

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 404**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/115 (2010.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2013 PCT/EP2013/065152**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14013005**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2013 E 13737614 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2875049**

54 Título: **Métodos para prevenir y tratar la enfermedad renal crónica (CKD)**

30 Prioridad:

18.07.2012 EP 12305869
03.08.2012 US 201261679211 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.05.2019

73 Titular/es:

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS (33.3%) y
INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION (33.3%)

72 Inventor/es:

CHATZIANTONIOU, CHRISTOS;
DUSSOLE, JEAN-CLAUDE y
CONWAY, SIMON J.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 713 404 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para prevenir y tratar la enfermedad renal crónica (CKD)

Campo de la invención:

5 La presente invención describe métodos para prevenir y tratar la enfermedad renal crónica (CKD, por sus siglas en inglés *Chronic Kidney Disease*).

Antecedentes de la invención:

10 La enfermedad renal crónica (CKD) puede deberse a diferentes causas, pero la vía final sigue siendo la fibrosis renal caracterizada por una inflamación crónica que conduce a una acumulación anómala de matriz extracelular (ECM). Este proceso fibrótico que conduce a una disminución en el número de nefronas en funcionamiento aún no está claro y constituye la clave de la progresión de la CKD. Así, nuevos conocimientos sobre los mecanismos patofisiológicos de la fibrogénesis renal nos guiarán a una terapia más eficaz. La cantidad de ECM es regulada por el equilibrio entre la síntesis y la degradación de las proteínas y es particularmente importante durante el desarrollo embrionario y los estados patológicos. Aunque los mecanismos de fibrogénesis han sido objeto de estudios en curso, la atención se ha centrado en las proteínas de la ECM, debido a su importancia no solo como componentes de la fibrosis, sino también como reguladores activos de la remodelación tisular por medio de la señalización células-matriz. A la vista de lo anterior, existe la necesidad en la técnica de identificar un factor que pueda ser responsable de la progresión de la fibrosis renal y por tanto de la progresión de la CKD, con el objetivo de considerar nuevas herramientas para el tratamiento de dicha enfermedad.

20 La periostina (POSTN) también denominada factor específico de osteoblastos 2 (OSF-2) es una proteína extracelular de 90 kDa expresada durante el desarrollo y en el tejido posnatal muy temprano; su expresión en tejidos adultos sanos es muy baja, pero aumenta considerablemente después de una lesión.

25 Se ha indicado previamente que la expresión de la periostina es aumentada significativamente tanto por el factor de crecimiento transformante beta-1 (TGFbeta1) como por la proteína morfogenética ósea (BMP-2). Muchos estudios en el corazón mostraron que la periostina es segregada por los fibroblastos y regula la deposición de colágeno, alterando con ello las propiedades mecánicas de los tejidos conjuntivos. Cuando se desactivo la periostina, los animales mostraron una fibrosis reducida después del infarto de miocardio. Esta proteína matricelular tiene también la capacidad de asociarse a otros componentes de la ECM, como tenascina, fibronectina, e interaccionar con integrinas tales como avb3 avbv, dando como resultado la activación de las vías de la quinasa Akt o PI3. Recientemente, la periostina se describió para una amplia gama de patologías (cánceres, asma...), pero se sabe poco sobre la periostina en el riñón y su potencial función en la progresión de la enfermedad renal crónica. Hasta la fecha, la periostina se describió en el riñón poliquístico autosómico dominante humano y se demostró que se expresaba *de novo* en las células epiteliales de los quistes (Wallace et al. 2008). Otro estudio describió los perfiles de expresión génica de diversas proteínas matricelulares en biopsias de pacientes con glomerulopatías y disfunción renal; mostró que la periostina era altamente inducida en los compartimentos tubulointersticiales y fibróticos y estaba correlacionada negativamente con la función renal. Recientemente, la periostina se identificó en la nefropatía hipertensiva inducida por L-NAME como un indicador de la progresión y regresión de la CKD (Guerrot et al. 2012). Se demostró en realidad que la expresión de periostina se correlaciona con los marcadores funcionales de la enfermedad renal (creatinina plasmática, proteinuria, flujo sanguíneo renal) y que su localización estaba asociada a las áreas fibróticas perivasculares, característica de la nefropatía hipertensiva experimental. Curiosamente, la periostina estaba sobre-expresada en la enfermedad renal humana y se encontraba en las regiones tubulointersticiales fibróticas lesionadas de la nefropatía crónica por aloinjerto. En resumen, estos resultados indican que la periostina es un buen marcador de la progresión y probablemente regresión de la fibrosis renal. Sin embargo, estos estudios no abordaron la cuestión de si la periostina participa o no en el desarrollo de la fibrosis renal y de la CKD.

Sumario de la invención:

45 La presente invención se refiere a un inhibidor de la expresión del gen de periostina o del mRNA de periostina para uso en el tratamiento de una CKD en un sujeto que lo necesite, en el que dicho inhibidor de la expresión del gen de periostina o del mRNA de periostina es un pequeño RNA inhibidor (siRNA) de la periostina, una ribozima de la periostina o un oligonucleótido antisentido anti-periostina.

El inhibidor para uso de acuerdo con la invención, en el que el sujeto que lo necesita padece nefropatía hipertensiva.

50 El inhibidor para uso de acuerdo con la invención, en el que el sujeto que lo necesita padece glomerulonefritis.

El inhibidor para uso de acuerdo con la invención, en el que el sujeto que lo necesita padece nefropatía diabética.

Descripción detallada de la invención:

Los inventores se centraron en la implicación de la periostina en el establecimiento de la fibrosis renal. Para este fin, investigaron su función y mecanismos en la nefropatía tubulointersticial experimental; por tanto, desarrollaron un

modelo de obstrucción ureteral unilateral (UUO) en ratones de tipo natural (WT, por sus siglas en inglés *Wild-Type*) y con la periostina eliminada (KO, por sus siglas en inglés *Knock-Out*) y mostraron que los ratones que carecen de periostina están protegidos contra el desarrollo de fibrosis renal y enfermedad renal.

5 A continuación, los inventores mostraron que la administración de un inhibidor del inhibidor del gen de periostina (es decir, un oligonucleótido antisentido) en un modelo de rata con nefropatía hipertensiva (ratas tratadas con L-NAME) es también útil para protegerlas contra el desarrollo de fibrosis renal y enfermedad renal. En resumen, estos datos proporcionan una evidencia inicial de que la periostina puede ser una diana prometedoras contra la progresión de la CKD.

10 Por consiguiente, en un primer objeto, la presente descripción detalla un agente que se une a la periostina seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos, aptámeros, moléculas orgánicas pequeñas y polipéptidos para uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad renal crónica (CKD) en un sujeto que lo necesite.

Como se usa en la presente memoria, el término “periostina” pretende abarcar todos los sinónimos que incluyen, aunque sin limitación, “factor específico de osteoblastos 2”, “OSF-2” o “POSTN”, incluyendo la periostina que existe de forma natural, así como sus variantes.

15 El término “proteína periostina” se refiere a la proteína periostina de 834 aminoácidos proporcionada en la base de datos GenPept con el número de acceso NP_006466.

Como se usa en la presente memoria, el término “prevención” se refiere a prevenir la aparición de la enfermedad o afección en un sujeto al que todavía no se le ha diagnosticado.

20 Como se usa en la presente memoria, el término “tratamiento” se refiere a inhibir la enfermedad o afección, es decir, detener su desarrollo; aliviar la enfermedad o afección, es decir, provocar la regresión de la afección; o aliviar las afecciones causadas por la enfermedad, es decir, los síntomas de la enfermedad.

25 Como se usa en la presente memoria, el término “enfermedad renal crónica” (CKD) se refiere a una pérdida progresiva de la función renal durante un período de meses o años. La CKD tiene su significado general en la técnica y se usa para clasificar numerosas afecciones que afectan al riñón, la destrucción del parénquima renal y la pérdida de nefronas o glomérulos funcionales. Además, se debe observar que la CKD puede deberse a diferentes causas, pero la vía final sigue siendo la fibrosis renal. Los ejemplos de etiología de la CKD incluyen, aunque sin limitación, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes, glomerulonefritis, enfermedades renales poliquísticas y rechazo de injerto renal.

30 Como se usa en la presente memoria, los términos “fibrosis renal” o “fibrogénesis renal” se refieren a un mecanismo patológico caracterizado por una inflamación crónica que conduce a una acumulación anómala de la matriz extracelular (ECM), por ejemplo, cambios cualitativos y cuantitativos de la composición de las membranas del basamento tubular (TBM), matriz intersticial, atrofia tubular y acumulación de miofibroblastos. Este proceso fibrótico que conduce a una disminución del número de nefronas en funcionamiento aún no está claro y constituye la clave de la progresión de la CKD.

35 Más precisamente, el consorcio *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) desarrolló y publicó por primera vez un sistema para la definición y clasificación de estadios de la CKD. Por tanto, la CKD se ha definido según los criterios enumerados de acuerdo con la Tabla 11 de la clasificación KDOQI CKD (sobre la base de la reducción de la tasa de filtración glomerular (GFR) en combinación con signos de lesión renal) como se reproduce en la Tabla 1 siguiente:

Tabla 1. Definición de criterios de la enfermedad renal crónica

40 1. Lesión renal durante ≥ 3 meses, definida por anomalías estructurales o funcionales del riñón, con o sin disminución de la GFR, que se manifiesta por:

- Anomalías patológicas; o

- Marcadores de la lesión renal, incluyendo anomalías en la composición de la sangre u orina, o anomalías en las pruebas de imagen

45 2. GFR < 60 mL/min/1,73 m² durante ≥ 3 meses, con o sin lesión renal

Los métodos para estimar la GFR se describen en la Guía 4.

Los marcadores de la lesión renal se describen en las Guías 5-6.

Un “sujeto” en el contexto de la presente invención es un ser humano (hombre o mujer). Típicamente, dicho sujeto ha sido diagnosticado previamente con una enfermedad que conduce a la CKD.

50 La descripción detalla que el paciente que lo necesita padece una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en nefropatía (por ejemplo, nefropatía membranosa (MN), nefropatía diabética y nefropatía hipertensiva),

glomerulonefritis (por ejemplo, glomerulonefritis membranosa y glomerulonefritis membranoproliferante (MPGN), tal como glomerulonefritis rápidamente progresiva (RPGN), nefritis intersticial, nefritis lúpica, síndrome nefrótico idiopático (INS) (por ejemplo, síndrome nefrótico por cambios mínimos (MCNS) y glomeruloesclerosis focal y segmentaria (FSGS)), uropatía obstructiva, enfermedad renal poliquística (por ejemplo, enfermedad renal poliquística autosómica dominante (ADPKD) y enfermedad renal poliquística autosómica recesiva (ARPKD), enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes y rechazo de injerto renal (por ejemplo, rechazo renal agudo y crónico).

La descripción detalla que el agente es un anticuerpo o una de sus porciones. La invención describe respecto a los anticuerpos o sus porciones descritos en la presente memoria, que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. La descripción detalla respecto a los anticuerpos o sus porciones descritos en la presente memoria, que el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. La descripción detalla respecto a los anticuerpos o sus porciones descritos en la presente memoria, que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. La descripción detalla respecto a los anticuerpos o sus porciones descritos en la presente memoria, que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. La descripción detalla respecto a los anticuerpos o sus porciones descritos en la presente memoria, que la porción del anticuerpo comprende una cadena ligera del anticuerpo. La descripción detalla respecto a los anticuerpos o sus porciones descritos en la presente memoria, que la porción del anticuerpo comprende una cadena pesada del anticuerpo. La descripción detalla respecto a los anticuerpos o sus porciones descritos en la presente memoria, que la porción del anticuerpo comprende una porción Fab del anticuerpo. La descripción detalla respecto a los anticuerpos o sus porciones descritos en la presente memoria, que la porción del anticuerpo comprende una porción F(ab')₂ del anticuerpo. La descripción detalla respecto a los anticuerpos o sus porciones descritos en la presente memoria, que la porción del anticuerpo comprende una porción Fc del anticuerpo. La descripción detalla respecto a los anticuerpos o sus porciones descritos en la presente memoria, que la porción del anticuerpo comprende una porción Fv del anticuerpo. La descripción detalla respecto a los anticuerpos o sus porciones descritos en la presente memoria, que la porción del anticuerpo comprende un dominio variable del anticuerpo. La descripción detalla respecto a los anticuerpos o sus porciones descritos en la presente memoria, que la porción del anticuerpo comprende uno o más dominios de CDR del anticuerpo.

Como se usa en la presente memoria, "anticuerpo" incluye tanto anticuerpos naturales como no naturales. Específicamente, "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales y monoclonales y sus fragmentos monovalentes y divalentes. Además, "anticuerpo" incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos totalmente sintéticos, anticuerpos de una sola cadena y sus fragmentos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o no humano. Un anticuerpo no humano puede ser humanizado por métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en el hombre.

Los anticuerpos se preparan de acuerdo con la metodología convencional. Los anticuerpos monoclonales se pueden generar utilizando el método de Kohler and Milstein (*Nature*, 256:495, 1975). Para preparar anticuerpos monoclonales útiles en la invención, se inmuniza un ratón u otro animal hospedante apropiado a intervalos adecuados (por ejemplo, dos veces por semana, semanalmente, dos veces al mes o mensualmente) con formas antigénicas de periostina. Al animal se le puede administrar un "refuerzo" final de antígeno antes de una semana del sacrificio. Con frecuencia es deseable usar durante la inmunización un adyuvante inmunológico. Los adyuvantes inmunológicos adecuados incluyen adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, alumbre, adyuvante de Ribí, Titermax de Hunter, adyuvantes de saponina, tales como QS21 o Quil A, u oligonucleótidos inmunoestimulantes que contienen CpG. Otros adyuvantes adecuados son bien conocidos en la técnica. Los animales pueden ser inmunizados por vías subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intranasal u otras. Un animal dado puede ser inmunizado con múltiples formas del antígeno por múltiples vías.

En resumen, la periostina recombinante se puede proporcionar por expresión con líneas celulares recombinantes. La forma recombinante de periostina se puede proporcionar utilizando cualquier método descrito previamente. Después del régimen de inmunización, los linfocitos se aíslan del bazo, ganglio linfático u otro órgano del animal y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada utilizando un agente, tal como polietilenglicol, para formar un hibridoma. Después de la fusión, las células se colocan en medios que permitan el crecimiento de hibridomas, pero no los socios de fusión, utilizando métodos estándares, como se ha descrito (*Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology*, 3rd edition, Academic Press, New York, 1996). Después del cultivo de los hibridomas, se analizan los líquidos sobrenadantes celulares para determinar la presencia de anticuerpos de la especificidad deseada, es decir, que se unan selectivamente al antígeno. Las técnicas analíticas adecuadas incluyen ELISA, citometría de flujo, inmunoprecipitación y transferencia de Western. Otros métodos de cribado son bien conocidos en la técnica. Las técnicas preferidas son las que confirman la unión de anticuerpos al antígeno plegado de forma natural y conformacionalmente intactos, tales como ELISA no desnaturalizante, citometría de flujo e inmunoprecipitación.

Significativamente, como es bien sabido en la técnica, solo una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el paratopo, está implicada en la unión del anticuerpo a su epítipo (véase, en general, Clark, W.R. (1986) *The Experimental Foundations of Modern Immunology* Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) *Essential Immunology*, 7th edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones Fc' y Fc, por ejemplo, son efectoras de la cascada del complemento, pero no están implicadas en la unión al antígeno. Un anticuerpo a partir del cual la región pFc' ha sido escindida enzimáticamente, o que ha sido producida sin la región pFc', denominado un fragmento F(ab')₂, retiene ambos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo intacto. De manera similar, un anticuerpo a partir del cual la región Fc ha sido escindida enzimáticamente, o que ha sido producida sin la región Fc,

denominada fragmento Fab, retiene uno de los sitios de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo intacto. Continuando, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera de anticuerpo unida covalentemente y una porción de la cadena pesada del anticuerpo denominada Fd. Los fragmentos Fd son el principal determinante de la especificidad del anticuerpo (un solo fragmento Fd se puede asociar con hasta diez cadenas ligeras diferentes sin alterar la especificidad del anticuerpo) y los fragmentos Fd retienen la capacidad de unión al epítipo de manera aislada.

Dentro de la porción de unión a antígeno de un anticuerpo, como es bien conocido en la técnica, existen regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que interaccionan directamente con el epítipo del antígeno, y regiones marco (FR), que mantienen la estructura terciaria del paratopo (véase, en general, Clark, 1986; Roitt, 1991). Tanto en el fragmento Fd de la cadena pesada como en la cadena ligera de las inmunoglobulinas IgG, hay cuatro regiones marco (FR1 a FR4) separadas respectivamente por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1 a CDR3). Las CDR, y en particular las regiones CDR3, y más particularmente las CDR3 de cadena pesada, son en gran parte responsables de la especificidad del anticuerpo.

Ahora está bien establecido en la técnica que las regiones no CDR de un anticuerpo de mamífero se pueden sustituir por regiones similares de anticuerpos coespecíficos o heteroespecíficos manteniendo mientras la especificidad epitópica del anticuerpo original. Esto se manifiesta más claramente en el desarrollo y uso de anticuerpos "humanizados" en los que las CDR no humanas se unen covalentemente a las regiones FR y/o Fc/pFc' humanas para producir un anticuerpo funcional.

Esta descripción detalla composiciones y métodos que incluyen formas humanizadas de anticuerpos. Como se usa en la presente memoria, "humanizados" describe anticuerpos en los que alguno, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de las regiones CDR están sustituidos por aminoácidos correspondientes procedentes de moléculas de inmunoglobulina humana. Los métodos de humanización incluyen, aunque sin limitación, los descritos en las patentes de EE.UU. n.ºs 4.816.567, 5.225.539, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 5.859.205, que se incorporan aquí como referencia. Las patentes de EE.UU. n.ºs 5.585.089 y 5.693.761 anteriores y el documento WO 90/07861 proponen también cuatro criterios posibles que se pueden usar en el diseño de los anticuerpos humanizados. La primera propuesta fue que, para un aceptor, se use un marco de una inmunoglobulina humana particular que sea inusualmente homóloga a la inmunoglobulina del donante que se ha de humanizar, o se use un marco de consenso de muchos anticuerpos humanos. La segunda propuesta fue que, si un aminoácido en el marco de la inmunoglobulina humana es inusual y el aminoácido donante en dicha posición es típico de las secuencias humanas, entonces se puede seleccionar el aminoácido donante en lugar del aceptor. La tercera propuesta fue que en las posiciones inmediatamente adyacentes a las 3 CDR en la cadena de inmunoglobulina humanizada, se puede seleccionar el aminoácido donante en lugar del aminoácido aceptor. La cuarta propuesta fue utilizar el aminoácido donante que reside en las posiciones marco en las que se predice que el aminoácido tendrá un átomo de cadena lateral dentro de 3Å de las CDR en un modelo tridimensional del anticuerpo y se predice que puede ser capaz de interaccionar con las CDR. Los métodos anteriores son simplemente ilustrativos de algunos de los métodos que un experto en la técnica podría emplear para preparar anticuerpos humanizados. Un experto en la técnica estará familiarizado con otros métodos para la humanización de anticuerpos.

La descripción detalla que, en las formas humanizadas de los anticuerpos, alguno, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de las regiones CDR han sido sustituidos por aminoácidos de moléculas de inmunoglobulina humana pero donde alguno, la mayoría o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR están inalterados. Son aceptables pequeñas adiciones, deleciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos, siempre que no anulen la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno dado. Las moléculas de inmunoglobulina humana adecuadas incluirían moléculas de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgM. Un anticuerpo "humanizado" retiene una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original. Sin embargo, usando ciertos métodos de humanización, la afinidad y/o especificidad de unión del anticuerpo se puede aumentar usando métodos de "evolución dirigida", como ha sido descrito por Wu et al., *J. Mol. Biol.* 294:151, 1999, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia.

Los anticuerpos monoclonales completamente humanos se pueden preparar también inmunizando ratones transgénicos para grandes porciones de locus de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas humanas. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.ºs 5.591.669, 5.598.369, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584, y las referencias citadas en ellas, cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria como referencia. Estos animales han sido modificados genéticamente de tal manera que haya una delección funcional en la producción de anticuerpos endógenos (por ejemplo, múridos). Los animales se modifican adicionalmente para que contengan toda o una porción del locus del gen de la inmunoglobulina de la línea germinal humana, de modo que la inmunización de estos animales dará como resultado la producción de anticuerpos completamente humanos frente al antígeno de interés. Después de la inmunización de estos ratones (por ejemplo, XenoMouse (Abgenix), ratones HuMAb (Medarex/GenPharm)), se pueden preparar anticuerpos monoclonales de acuerdo con la tecnología del hibridoma estándar. Estos anticuerpos monoclonales tendrán secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina humana y por tanto no provocarán respuestas de anticuerpos anti-ratón humanos (KAMA) cuando se administren a seres humanos.

Existen también métodos *in vitro* para producir anticuerpos humanos. Estos incluyen la tecnología de presentación de fagos (Patentes de EE.UU. n.ºs 5.565.332 y 5.573.905) y la estimulación *in vitro* de linfocitos B humanos (Patentes de EE.UU. n.ºs 5.229.275 y 5.567.610). Los contenidos de estas patentes se incorporan en la presente

memoria como referencia.

Por tanto, como será evidente para un experto en la técnica, la presente descripción también proporciona los fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd; anticuerpos quiméricos en los que las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera han sido sustituidas por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos quiméricos del fragmento F(ab')₂ en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera han sido sustituidos por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos quiméricos del fragmento Fab en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera han sido sustituidos por secuencias homólogas humanas o no humanas; y anticuerpos quiméricos del fragmento Fd en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 han sido sustituidos por secuencias homólogas humanas o no humanas. La presente invención incluye también los denominados anticuerpos de una sola cadena.

Las diversas moléculas y fragmentos de anticuerpos pueden proceder de cualquiera de las clases de inmunoglobulinas comúnmente conocidas, incluyendo, aunque sin limitación, IgA, IgA secretora, IgE, IgG e IgM. También son muy conocidas por los expertos en la técnica las subclases de IgG e incluyen, aunque sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

En la descripción se detalla que el anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo de un solo dominio. El término "anticuerpo de un solo dominio" (sdAb) o "VHH" se refiere al único dominio variable de cadena pesada de anticuerpos del tipo que se pueden encontrar en mamíferos camélidos que están desprovistos de forma natural de cadenas ligeras. Dichos VHH se denominan también "nanobody®". De acuerdo con la descripción, sdAb puede ser particularmente sdAb de llama.

A continuación, para esta descripción, una vez que se han obtenido los anticuerpos que se unen a la periostina, se seleccionan los anticuerpos neutralizantes de la periostina. Por consiguiente, la descripción detalla que el anticuerpo que se une a la periostina es un anticuerpo anti-periostina neutralizante (es decir, un anticuerpo que bloquea la actividad de la periostina conduciendo a la prevención de la fibrosis renal y a la acumulación excesiva de matriz extracelular (ECM) en el riñón).

Un ejemplo de anticuerpo neutralizante (MZ-1) ha sido descrito por Zhu et al., 2011, que se incorpora en la presente memoria como referencia.

Los métodos para obtener anticuerpos anti-periostina neutralizantes son muy conocidos por los expertos en la técnica, como los descritos en la solicitud de patente EP1978034.

La descripción detalla que el agente es un aptámero. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con capacidad para reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Dichos ligandos se pueden aislar por medio de enriquecimiento por *Systematic Evolution of Ligands by EXponential* (SELEX) de una colección de secuencias aleatorias, como ha sido descrito por Tuerk C. and Gold L., 1990. La colección de secuencias aleatorias se puede obtener por síntesis química combinatoria de DNA. En esta colección, cada miembro es un oligómero lineal, finalmente modificado químicamente, de una sola secuencia. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas han sido revisados por Jayasena S.D, 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo conformacionalmente restringida presentada por una proteína de plataforma, tal como la tiorredoxina A de *E. coli*, que se seleccionan de colecciones combinatorias por dos métodos híbridos (Colas et al., 1996).

A continuación, en esta descripción, se seleccionan los aptámeros neutralizantes de la periostina.

La descripción detalla que el agente es un polipéptido. En una realización particular, el polipéptido es un equivalente funcional de una proteína de la matriz extracelular o un receptor de adhesión que es capaz de unirse a la periostina. Como se usa en la presente memoria, "una proteína de la matriz extracelular" es una proteína seleccionada del grupo que consiste en fibronectina, tenascina-C, colágenos (por ejemplo, colágeno de tipo I y V). Como se usa en la presente memoria, "un receptor de adhesión" es un receptor seleccionado del grupo que consiste en integrinas (por ejemplo, $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ y $\alpha6\beta4$).

Como se usa en la presente memoria, un "equivalente funcional de una proteína de la matriz extracelular o un receptor de adhesión" es un compuesto que es capaz de unirse a la periostina. El término "equivalente funcional" incluye fragmentos, mutantes y muteínas de una proteína de la matriz extracelular o un receptor de adhesión. El término "funcionalmente equivalente" incluye por tanto cualquier equivalente de una proteína de la matriz extracelular o un receptor de adhesión obtenido alterando la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, por una o más deleciones, sustituciones o adiciones de aminoácidos de manera que el análogo de la proteína retenga la capacidad de unión a la periostina. Se pueden hacer sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, por mutación puntual del DNA que codifica la secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, el equivalente funcional es al menos 80% homólogo a la proteína correspondiente. En una realización preferida, el equivalente funcional es al menos 90% homólogo evaluado por cualquier algoritmo de análisis convencional, tal como, por ejemplo, el programa informático de análisis de secuencias Pileup (*Program Manual for the Wisconsin Package*, 1996). Se considera que dichas moléculas serán útiles para la prevención o el tratamiento de la CKD, puesto que estas moléculas se unirán específicamente a la

perioquina y por tanto evitarán la fibrosis renal inducida por la perioquina y finalmente evitarán o tratarán la CKD. Como se usa en la presente memoria, “uniéndose específicamente” significa que el análogo funcionalmente equivalente tiene una alta afinidad por la perioquina, pero no por las proteínas de control. La unión específica se puede medir por una serie de técnicas, tales como ELISA, citometría de flujo, transferencia de Western o inmunoprecipitación. Preferiblemente, el análogo funcionalmente equivalente se une específicamente a la perioquina a niveles nanomolares o picomolares.

Los polipéptidos de la descripción se pueden producir por cualquier medio adecuado, como será evidente para los expertos en la técnica. Con el fin de producir cantidades suficientes de una proteína de la matriz extracelular, de un receptor de adhesión o de sus equivalentes funcionales para uso de acuerdo con la presente descripción, la expresión se puede lograr convenientemente cultivando en condiciones apropiadas células hospedantes recombinantes que contengan el polipéptido de la invención. Preferiblemente, el polipéptido se produce por medios recombinantes, por expresión a partir de una molécula de ácido nucleico codificante. Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células hospedantes son bien conocidos.

Cuando se expresa en forma recombinante, el polipéptido se genera preferiblemente por expresión a partir de un ácido nucleico codificante en una célula hospedante. Se puede usar cualquier célula hospedante, dependiendo de los requisitos individuales de un sistema en particular. Las células hospedantes adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, células de plantas, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de cría de hámster y muchas otras. Las bacterias son también hospedantes preferidos para la producción de proteína recombinante, debido a la facilidad con la que las bacterias se pueden manipular y cultivar. Un hospedante bacteriano preferido es *E. coli*.

La descripción detalla que se considera que los polipéptidos usados en los métodos terapéuticos de la presente descripción pueden ser modificados con el fin de mejorar su eficacia terapéutica. Dicha modificación de los compuestos terapéuticos se puede usar para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo circulatorio o modificar la biodistribución. Por ejemplo, la toxicidad de compuestos terapéuticos potencialmente importantes se puede disminuir significativamente por combinación con una variedad de vehículos portadores de fármacos que modifican la biodistribución. Por ejemplo, la adición de dipéptidos puede mejorar la penetración de un agente circulante en el ojo a través de la barrera hemato-retiniana utilizando transportadores endógenos.

Una estrategia para mejorar la viabilidad del fármaco es la utilización de polímeros solubles en agua. Se ha demostrado que varios polímeros solubles en agua modifican la biodistribución, mejoran el modo de captación celular, cambian la permeabilidad a través de barreras fisiológicas; y modifican la velocidad de eliminación por el cuerpo. Para lograr un efecto de direccionamiento o de liberación prolongada, se han sintetizado polímeros solubles en agua que contienen restos de fármacos como grupos terminales, como parte de la cadena principal, o como grupos colgantes en la cadena del polímero.

El polietilenglicol (PEG) ha sido utilizado ampliamente como vehículo de fármacos, dado su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. Se ha demostrado que la unión a varios fármacos, proteínas y liposomas mejora el tiempo de permanencia y disminuye la toxicidad. El PEG se puede acoplar a agentes activos a través de los grupos hidroxilo en los extremos de la cadena y por medio de otros métodos químicos; sin embargo, el PEG propiamente dicho se limita como sumo a dos agentes activos por molécula. En un planteamiento diferente, se exploraron los copolímeros de PEG y aminoácidos como nuevos biomateriales que retendrían las propiedades de biocompatibilidad del PEG, pero que tendrían la ventaja añadida de numerosos puntos de unión por molécula (proporcionando una mayor carga de fármaco), y que podrían ser diseñados sintéticamente para adaptarse a una variedad de aplicaciones.

Los expertos en la técnica conocen los métodos de PEGilación para la modificación eficaz de fármacos. Por ejemplo, VectraMed (Plainsboro, N.J.) ha utilizado polímeros para suministro de fármacos que consisten en polímeros alternativos al PEG y monómeros trifuncionales, tal como la lisina. Las cadenas del PEG (típicamente 2000 daltones o menos) están unidas a los grupos α - y ϵ -aminos de la lisina por medio de enlaces de uretano estables. Dichos copolímeros retienen las propiedades deseables del PEG, proporcionando mientras grupos colgantes reactivos (los grupos de ácido carboxílico de la lisina) a intervalos estrictamente controlados y predeterminados a lo largo de la cadena del polímero. Los grupos colgantes reactivos se pueden utilizar para la derivatización, reticulación o conjugación con otras moléculas. Estos polímeros son útiles para producir profármacos estables de larga circulación variando el peso molecular del polímero, el peso molecular de los segmentos de PEG y el enlace escindible entre el fármaco y el polímero. El peso molecular de los segmentos del PEG afecta al espaciamiento del complejo fármaco/grupo de enlace y a la cantidad de fármaco por peso molecular del conjugado (los segmentos de PEG más pequeños proporcionan mayor carga de fármaco). En general, el aumento del peso molecular total del conjugado de copolímeros de bloque aumentará la semivida circulatoria del conjugado. Sin embargo, el conjugado debe ser fácilmente degradable o tener un peso molecular por debajo del de la filtración glomerular que limita el umbral (por ejemplo, menor que 60 kDa).

Además de que la cadena principal del polímero es importante para mantener la semivida circulatoria, y la biodistribución, se pueden usar enlazadores para mantener el agente terapéutico en una forma profármaco hasta

que sea liberado de la cadena principal del polímero por un desencadenador específico, típicamente la actividad enzimática en el tejido al que ha sido dirigido. Por ejemplo, este tipo de suministro de fármaco activado por tejido es particularmente útil cuando se requiere el suministro a un sitio específico de biodistribución y el agente terapéutico es liberado en el sitio de la patología o cerca de él. Las colecciones de grupos de enlace para uso en el suministro de fármacos activados son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden basar en la cinética de enzimas, la prevalencia de la enzima activa y la especificidad de escisión de las enzimas específicas de la enfermedad seleccionadas. Dichos enlazadores se pueden usar para modificar la proteína o el fragmento de proteína descrita en la presente memoria para la administración terapéutica.

La presente descripción detalla además un agente que se une a la periostina seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos, aptámeros, pequeñas moléculas orgánicas y polipéptidos para prevenir o reducir la fibrosis renal.

En otro objeto, la presente invención se refiere a un inhibidor de la expresión del gen de periostina o del mRNA de periostina para uso en el tratamiento de una CKD en un sujeto que lo necesite, en el que dicho inhibidor de la expresión del gen de periostina o del mRNA de periostina es un pequeño RNA inhibidor (siRNA), una ribozima de la periostina o un oligonucleótido antisentido anti-periostina.

El inhibidor para uso de acuerdo con la invención, en el que el sujeto que lo necesita padece nefropatía hipertensiva.

El inhibidor para uso de acuerdo con la invención, en el que el sujeto que lo necesita padece glomerulonefritis.

El inhibidor para uso de acuerdo con la invención, en el que el sujeto que lo necesita padece nefropatía diabética.

Un "inhibidor de expresión" se refiere a un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir la expresión de un gen. Por tanto, un "inhibidor de la expresión del gen de periostina" significa un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir la expresión del gen de periostina.

La invención describe que dicho inhibidor de la expresión del gen de periostina o del mRNA de periostina es un siRNA de periostina, un oligonucleótido antisentido anti-periostina o una ribozima de periostina.

Los inhibidores de la expresión del gen de periostina para uso en la presente invención se pueden basar en construcciones de oligonucleótidos antisentido. Los oligonucleótidos antisentido, incluyendo las moléculas de RNA antisentido y las moléculas de DNA antisentido, actuarán para bloquear directamente la traducción del mRNA de periostina uniéndose a él y evitando así la traducción de la proteína o aumentando la degradación del mRNA, disminuyendo por tanto el nivel de periostina, y por tanto la actividad, en una célula. Por ejemplo, se pueden sintetizar oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios a regiones únicas de la secuencia transcrita del mRNA que codifica la periostina, por ejemplo, por técnicas de fosfodiéster convencionales y ser administradas, por ejemplo, por inyección o infusión intravenosa. Los métodos para usar técnicas antisentido para inhibir específicamente la expresión génica de genes cuya secuencia es conocida son muy conocidos en la técnica (por ejemplo, véanse las patentes de EE. UU. n.ºs 6.566.135; 6.566.131; 6.365.354; 6.410.323; 6.107.091; 6.046.321 y 5.981.732).

Se debe observar además que los oligonucleótidos antisentido pueden ser modificados con fosforotioato para evitar su hidrólisis *in vivo* por nucleasas. Dichas modificaciones son muy conocidas por los expertos en la técnica.

La invención describe que la secuencia del oligonucleótido antisentido que se dirige a la periostina está representada por la SEQ ID NO: 1.

La invención describe que la secuencia del oligonucleótido antisentido que se dirige a la periostina está representada por la SEQ ID NO: 2.

Los RNA inhibidores pequeños (siRNA) también pueden actuar como inhibidores de la expresión del gen de periostina para su uso en la presente invención. La expresión del gen de periostina se puede reducir poniendo en contacto el tumor, el sujeto o la célula, con un RNA bicatenario pequeño (dsRNA) o un vector o construcción que provoque la producción de un RNA bicatenario pequeño, de manera que se inhiba específicamente la expresión del gen de periostina (es decir, RNA de interferencia o RNAi). Los métodos para seleccionar un dsRNA apropiado o un vector que codifica dsRNA son muy conocidos en la técnica para genes cuya secuencia se conoce (por ejemplo, véanse Tuschli, T. et al. (1999); Elbashir, S.M. et al. (2001); Hannon, GJ (2002); McManus, MT. et al. (2002); Brummelkamp, TR. et al. (2002); Patentes de EE.UU. n.ºs 6.573.099 y 6.506.559 y publicaciones de patentes internacionales n.ºs WO 01/36646, WO 99/32619 y WO 01/68836).

Las ribozimas también pueden actuar como inhibidores de la expresión del gen de periostina para su uso en la presente invención. Las ribozimas son moléculas de RNA enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica del RNA. El mecanismo de la acción de la ribozima implica la hibridación específica de una secuencia de la molécula de ribozima al RNA diana complementario, seguido por la escisión endonucleolítica. Las moléculas de ribozima con restos en horquilla o en cabeza de martillo modificadas genéticamente que catalizan específica y eficazmente la escisión endonucleolítica de las secuencias del mRNA de periostina son por tanto útiles dentro del alcance de la presente invención. Los sitios específicos de escisión de las ribozimas dentro de cualquier diana potencial de RNA

se identifican inicialmente explorando la molécula diana en busca de sitios de escisión por la ribozima, que incluyen normalmente las siguientes secuencias, GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, se pueden evaluar las secuencias cortas de RNA de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión para determinar las características estructurales predichas, tal como la estructura secundaria, que pueden hacer que la secuencia de oligonucleótidos sea inapropiada. La idoneidad de las dianas candidatas también se puede evaluar analizando su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios, utilizando, por ejemplo, ensayos de protección con ribonucleasas.

Tanto los oligonucleótidos antisentido como las ribozimas útiles como inhibidores de la expresión del gen de perióstina se pueden preparar por métodos conocidos. Estos incluyen técnicas para la síntesis química tal como, por ejemplo, por síntesis química con fosforamidita en fase sólida. Alternativamente, las moléculas de RNA antisentido pueden ser generadas por transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de DNA que codifican la molécula de RNA. Dichas secuencias de DNA se pueden incorporar en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de RNA polimerasa adecuados, tales como los promotores T7 o SP6 de la polimerasa. Se pueden introducir diversas modificaciones en los oligonucleótidos de la invención como medio para aumentar la estabilidad intracelular y la semivida. Las posibles modificaciones incluyen, aunque sin limitación, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de enlaces de fosfodiesterasa dentro de la cadena principal del oligonucleótido.

Los siRNA de oligonucleótidos antisentido y las ribozimas de la invención se pueden suministrar *in vivo* solos o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del siRNA del oligonucleótido antisentido o del ácido nucleico de la ribozima a las células y preferiblemente a las células que expresan la perióstina. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a las células con una degradación reducida con relación al grado de degradación que resultaría de la ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, aunque sin limitación, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que han sido manipulados por la inserción o incorporación de las secuencias de siRNA del oligonucleótido antisentido o del ácido nucleico de las ribozimas. Un tipo preferido de vector son los vectores virales e incluyen, aunque sin limitación, secuencias de ácidos nucleicos procedentes de los siguientes virus: retrovirus, tal como el virus de la leucemia de múridos de Moloney, el virus del sarcoma de múridos de Harvey, el virus del tumor mamario de múridos y el virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adeno-asociados; virus de tipo SV40; virus de polioma; virus de Epstein-Barr; virus de papiloma; herpesvirus; virus de la viruela vacuna; poliovirus; y virus de RNA, tal como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no nombrados pero conocidos en la técnica.

Los vectores virales preferidos se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que los genes no esenciales han sido sustituidos por el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (por ejemplo, lentivirus), cuyo ciclo vital implica la transcripción inversa del RNA viral genómico en DNA con la integración proviral subsiguiente en el DNA celular hospedante. Los retrovirus han sido aprobados para ensayos de terapia génica en seres humanos. Los más útiles son los retrovirus que tienen una replicación deficiente (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Dichos vectores de expresión retrovirales genéticamente alterados tienen una utilidad general para la transducción *in vivo* de alta eficacia de genes. Se proporcionan protocolos estándares para producir retrovirus con replicación deficiente (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una célula empaquetadora revestida con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la línea de células empaquetadoras, recogida de partículas virales de medios de cultivo de tejidos e infección de las células diana con partículas virales) en KRIEGLER ("A Laboratory Manual", W.H. Freeman C.O., New York, 1990) y en MURRY ("Methods in Molecular Biology", vol.7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J., 1991).

Los virus preferidos para ciertas aplicaciones son los adenovirus y los virus adeno-asociados, que son virus de DNA bicatenario que ya han sido aprobados para uso humano en terapia génica. El virus adeno-asociado puede estar modificado genéticamente para tener una replicación deficiente y ser capaz de infectar una amplia gama de tipos de células y especies. Además, tiene ventajas, tales como estabilidad al calor y en disolventes lipídicos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluyendo las células hemopoyéticas; y falta de inhibición de la superinfección permitiendo así múltiples series de transducciones. Según se informa, el virus adeno-asociado se puede integrar en el DNA celular humano de una manera específica del sitio, minimizando con ello la posibilidad de mutagénesis por inserción y la variabilidad de la expresión génica insertada característica de la infección retroviral. Además, las infecciones por virus adeno-asociados de tipo natural se han seguido en el cultivo de tejidos durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adeno-asociado es un episodio relativamente estable. El virus adeno-asociado también puede actuar de manera extracromosómica.

Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos han sido descritos ampliamente en la técnica y son muy conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, SANBROOK et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. En los últimos años, los vectores plasmídicos se han utilizado como vacunas de DNA para suministrar *in vivo* a las células genes que codifican antígenos. Son particularmente ventajosos para este fin debido a que no se tienen las mismas precauciones de seguridad que con muchos de los vectores virales. Estos plásmidos, sin embargo, que tienen un

promotor compatible con la célula hospedante, pueden expresar un péptido de un gen codificado operativamente dentro del plásmido. Algunos plásmidos usados comúnmente incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Otros plásmidos son muy conocidos por los expertos en la técnica. Además, los plásmidos pueden diseñarse a medida utilizando enzimas de restricción y reacciones de ligación para retirar y añadir fragmentos específicos de DNA. Los plásmidos pueden ser suministrados por una variedad de vías parenteral, mucosal y tópica. Por ejemplo, el DNA plasmídico se puede inyectar por vías intramuscular, intradérmica, subcutánea u otras vías. También se puede administrar por pulverizaciones o gotas intranasales, supositorio rectal y por vía oral. También se pueden administrar en la epidermis o en una superficie de la mucosa usando una pistola de genes. Los plásmidos se pueden administrar en una solución acuosa, secados sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de administración de DNA incluyendo, aunque sin limitación, liposomas, dendrímeros, coqueato y microencapsulación.

La presente invención describe además un inhibidor de la expresión del gen de periostina para prevenir o reducir la fibrosis renal.

Otro objeto de la descripción se refiere a un método para la prevención o el tratamiento de la CKD que comprende una etapa de administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente que se une a la periostina seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos, aptámeros, pequeñas moléculas orgánicas y polipéptidos o un inhibidor de la expresión del gen de periostina o del mRNA de periostina a un sujeto que lo necesite.

La descripción detalla un método para prevenir o reducir la fibrosis renal que comprende una etapa de administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente que se une a la periostina seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos, aptámeros, pequeñas moléculas orgánicas y polipéptidos o un inhibidor de la expresión del gen de periostina a un sujeto que lo necesite.

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" del agente o inhibidor de la expresión del gen de periostina, como se ha descrito anteriormente, se entiende una cantidad suficiente del agente o inhibidor para prevenir o tratar la CKD. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico responsable dentro del alcance de un buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares muy conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está dentro de la experiencia de la técnica iniciar dosis del compuesto a niveles menores que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado e ir aumentando gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variar en un amplio intervalo desde 0,01 hasta 1000 mg por adulto al día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al sujeto que se ha de tratar. Un medicamento contiene típicamente desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente desde 1 mg hasta aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Generalmente se suministra una cantidad eficaz del fármaco a un nivel de dosificación desde 0,0002 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg de peso al día, especialmente desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta 7 mg/kg de peso al día.

El agente que se une a la periostina o inhibidor de la expresión del gen de periostina de la descripción se puede combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación prolongada, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

Por tanto, la presente invención describe una composición farmacéutica para uso en la prevención o tratamiento de la CKD que comprende un agente o un inhibidor de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también describe una composición farmacéutica para prevenir o reducir la fibrosis renal que comprende un agente o un inhibidor de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inapropiada cuando se administran a un mamífero, especialmente a un ser humano, según proceda. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga sólida, semisólida o líquida no tóxica, un diluyente, un material encapsulante o un auxiliar de formulación de cualquier tipo.

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

formas de administración rectal.

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

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

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

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

El vehículo puede ser también un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), sus mezclas adecuadas y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser realizada por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenes, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr por el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

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

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

Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe ser tamponada adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido debe hacerse primero isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán muy conocidos por los expertos en la técnica gracias a la presente descripción. Por ejemplo, una dosis podría disolverse en 1 mL de solución isotónica de NaCl y añadirse hasta 1000 mL de fluido para hipodermoclasia o inyectarse en el sitio propuesto para la infusión. Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo del estado del sujeto que se está tratando. En cualquier caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis adecuada para el sujeto individual.

El agente que se une a la periostina o al inhibidor de la expresión del gen de periostina de la invención se puede formular dentro de una mezcla terapéutica que comprenda de aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o de aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o de aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis. También se pueden administrar dosis múltiples.

Además de los compuestos de la invención formulados para administración parenteral, tales como inyección

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

5 La invención será ilustrada adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ningún modo como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras:

Figura 1: La expresión de periostina es altamente inducida en la corteza renal de ratones después de la obstrucción ureteral unilateral (UUO). A. mRNA de periostina; B. Proteína periostina.

10 Figura 2: Los ratones que carecen de expresión de periostina están protegidos contra las alteraciones estructurales típicas inducidas por la UUO. A. Dilatación tubular; B. Fibrosis; C. Acumulación de colágeno fibrilar (tinción con rojo sirio) y D. Expresión de mRNA de colágeno III.

Figura 3: Los ratones que carecen de expresión de periostina presentan un mejor grado de conservación del parénquima renal después de la UUO. A. Conservación tubular (expresión de RNA de vimentina); B. Proliferación celular (inmunotinción con Ki 67); C. Apoptosis

15 Figura 4: Los ratones que carecen de expresión de periostina tienen una respuesta inflamatoria suave después de la UUO. A. Expresión de RNA de MCP-1; B. Expresión de RNA de IL-17; C. Expresión de RNA de Foxp3; D. Expresión de RNA de ROR δ T.

Figura 5: El suministro de ODN antisentido específico *in vivo* disminuye la expresión de periostina en los riñones de ratas hipertensas (modelo L-NAME).

20 Figura 6: La administración *in vivo* de ODN antisentido de periostina específico atenuó las alteraciones estructurales típicas observadas en la nefropatía hipertensiva en ratas. A. Dilatación tubular; B. Glomeruloesclerosis; C. Hipertrofia vascular; D. Fibrosis.

Figura 7: Administración de ODN antisentido de periostina específico a ratas hipertensas en las que la proteinuria superó en 2 gramos las tasas de mortalidad sustancialmente reducidas.

25 **Ejemplos:** Periostina, una proteína extracelular implicada en el desarrollo de la CKD

Ejemplo 1: Los ratones con la periostina desactivada (KO) están protegidos contra el desarrollo de la CKD en una nefropatía tubulointersticial experimental (modelo UUO).

Material y Métodos

30 **Animales:** Los experimentos se realizaron en ratones de tipo natural y periostina anulada (POSTN KO) donados amablemente por S.J. Conway (Indianapolis, Indiana). Estos ratones se caracterizan por la falta del gen de periostina y la sustitución del sitio de iniciación de la traducción y el primer exón por un gen informador lacZ (ref). Se usaron ratones hembras C57BL/6 WT y POSTN KO de 4 a 6 meses (n = 9). El modelo de nefropatía tubulointersticial fue inducido por la obstrucción ureteral unilateral (UUO). Después de una anestesia general (inyección intraperitoneal de pentobarbital 50 mg/kg), los ratones POSTN KO y sus homólogos WT se sometieron a una incisión en el flanco izquierdo. La UUO se realizó por ligación completa del uréter izquierdo a la unión ureteropélvica, utilizando dobles suturas de seda. Se utilizaron como controles los riñones contralaterales. Los ratones fueron sacrificados el día 15.

40 Los animales se mantuvieron con acceso libre a la comida estándar y al agua del grifo durante los protocolos. Se sacrificaron bajo anestesia general (pentobarbital 150 mg/kg). Se extrajeron los riñones y se dividieron en cuatro partes iguales (para RNA, proteínas, criocortes y cortes en parafina). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las Directrices de la Unión Europea para el cuidado y el uso de animales de laboratorio y fueron aprobados por el comité de ética local.

45 **Histología renal:** Los riñones se sumergieron 24 h en alcohol-formaldehído-ácido acético (AFA) y luego se incrustaron en cera de parafina antes del corte. Los tejidos se cortaron en secciones de 4 μ m y se tiñeron con tricromo de Masson. Los portaobjetos se examinaron independientemente a ciegas para determinar el nivel de dilatación tubular, la fibrosis perivascular (para ratones y ratas), la glomeruloesclerosis y la hipertrofia vascular (para ratas), utilizando una escala de lesiones de 0 a 4 como se ha descrito anteriormente. El valor medio se utilizó para comparar los grupos de animales.

50 **Rojo sirio:** La fibrosis intersticial se evaluó en cortes de parafina teñidos con rojo sirio de 4 μ m de espesor a 40 aumentos, bajo luz polarizada. Se seleccionaron aleatoriamente cinco campos corticales excluyendo las arterias interlobulares de cada riñón y se cuantificó el área teñida de rojo por área total, que refleja la fibrosis intersticial, utilizando un programa de análisis morfométrico informático (Axionplan, Axiophot2, Zeiss, Alemania). La puntuación se realizó de forma ciega en diapositivas codificadas. Los datos se expresan como el valor medio del porcentaje de

área positiva examinada.

IHC: La tinción para determinar la periostina se realizó en cortes congelados de 5 µm. Los cortes se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-periostina de ratón de rata (R&D Systems, 1/1000), durante una hora a 37°C. Para la tinción de linfocitos T y macrófagos en proliferación, se desparafinaron cortes de 5 µm de riñones incrustados en parafina, se calentaron en solución de ácido cítrico (pH 6) a 98°C durante 30 minutos, y se incubaron respectivamente con: Ki 67 (conejo policlonal, Abcam, 1/1000), CD3 (anti-humano de ratón, Dako 1/200), F4/80 (anti-ratón de rata monoclonal, AbD Serotec, 1/200).

Los anticuerpos secundarios proceden del kit N-Histofine (Nichirei Biochemicals, Japón). Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La tinción se reveló aplicando AEC (Dako), se contratiñó con hematoxilina QS (Vector, Burlingame, CA) y se finalizó con medios de montaje acuosos permanentes (Innovex).

Tinción de β-gal: La tinción de β-gal ha sido descrita por JS. Duffield et al. Los tejidos se fijaron con PFA al 4% a 4°C durante una hora, se transfirieron a PBS que contenía sacarosa al 18% durante una noche (4°C) y luego se almacenaron a -80°C. Se realizaron cortes de 5 µm, se lavaron en PBS durante 10 minutos, se incubaron en un tampón de bloqueo (MgCl₂ 1 mM, desoxicolato de Na al 0,01%, IGEPAL-CA630 al 0,02% y EGTA 5 mM en PBS) durante 20 minutos a temperatura ambiente, y se incubaron en la mezcla X-gal [MgCl₂ 1 mM, desoxicolato de Na al 0,01%, IGEPAL-CA630 al 0,02%, EGTA 5 mM, K₃Fe(CN)₆ 5 mM, K₄Fe(CN)₆·3 H₂O 5 mM y 1 µg de X-gal; todos de Invivogen]; se tuvo cuidado de realizar la tinción de X-gal a pH neutro y la incubación se llevó a cabo durante 16 horas a 37°C. Después de 5 min de lavado con PBS, los cortes se contratiñeron con eosina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se montaron.

Marcaje final in situ para la detección de las células apoptóticas: Para detectar las células apoptóticas, se tiñeron cortes de tejido de 5 µm fijados en AFA e incrustados en parafina por el ensayo TUNEL, utilizando el kit de peroxidasa ApopTag Plus (Qbiogen, Francia S7101-KIT) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para cada corte de riñón, se analizó el área cortical completa con 40 aumentos. Se contó manualmente el número de células apoptóticas teñidas por campo de potencia y se usó el valor medio para comparar los animales.

PCR: Los inventores extrajeron el RNA de la corteza renal utilizando una solución de TRIzol (Life Technologies BRL, Gaithersburg, MD). La calidad del RNA se verificó midiendo la relación de densidades ópticas a 260 y 280 nm y se separó el DNA genómico residual por tratamiento con DNasa I durante 30 minutos a 37°C (Fermentas). Los inventores utilizaron transcripción inversa con el kit de síntesis de la primera cadena de DNA *Revert Aid H minus* (Fermentas) para convertir 1 µg de RNA en cDNA. Los análisis transcriptómicos se realizaron con RT²Profiler PCR Array (Superarray, Bioscience Corp, Tebu Bio, Le Perray en Yvelines, Francia). El cDNA se amplificó por PCR utilizando un LightCycler 480 (Roche Diagnostic) que usa SYBR Green (Fast Start DNA Master SYBR Green I; Roche Applied Science, Roche Diagnostic), cebadores específicos para el mRNA seleccionado y el gen de mantenimiento de proteínas ribosómica L32 (RPL32) de 60S bajo las siguientes condiciones: 95°C durante 5 min y 45 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 15 segundos, luego 72°C durante 15 segundos. Los cebadores específicos fueron diseñados por el sistema *Universal Probe Library* (UPL, Roche Applied Science). Para normalizar los resultados de qRT-PCR, los inventores utilizaron el programa informático Roche LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics). Los inventores expresaron los resultados como 2-ΔCp, donde Cp es el número de umbrales del ciclo. Analizaron las curvas de disociación después de cada experimento para cada amplicón para evaluar la especificidad de la cuantificación cuando se usa SYBR Green.

Análisis por transferencia de Western: Las proteínas se extrajeron de la corteza renal utilizando un tampón RIPA suplementado con un cóctel inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich). Se calentaron 20 µg de proteínas diluidas en tampón de muestra de SDS a 70°C durante 10 minutos, se separaron en un gel de Tris-HCl al 4-15% y luego se transfirieron a una membrana de PVDF (Thermo Scientific). Después de bloquear en PBS 1x, leche al 5% (Thermoscientific) durante 2 horas a temperatura ambiente, se incubó la membrana con los anticuerpos primarios (periostina, E-cadherina) durante una noche a 4°C, se lavó y se incubó con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano silvestre (SouthernBiotech o Vector) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las bandas de proteínas se visualizaron utilizando reactivos picoquimioluminescentes Supersignal® West potenciados de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermoscientific) y se cuantificaron utilizando densitometría (Chemicaapt, Fisher Bioblock Scientific).

Estadística: Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA seguido por el ensayo *Protected Least Significance. Difference Fisher* (programa informático Statview). Los resultados con p < 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los valores son medias ± SEM.

Resultados

La expresión de periostina es inducida después de UUU: El RNA mensajero de periostina (mRNA) examinado por RT-qPCR, muestra una expresión basal muy baja de periostina en los riñones de control. Esta expresión está 50 veces sobrerregulada el día 15 después de la obstrucción (Figura 1A). Este hallazgo es confirmado por inmunotransferencia que no muestra periostina en los riñones de control y una inducción significativa de periostina renal el día 5 y el día 15 después de la UUU (Figura 1B). Con el fin seguir la aparición y la localización de la

periostina, los inventores realizaron una tinción de β -galactosidasa en ratones KO y una inmunotinción en ratones WT correspondientes 2 días, 5 días y 15 días después de la UUO. La tinción de β -galactosidasa y periostina no se detectó en los riñones de control. Después de la UUO, la β -galactosidasa muestra que comienza la expresión de periostina en las células epiteliales del conducto colector (día 2), luego en células epiteliales tubulares (día 5, día 15) y en las células intersticiales (día 15). La inmunohistoquímica muestra una tinción intersticial para la periostina que comienza en la médula (día 2) y se expande a la corteza (día 5, día 15). En conjunto, estos datos demuestran que la expresión de periostina es inducida por UUO y está correlacionada con la progresión de la lesión.

Los ratones con periostina anulada están protegidos de la dilatación tubular y la fibrosis inducidas por UUO: La evaluación de la histología renal se realizó por tinción tricrómica de Masson en riñones normales y obstruidos. 15 días después de la UUO, los ratones KO muestran menos dilatación tubular (Figura 2A) y menos fibrosis (Figura 2B). Para resaltar la acumulación de colágeno fibrilar, los cortes renales se tiñeron con rojo sirio y el análisis morfométrico demostró que los ratones KO tenían menos colágeno fibrilar en comparación con los WT (Figura 2C). Este dato fue confirmado por la expresión de mRNA de colágeno III evaluada por RT-qPCR (Figura 2D).

Los ratones con periostina anulada presentan una mejor conservación de las células tubulares epiteliales: Para aclarar la diferencia observada entre los ratones WT y KO en términos de dilatación tubular, los inventores examinaron la proliferación celular (Figura 3B), la conservación tubular (Figura 3A) y la apoptosis (Figura 3C). La proliferación se evaluó por inmunotinción con Ki 67 (marcador de células proliferantes); la conservación tubular se demostró por la expresión del RNA de vimentina (marcador de células mensesquimales) y el nivel de proteína E-cadherina (molécula de adhesión de células epiteliales). La apoptosis fue evaluada por TUNEL. El día 15, las células tubulares epiteliales proliferaron más en el riñón obstruido de ratones KO en comparación con el de ratones WT. El aumento del nivel del RNA de vimentina fue simultáneo a la pérdida de E-cadherina para los ratones WT, mientras que los ratones KO mostraron menos aumento de vimentina y mantenimiento de E-cadherina. Por el contrario, las células apoptóticas aumentaron de manera similar en ratones WT y KO después de la UUO.

Periostina e inflamación: La nefropatía obstructiva se caracteriza por una respuesta inflamatoria en el riñón que contribuye a la atrofia tubular y la fibrosis intersticial. Puesto que los ratones POSTN KO estaban protegidos en cuanto a la fibrosis y la lesión tubular, los inventores investigaron la inflamación. Curiosamente, después de la UUO, la RT-qPCR mostró que la sobreexpresión de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) estaba significativamente atenuada en ratones POSTN KO (Figura 4A). Sin embargo, no había diferencias significativas entre los ratones POSTN KO y WT para IL-17 (Figura 4B) o para la expresión de ROR δ T/Foxp3 (Figuras 4C y 4D). La infiltración de los macrófagos fue evaluada por IHC, no observándose diferencias en las células F4/80+, 15 días después de la UUO.

Ejemplo 2: Los oligonucleótidos antisentido de la periostina protegen frente al desarrollo de nefropatía hipertensiva en un modelo de rata (ratas tratadas con L-NAME).

Material y Métodos

Animales: Ratas Sprague-Dawley machos, que pesaban 250 g, se mantuvieron a una dieta con sal normal y con acceso libre a comida y agua. Para inducir un modelo de nefropatía hipertensiva, L-NAME, un inhibidor de la síntesis de NO, se administró en el agua de beber a la dosis de 30 mg/kg/día. Con el fin de investigar el papel de la periostina, los inventores utilizaron un método antisentido para sub-regular su expresión.

Administración de ODN antisentido (AS) contra periostina: Para bloquear la expresión de periostina, los inventores utilizaron oligodesoxinucleótidos (ODN) AS específicos modificados con fosforotioato para evitar su hidrólisis *in vivo* por nucleasas. Los ODN AS o de control desordenados se administraron por vía intraperitoneal (IP, 1 μ M) bien de forma preventiva o curativa. En el protocolo preventivo, la inyección de ODN antisentido comenzó con la administración de L-NAME y las ratas se sacrificaron el día 19. Sin embargo, en el protocolo curativo, la inyección de ODN antisentido comenzó después de la administración de L-NAME, cuando las ratas habían alcanzado una proteinuria de 1 g/mmol. L-NAME se mantuvo, pero la dosis se redujo hasta 15 mg/kg/día y las ratas se sacrificaron una semana después del tratamiento con ODN antisentido.

Resultados

Como se muestra en la Figura 5, la administración *in vivo* de ODN antisentido específico disminuye la expresión de periostina en los riñones de ratas hipertensas (modelo L-NAME). Como se muestra en la Figura 6, la administración *in vivo* de ODN antisentido de periostina específico atenuó las alteraciones estructurales típicas observadas en la nefropatía hipertensiva en ratas (es decir, dilatación tubular, glomeruloesclerosis, hipertrofia vascular y fibrosis). Además, como se muestra en la Figura 7, la administración de ODN antisentido de periostina específico a ratas hipertensas en las que la proteinuria superaba 2 gramos disminuyó sustancialmente las tasas de mortalidad demostrando el interés de incidir en la periostina (por ejemplo, por el inhibidor de la expresión del gen de periostina o por un anticuerpo o aptámero neutralizante anti-periostina) para prevenir y también para tratar la CKD.

Conclusión:

Los inventores han demostrado que la periostina está implicada en el desarrollo de la CKD promoviendo la fibrosis

renal y la acumulación excesiva de ECM en el riñón, utilizando dos modelos distintos como se ha descrito anteriormente. Resulta que los agentes que se unen a la periostina (por ejemplo, el anticuerpo o aptámero neutralizante anti-periostina) y los inhibidores de la expresión del gen de periostina son útiles para prevenir la fibrosis renal y la acumulación excesiva de ECM en el riñón y por tanto son útiles en la prevención o el tratamiento de la CKD en un sujeto que lo necesite.

Referencias

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

Guerrot D, Dussaule JC, Mael-Ainin M, Xu-Dubois YC, Rondeau E, Chatziantoniou C, Placier S. Identification of periostin as a critical marker of progression/reversal of hypertensive nephropathy. PLoS One. 2012;7(3):e31974.

Wallace DP, Quante MT, Reif GA, Nivens E, Ahmed F, Hempson SJ, Blanco G, Yamaguchi T. Periostin induces proliferation of human autosomal dominant polycystic kidney cells through alphaV-integrin receptor. Am J Physiol Renal Physiol. 2008 Nov;295(5):F1463-71

Zhu M, Saxton RE, Ramos L, Chang DD, Karlan BY, Gasson JC, Slamon DJ. Neutralizing monoclonal antibody to periostin inhibits ovarian tumor growth and metastasis. Mol Cancer Ther. 2011 Aug;10(8):1500-8.

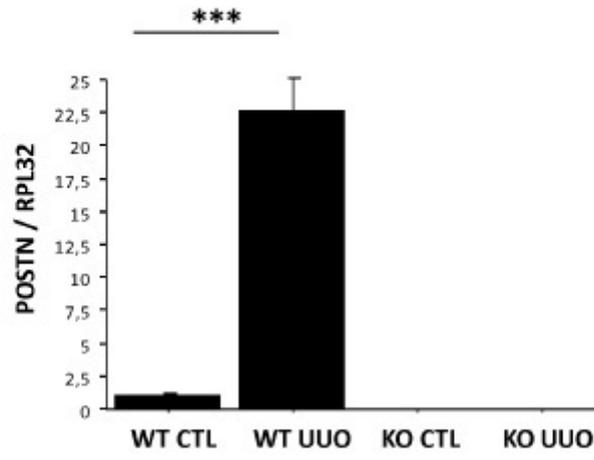
Listado de secuencias

- 10 <110> INSERM
- <120> MÉTODOS PARA PREVENIR Y TRATAR LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA (CKD)
- 15 <130> BIO12003/AS
- <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.3
- 20 <210> 1
- <211> 30
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 25 <220>
- <223> oligodeoxinucleótidos (ODN) antisentido (AS) contra periostina
- <400> 1
- 30 gagaggaacc atcttcagcc ctgagctccg 30
- <210> 2
- <211> 21
- <212> ADN
- 35 <213> Artificial
- <220>
- <223> oligodeoxinucleótidos (ODN) antisentido (AS) contra periostina
- <400> 2
- 40 tctccctcac accctatttc a 21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un inhibidor de la expresión del gen de periostina o del mRNA de periostina para uso en el tratamiento por terapia de la enfermedad renal crónica (CKD) en un sujeto que lo necesite, en el que dicho inhibidor de la expresión del gen de periostina o del mRNA de periostina es un pequeño RNA inhibidor (siRNA) de periostina, una ribozima de periostina o un oligonucleótido antisentido anti-periostina.
2. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sujeto que lo necesita padece nefropatía hipertensiva.
3. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sujeto que lo necesita padece glomerulonefritis.
- 10 4. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el sujeto que lo necesita padece nefropatía diabética.

A Expresión de periostina en el riñón



B

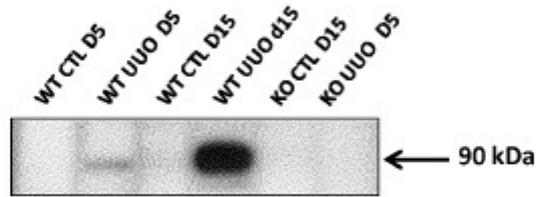


FIGURA 1

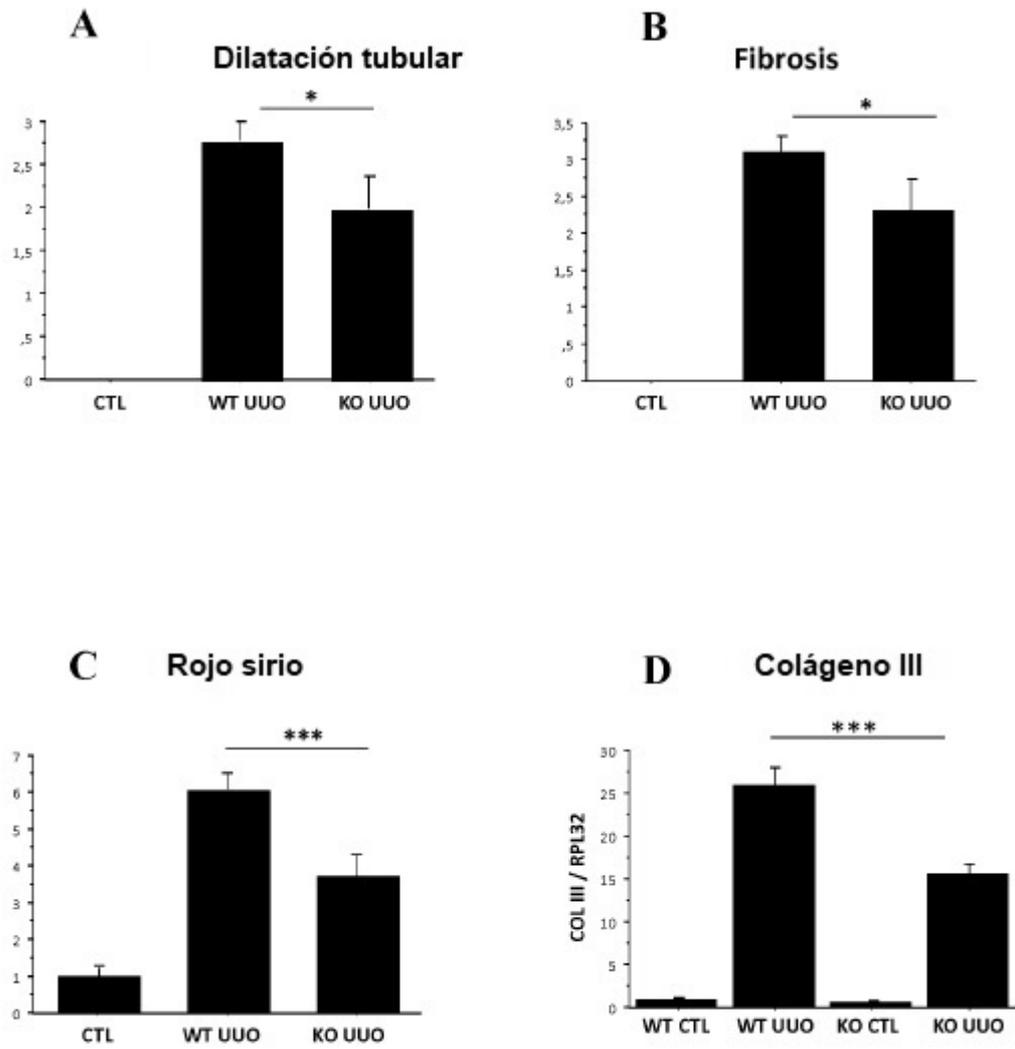


FIGURA 2

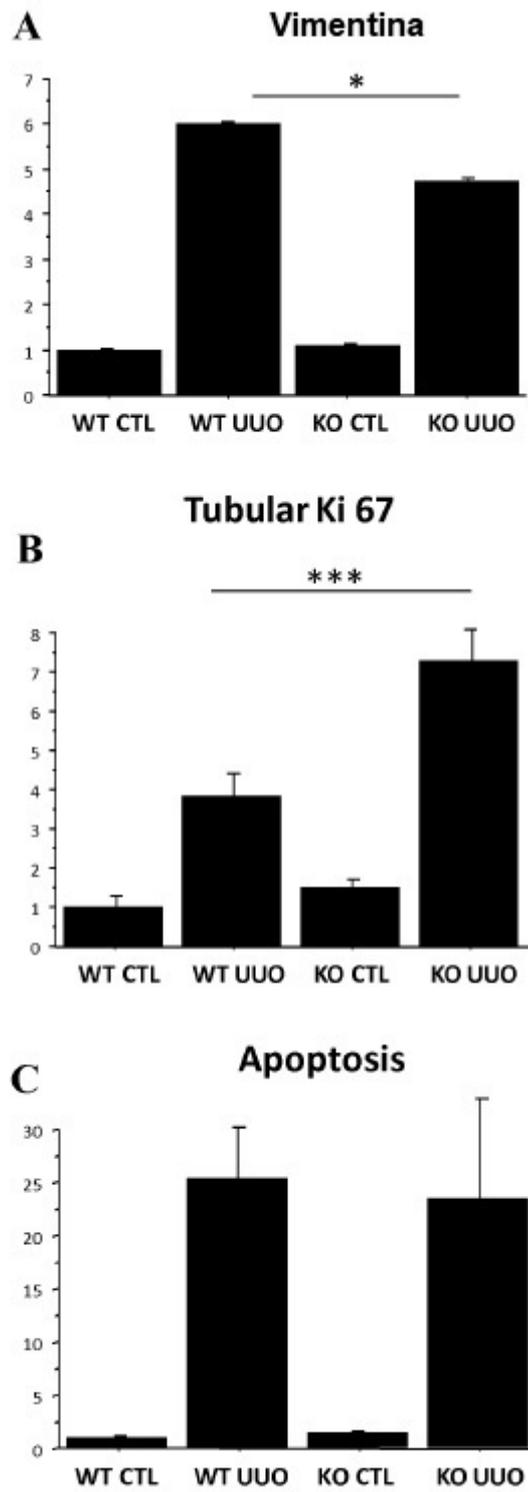


FIGURA 3

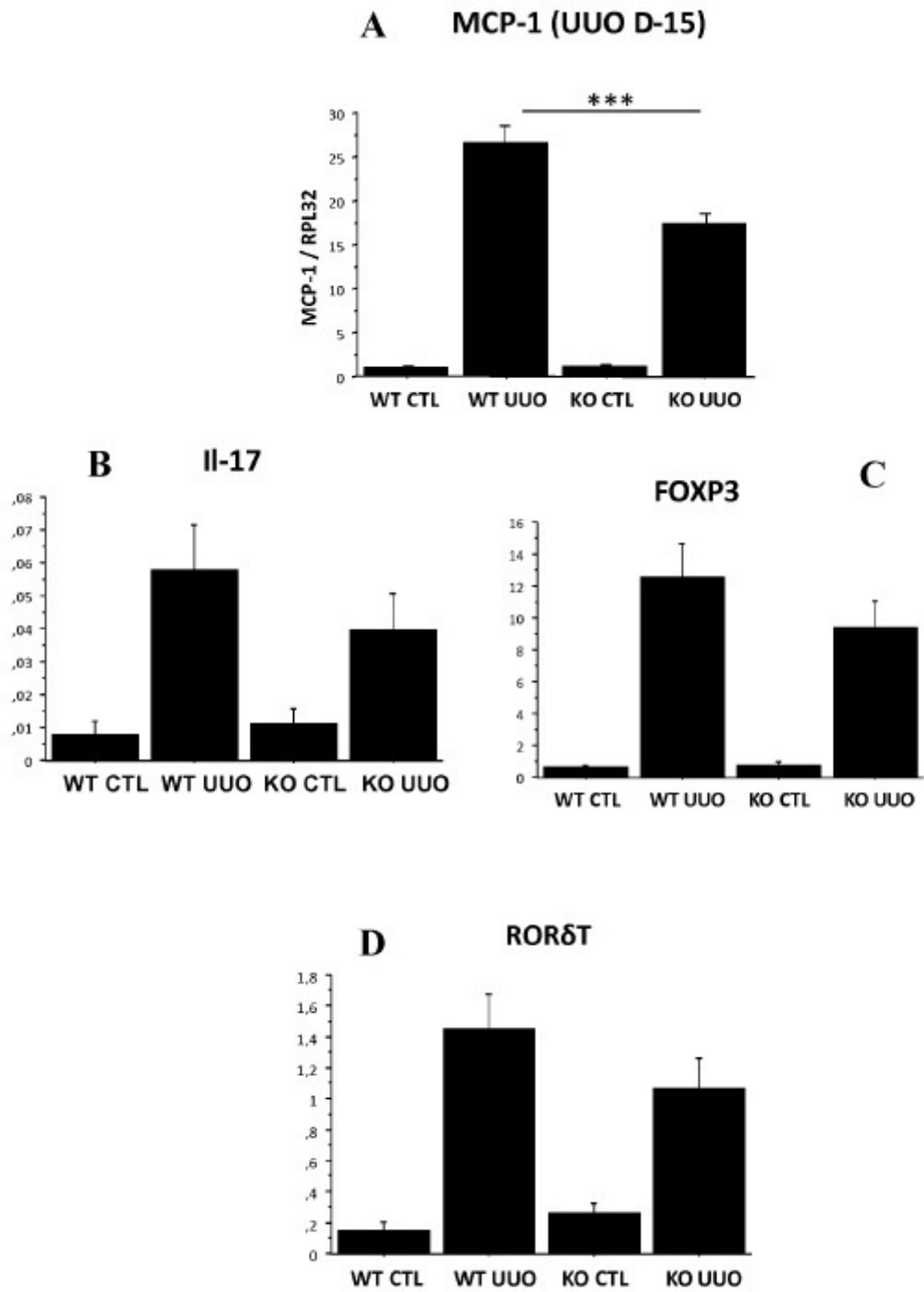


FIGURA 4

Expresión de periostina (RT-PCR) en ratas tratadas con L-NAME

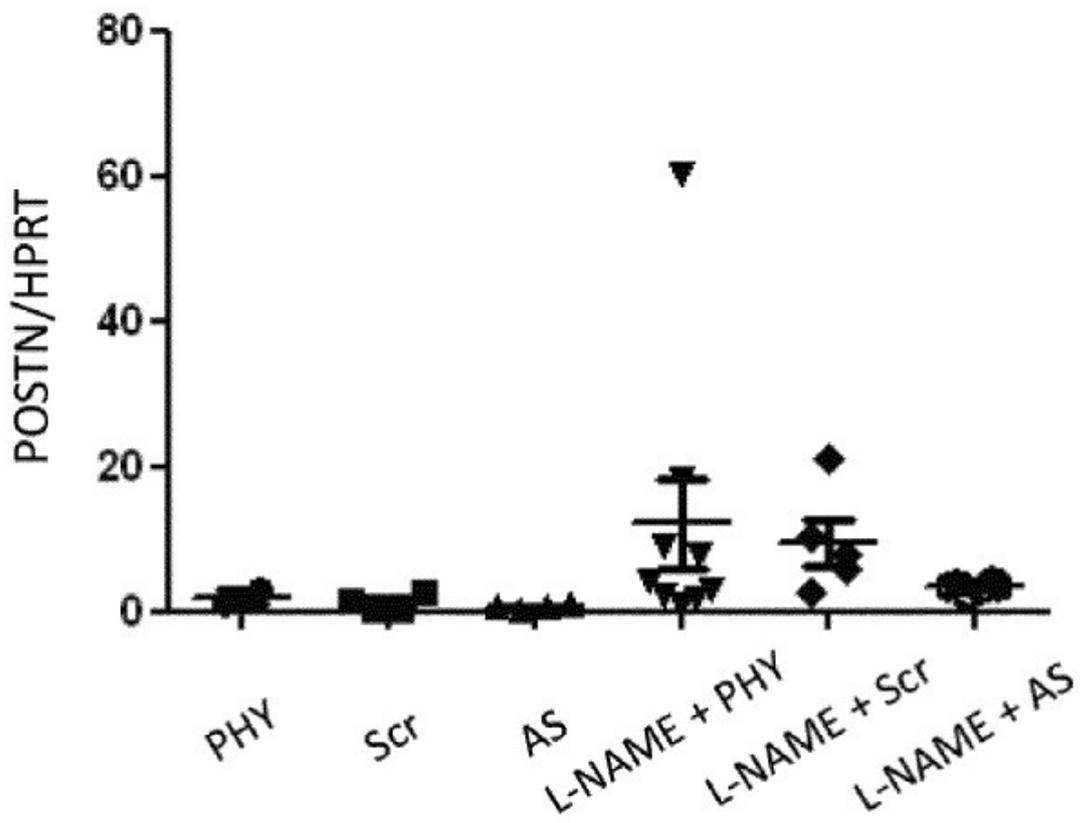


FIGURA 5

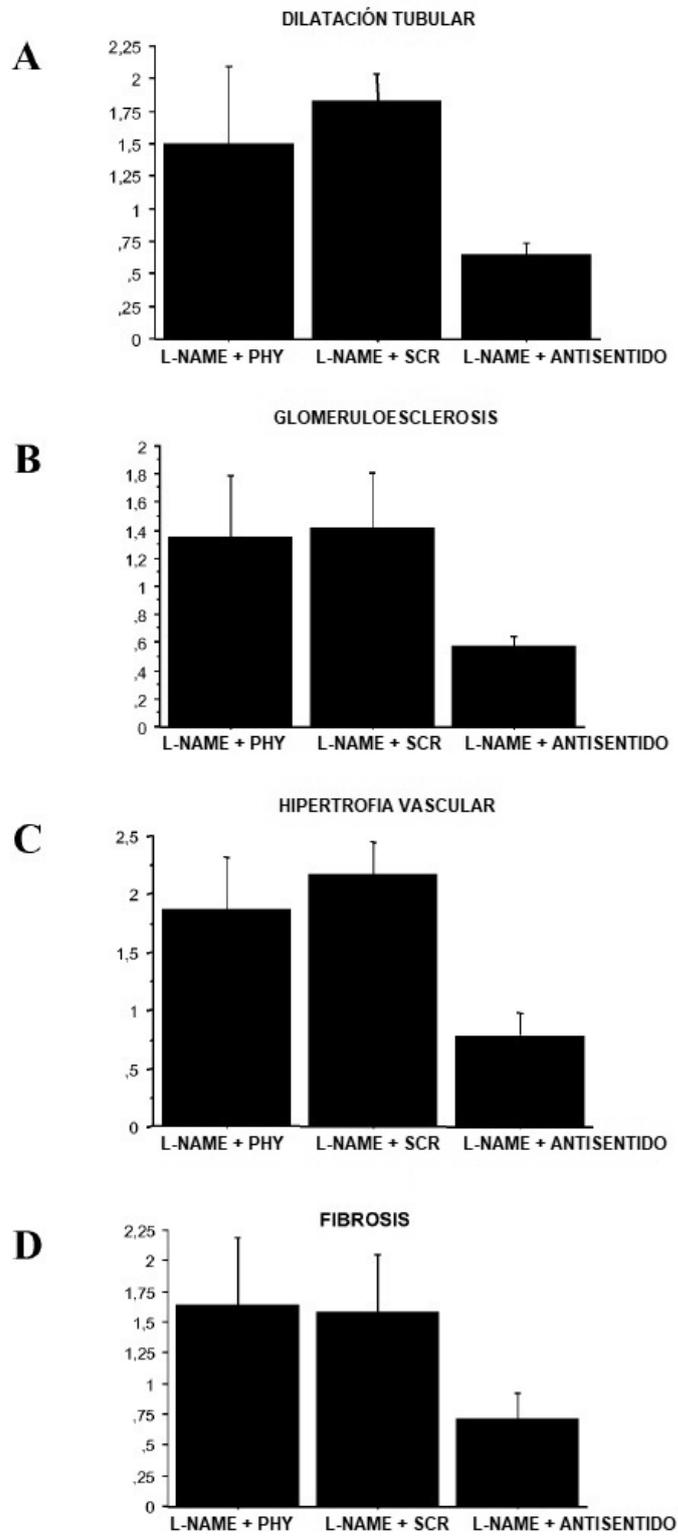


FIGURA 6

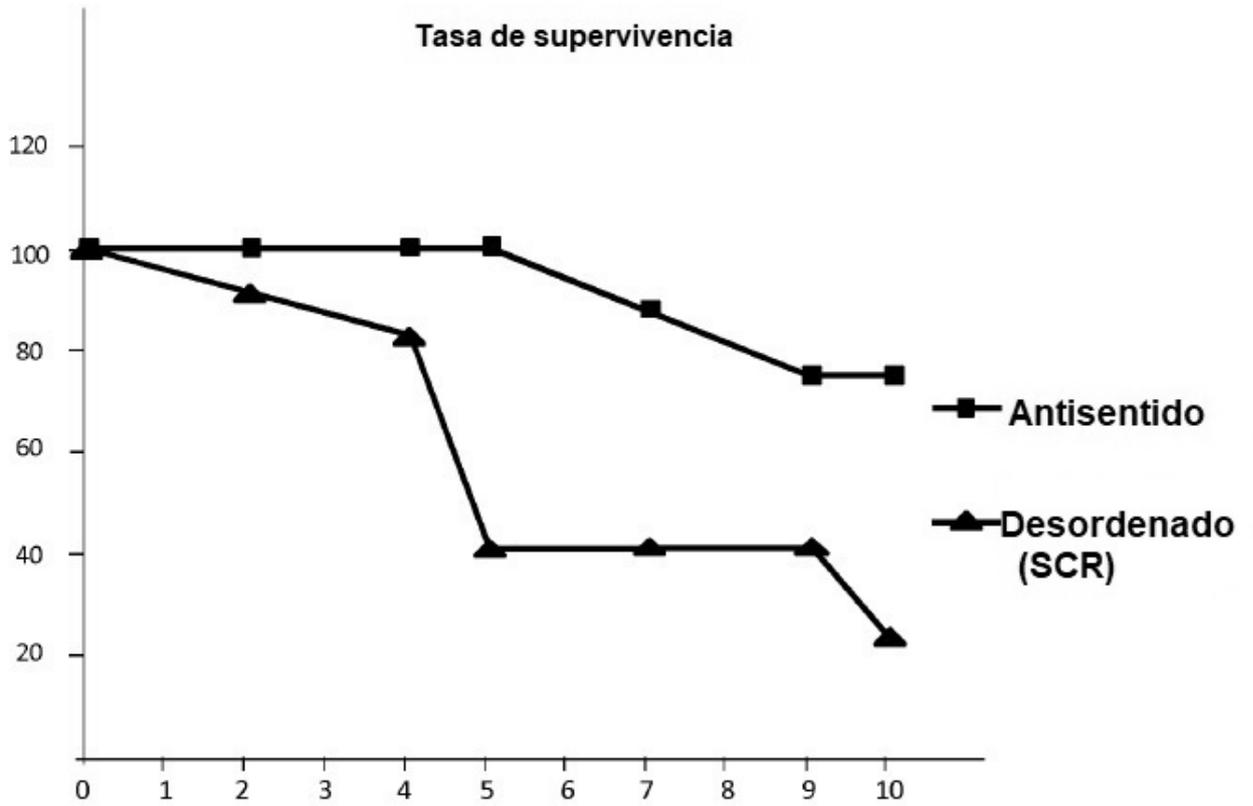


FIGURA 7