA 5A

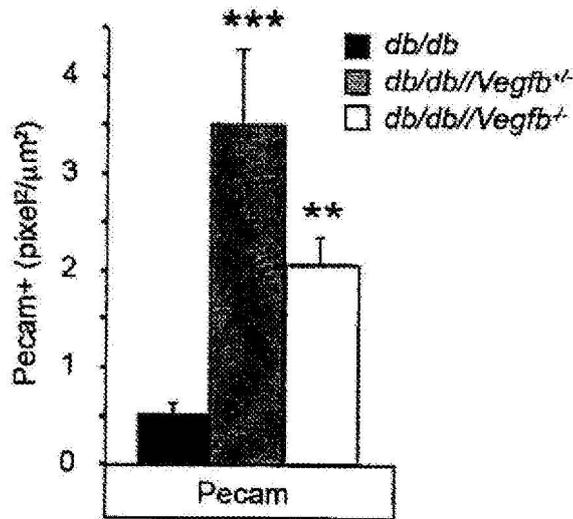


FIGURA 5B

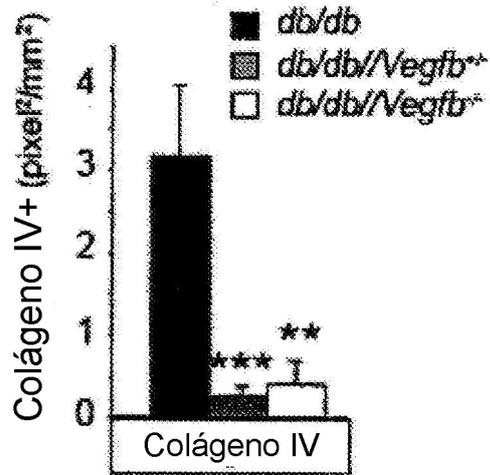


FIGURA 6A

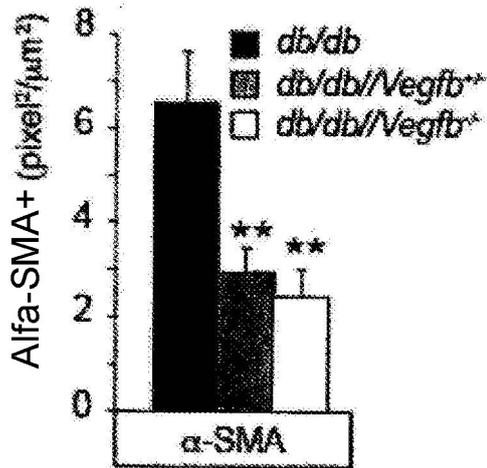


FIGURA 6B

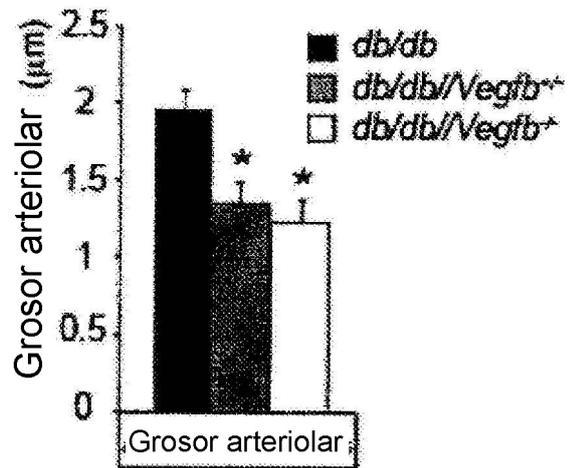


FIGURA 6C

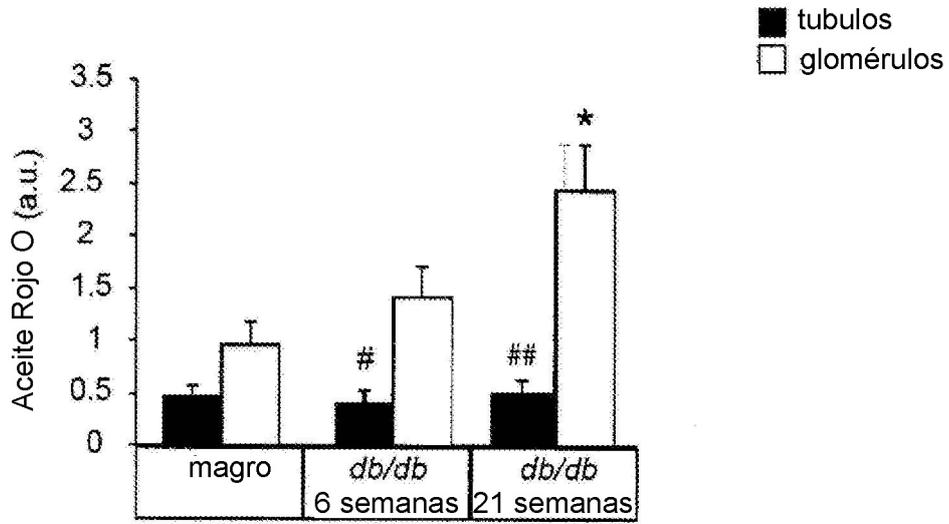


FIGURA 7

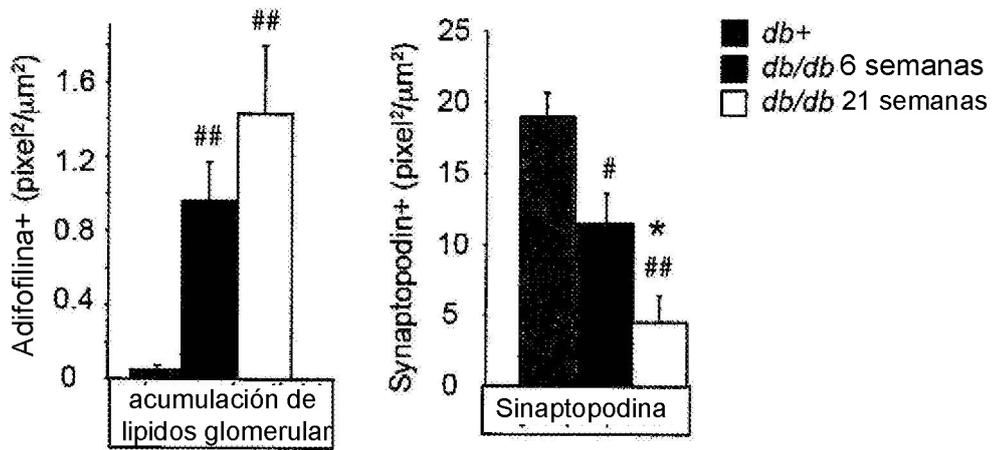


FIGURA 8

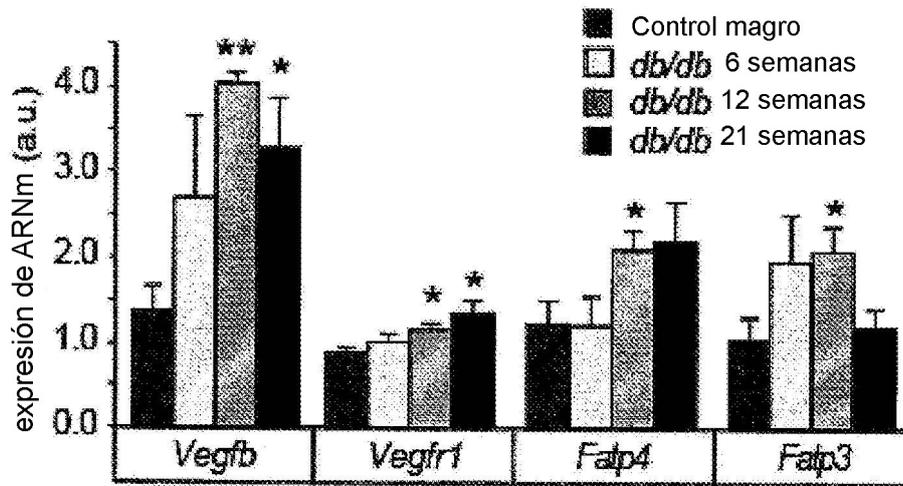


FIGURA 9

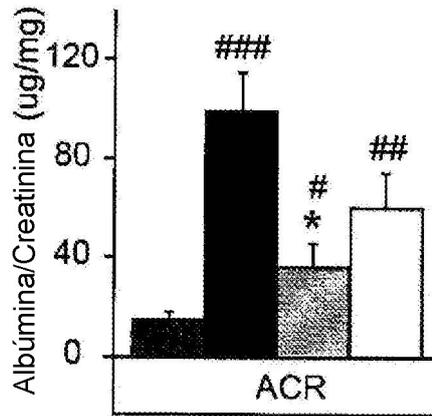


FIGURA 10A

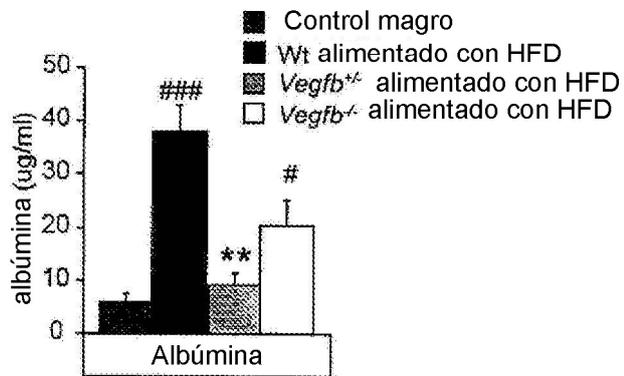


FIGURA 10B

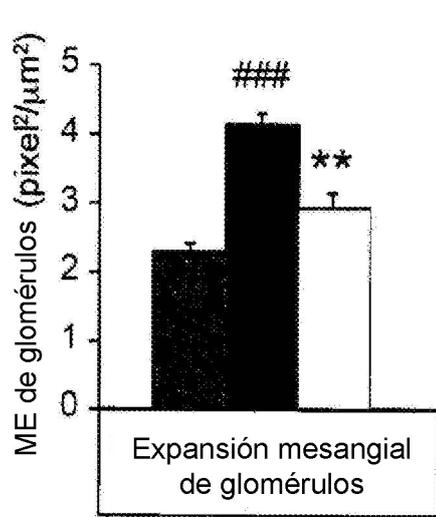


FIGURA 11A

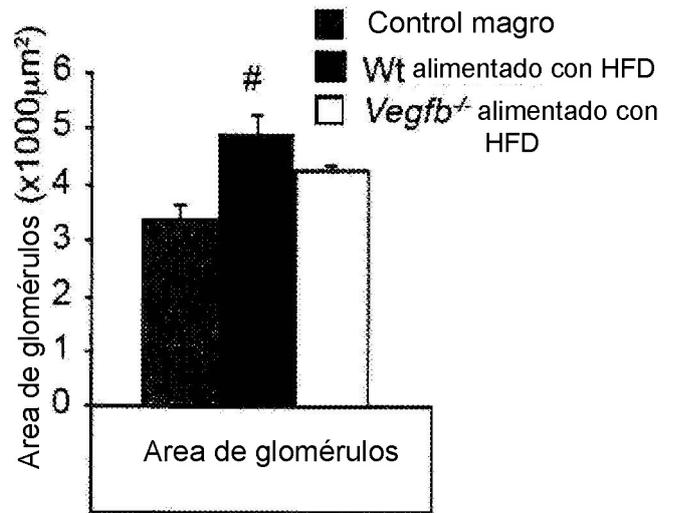


FIGURA 11B

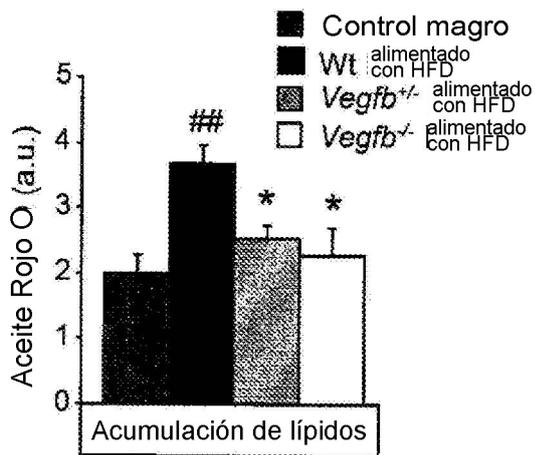


FIGURA 12

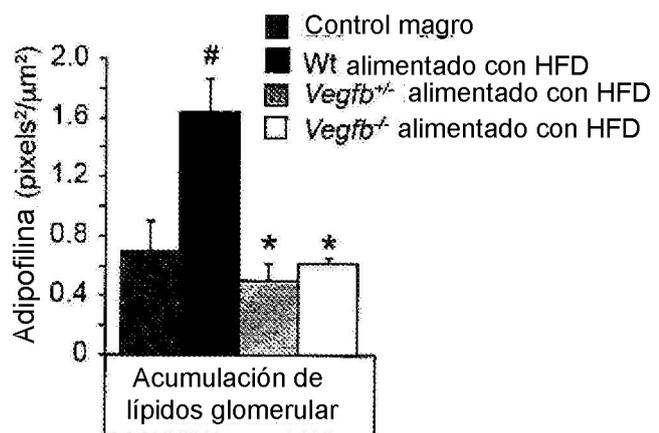


FIGURA 13

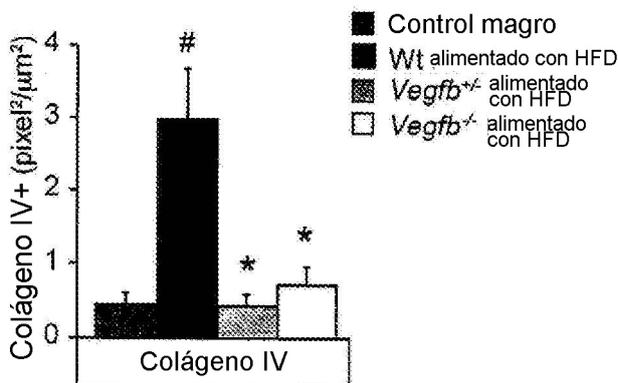


FIGURA 14A

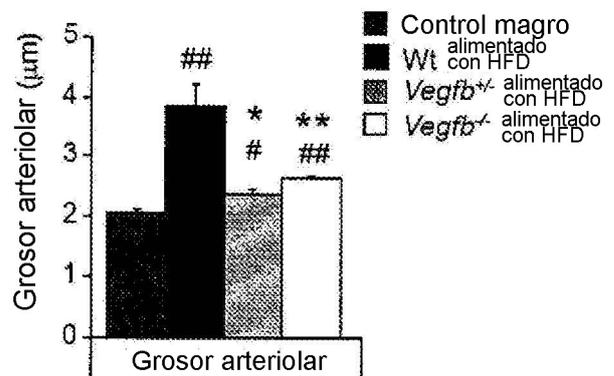


FIGURA 14B

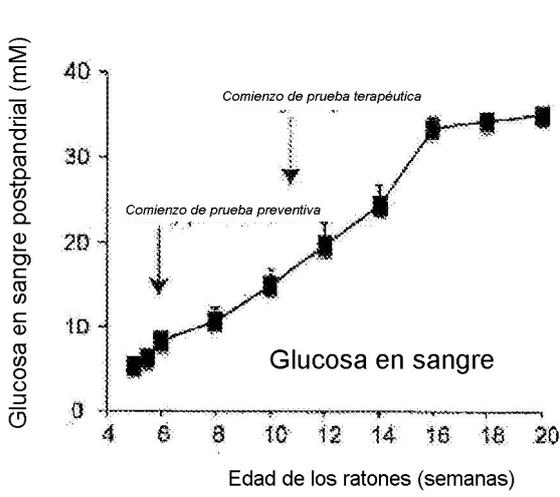


FIGURA 15A

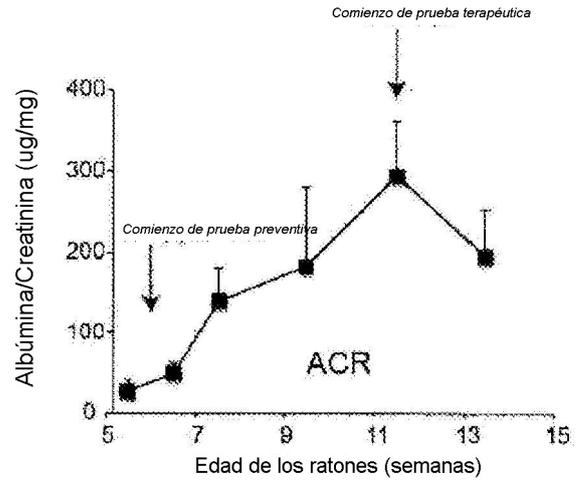


FIGURA 15B

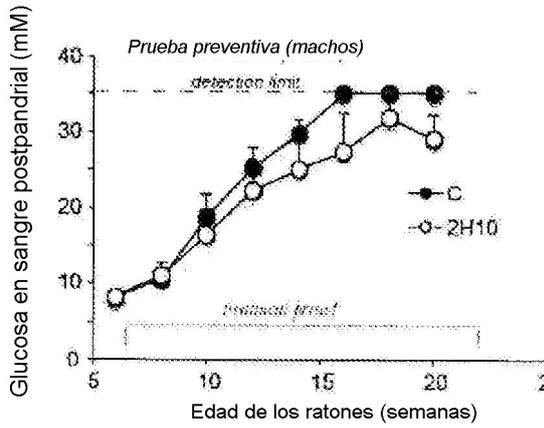


FIGURA 15C

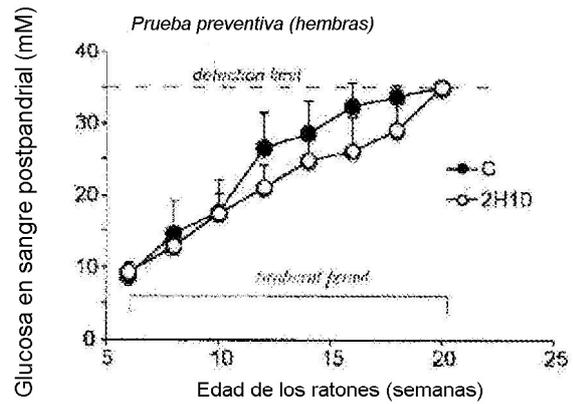


FIGURA 15D

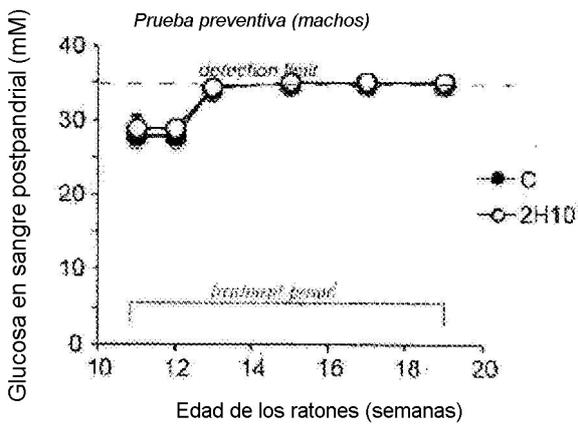


FIGURA 15E

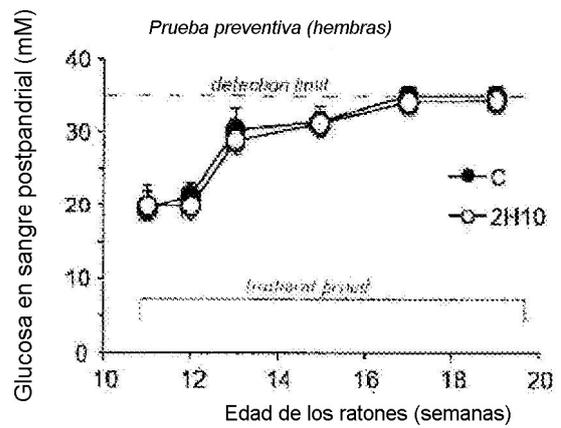


FIGURA 15F

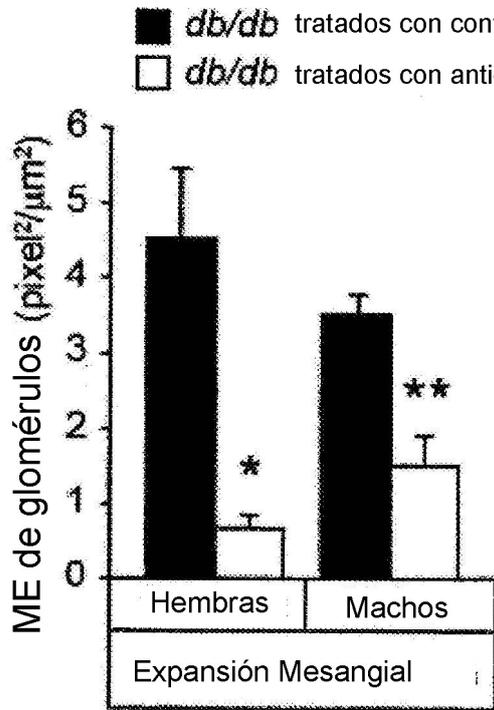


FIGURA 16A

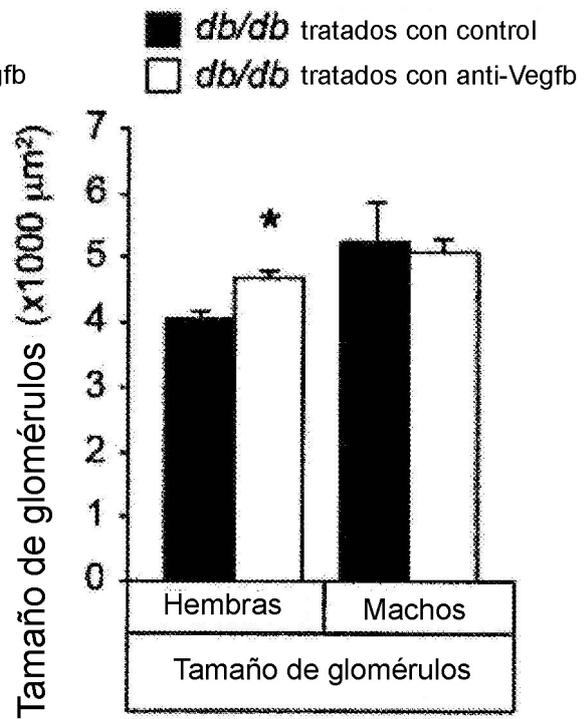


FIGURA 16B

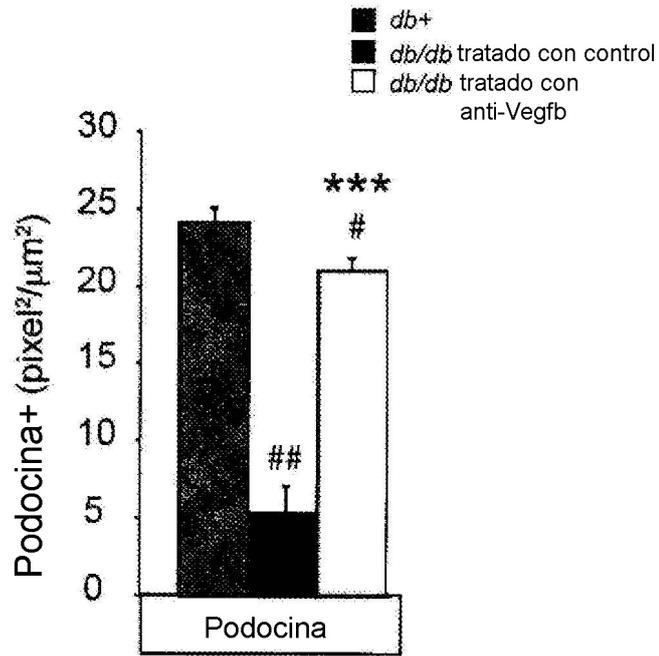


FIGURA 17A

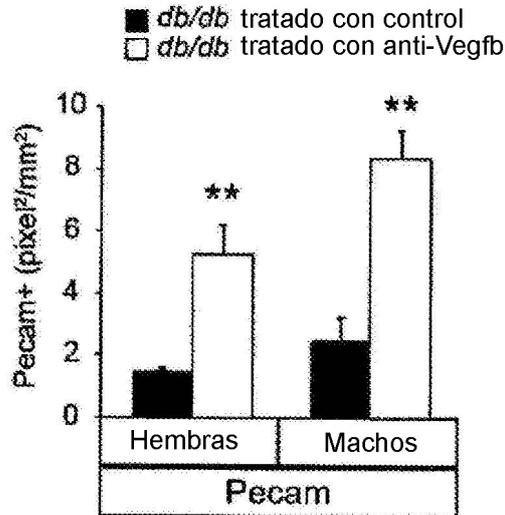


FIGURA 17B

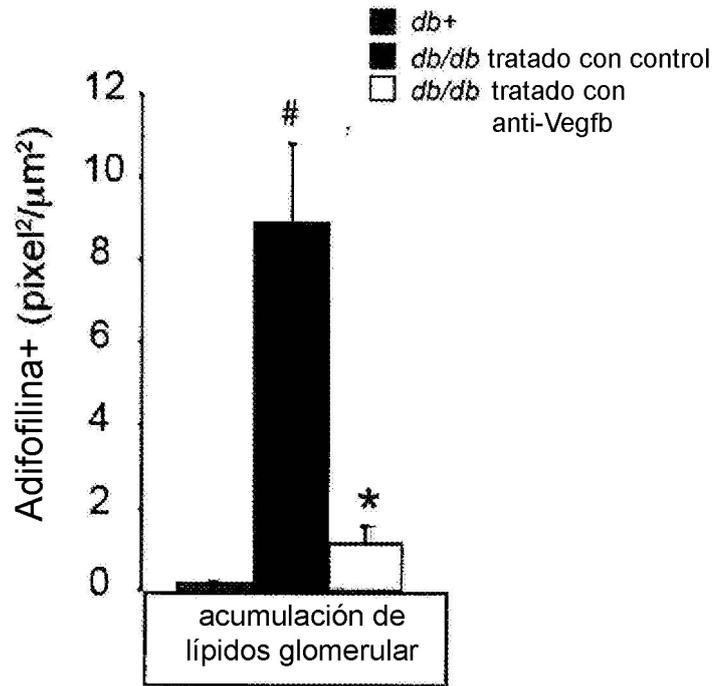


FIGURA 18A

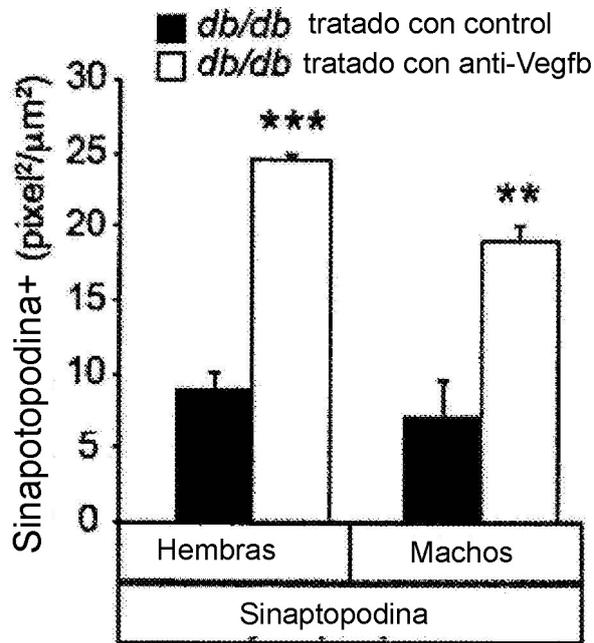


FIGURA 18B

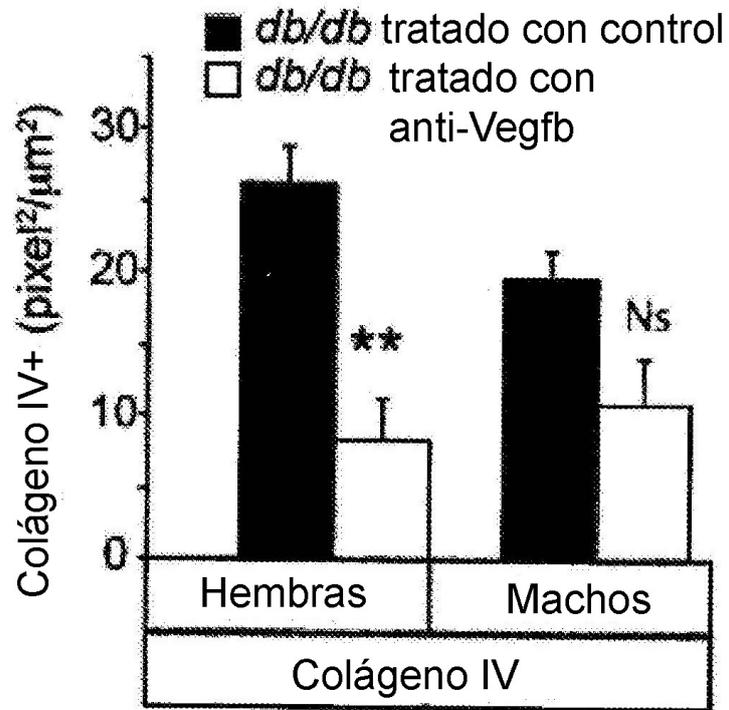


FIGURA 19

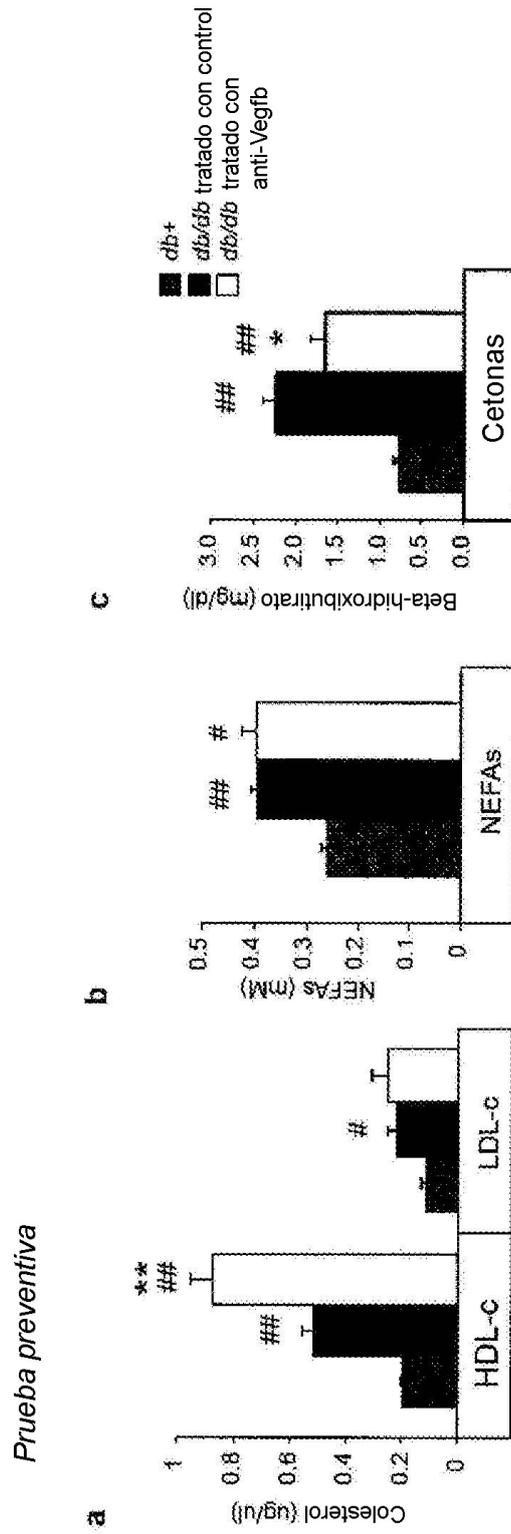


FIGURA 20

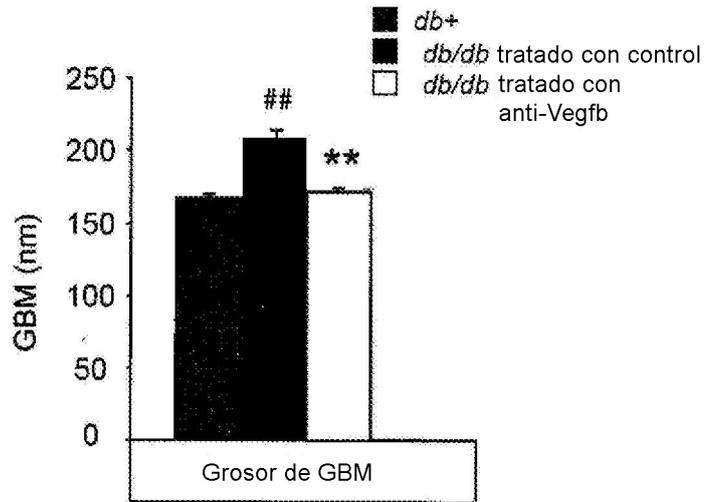


FIGURA 21A

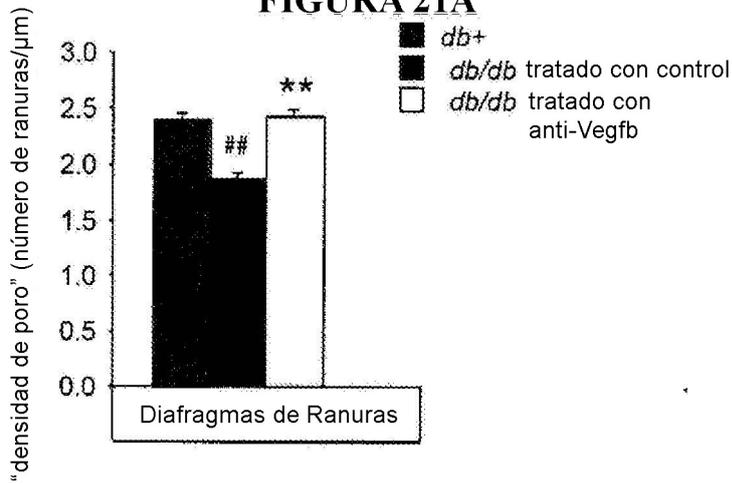


FIGURA 21B

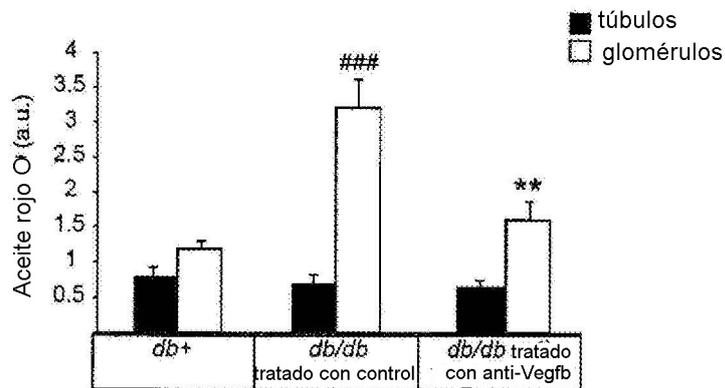


FIGURA 22

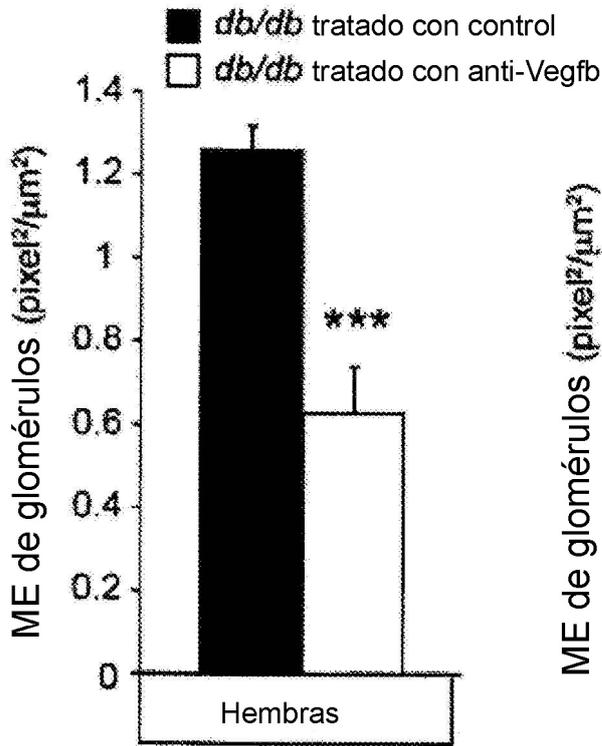


FIGURA 23A

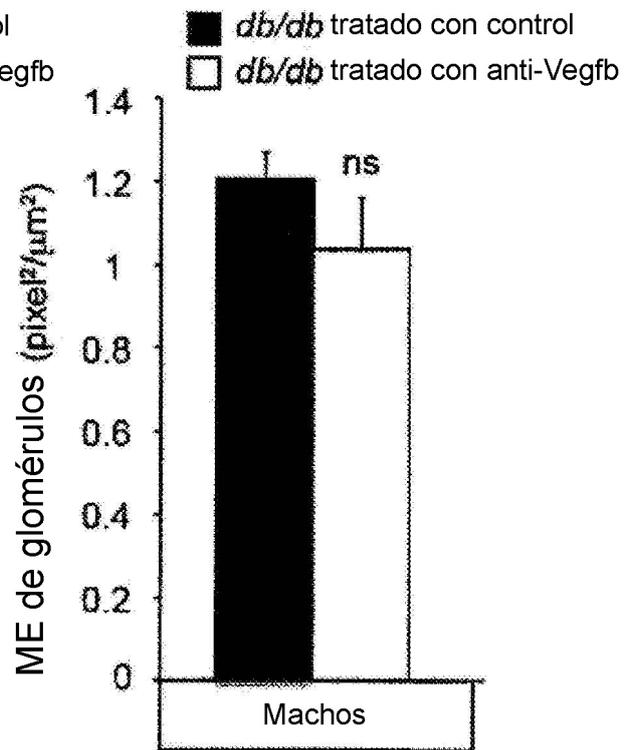


FIGURA 23B

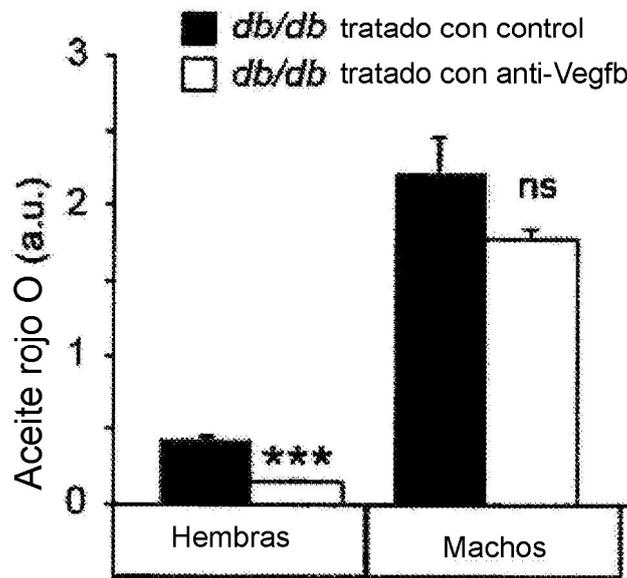


FIGURA 24

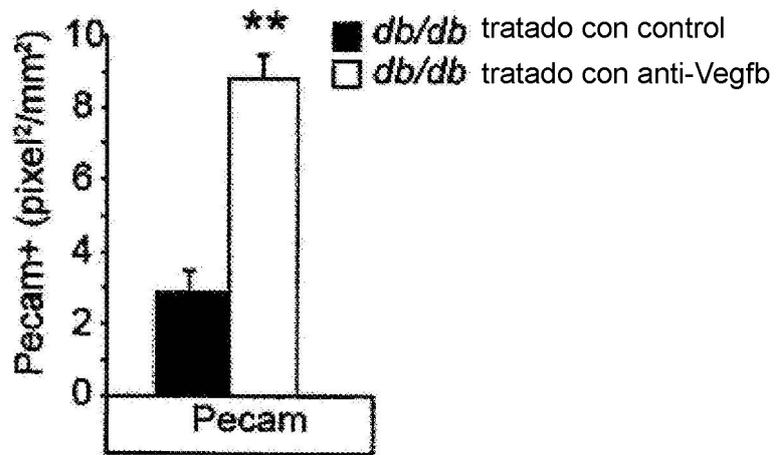


FIGURA 25A

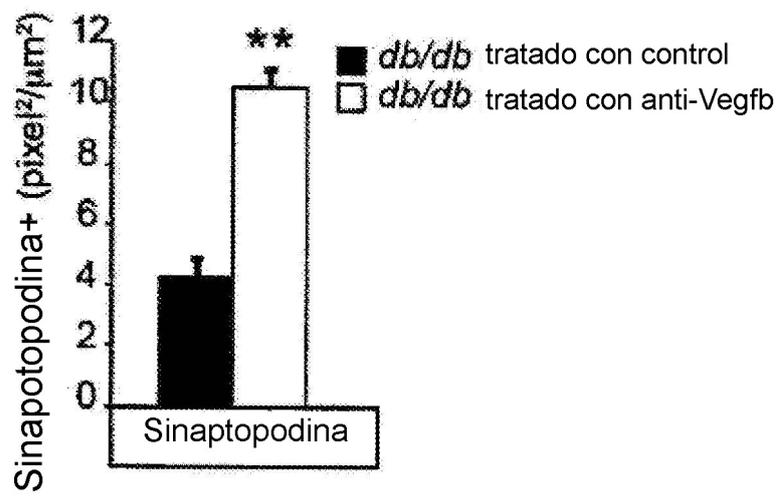


FIGURA 25B

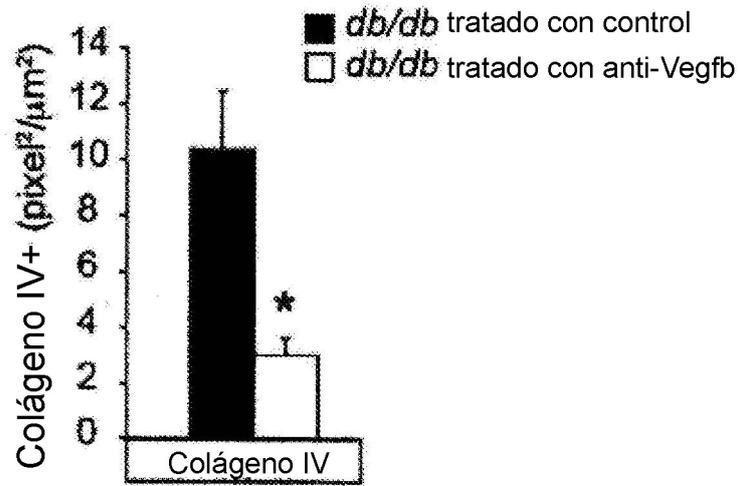


FIGURA 26A

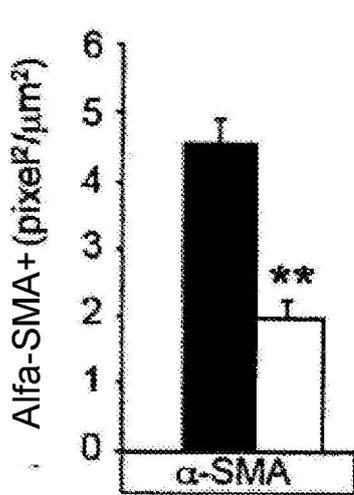


FIGURA 26B

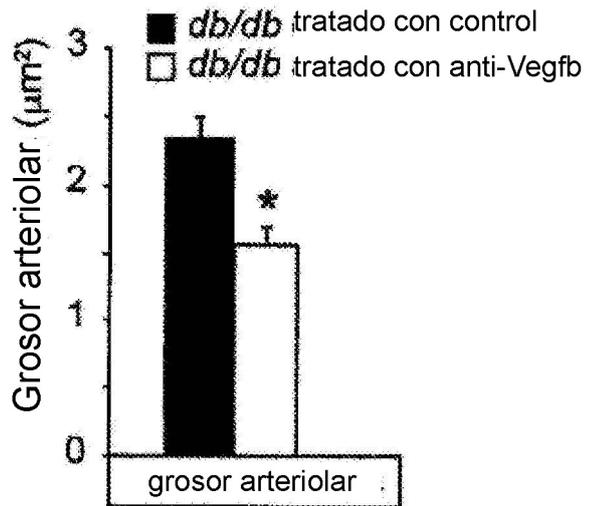


FIGURA 26C

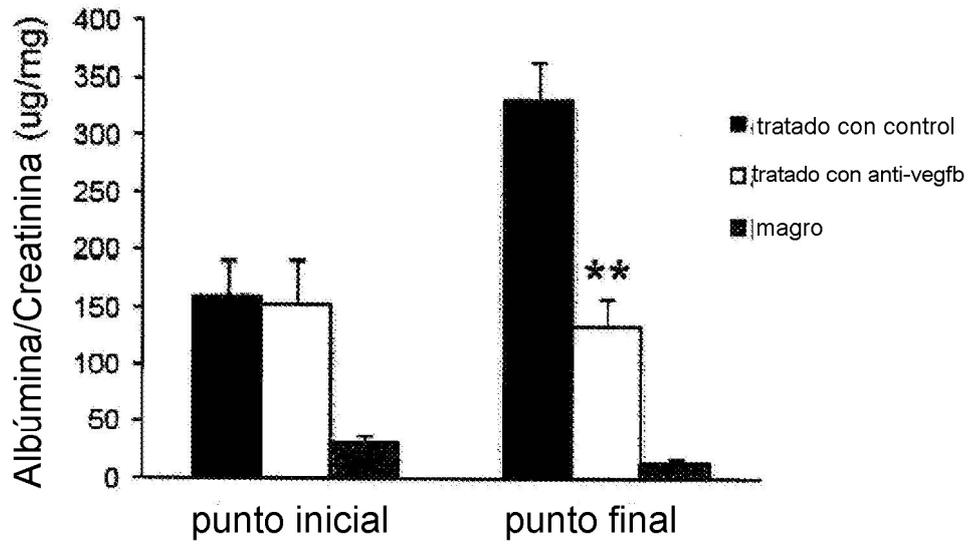


FIGURA 27A

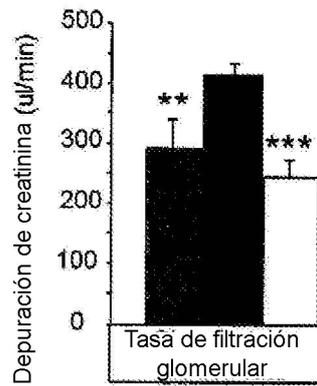


FIGURA 27B

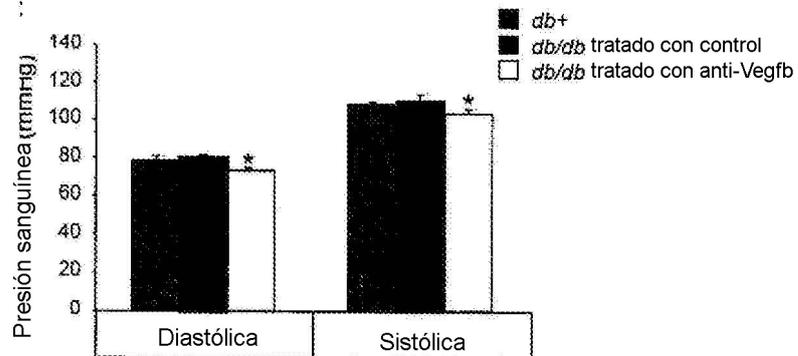


FIGURA 27C

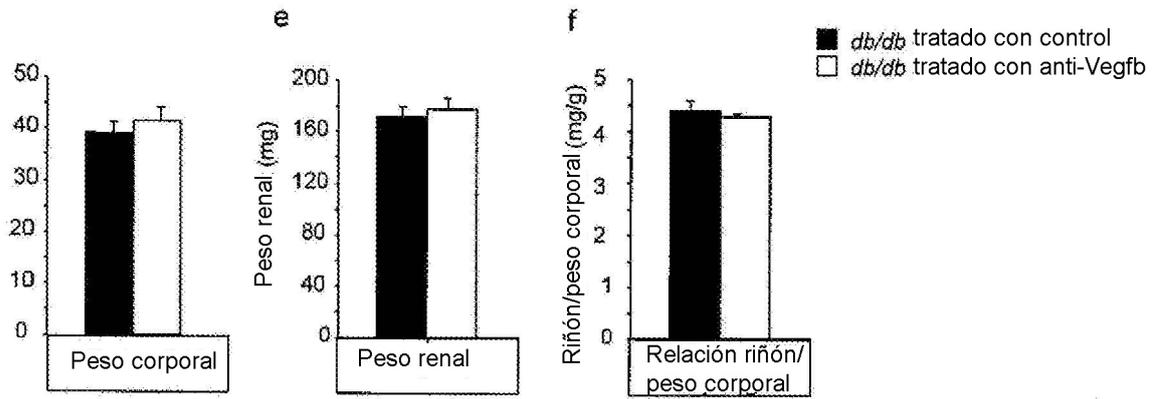


FIGURA 27D

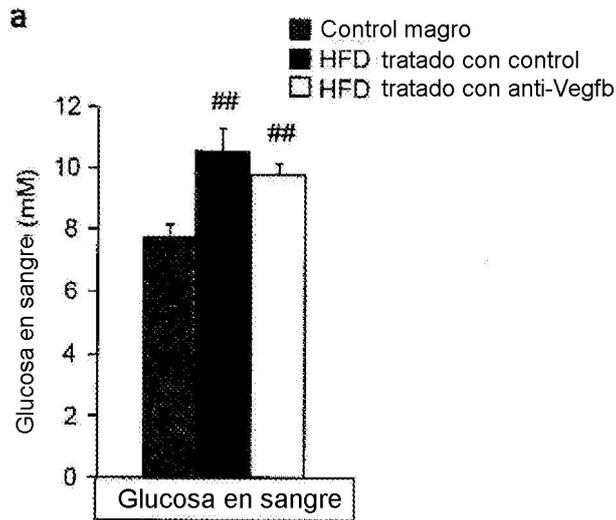


FIGURA 28

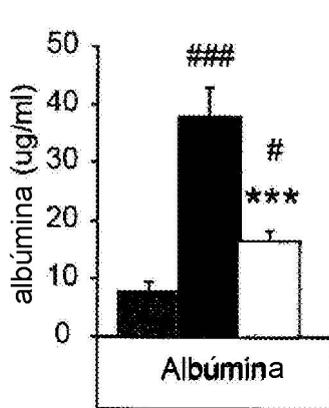


FIGURA 29A

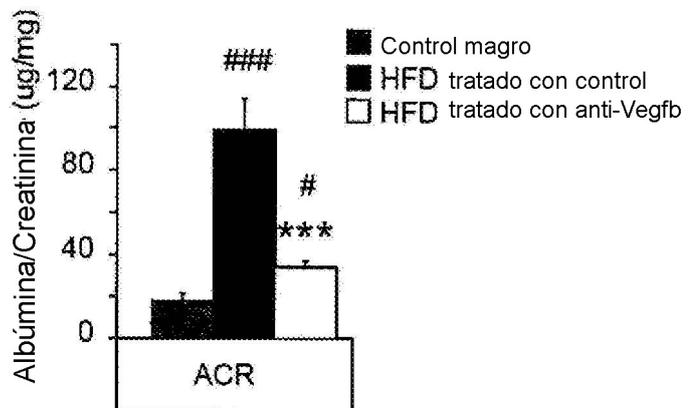
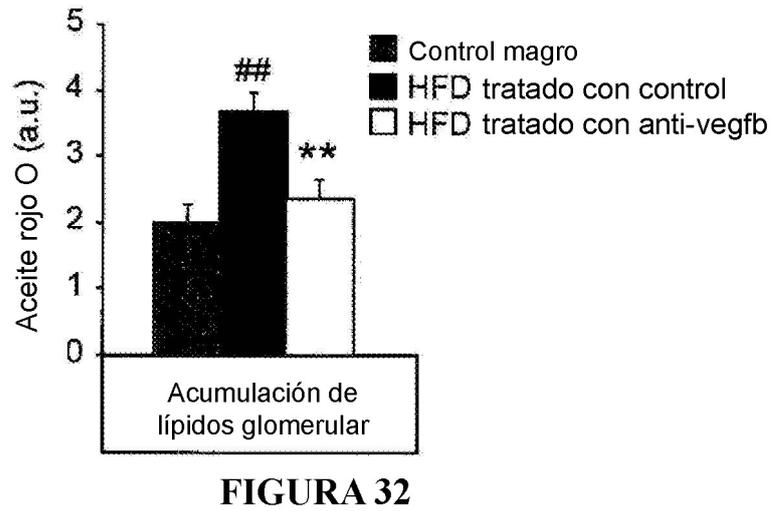
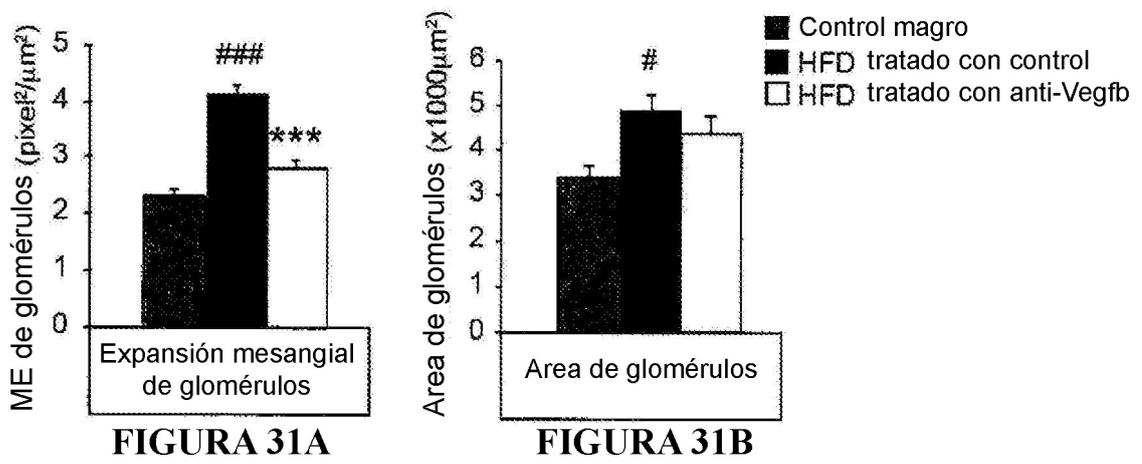
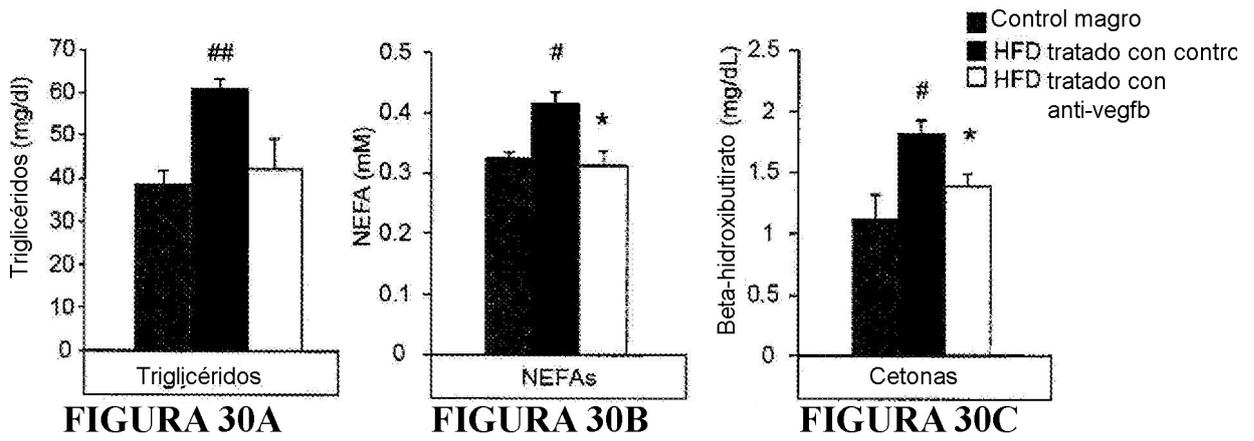


FIGURA 29B



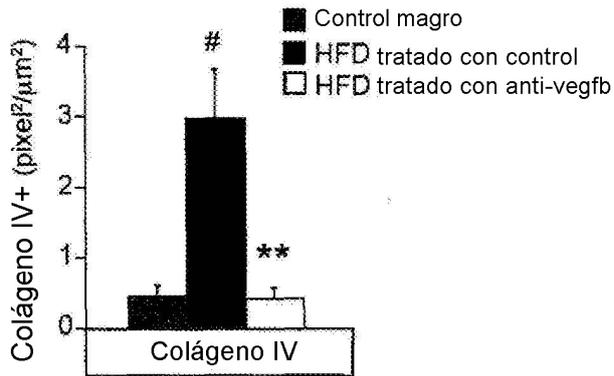


FIGURA 33A

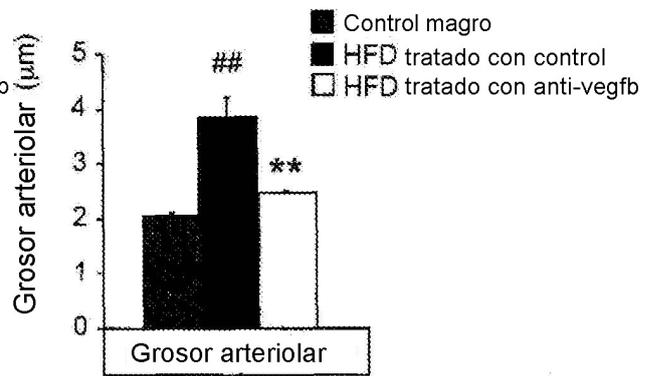


FIGURA 33B

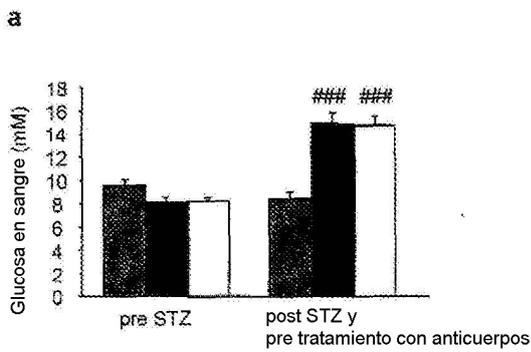


FIGURA 34A

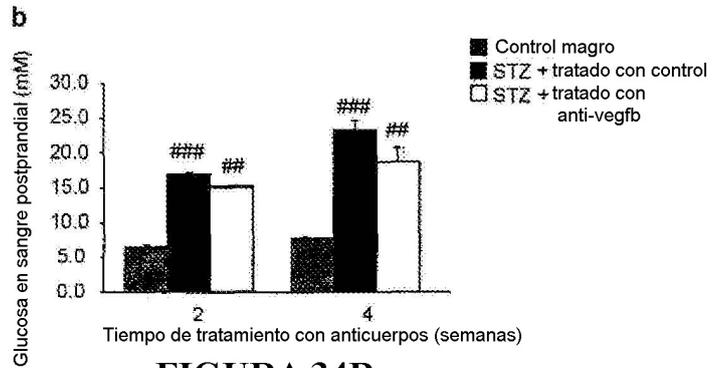


FIGURA 34B

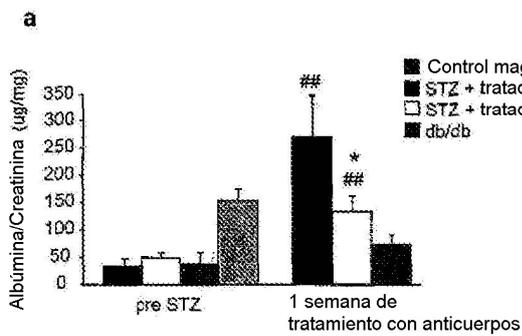


FIGURA 35A

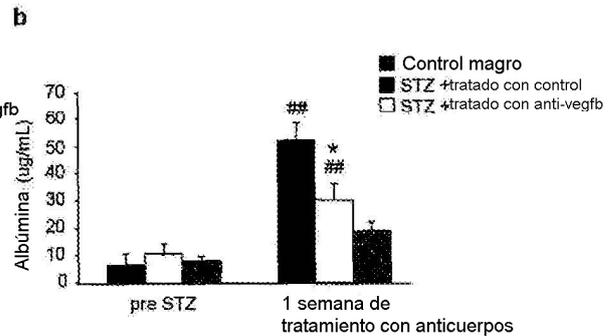


FIGURA 35B