

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 700**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 13/12** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.01.2013** **PCT/US2013/020280**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.07.2013** **WO13103811**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2013** **E 13733786 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018** **EP 2800578**

54 Título: **Señalización de SLIT-ROBO para el diagnóstico y el tratamiento de una enfermedad de riñón**

30 Prioridad:

**05.01.2012 US 201261583379 P**

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

**29.05.2019**

73 Titular/es:

**BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATION  
(100.0%)**

**One Boston Medical Center Place  
Boston, MA 02118, US**

72 Inventor/es:

**LU, WEINING;  
FAN, XUEPING y  
SALANT, DAVID, J.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

### Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 714 700 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

Señalización de SLIT-ROBO para el diagnóstico y el tratamiento de una enfermedad de riñón

Campo de la invención

5 El campo de la invención se refiere a métodos para el tratamiento de enfermedad renal crónica y proteinuria y para el diagnóstico de la enfermedad renal crónica y al control de los efectos del tratamiento sobre la progresión de la enfermedad renal crónica y la proteinuria.

10 Lu, W. y otros (Am. J. Hum. Genet. Vol. 80, no. 4, abril de 2007) informan que la interrupción de ROBO2 está asociada con anomalías del tracto urinario y confiere riesgo de reflujo vesicoureteral. Se observó a un paciente con una translocación cromosómica que interrumpe el gen ROBO2 y da como resultado las proteínas de fusión Fu-129 (129aas) y Fu-153 (153aas) que comprenden el primer dominio de inmunoglobulina (Ig) extracelular de ROBO2.

Sumario de la invención

15 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de ROBO2 que inhibe la actividad biológica de ROBO2, en la que el inhibidor de ROBO2 es una proteína ROBO2 soluble que comprende un polipéptido de fusión que comprende los dominios de unión a SLIT de Ig1 e Ig2 de ROBO2 sin un dominio de ROBO2 intracelular.

La presente invención también proporciona dicha composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de una enfermedad renal crónica o proteinuria.

20 En el presente documento se proporcionan métodos novedosos para el tratamiento de la enfermedad renal crónica y la proteinuria y para el diagnóstico de la enfermedad renal crónica, y para controlar los efectos del tratamiento sobre la progresión de la enfermedad renal crónica y la proteinuria basados, en parte, en el descubrimiento de los inventores de un nuevo e inesperado papel para la ruta de señalización de SLIT-ROBO en la regulación del citoesqueleto de podocitos de F-actina y la estructura del proceso del pie en el riñón.

25 Por consiguiente, en algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para el tratamiento de la enfermedad renal crónica en un sujeto que lo necesite, comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que tiene o están en riesgo de una enfermedad renal crónica una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un inhibidor de ROBO2.

También se proporcionan en este documento, en algunos aspectos, un método para la reducción de la proteinuria en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de proteinuria una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un inhibidor de ROBO2.

30 En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el inhibidor de ROBO2 es un anticuerpo de bloqueo o un fragmento de unión a antígeno del mismo específico para ROBO2, una molécula antisentido específica para ROBO2, un ARN de interferencia corto (ARNic) específico para ROBO2, un inhibidor de molécula pequeña de ROBO2, un polipéptido inhibidor de ROBO2, o un análogo estructural de ROBO2.

35 En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el inhibidor de ROBO2 bloquea o reduce la unión de ROBO2 a SLIT, a Nck, o a ambos.

En algunas formas de realización de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el inhibidor de ROBO2 es específico para el dominio de unión a SLIT de Ig1, los dominios de unión de SLIT de Ig1 e Ig2, el dominio de unión intracelular de Nck, o cualquier combinación de los mismos.

40 En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el polipéptido inhibidor de ROBO2 es una proteína de fusión ROBO2 dominante negativa, un polipéptido que comprende un dominio extracelular de ROBO2 sin el dominio intracelular, o un polipéptido que comprende un dominio intracelular de ROBO2 sin el dominio extracelular.

En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el sujeto que tiene o está en riesgo de padecer una enfermedad renal crónica tiene nefropatía diabética o presión arterial alta.

45 En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el método comprende además administrar al sujeto un agente terapéutico adicional.

En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) o un bloqueador del receptor de la angiotensina II (ARB).

50 También se proporcionan en el presente documento, en algunos aspectos, métodos que comprenden:

a. ensayar una muestra de prueba biológica de un sujeto para determinar un nivel de expresión de polipéptido ROBO2 o un ARN que codifica un polipéptido ROBO2;

b. determinar si el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 en la muestra biológica de prueba está por encima de un nivel de umbral de referencia; y

5 c. diagnosticar al sujeto como necesitado de tratamiento o terapia para la enfermedad renal crónica.

En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el ensayo del nivel de expresión del polipéptido ROBO2 se realiza utilizando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo específico para el polipéptido ROBO2.

10 En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el ensayo del nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 se realiza mediante PCR o un ensayo de hibridación.

En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, la muestra biológica de prueba es una biopsia de riñón, orina, sangre, muestra de suero o células sedimentadas de una muestra de orina.

15 En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 está al menos un 20% por encima del nivel de umbral de referencia.

En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 es al menos dos desviaciones estándar por encima del nivel de umbral de referencia.

20 También se proporcionan en el presente documento, en algunos aspectos, ensayos que comprenden:

a. poner en contacto una muestra de prueba biológica aislada de un sujeto con un reactivo que detecta el polipéptido ROBO2 o un ARN que codifica un polipéptido ROBO2; y

b. medir el nivel de polipéptido ROBO2 o un ARN que codifica un polipéptido ROBO2,

25 en los que un nivel aumentado de dicho polipéptido ROBO2 o dicho ARN que codifica un polipéptido ROBO2, en relación con una muestra biológica normal, identifica a un sujeto que tiene enfermedad renal crónica y/o progresión de enfermedad renal crónica o proteinuria.

En algunas realizaciones de estos ensayos y todos los ensayos descritos en el presente documento, la detección del nivel de expresión del polipéptido ROBO2 se realiza utilizando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo específico para el polipéptido ROBO2.

30 En algunas realizaciones de estos ensayos y todos los ensayos descritos en el presente documento, la detección del nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 se realiza mediante PCR o un ensayo de hibridación.

En algunas realizaciones de estos ensayos y todos los ensayos descritos en el presente documento, la muestra biológica de prueba es una biopsia de riñón, orina, sangre, muestra de suero o células sedimentadas de una muestra de orina.

35 En algunas realizaciones de estos ensayos y todos los ensayos descritos en el presente documento, el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 está al menos un 20% por encima del nivel de umbral de referencia.

40 En algunas realizaciones de estos ensayos y todos los ensayos descritos en el presente documento, el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 es al menos dos desviaciones estándar por encima del nivel de umbral de referencia.

En algunas realizaciones de estos ensayos y todos los ensayos descritos en el presente documento, el sujeto ha sido diagnosticado con diabetes o presión arterial alta.

En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan sistemas para determinar si un sujeto está en riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria, o tiene enfermedad renal crónica que comprende:

45 a. un módulo de medición configurado para determinar el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 en una muestra biológica obtenida de un sujeto;

b. un módulo de comparación configurado para recibir dicho nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 determinado por el módulo de medición y realizar al menos un análisis para determinar si el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del ARN que codifica

un polipéptido ROBO2 es mayor que un nivel o proporción de referencia predeterminado, y para proporcionar un contenido recuperado; y

- 5 c. un módulo de visualización para mostrar un contenido basado en la salida de datos de dicho módulo de comparación, en el que el contenido comprende una señal indicativa de que el nivel de expresión o proporción de polipéptido o ARN de ROBO2 es mayor que el nivel o relación de referencia predeterminado, o una señal indicativa que el nivel o la relación de expresión de ROBO2 no sea mayor que el nivel de referencia o relación predeterminada.

En algunas realizaciones de estos sistemas y todos los sistemas descritos en el presente documento, el contenido mostrado en el módulo de visualización comprende además una señal indicativa de que se recomienda al sujeto que reciba un régimen de tratamiento particular.

- 10 En algunos aspectos, se proporcionan en este documento sistemas para determinar si un sujeto está en riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria, o tiene enfermedad renal crónica que comprende:

a. un módulo de determinación configurado para recibir al menos una muestra de prueba obtenida de un sujeto y realizar al menos un análisis en dicha al menos una muestra de prueba para determinar la presencia o ausencia de cualquiera de las siguientes condiciones:

- 15 i. una relación de expresión de ROBO2 mayor que una relación predeterminada, o

ii. un nivel de expresión de ROBO2 mayor que un nivel predeterminado

b. un dispositivo de almacenamiento configurado para almacenar la salida de datos de dicho módulo de determinación; y

- 20 c. un módulo de visualización para mostrar un contenido basado en la salida de datos de dicho módulo de determinación, en el que el contenido comprende una señal indicativa de que la relación de expresión de ROBO2 es mayor que la relación predeterminada o el nivel de ROBO2 mayor que un nivel predeterminado, o una señal indicativa de que la relación de expresión de ROBO2 no es mayor que la relación predeterminada o no mayor que un nivel predeterminado.

- 25 En algunas realizaciones de estos sistemas y todos los sistemas descritos en el presente documento, el contenido mostrado en el módulo de visualización comprende además una señal indicativa de que se recomienda al sujeto que reciba un régimen de tratamiento particular.

- 30 También se proporcionan en este documento, en algunos aspectos, métodos para tratar a un sujeto humano con riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria, que comprenden administrar un tratamiento o terapia para prevenir la aparición de enfermedad renal crónica o proteinuria a un sujeto humano que está determinado a tener un nivel de proteína ROBO2 por encima de un nivel de umbral de referencia.

En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el nivel de proteína ROBO2 está al menos un 20% por encima del nivel de referencia.

En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el nivel de proteína ROBO2 es al menos dos desviaciones estándar por encima del nivel de referencia.

- 35 En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el tratamiento o terapia para prevenir la aparición de enfermedad renal crónica o proteinuria comprende un inhibidor de ROBO2.

- 40 En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el inhibidor de ROBO2 es un anticuerpo bloqueante o un fragmento de unión a antígeno del mismo específico para ROBO2, una molécula antisentido específica para ROBO2, un ARN interferente corto (ARNic) específico para ROBO2, un inhibidor de molécula pequeño de ROBO2, un polipéptido inhibidor de ROBO2, o un análogo estructural de ROBO2.

En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el inhibidor de ROBO2 bloquea o reduce la unión de ROBO2 a SLIT, a Nck, o a ambos.

- 45 En algunas formas de realización de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el inhibidor de ROBO2 es específico para el dominio de unión a SLIT de Ig1, los dominios de unión a SLIT de Ig1 e Ig2, el dominio de unión intracelular a Nck, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el polipéptido inhibidor de ROBO2 es una proteína de fusión ROBO2 negativa dominante, un polipéptido que comprende un dominio extracelular de ROBO2 sin el dominio intracelular, o un polipéptido que comprende un dominio intracelular de ROBO2 sin el dominio extracelular.

- 50 También se proporcionan en este documento, en algunos aspectos, inhibidores de ROBO2 para uso en el tratamiento de una enfermedad renal crónica, e inhibidor de ROBO2 para uso en el tratamiento de proteinuria.

En algunas realizaciones de estos usos y todos los usos descritos en el presente documento, el inhibidor de ROBO2 es un anticuerpo bloqueante o un fragmento de unión a antígeno del mismo específico para ROBO2, una molécula antisentido específica para ROBO2, un ARN interferente corto (ARNic) específico para ROBO2, un inhibidor de molécula pequeña de ROBO2, un polipéptido inhibidor de ROBO2, o un análogo estructural de ROBO2.

- 5 En algunas realizaciones de estos usos y todos los usos descritos en el presente documento, el inhibidor de ROBO2 bloquea o reduce la unión de ROBO2 a SLIT, a Nck, o a ambos.

En algunas realizaciones de estos usos y todos los usos descritos en el presente documento, el inhibidor de ROBO2 es específico para el dominio de unión a SLI de Ig1, los dominios de unión a SLIT de Ig1 e Ig2, el dominio de unión intracelular a Nck, o cualquier combinación de los mismos.

- 10 En algunas realizaciones de estos usos y todos los usos descritos en el presente documento, el polipéptido inhibidor de ROBO2 es una proteína de fusión ROBO2 negativa dominante, un polipéptido que comprende un dominio extracelular de ROBO2 sin el dominio intracelular, o un polipéptido que comprende un dominio intracelular de ROBO2 sin el dominio extracelular.

- 15 En algunas realizaciones de estos usos y todos los usos descritos en el presente documento, la enfermedad renal crónica o proteinuria es causada por nefropatía diabética o presión arterial alta.

- En algunas realizaciones de cualquiera de estos aspectos y todos los aspectos descritos en el presente documento, ROBO2 se refiere a ROBO2 humano que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 codificada por la secuencia del ARNm de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones de cualquiera de estos aspectos y todos los aspectos descritos en el presente documento, ROBO2 se refiere a ROBO2 humano que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 codificada por la secuencia de ARNm de la SEQ ID NO: 4.
- 20

#### Definiciones

- En aras de la conveniencia, ciertos términos empleados en el presente documento, en la memoria descriptiva, ejemplos y las reivindicaciones adjuntas se reúnen en el presente documento. A menos que se indique lo contrario, o este implícito a partir del contexto, los siguientes términos y frases incluyen los significados que se proporcionan a continuación. A menos que se indique explícitamente lo contrario, o que se desprenda del contexto, los términos y frases a continuación no excluyen el significado que el término o la frase ha adquirido en la técnica a la que pertenece. Las definiciones se proporcionan para ayudar a describir realizaciones particulares, y no pretenden limitar la invención reivindicada, porque el alcance de la invención está limitado solo por las reivindicaciones. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.
- 25
- 30

Como se usa en el presente documento, el término "que comprende" o "comprende" se usa en referencia a las composiciones, métodos y sus respectivos componentes, que son esenciales para la invención, pero abiertos a la inclusión de elementos no especificados, ya sean esenciales o no.

- 35 Como se usa en el presente documento, el término "que consiste esencialmente en" se refiere a los elementos requeridos para una realización dada. El término permite la presencia de elementos adicionales que no afectan materialmente las características básicas y novedosas o funcionales de esa realización de la invención.

El término "que consiste en" se refiere a composiciones, métodos y componentes respectivos de los mismos como se describe en el presente documento, que son exclusivos de cualquier elemento no mencionado en esa descripción de la realización.

- 40 Según se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito aquí y/o que serán evidentes para los expertos en la materia al leer esta descripción y así sucesivamente.

- 45 Aparte de en los ejemplos operativos, o cuando se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción utilizadas en este documento deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" cuando se usa en relación con porcentajes puede significar  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$  o  $\pm 1\%$ .

- A menos que se defina lo contrario en este documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente solicitud deberán tener los significados que comúnmente entienden los expertos en la técnica a los que pertenece esta descripción. Debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos particulares, etc., descritos en este documento y como tales pueden variar. La terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones. Las definiciones de términos comunes en inmunología y biología molecular se pueden encontrar en The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Decimoctava Edición, publicado por Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-18-2); Robert S. Porter y colaboradores, (editores),
- 50
- 55

The Encyclopedia of Molecular Biology, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); and Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicada por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); Immunology by Werner Luttmann, publicada por Elsevier, 2006. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se encuentran en Benjamin Lewin, Genes IX, publicado por Jones & Bartlett Publishing, 2007 (ISBN-13: 9780763740634); Kendrew y colaboradores, (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Maniatis y colaboradores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., EE.UU (1982); Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., EE.UU (1989); Davis y colaboradores, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1986); o Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol.152, S. L. Berger y A. R. Kimmerl Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA (1987); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB) (Fred M. Ausubel, y colaboradores ed., John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, et. al., ed., John Wiley and Sons, Inc.) y Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, et. al., ed. John Wiley and Sons, Inc.).

#### Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1R demuestran que Robo2 se expresa y localiza en la superficie celular basal de los podocitos. Todas las inmunotinciones en (Figuras 1A-1Q) se llevan a cabo en ratones los días E16.5 con un aumento de 600X (véase las Figuras 5A-5M para inmunotinciones en glomérulos de ratones adultos). (Figuras 1A-1C) Robo2 se localiza conjuntamente con la proteína nefrina del diafragma de hendidura del podocito. (Figuras 1D-1F) Robo2 se localiza conjuntamente con la proteína podocina del diafragma de hendidura del podocito. (Figuras 1G-1I) Robo2 se localiza conjuntamente con la proteína adaptadora Nck en los glomérulos. (Figuras 1J-1L) Robo2 se expresa en la superficie de los podocitos basales adyacentes a la proteína nidógeno de la membrana basal glomerular. (Figuras 1M-1O) Robo2 no se localiza conjuntamente con el marcador de proteína de células endoteliales glomerulares Pecam1. (Figura 1P) La región ampliada encuadrada en (Figura. 1L) muestra que Robo2 se expresa predominantemente en la superficie de las células basales (flecha) de los podocitos (p) adyacentes al marcador de membrana basal glomerular nidógeno. Robo2 se expresa débilmente en las superficies de las células apicales y laterales (puntas de flecha) de los podocitos. (Figura 1Q) Robo2 se expresa predominantemente en la superficie de las células basales (flechas) de los podocitos (p) y se expresa débilmente en las superficies de las células apicales o laterales (puntas de flecha). (Figuras 1R) La microscopía electrónica de Inmuno-oro muestra la localización de partículas de oro (flechas) conjugadas con el anticuerpo Robo2 en el proceso del pie (fp) de un podocito de un ratón de 3 semanas de edad. GBM, membrana basal glomerular. Ampliación: 50.000X. Véase también las Figuras 5A-5M.

Las Figuras 2A-2J demuestran que Robo2 interactúa con la proteína adaptadora Nck y forma un complejo con nefrina. (Figura 2A) Los ensayos de doble híbrido en levadura muestran una interacción positiva entre el dominio intracelular de Robo2 (Robo2-ICD) y Nckl. El informador LacZ (X-gal): +++, la levadura se tornó oscura; ++, clara; -, blanco en 24 horas. El informador de leucina (-Leu): +, la levadura creció; -, la levadura no creció. CC, región conservada citoplasmática. Los números indican las posiciones de los residuos en la proteína de longitud completa. (Figura 2B) Los ensayos de doble híbrido en levadura muestran que los dos primeros dominios SH3 de Nckl son necesarios para su interacción con Robo2-ICD. (Figura 2C) Los ensayos de doble híbrido en levadura muestran dominios de unión potenciales que median la interacción de Robo2 y Nckl. La secuencia es la región de unión potencial en Robo2 para Nckl. Se destacan las regiones ricas en prolina. (Figura 2D) Precipitación conjunta de Robo2 y Nck. Los lisados celulares en el carril 5 se recogen de células transfectadas con His-myc-Robo2 (usadas en los carriles 1 y 2); los lisados celulares en el carril 6 se recogen de células transfectadas con His-myc-Robo2- $\Delta$ NBD (usadas en los carriles 3 y 4). (Figura 2E) Precipitación conjunta de Robo2, Nck y nefrina. (Figura 2F) una precipitación conjunta similar a la de la (Figura 2E), excepto que His-myc-nefrina se extrae en lugar de His-myc-Robo2. (Figura 2G) Inmunoprecipitación conjunta Robo2, Nck y nefrina endógeno de riñón. (Figura 2H) Un ensayo similar al de la Figura 2G, excepto que los precipitados se preparan utilizando un anticuerpo anti-nefrina de ratón. (I) Slit2 mejora la formación del complejo Robo2-Nck-nefrina. His-myc-Robo2, nefrina y Fyn se expresan en células HEK que se estimulan con medio acondicionado con Slit2 (carriles 1, 3) o medio acondicionado de control (carril 2, 4). (Figura 2J) Cuantificación de la intensidad de (Figura 2I). Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM; n = 7, \*p 0,05, \*\*p 0,01 comparado con el control, prueba t de Student pareada. Véase también las Figuras 6A-6F'.

Las Figuras 3A-3G demuestran que la señalización de Slit2-Robo2 inhibe la polimerización de actina mediada por nefrina. (Figura 3A) CD16/7-NCD se expresa conjunta con Robo2 en células HEK, que se tratan con anticuerpo anti-CD16 y anticuerpo anti-IgG conjugado con rodamina en presencia de medio acondicionado con Slit2 (Slit) o medio acondicionado de control (CTL). Las células luego se fijan y se tiñen con faloidina conjugada con FITC para revelar F-actina. Barra de escala, 5  $\mu$ m. NCD: dominio citoplasmático de nefrina. (Figura 3B) Un ensayo similar al de la (Figura 3A), excepto que CD16/7-NCD se reemplaza por CD16/7-HA y se usa como un ensayo de control. (Figura 3C) Se cuantifica el porcentaje de células con colas de F-actina sobre células totales con agrupaciones de CD16/7 en cada grupo. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM, \*p 0,01, n = 5. (Figura 3D) CD16/7-NCD en (Figura 3A) se inmunoprecipita por el anticuerpo anti-CD16 después de la estimulación del medio acondicionado con Slit2 (carriles 1 y 3) o del medio acondicionado de control (carriles 2 y 4). Nótese la F-actina reducida en el carril 1. CD16/7-HA se usa como control negativo. (Figura 3E) Cuantificación de la intensidad de (Figura 3D). Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM; n = 4, \*p 0,05 en comparación con el control, prueba t de Student pareada. (Figura 3F) Inmunoprecipitación de nefrina de riñones de ratón con desactivación de Robo2 homocigotos (Robo2<sup>-/-</sup>), heterocigotos

(Robo2 +/-), y de tipo silvestre (Robo2+/+) utilizando el anticuerpo anti-nefrina. Obsérvese el aumento de F-actina en el carril 3. (Figura 3G) Cuantificación de la intensidad de (Figura 3F). Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM; n = 4, \*p 0,05 en comparación con el tipo silvestre y heterocigoto, análisis ANOVA. Véase también las Figuras 7A-7C.

Las Figuras 4A-4W demuestran los fenotipos estructurales de podocitos en ratones nulos homocigotos para Robo2, desactivados específicos para podocitos de Robo2 y desactivación doble de Robo2 y Nphs1. (Figuras 4A y 4B) Las imágenes representativas de riñones de recién nacidos muestran cuerpos de podocitos (puntas de flecha) y la cápsula de Bowman (flechas) en ratones de tipo silvestre (Figura 4A) y nulos homocigotos para Robo2 (Figura 4B). (Figuras 4C y 4D) Las imágenes de gran aumento de (Figuras 4A y 4B) muestran procesos base de podocitos (flechas) en el riñón del recién nacido. Barra de escala, 1  $\mu$ m. (Figuras 4E y 4F) Las imágenes representativas de riñones de 3 semanas con bajo aumento muestran el cuerpo celular de podocitos (puntas de flecha) en un ratón nulo homocigótico para Robo2 (Figura 4F) en comparación con un control de igual edad (Figura 4E). (Figuras 4G y 4H) Las imágenes de mayor aumento de (Figuras 4E y 4F) muestran procesos base serpenteantes más cortos y desorganizados (flecha) en un ratón nulo homocigoto para Robo2 de 3 semanas (Figura 4H) en comparación con procesos base con forma de cremallera bien organizados en el control de la misma edad (Figura 4G). Barras de escala: 2  $\mu$ m. (Figuras 4I y 4J) Las imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión (ampliación a 5.000x) representan el desplazamiento del proceso del pie del podocito segmentario focal (flecha en la Figura 4J) en un ratón de un mes de edad con desactivación específica de podocito de Robo2 y el fenotipo normal en el control (Figura 4I). Abreviaturas: gc: capilar glomerular; us: espacio urinario. (Figuras 4K y 4L) Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de mayor aumento (40.000x) muestran procesos base de podocitos más amplios (flecha en la Figura 4L) en un ratón mutante de dos meses de edad específico de podocitos de Robo2 en comparación con el control (Figura 4K). Abreviaturas: fp, proceso del pie de podocitos; GBM, membrana basal glomerular. (Figura 4M) Cuantificación del ancho del proceso del pie de podocito en ratones de un mes de edad con desactivación específica de podocitos de Robo2<sup>del5/flox</sup>;Tg<sup>Nphs2-cre+</sup> (KO de Robo2) y los controles de la camada de tipo silvestre (WT). Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM, n = 333, \*p 0,01. (Figura 4N) Ensayo ELISA de orina puntual muestra una elevada proporción de albúmina/creatinina en ratones adultos Robo2<sup>del5/flox</sup>;Nphs2-Cre+ (KO) en comparación con el control de tipo silvestre (WT). Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM, n = 20, \*p 0,01. (Figura 4O) El análisis de transferencia Western muestra la presencia de albúmina en la orina; se cargó 1  $\mu$ L de orina en cada pozo, se usaron 0,2  $\mu$ g de albúmina como control positivo. WT, tres compañeros de camada de tipo silvestre; Robo2 KO, tres ratones individuales Robo2<sup>del5/flox</sup>;Nphs2-Cre+. (Figuras 4P y 4Q) Las imágenes representativas del microscopio electrónico de barrido muestran procesos base de podocitos interdigitales interrumpidos que se asemejan a protuberancias celulares desorganizadas (flechas) en el riñón de ratón recién nacido homocigoto sencillo para Nphs1<sup>-/-</sup>. Barras de escala: 1  $\mu$ m. (Figuras 4R y 4S) Los glomérulos de ratones recién nacidos homocigotos dobles para Nphs1<sup>-/-</sup> Robo2<sup>-/-</sup> exhiben procesos base interdigitales restaurados (flechas), lo que indica un alivio del fenotipo nulo de nefrina por desactivación de Robo2. (Figuras 4T y 4U), los glomérulos de ratones recién nacidos homocigotos sencillos para Robo2<sup>-/-</sup> presentan procesos base irregulares y más amplios, pero una extensa formación de patrones interdigitales (flechas). (Figuras 4V y 4W), glomérulos de ratones de tipo silvestre recién nacidos con un patrón de interdigitación regular normal del proceso del pie (flechas). Véase también las Figuras. 8A-8Z y Tablas 1-4.

Las Figuras 5A-5M demuestran que Robo2 se expresa en glomérulos en desarrollo y en adultos. (Figuras 5A y 5B) El análisis de hibridación *in situ* muestra que los transcritos de Robo2 se expresan en glomérulos en desarrollo (flechas) en E16.5. Ampliación: 60X (Figura 5A) y 200X (Figura 5B). (Figuras 5C-5F) Los estudios de inmunohistoquímica (IHC) revelan que Robo2 se expresa durante el desarrollo de glomérulos desde E14.5 hasta E17.5. Ampliación: 600X. (Figura 5G) IHC muestra que Robo2 se expresa específicamente en glomérulos de ratones adultos a las 5 semanas de edad (Figura 5G). DAPI marca los núcleos celulares en el riñón. Ampliación: 400X. (Figura 5H) Las tinciones de localización conjunta de IHC de riñón de 5 semanas muestran que Robo2 se expresa conjuntamente en el glomérulo con el marcador de podocitos Wt1. Ampliación: 600X. (Figuras 5I-5K) Robo2 y WT1 se expresan conjuntamente en el glomérulo del ratón en E16.5. Ampliación: 600X. (Figuras 5L y 5M) Las tinciones de localización conjunta de IHC de riñón de 5 semanas muestran que Robo2 se expresa conjuntamente en el glomérulo con el marcador de células mesangiales Pdgfrb (Figura 5L) y el marcador de células endoteliales Pecam1 (Figura 5M). Ampliación: 600X.

Las Figuras 6A-6F' demuestran que Robo2 interactúa con Nck y forma un complejo con nefrina, que se ve reforzado por la estimulación con Slit2. (Figura 6A) Co-IP de Robo2 y nefrina con Nck endógeno. Robo2, nefrina y Fyn se expresan en células HEK y se estimulan con Slit2. El Nck endógeno está inmunoprecipitado por un anticuerpo anti-Nck. El ratón IgG se utiliza como control. La formación de complejos con nefrina se ve reforzada por la expresión Slit2 y d Fyn. (Figuras 6B y 6C) Slit2 se expresa en los glomérulos de ratones recién nacidos mediante tinción con inmunoperoxidasa (Figura 6B) y se expresa conjuntamente en el glomérulo con el marcador de podocitos Sinaptopodina (Figura 6C). Ampliación: 600X. (Figuras 6D y 6D') CD16/7-NCD se expresa conjuntamente con Robo2 en células HEK en presencia de Slit2, se trata con anticuerpo anti-CD16 y anticuerpo anti-IgG conjugado con rodamina, luego se fija y se tiñe con anticuerpos anti-Robo2. Las agrupaciones de CD16/7-NCD se localizan conjuntamente con Robo2 (Figura 6D) pero no se observa localización conjunta en las agrupaciones CD16/7-HA de control (Figura 6D'). Barra de escala: 5  $\mu$ m. NCD: dominio citoplasmático de nefrina. (Figuras 6E y 6E') La eliminación del dominio de unión a Nck (NBD) de Robo2 afecta su localización conjunta con CD16/7-NCD en presencia de Slit2. Las agrupaciones de CD16/7-NCD se localizan conjuntamente con Robo2 (Figura 6E), pero no se observa localización conjunta en agrupaciones de Robo2-  $\Delta$ NBD (Figura 6E'). Barra de escala: 5  $\mu$ m. (Figuras 6F y 6F') La estimulación con Slit2 mejora la localización conjunta de CD16/7-NCD y Robo2 en células HEK. Las agrupaciones CD16/7-NCD se localizan

conjuntamente con Robo2 en presencia de Slit2 (Figura 6F) pero no con medio acondicionado de control (Figura 6F'). Barra de escala: 5  $\mu$ m.

Las Figuras 7A-7C demuestran que la eliminación del dominio de unión a Nck de Robo2 compromete la inhibición de Slit2-Robo2 en la polimerización de actina inducida por nefrina. (Figura 7A) CD16/7-NCD y Robo2 se expresan conjuntamente en células HEK, agrupadas con anticuerpo anti-CD16 y anticuerpo anti-IgG conjugado con rodamina en presencia de medio acondicionado con Slit2 (Slit2) o medio condicionado de control (CTL). Las células se fijaron y se tiñeron con faloidina conjugada con FITC para revelar las fibras de F-actina. Se examinaron agrupaciones de CD16/7-NCD y fibras de F-actina usando microscopía confocal. Barra de escala, 5  $\mu$ m. NCD, dominio citoplasmático de nefrina. (Figura 7B) CD16/7-NCD y Robo2- $\Delta$ NBD se expresaron conjuntamente en células HEK. Barra de escala, 5  $\mu$ m. NBD, dominio de unión a Nck. (Figura 7C) Se cuantificó el porcentaje de células con colas de F-actina sobre células totales con agrupaciones de CD16/7-NCD en cada grupo. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM, \*p = 1,436x 10<sup>-5</sup>, \*\* p = 6,32x 10<sup>-5</sup>, n = 5, ANOVA.

Las Figuras 8A-8Z demuestran fenotipo glomerular en ratones nulos homocigotos de *Robo2*, con desactivación específica de podocitos de Robo2, desactivados dobles de *Robo2* y *Nphs1*, y un modelo propuesto de señalización de Robo2-Nefrina. (Figuras 8A-8F) Análisis por microscopía electrónica de transmisión de la ultraestructura glomerular en riñones de ratones mutantes *Robo2*<sup>del5/del5</sup> recién nacidos (NB). (Figuras 8A, 8C, 8E) Ultraestructura glomerular de un ratón control heterocigótico *Robo2* recién nacido con aumentos bajos (Figura 8A, 2.200X), medios (Figura 8C, 15.500X) y altos (Figura 8E, 52.000X). (Figuras 8B, 8D, 8F) Ultraestructura glomerular de un ratón mutante recién nacido homocigoto *Robo2* (-/-) (es decir, *Robo2*<sup>del5/del5</sup>) con amplificaciones baja (Figura 8B), media (Figura 8D) y alta (Figura 8F). Las flechas indican el desplazamiento focal del proceso del pie. Abreviaturas: gc: capilar glomerular; us: espacio urinario; GBM: membrana basal glomerular. (Figuras 8G-8N) Patrones anormales del proceso del pie de podocitos en ratones con desactivación específica de podocitos de Robo2. (Figuras 8G-8J) Imágenes representativas de microscopía electrónica de barrido de glomérulos de ratones de un mes de edad con desactivación específica de podocitos de *Robo2*<sup>del5/flox</sup>; *Nphs2-Cre*<sup>+</sup> y ratones de control *Robo2*<sup>del5/flox</sup> de la misma edad. Se encontraron irregularidades leves de los procesos base de podocitos de interdigitación en un ratón de un mes de edad con desactivación específica de podocito de *Robo2* (Figuras 8K y 8N). A los siete meses de edad, los ratones con desactivación específica para podocitos de Robo2 desarrollaron procesos base marcadamente irregulares (Figuras 8L y 8N). Barras de escala: 10  $\mu$ m (Figuras 8G, 8H, 8K, 8L con una amplificación de 2.000x) y 2  $\mu$ m (Figuras 8I, 8J, 8M, 8N con una amplificación de 13.000x). (Figuras 8O-8T) Morfología glomerular en ratones con desactivación específica de podocito de *Robo2*. (Figuras 8O-8R) La tinción periódica con ácido de Schiff (PAS) mostró una expansión de la matriz mesangial en los glomérulos de ratones de 2 meses y 6 meses con desactivación específica de podocitos de Robo2 (Figuras 8P, 8R) en comparación con los controles de la misma edad (Figuras 8O, 8Q). (Figura 8S) El análisis cuantitativo de los glomérulos muestra la expansión de la matriz mesangial en ratones de 12 meses de edad con desactivación específica de podocitos de Robo2 en comparación con controles de tipo silvestre (WT) de la misma edad. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM, n = 5, \*p < 0,01. (T) La desactivación específica de podocitos de Robo2 no afecta el número de podocitos. Se identificaron células de podocitos usando tinción con WT-1. El número de podocitos por sección transversal glomerular se contó en 4 ratones de 1 año de edad con desactivación específica de podocitos de *Robo2*<sup>del5/flox</sup>; *Tg*<sup>*Nphs2-Cre*+</sup> (MU) en comparación con cuatro ratones de tipo silvestre (WT) de la misma edad. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM, p = 0,645, prueba t; mutante: n = 165 glomérulos; control: n = 166 glomérulos. (Figuras 8U-8Y) Fenotipo glomerular en ratones con desactivación doble de *Robo2* y *Nphs1*. (Figura 8U) La tinción con H&E muestra glomérulos con dilataciones características del espacio de Bowman (asteriscos) en un ratón recién nacido homocigoto único *Nphs1*<sup>-/-</sup>, 400x. (Figura 8V) Los glomérulos de un ratón recién nacido homocigoto único *Robo2*<sup>-/-</sup> muestran ausencia de dilataciones espaciales de Bowman; 400x. (Figura 8W) Los glomérulos de aspecto normal sin dilataciones espaciales de Bowman significativas (flechas) se muestran en un ratón recién nacido homocigótico doble *Robo2*<sup>-/-</sup>; *Nphs1*<sup>-/-</sup> que indica alivio del fenotipo glomerular *Nphs1*<sup>-/-</sup>; 400x. (Figura 8X) Tinción con H&E de riñón normal y glomérulos de un control de ratón recién nacido de tipo silvestre de edades similares; 400x. (Figura 8Y) La cuantificación de glomérulos con espacio de Bowman dilatado en ratones recién nacidos muestra una reducción significativa de los glomérulos con el fenotipo de dilatación característica del espacio de Bowman en homocigotos dobles para *Robo2*<sup>-/-</sup>; *Nphs1*<sup>-/-</sup> comparado con homocigotos sencillos para *Nphs1*<sup>-/-</sup> (*Robo2*<sup>-/-</sup>; *Nphs1*<sup>-/-</sup>). Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM, \*p < 0,01. (Figura 8Z) Un modelo de efectos inhibidores de señalización de Slit2-Robo2 en nefrina para influir en la estructura del proceso del pie de podocitos: Bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo, durante el desarrollo del proceso del pie), los dominios de tirosina intracelular fosforilada de nefrina (YDxV-p) reclutan a Nck a través de su interacción con el dominio SH2. Nck a su vez recluta reguladores del citoesqueleto a través de sus dominios SH3 para promover la polimerización de la actina. Slit2 se une a Robo2 para aumentar la interacción del dominio intracelular de Robo2 con los dominios SH3 de Nck, lo que evitaría la unión de Nck a los reguladores del citoesqueleto y daría como resultado una inhibición de la polimerización de actina inducida por nefrina. La polimerización de actina equilibrada se mantiene durante el desarrollo del podocito para una estructura normal del proceso del pie. En ausencia de señalización de Slit2-Robo2 (por ejemplo, cuando se inactiva *Robo2*), se pierden los efectos inhibidores de Robo2 sobre la polimerización inducida por nefrina. Los dominios SH3 de Nck son capaces de interactuar con los reguladores del citoesqueleto secuenciados abajo para aumentar la polimerización de la actina, lo que puede explicar la estructura alterada del proceso del pie del podocito en ratones mutantes *Robo2*. Abreviaturas: Ig: dominio de inmunoglobulina; FN3: dominio de fibronectina tipo 3; SH2: dominio del homólogo 2 de Src; SH3: dominio del homólogo 3 de Src; CC0, CC1, CC2, CC3: Región conservada citoplasmática 0, 1, 2, 3.

## Descripción detallada

Se ha demostrado previamente que Robo2 es el receptor de la superficie celular para la SLIT señal de guía de repulsión y está involucrado en la guía de axones y la migración neuronal en el sistema nervioso. La nefrina es una proteína del diafragma de hendidura del podocito que funciona en la barrera de filtración glomerular del riñón. En el presente documento se ha demostrado que Robo2 se expresa en la superficie basal de los podocitos, tal como los podocitos de ratón, y se localiza conjuntamente con nefrina. Los estudios bioquímicos indican que Robo2 forma un complejo con nefrina en el riñón a través de la proteína adaptadora Nck. En contraste con el papel de la nefrina que promueve la polimerización de actina, en el presente documento se demuestra que la señalización de Slit2-Robo2 inhibe la polimerización de actina inducida por nefrina. Por ejemplo, la cantidad de F-actina asociada con la nefrina aumenta en los ratones con desactivación de Robo2 que desarrollan una estructura alterada del proceso del pie del podocito y microalbuminuria. Los estudios de interacción genética revelan además que la pérdida de Robo2 alivia el fenotipo anormal de podocitos en ratones con nefrina nula. Los resultados proporcionados en este documento muestran que la señalización de Robo2 actúa como un regulador negativo sobre la nefrina para influir en la arquitectura del proceso del pie del podocito.

Además, se ha demostrado que un paciente con reflujo vesicoureteral (VUR) tiene una translocación cromosómica que interrumpe el gen ROBO2 y produce proteínas de fusión ROBO2 negativas dominantes que anulan la ruta de señalización de SLIT2-ROBO2. Normalmente, VUR es una enfermedad caracterizada por el flujo retrógrado de orina desde la vejiga hacia los uréteres y el riñón, y los pacientes con VUR pueden presentar nefropatía por reflujo, una afección que se manifiesta con proteinuria severa. Se ha demostrado que las proteínas de fusión ROBO2 dominantes negativas producidas por un paciente con VUR bloquean la ruta de señalización de SLIT2-ROBO2 y protegen al paciente de la nefropatía por reflujo y la proteinuria, lo que confirma y apoya aún más los resultados de los inventores en modelos animales del valor terapéutico del direccionamiento de la ruta de señalización SLIT2-ROBO2 para el tratamiento de la enfermedad renal crónica.

En el riñón normal, la pared capilar glomerular trilaminar, compuesta por células endoteliales fenestradas, membrana basal y podocitos, restringe la permeabilidad a las proteínas plasmáticas. Los podocitos son células epiteliales especializadas que extienden los procesos primarios y secundarios para cubrir la superficie externa de la membrana basal glomerular. Los procesos secundarios de interdigitación ricos en actina, o procesos base, de podocitos vecinos crean hendiduras de filtración unidas por un diafragma de hendidura semiporoso que forma la barrera final a la permeación de proteínas. Mientras que las mutaciones genéticas de las proteínas de diafragma de hendidura de los podocitos, como la nefrina y otras, están asociadas con formas hereditarias de enfermedad renal proteinúrica (Tryggvason y colaboradores, 2006), se ha hecho evidente que las proteínas que forman y se asocian con el diafragma de hendidura son más que una simple barrera estructural. Estas proteínas forman una red de señalización equilibrada que puede influir en la estructura del proceso del pie de los podocitos y funcionar a través de la interacción con el citoesqueleto de F-actina (Faul y colaboradores, 2007; Jones y colaboradores, 2006; Verma y colaboradores, 2006).

Las proteínas de la familia Roundabout (Robo), Robo1, Robo2, Robo3 y Robo4 son receptores de la superficie celular para el ligando secretado Slit (Dickson y Gilestro, 2006). Slit1, Slit2 y Slit3 se encontraron originalmente como señales de guía repulsivas para la búsqueda de axones y las neuronas migratorias durante el desarrollo del sistema nervioso (Guan y Rao, 2003). La proteína transmembrana Robo contiene cinco motivos de Ig y tres repeticiones de fibronectina tipo III (FNIII) en su dominio extracelular (Dickson y Gilestro, 2006). Si bien ambos motivos de inmunoglobulina (Ig) 1 y 2 interactúan con Slit, el primer motivo de Ig1 de Robo es el sitio de unión principal para Slit (Dickson y Gilestro, 2006). El dominio intracelular de Robo tiene cuatro secuencias conservadas citoplasmáticas (CC) denominadas CC0, CC1, CC2 y CC3 (Bashaw y colaboradores, 2000; Kidd y colaboradores, 1998; Morlot y colaboradores, 2007; Zallen y colaboradores, 1998). CC0 y CC1 contienen tirosina, mientras que CC2 y CC3 son estiramientos ricos en prolina. La actividad repulsiva de la señalización de Slit-Robo inhibe la polimerización de la actina (Guan y Rao, 2003) o induce la despolimerización de la F-actina (Piper y colaboradores, 2006).

La señalización Slit-Robo también desempeña funciones cruciales durante la inducción renal temprana y el crecimiento de las yemas uretrales. Los mutantes de ratón que carecen de *Slit2* o *Robo2* desarrollan brotes uretrales supernumerarios, lo que conduce a un amplio espectro de fenotipo del tracto urinario, que incluye riñones dúplex, uniones ureterovesicales anormales e hidronefrosis (Grieshammer y colaboradores, 2004; Lu y colaboradores, 2007). La interrupción de *ROBO2* en humanos causa anomalías congénitas de los riñones y vías urinarias (CAKUT), y se han identificado mutaciones puntuales de *ROBO2* en pacientes con reflujo vesicoureteral (VUR) (Lu y colaboradores, 2007). Nuestro estudio reciente demuestra que *Robo2* es crucial para la formación de un orificio ureteral normal y para el mantenimiento de un mecanismo efectivo contra el reflujo (Wang y colaboradores, 2011).

En este documento se demuestra que Robo2 es una nueva proteína de podocitos expresada en la superficie basal de los podocitos glomerulares en el riñón y se localiza conjuntamente con nefrina y podocina. Robo2 interactúa directamente con los dominios SH3 de la proteína adaptadora Nck y forma un complejo con nefrina. Mientras que los ratones con desactivación de Robo2 desarrollaron procesos de base alterados de podocitos, la pérdida de Robo2 alivia las anomalías estructurales del proceso del pie que se observan en ratones nulos para nefrina. Estos resultados descritos en el presente documento indican que la señalización de Robo2 actúa como un regulador negativo en la señalización de nefrina para influir en la arquitectura del proceso del pie de podocitos. Además, como se demuestra en este documento, se ha descubierto que las proteínas de fusión ROBO2 negativas dominantes producidas por un

paciente bloquean la ruta de señalización SLIT2-ROBO2 y protegen al paciente de la nefropatía por reflujo y proteinuria, lo que confirma y respalda los resultados descritos en este documento en modelos animales del valor terapéutico del direccionamiento de la ruta de señalización SLIT2-ROBO2 para el tratamiento de la enfermedad renal crónica.

- 5 Por consiguiente, en algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para el tratamiento de la enfermedad renal crónica en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de una enfermedad renal crónica una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un inhibidor de la ruta de señalización SLIT2-ROBO2.

- 10 También se proporcionan en este documento, en algunos aspectos, métodos para la reducción de la proteinuria en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de proteinuria una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un inhibidor de la ruta de señalización SLIT2-ROBO2

- 15 En otros aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para prevenir enfermedades renales o promover la profilaxis de enfermedades renales en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un inhibidor de la ruta de señalización SLIT2-ROBO2 para prevenir o promover la profilaxis de la enfermedad renal en el sujeto.

También se proporcionan en este documento, en algunos aspectos, métodos para mitigar los efectos de la enfermedad renal, reducir la gravedad de la enfermedad renal, reducir la probabilidad de desarrollar enfermedad renal y/o ralentizar la progresión de la enfermedad renal en un sujeto que la necesite.

Como se usa en este documento, "ROBO2" se refiere al polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de:

- 20 MARRHERVTRRMWTWAPGLLMMTVVFWGHQNGQGQGSRLRQEDFPPRIVEHPSDVIVSK  
GEPTTLNCKAEGRPPTIEWYKDERVETDKDDPRSHRMLLPSSGLFFLRIVHGRRSKPDEGS  
YVCVARNYLGEAVSRNASLEVALLRDDFRQNPTDVVVAAGEPAILECQPPRGHPEPTIYWKK  
25 DKVRIDDKEERISIRGGKLMISNTRKSDAGMYTCVGTNMVGERDSDPAELTVFERPTFLRRPI  
NQVVLEEEAVEFRQVQGDQPPTVRWKKDDADLPGRYDIKDDYTLRIKKTMTSTDEGTYM  
CIAENRVGKMEASATLTVRAPPQFVVRPRDQIVAQGRVTFTPCETKGNPQPAVFWQKEGSQ  
NLLFPNQPPQNSRCSVSPTGDLTITNIQRSDAGYYICQALTVAGSILAKAQLEVTDVLTDRPP  
PIILQGPANQTLAVDGTALLKCKATGDPLPVISWLKEGFTFPGRDPRATIQEQGTLQIKNLRIS  
DTGTYTCVATSSSGETSWSAVLDTVESGATISKNYDLSDLPGPSKPKQVTDVTKNSVTLWSQ  
PGTPTGLPASAYIIIEAFSQQSVNSWQTVANHVKTLLTYVRGLRPNTIYLFMVRAINPQGLSDPS  
30 PMSDPVTRQDISPPAQGVDRHQVQKELGDLVRLHNPVLTPTTVQVTVTVDRQPFIQGY  
RVMYRQTSGLQATSSWQNLDAKVPTERSAVLVNLKKGVTYIEIKVRPYFNEFQGMDSSEKTV  
RTTEEAPSAPPQSVTLTVGSYNSTSSISVSWDPPPPDHQNGIIQYKIWCLGNETRFHINKTVD  
AAIRSVIIGGLFPGIYRVEVAASTSAGVGKSEPQPIIIGRRNEVVITENNNSITEQITDVVKQP  
AFIAGIGGACWVILMGFSIWLYWRRKKRKLGSNYAVTFQRGDGGLMSGSRPGLLNAGDPS  
35 YPWLADSWPATSLPVNNSNSGPNIEGNFRGVDLPPVPGQGDKTATMLSDGAIYSSIDFTTKT  
SYNSSSQITQATPYATTQILHSNSIHELAVDLPDPQWKSSIQKTDLMGFGYSLPDQNKGNNG  
GKGGKKNKNGSTWANNVPLPPPVQPLPGTELEHYAVEQNGYDSDSWCOPPLPVQTYLHQGLEDELEEDDDRVPTPPVGRVASSPAISFGQQSTATLTPSPREEMQPMQLAHLD  
ELTRAYQFDIAKQTVHISNNQPPQPPVPLGYVSGALISDLETVDVADDDADDEEEALEIPRP  
40 LRALDQTPGSSMDNLDSSVTGKAFTSSQRPRPTSPFSTDSNTSAALSQSQRPRPTKKHKGGRM  
DQQPALPHRRREGMTDEEALVPYSKPSFSPGGHSSSGTASSKGSTGPRKTEVLRAGHQNAS  
DLLDIGYMGNSNSQGQFTGEL(isoforma ROBO2a del homólogo 2 Roundabout de Homo sapiens; SEQ ID NO: 1),  
como se describe por ejemplo, por NP\_001122401.1 y se codifica por NM\_001128929.2 (SEQ ID NO: 2); o  
45 MSLLMFTQQLLCGFLYVRVDGSLRQEDFPPRIVEHPSDVIVSKGEPTTLNCKAEGRPPTIE  
WYKDERVETDKDDPRSHRMLLPSSGLFFLRIVHGRRSKPDEGSYVCVARNYLGEAVSRNA  
SLEVALLRDDFRQNPTDVVVAAGEPAILECQPPRGHPEPTIYWKKDKVRIDDKEERISIRGGK  
LMISNTRKSDAGMYTCVGTNMVGERDSDPAELTVFERPTFLRRPINQVVLEEEAVEFRQVQ  
GDQPPTVRWKKDDADLPGRYDIKDDYTLRIKKTMTSTDEGTYMCIAENRVGKMEASATLTV  
50 RAPPQFVVRPRDQIVAQGRVTFTPCETKGNPQPAVFWQKEGSQNLFPNQPPQNSRCSVS  
TGDLTITNIQRSDAGYYICQALTVAGSILAKAQLEVTDVLTDRPPPIILQGPANQTLAVDGTAL  
LKCKATGDPLPVISWLKEGFTFPGRDPRATIQEQGTLQIKNLRISDTGTYTCVATSSSGETSWS  
AVLDTVESGATISKNYDLSDLPGPSKPKQVTDVTKNSVTLWSQPGTPTGLPASAYIIIEAFSQQSV  
SNSWQTVANHVKTLLTYVRGLRPNTIYLFMVRAINPQGLSDPSPMSDPVTRQDISPPAQGV  
55 HRQVQKELGDLVRLHNPVLTPTTVQVTVTVDRQPFIQGYRVMYRQTSGLQATSSWQNL  
LDAKVPTERSAVLVNLKKGVTYIEIKVRPYFNEFQGMDSSEKTVRTTEEAPSAPPQSVTLTV  
GSYNSTSSISVSWDPPPPDHQNGIIQYKIWCLGNETRFHINKTVDAAIRSVIIGGLFPGIYRVE  
VAASTSAGVGKSEPQPIIIGRRNEVVITENNNSITEQITDVVKQPAFIAGIGGACWVILMGFSI  
WLYWRRKKRKLGSNYAVTFQRGDGGLMSGSRPGLLNAGDPSYPWLADSWPATSLPVNNS  
60 NSGPNEIGNFRGVDLPPVPGQGDKTATMLSDGAIYSSIDFTTKTSYNSSSQITQATPYATTQI  
LHSNSIHELAVDLPDPQWKSSIQKTDLMGFGYSLPDQNKGNNGGKGGKKNKNSKPKQ  
NNGSTWANNVPLPPPVQPLPGTELEHYAVEQNGYDSDSWCOPPLPVQTYLHQGLEDELEED

DDRVPTPPVRGVASSPAISFGQQSTATLTSPREEMQPMLQAHLDLTRYQFDIAKQTHWHIQ  
SNNQPPQPPVPLGYVSGALISDLETDVADDDADDEEEALEIPRPLRALDQTPGSSMDNLDSS  
VTGKAFSTSSQRPRPTSPFSTDSNTSAALSQSQRPRPTKKHKGGRRMDQQPALPHRRGMTDEE  
ALVPYSKPSFPSPGGHSSSGTASSKGSTGPRKTEVLRAGHQNRNASDLLDIGYMGSNSQGGFTG

5 EL (isoforma ROBO2b del homólogo 2 de Roundabout de Homo sapiens; **SEQ ID NO: 3**), como se describe en, por ejemplo, NP\_002933.1 y codificado por NM\_002942.4 (**SEQ ID NO: 4**), junto con cualquiera de las variantes de empalme alélicas de origen natural y formas procesadas de las mismas. Típicamente, ROBO2 se refiere a ROBO2 humano. El gen ROBO2 se conserva en chimpancé, mono Rhesus, perro, vaca, ratón, rata, pollo, pez cebra, mosca de la fruta, mosquito y *C. elegans*. Los residuos específicos de ROBO2 se pueden denominar, por ejemplo, "ROBO2(30)".

10 Los dominios específicos de ROBO2 también pueden ser denominados por dicha nomenclatura. El dominio N-terminal o "extracelular de ROBO2", que comprende los cinco motivos de inmunoglobulina y las tres repeticiones de fibronectina tipo III (FNIII), puede denominarse ROBO2 (46-848) de la SEQ ID NO: 1 o ROBO2 (30-832) de la SEQ ID NO: 3, por ejemplo. Los motivos de inmunoglobulina (Ig) 1 y 2 que interactúan con Slit2, o el "dominio de unión a SLIT de Ig" pueden denominarse ROBO2 (46-145) y ROBO2 (151-237) respectivamente de la SEQ ID NO: 1, y ROBO2 (30-129) y ROBO2 (135-221) respectivamente de la SEQ ID NO: 3. De manera similar, el "dominio intracelular" que comprende el "dominio de unión intracelular a Nck", que comprende los cuatro motivos intracelulares ricos en prolina, descritos en este documento, pueden denominarse como ROBO2 (881-1378) de la SEQ ID NO: 3.

20 Como se usa en el presente documento, los términos "inhibidor de ROBO2", "antagonista de ROBO2", "agente inhibidor de ROBO2" y "agente antagonista de ROBO2" se refieren a una molécula o agente que bloquea, inhibe, reduce o interfiere significativamente con la actividad biológica de ROBO2 (mamífero, tal como humano, ROBO2) *in vitro*, *in situ* y/o *in vivo*, incluida la actividad de rutas posteriores mediadas por la señalización de ROBO2, tales como, por ejemplo, la interacción de ROBO2 con la proteína adaptadora Nck y/o la formación de complejo con nefrina, inhibición mediada por SLIT2-ROBO-2 de polimerización de actina mediada por nefrina y/o provocación de una respuesta celular a ROBO2. El término "agente" como se usa en el presente documento en referencia a un inhibidor de ROBO2 significa cualquier compuesto o sustancia tal como, pero sin limitarse a, una molécula pequeña, ácido nucleico, polipéptido, péptido, fármaco, ión, etc. Un "agente" puede ser cualquier sustancia química, entidad o fracción, incluyendo, sin limitación, entidades proteicas y no proteicas sintéticas y naturales. En algunas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, un agente es un ácido nucleico, un análogo de ácido nucleico, una proteína, un anticuerpo, un péptido, un aptámero, un oligómero de ácidos nucleicos, un aminoácido o un carbohidrato, e incluye, sin limitación, proteínas, oligonucleótidos, ribozimas, ADNzimas, glicoproteínas, ARN antisentido, ARN<sub>i</sub>, lipoproteínas, aptámeros y modificaciones y combinaciones de los mismos, etc. Se puede saber que los compuestos para uso en las composiciones terapéuticas y los métodos descritos en este documento tienen una actividad deseada y/o propiedad, o puede seleccionarse de una biblioteca de diversos compuestos, utilizando métodos de cribado conocidos por un experto en la técnica.

35 Los ejemplos de inhibidores de ROBO2 contemplados para uso en los diversos aspectos y realizaciones descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-ROBO2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a ROBO2; moléculas antisentido dirigidas a un ácido nucleico que codifica ROBO2 (por ejemplo, ROBO2a o ROBO2b o ambos); moléculas ARN de interferencia corta ("ARN<sub>i</sub>") dirigidas a un ácido nucleico que codifica ROBO2 (por ejemplo, ROBO2a o ROBO2b o ambos); aptámeros de ARN o ADN que se unen a ROBO2, e inhiben/reducen/bloquean la señalización mediada por ROBO2; análogos estructurales de ROBO2; y proteínas ROBO2 solubles, polipéptidos inhibidores, por ejemplo, polipéptidos negativos dominantes, o polipéptidos de fusión de los mismos. En algunas realizaciones de estos aspectos y todos los aspectos descritos en el presente documento, un inhibidor de ROBO2 (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) se une (interactúa físicamente con) ROBO2, se dirige secuencialmente abajo de la señalización de ROBO2 y/o inhibe (reduce) la síntesis producción o liberación de ROBO2. En algunas realizaciones de estos aspectos y todos los aspectos descritos en el presente documento, un inhibidor de ROBO2 se une y evita su unión a un ligando de proteína SLIT, tal como SLIT2. En algunas realizaciones de estos aspectos y todos los aspectos descritos en el presente documento, un inhibidor de ROBO2 reduce o elimina específicamente la expresión (es decir, la transcripción o traducción) de una o más isoformas de ROBO2.

50 Como se usa en el presente documento, un inhibidor o antagonista de ROBO2 tiene la capacidad de reducir la actividad y/o expresión de ROBO2 en una célula (por ejemplo, podocitos) en al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 15%, en al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99%, o más, en relación con la actividad o nivel de expresión en ausencia del inhibidor de ROBO2.

60 Por consiguiente, en algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el inhibidor de ROBO2 inhibe la transducción de señales mediada por ROBO2. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el inhibidor de ROBO2 se dirige a la interacción de ROBO2 con la proteína adaptadora Nck y/o la formación de complejos con nefrina, la inhibición mediada por SLIT2-ROBO-2 de la polimerización de actina mediada por nefrina y/o la provocación de una respuesta celular a ROBO2.

En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, los sitios de unión de los inhibidores de ROBO2, tales como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, se dirigen contra un sitio de interacción de ligando de ROBO2, tal como un sitio de interacción de ligando de SLIT2. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, los sitios de unión del inhibidor de ROBO2, tales como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, se dirigen contra un sitio de interacción del adaptador de ROBO2 tal como un sitio de interacción Nck o el dominio de unión intracelular a NCK que comprende los cuatro motivos intracelulares ricos en prolina de ROBO2. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, los sitios de unión de los inhibidores de ROBO2 se dirigen contra un sitio en un objetivo en la proximidad del sitio de interacción del ligando, con el fin de proporcionar un impedimento estérico para la interacción del receptor (por ejemplo, ROBO2) con su ligando (por ejemplo, SLIT2). Al unirse a un sitio de interacción del ligando de ROBO2, un inhibidor de ROBO2 descrito en este documento puede reducir o inhibir la actividad o expresión de ROBO2, y las consecuencias de señalización de ROBO2 secuencia abajo (por ejemplo, la interacción de ROBO2 con la proteína adaptadora Nck y/o la formación de complejos con nefrina, inhibición mediada por SLIT2-ROBO-2 de la polimerización de la actina mediada por nefrina, y/o provocación de una respuesta celular a ROBO2). Por ejemplo, en algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, los sitios de unión de los inhibidores de ROBO2 bloquean o se dirigen al menos a la Ig1, y preferiblemente a los sitios de Ig1 e Ig2, en ROBO2, es decir, ROBO2 (46-145) y ROBO2 (151-237) respectivamente de la SEQ ID NO: 1, y ROBO2 (30-129) y ROBO2 (135-221) respectivamente de la SEQ ID NO: 3, por ejemplo. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, los sitios de unión de los inhibidores de ROBO2 bloquean o se dirigen al dominio intracelular de ROBO2 que comprende el dominio de unión intracelular a Nck, es decir, ROBO2 (881-1378) de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, los sitios de unión de los inhibidores de ROBO2 bloquean o se dirigen al dominio de unión intracelular a Nck de ROBO2 que comprende los cuatro motivos intracelulares ricos en prolina de ROBO2. Esto se puede lograr mediante una variedad de medios bien conocidos en la técnica, tales como anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, ARN inhibidores, etc., y como se describe en el presente documento.

Por consiguiente, en algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el inhibidor de ROBO2 es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une selectivamente o interactúa físicamente con ROBO2. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el inhibidor de ROBO2 es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a ROBO2 e inhibe y/o bloquea y/o evita la interacción con Nck y/o la formación de complejos con nefrina. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une al dominio de unión a SLIT de Ig de ROBO2. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une al dominio de unión a SLIT de Ig1 de ROBO2 o ambos dominios de unión a SLIT de Ig1 e Ig2 de ROBO2, es decir, ROBO2 (46-145) y ROBO2 (151-237) respectivamente de la SEQ ID NO: 1, y ROBO2 (30-129) y ROBO2 (135-221) respectivamente de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el anticuerpo o antígeno fragmento de unión del mismo se une o bloquea el dominio intracelular de ROBO2, es decir, ROBO2 (881-1378) de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma se une o bloquea el dominio de unión intracelular a Nck que comprende los cuatro motivos intracelulares ricos en prolina de ROBO2.

Los anticuerpos específicos para o que se unen selectivamente a ROBO2, adecuados para uso en las composiciones y para practicar los métodos descritos en el presente documento son preferiblemente monoclonales, y pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, que comprenden anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab y/o fragmentos de unión de cualquiera de los anteriores. Los anticuerpos también se refieren a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen antígeno o sitios de unión al objetivo o "fragmentos de unión a antígenos". Las moléculas de inmunoglobulina descritas en este documento 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 subclases de moléculas de inmunoglobulina, como es entendido por un experto en la técnica.

Por consiguiente, en algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, un inhibidor de ROBO2 como se describe en este documento es un anticuerpo monoclonal anti-ROBO2 o un fragmento de unión a antígeno.

En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, un inhibidor de ROBO2 como se describe en este documento es un fragmento de anticuerpo de ROBO2 o un fragmento de unión a antígeno. Los términos "fragmento de anticuerpo", "fragmento de unión a antígeno" y "derivado de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refieren a un fragmento de proteína que comprende solo una porción de un anticuerpo intacto, que generalmente incluye un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, por lo tanto, retiene la capacidad de unirse al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluidos en los términos fragmento de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene dominios V<sub>L</sub>, C<sub>L</sub>, V<sub>H</sub> y C<sub>H</sub>1; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más residuos de cisteína en el extremo terminal C del dominio C<sub>H</sub>1; (iii) el fragmento Fd que tiene dominios V<sub>H</sub> y C<sub>H</sub>1; (iv) el fragmento Fd' que tiene dominios V<sub>H</sub> y C<sub>H</sub>1 y uno o más

residuos de cisteína en el extremo terminal C del dominio C<sub>H</sub>1; (v) el fragmento F<sub>v</sub> que tiene los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de un solo brazo de un anticuerpo; (vi) un fragmento de dAb (Ward y colaboradores, Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio V<sub>H</sub> o un dominio V<sub>L</sub>; (vii) regiones CDR aisladas; (viii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab' unidos por un puente disulfuro en la región de la bisagra; (ix) moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo, F<sub>v</sub> de cadena sencilla; scFv) (Bird y colaboradores, Science 242: 423-426 (1988); y Huston y colaboradores, PNAS (EE.UU) 85: 5879-5883 (1988)); (x) "diacuerpos" con dos sitios de unión a antígeno, que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) en la misma cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, los documento EP 404.097; WO 93/11161; Hollinger y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU, 90: 6444-6448 (1993)); (xi) "anticuerpos lineales" que comprenden un par de segmentos F<sub>d</sub> en tándem (V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata y colaboradores, Protein Eng. 8 (10): 1057-1062 (1995) y la patente de Estados Unidos N° 5.641.870); y versiones modificadas de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, modificadas por la unión covalente de polialquilenglicol (por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol) u otro polímero adecuado).

En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, un inhibidor o antagonista de ROBO2 es un derivado de anticuerpo quimérico de un anticuerpo antagonista de ROBO2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

El inhibidor o anticuerpos antagonistas de ROBO2 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento también pueden ser, en algunas realizaciones, un derivado de anticuerpo humanizado.

En algunas realizaciones, el inhibidor o anticuerpos antagonistas de ROBO2 y sus fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documentos incluyen derivados que se modifican, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, siempre que la unión covalente no impida que el anticuerpo se una al antígeno objetivo, por ejemplo, ROBO2.

En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, se usan anticuerpos completamente humanos, que son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos.

En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el inhibidor de ROBO2 comprende al menos una molécula antisentido capaz de bloquear o disminuir la expresión de un ROBO2 funcional particular dirigiéndose a los ácidos nucleicos que codifican ROBO2, por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 o ambos, o dominios relevantes de los mismos. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, al menos una molécula antisentido se dirige a los ácidos nucleicos que codifican el dominio de unión a SLIT de Ig de ROBO2. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, al menos una molécula antisentido se dirige a los ácidos nucleicos que codifican el dominio de unión a SLIT de Ig1 de ROBO2 o ambos dominios de unión a SLIT de Ig1 e Ig2 de ROBO2. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, al menos una molécula antisentido se dirige a los ácidos nucleicos que codifican el dominio intracelular de ROBO2. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, al menos una molécula antisentido se dirige a ácidos nucleicos que codifican el dominio de unión intracelular a Nck que comprende los cuatro motivos intracelulares ricos en prolina de ROBO2. Los expertos en la técnica conocen métodos para la preparación de moléculas de oligonucleótidos antisentido que se unirán específicamente al ARNm de ROBO2 sin reaccionar de forma cruzada con otros polinucleótidos. Los ejemplos de sitios de direccionamiento incluyen, pero no se limitan a, el codón de iniciación, las regiones reguladoras 5', incluidos los promotores o potenciadores, la secuencia codificadora, incluidas las regiones de consenso conservadas, y la región no traducida 3'. En alguna realización de estos aspectos y todos los aspectos descritos en el presente documento, los oligonucleótidos antisentido tienen una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos, una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos, una longitud de aproximadamente 18 a aproximadamente 25 nucleótidos, o más. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido comprenden además modificaciones químicas para aumentar la resistencia a la nucleasa y similares, tales como, por ejemplo, enlaces fosforotioato y modificaciones de 2'-O-azúcar conocidas por los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el inhibidor de ROBO2 comprende al menos una molécula ARN de interferencia corto (ARNic) capaz de bloquear o disminuir la expresión de ROBO2 funcional dirigiéndose a los ácidos nucleicos que codifican a ambas isoformas de ROBO2, por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, o dominios relevantes de las mismas. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, al menos una molécula de ARNic se dirige a los ácidos nucleicos que codifican el dominio de unión a SLIT de Ig de ROBO2. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, la al menos una molécula de ARNic se dirige a los ácidos nucleicos que codifican el dominio de unión a SLIT de Ig de ROBO2 o ambos dominios de unión a SLIT de Ig1 e Ig2 de ROBO2. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, al menos una molécula de ARNic se dirige a los ácidos nucleicos que codifican el dominio intracelular de ROBO2. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, al menos una molécula de ARNic se dirige a ácidos nucleicos que codifican el dominio de unión intracelular a Nck que comprende los cuatro motivos intracelulares ricos en prolina de ROBO2. Es rutina preparar moléculas de ARNic que se dirijan específicamente al ARNm de ROBO2 sin reaccionar de forma cruzada con otros polinucleótidos. Las moléculas de ARNic para uso en las composiciones y

métodos descritos en el presente documento pueden generarse por métodos conocidos en la técnica, tales como por ejemplo la síntesis típica de oligonucleótidos en fase sólida, y con frecuencia incorporarán modificaciones químicas para aumentar la vida media y/o la eficacia del agente de ARNic, y/o para permitir una formulación de suministro más robusta. Alternativamente, las moléculas de ARNic se administran utilizando un vector que codifica un casete de expresión para la transcripción intracelular de ARNic.

En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el inhibidor de ROBO2 es un aptámero de ARN o ADN que se une a una o más isoformas de ROBO2. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, un inhibidor o antagonista de ROBO2 es un aptámero de ARN o ADN que se une o interactúa físicamente con ROBO2 y bloquea las interacciones entre ROBO2 y un ligando o molécula adaptadora, por ejemplo, SLIT2 o Nck, respectivamente. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, un inhibidor o antagonista de ROBO2 es un aptámero de ARN o ADN que se une o interactúa físicamente con ROBO2, y reduce, impide o bloquea la señalización secuenciada abajo de ROBO2, tal como la inhibición SLIT2-ROBO2 mediada por la polimerización de actina mediada por nefrina y/o provocación de una respuesta celular a ROBO2. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el aptámero de ARN o ADN se une o interactúa físicamente con el dominio de unión a SLIT de Ig de ROBO2. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el aptámero de ARN o ADN se une a o interactúa físicamente con el dominio de unión a SLIT de Ig1 de ROBO2 o ambos dominios de unión a SLIT de Ig1 e Ig2 de ROBO2, es decir, ROBO2 (46-145) y ROBO2 (151-237) respectivamente de la SEQ ID NO: 1, y ROBO2 (30-129) y ROBO2 (135-221) respectivamente de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el aptámero de ARN o ADN se une o interactúa físicamente con el dominio intracelular de ROBO2, es decir, ROBO2 (881-1378) de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el aptámero de ARN o ADN se une o interactúa físicamente con o bloquea el dominio de unión intracelular a Nck que comprende los cuatro motivos intracelulares ricos en prolina de ROBO2.

En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el inhibidor de ROBO2 es un compuesto o agente de molécula pequeña que se dirige o se une a ROBO2, que incluye, entre otros, péptidos pequeños o moléculas similares a péptidos, péptidos solubles, y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos. Como se usa en el presente documento, el término "molécula pequeña" se refiere a un agente químico que puede incluir, entre otros, un péptido, un peptidomimético, un aminoácido, un análogo de aminoácido, un polinucleótido, un análogo de polinucleótido, un aptámero, un nucleótido, un análogo de nucleótido, un compuesto orgánico o inorgánico (por ejemplo, incluyendo compuestos heterorgánicos y organometálicos) que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5.000 gramos por mol, orgánicos o compuestos inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 500 gramos por mol, y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de tales compuestos. Los ejemplos de sitios de unión de moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, la porción de ROBO2 que se une a SLIT2 o al adaptador Nck, es decir, el dominio de unión a SLIT de Ig1 de ROBO2 o ambos dominios de unión a SLIT de Ig1 e Ig2 de ROBO2, el dominio intracelular de ROBO2 o el dominio de unión intracelular de Nck que comprende los cuatro motivos intracelulares ricos en prolina de ROBO2.

En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, un inhibidor o antagonista de ROBO2 comprende una pequeña molécula que se une a ROBO2 e inhibe la actividad biológica de ROBO2.

En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el inhibidor o antagonista de ROBO2 comprende al menos un análogo estructural de ROBO2, tal como un polipéptido de ROBO2 negativo dominante. El término análogos estructurales de ROBO2, como se usa en este documento, se refiere a compuestos que tienen una estructura tridimensional similar a la de ROBO2 y que se unen a SLIT2 y/o a Nck en condiciones fisiológicas *in vitro* o *in vivo*, en donde la unión inhibe al menos parcialmente la actividad biológica de ROBO2, tal como la inhibición mediada por SLIT2-ROBO2 de la polimerización de actina mediada por nefrina, y/o la provocación de una respuesta celular a ROBO2. Los análogos estructurales adecuados de ROBO2 se pueden diseñar y sintetizar a través del modelado molecular de la unión de ROBO2-SLIT2, por ejemplo. Los análogos estructurales de ROBO2 pueden ser monómeros, dímeros o multímeros de orden superior en cualquier combinación deseada de estructuras iguales o diferentes para obtener afinidades y efectos biológicos mejorados.

En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, un inhibidor o antagonista de ROBO2 comprende al menos un receptor soluble de ROBO2 o un polipéptido de fusión del mismo, tal como, por ejemplo, un polipéptido inhibidor de ROBO2. En algunas de tales realizaciones, el polipéptido inhibidor de ROBO2 es una proteína de fusión ROBO2 negativa dominante. En algunas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el polipéptido inhibidor de ROBO2 comprende el dominio extracelular de ROBO2, por ejemplo, el dominio de unión a SLIT de Ig1 de ROBO2 o ambos dominios de unión a SLIT de Ig1 e Ig2 de ROBO2, sin dominios de ROBO2 intracelulares.

Los inhibidores o antagonistas de ROBO2 para uso en las composiciones y métodos descritos en el presente documento pueden identificarse o caracterizarse usando métodos conocidos en la técnica, tales como ensayos de

unión proteína-proteína, ensayos de selección bioquímicos, inmunoensayos y ensayos basados en células, que son bien conocido en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en el presente documento en los Ejemplos.

Por ejemplo, para identificar una molécula que inhibe la interacción entre ROBO2 y su ligando, por ejemplo, SLIT2, se pueden usar los ensayos de unión. Por ejemplo, ROBO2 o SLIT se inmovilizan en una placa de microtitulación por unión covalente o no covalente. El ensayo se realiza agregando el componente no inmovilizado (ligando o receptor), que puede marcarse con una etiqueta detectable, al componente inmovilizado, en presencia o ausencia de un agente de prueba. Cuando se completa la reacción, los componentes que no reaccionan se eliminan y se detectan los complejos de unión. Si la formación de complejos de unión es inhibida por la presencia del agente de prueba, el agente de prueba puede considerarse un antagonista candidato que inhibe la unión entre ROBO2 y SLIT2, por ejemplo. Los ensayos basados en células o en membranas también se pueden usar para identificar los inhibidores de ROBO2. En otras realizaciones, al detectar y/o medir los niveles de expresión del gen ROBO2, se pueden probar las moléculas inhibidoras de ROBO2 que inhiben la expresión del gen ROBO2. La expresión del gen ROBO2 puede detectarse y/o medirse mediante una variedad de métodos, como RT-PCR en tiempo real, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ("ELISA"), transferencia Northern o citometría de flujo, y como sabe un experto habitual en el arte.

Dichos inhibidores de ROBO2 identificados pueden probarse adicionalmente utilizando modelos animales *in vivo* de la enfermedad renal crónica, como los modelos de lesión intersticial y glomerular (por ejemplo, modelos animales de nefritis lúpica, incluidos los ratones del híbrido NZB, (NZB x NZW) F1 (denominado NZB/W), y derivados congénicos de los mismos, cepas MRL/lpr y BXSB), modelos animales de envejecimiento (por ejemplo, ratas Sprague Dawley viejas y ratones C57BL/6 viejos); ratas espontáneamente hipertensas (SHR); ratas búfalo/mna, que son un modelo del síndrome nefrótico idiopático humano; ratas Munich Wistar Frömter (MWF), que son un modelo genético relacionado con un déficit congénito en el número de nefronas que está predispuesto al desarrollo de hipertensión y sensibilidad a la sal en la edad adulta; modelos genéticos específicos de podocitos primarios FSGS; modelos de ratones transgénicos de nefropatía asociada al VIH (HIVAN); modelos animales del síndrome de Alport, que comprenden mutaciones de las cadenas  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  o  $\alpha 5$  del colágeno de tipo IV (COL4A3, COL4A4 y COL4A5); modelos inducidos por el sistema inmunitario, tal como el modelo de nefritis Thy-1, que es un modelo experimental de rata de los modelos de glomerulonefritis mesangioproliferativa (MsPGN), modelos de membrana basal anti-glomerular (GBM); y modelos inducidos no inmunes.

Como se usa en este documento, con respecto a un inhibidor de ROBO2, "se une selectivamente" o "se une específicamente" o "específico para" se refiere a la capacidad de un inhibidor de ROBO2 como se describe en este documento, tal como, por ejemplo, un anticuerpo antagonista de ROBO2 o su fragmento de unión al antígeno ROBO2, para unirse a un objetivo, es decir, ROBO2, con un  $K_D$   $10^{-5}$  M (10.000 nM) o menos, por ejemplo,  $10^{-6}$  M o menos,  $10^{-7}$  M o menos,  $10^{-8}$  M o menos,  $10^{-9}$  M o menos,  $10^{-10}$  M o menos,  $10^{-11}$  M o menos, o  $10^{-12}$  M o menos. Por ejemplo, si un inhibidor/antagonista de ROBO2 descrito en el presente documento se une a ROBO2 con un  $K_D$  de  $10^{-5}$  M o inferior, pero no a una molécula relacionada, tal como, por ejemplo, otros miembros de la familia ROBO, se dice que el agente se une específicamente a ROBO2. La unión específica puede estar influida, por ejemplo, por la afinidad y avidéz de, por ejemplo, el inhibidor/anticuerpo antagonista de ROBO2 o su fragmento de unión a antígeno de los mismos y la concentración de agente polipeptídico. El experto en la materia puede determinar las condiciones apropiadas bajo las cuales los agentes polipeptídicos descritos en el presente documento se unen selectivamente a los objetivos utilizando cualquier método adecuado, como la titulación de un agente polipeptídico en un ensayo de unión celular adecuado.

Con respecto a los métodos para tratar la enfermedad renal crónica mediante la inhibición de la actividad de ROBO2, el término "enfermedad renal crónica" o CKD se refiere a enfermedades renales que empeoran lenta y progresivamente con el tiempo debido a la pérdida progresiva de nefronas y la consiguiente pérdida de la función renal. En las primeras etapas, puede no haber síntomas. La pérdida de la función suele tardar meses o años en ocurrir. Puede ser tan lento que los síntomas no aparecen hasta que la función renal es menos de una décima parte de lo normal. La etapa final de la enfermedad renal crónica se llama enfermedad renal en etapa terminal (ESRD). En esta etapa, los riñones ya no pueden eliminar suficientes desechos y exceso de líquidos del cuerpo. El paciente necesita diálisis o un trasplante de riñón. La diabetes, que conduce a la nefropatía diabética, y la presión arterial alta son las dos causas más comunes de la enfermedad renal crónica y representan la mayoría de los casos. Otras enfermedades y afecciones que pueden dañar los riñones y llevar a una enfermedad renal crónica, incluyen: trastornos autoinmunes (como lupus eritematoso sistémico y escleroderma); defectos de nacimiento de los riñones (tal como la enfermedad poliquística del riñón); ciertos químicos tóxicos; glomerulonefritis; lesión o trauma; cálculos renales e infección; problemas con las arterias que conducen hacia o dentro de los riñones; algunos medicamentos para el dolor y otros medicamentos (como los medicamentos contra el cáncer); nefropatía por reflujo (en la cual los riñones son dañados por el flujo de orina hacia los riñones) etc. Como se usa en este documento, "proteinuria" se refiere a la presencia de un exceso de proteínas séricas en la orina. La proteinuria puede, en algunas realizaciones, ser indicativa de enfermedad renal, pero, por sí misma, no es concluyente.

Por consiguiente, en algunas realizaciones de estos aspectos y todos los aspectos descritos en el presente documento, el sujeto que tiene o tiene riesgo de padecer una enfermedad renal crónica tiene nefropatía diabética.

Por "reducir" o "inhibir" en términos de la enfermedad renal crónica y los métodos de tratamiento de proteinuria descritos en el presente documento se entiende la capacidad de causar una disminución general de 20% o más, 30% o más, 40% o más, 45% o más, más preferiblemente de 50% o más, de 55% o más, de 60% o más, de 65% o más,

de 70% o más, y lo más preferiblemente de 75% o más, 80% o más, 85% o más, 90% o más, o 95% o más, para un parámetro o síntoma dado de una enfermedad renal crónica. Reducir o inhibir puede referirse, por ejemplo, a los síntomas del trastorno que se está tratando, por ejemplo, presión arterial alta, proteínas en la orina, etc.

La presión arterial alta casi siempre está presente en todas las etapas de la enfermedad renal crónica. Un examen del sistema nervioso puede mostrar signos de daño a los nervios. El médico puede escuchar ruidos cardíacos o pulmonares anormales cuando escucha con un estetoscopio. Los primeros síntomas de la enfermedad renal crónica también son síntomas de otras enfermedades. Estos síntomas pueden ser los únicos signos de enfermedad renal hasta que la afección esté más avanzada. Los síntomas de la enfermedad renal crónica pueden incluir: pérdida de apetito; malestar general y fatiga; dolores de cabeza, picazón (prurito) y piel seca; náusea; pérdida de peso sin intentar perder peso, etc. Otros síntomas que pueden desarrollarse, especialmente cuando la función renal ha empeorado, incluyen: piel anormalmente oscura o clara; dolor de huesos; síntomas del cerebro y del sistema nervioso; somnolencia y confusión; problemas para concentrarse o pensar; entumecimiento en las manos, pies u otras áreas; contracciones musculares o calambres; olor en el aliento, moretones fáciles, sangrado o sangre en las heces; sed excesiva; hipo frecuente, bajo nivel de interés sexual e impotencia; pérdida de los periodos menstruales (amenorrea); falta de aliento, problemas para dormir, tales como insomnio, síndrome de piernas inquietas y apnea obstructiva del sueño; hinchazón de los pies y manos (edema); vómitos, típicamente por la mañana.

Por consiguiente, en algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, una cantidad eficaz de una composición que comprende un inhibidor de ROBO2 descrito en este documento se administra a un sujeto con el fin de aliviar un síntoma de enfermedad renal crónica. Como se usa en este documento, "aliviar un síntoma de una enfermedad renal crónica" está mejorando cualquier afección o síntoma asociado con la enfermedad renal crónica. Alternativamente, el alivio de un síntoma de una enfermedad renal crónica puede implicar la reducción de uno o más síntomas de la enfermedad renal crónica en el sujeto en relación con un control no tratado que sufre de enfermedad renal crónica o en relación con el sujeto antes del tratamiento. En comparación con un control equivalente no tratado, o el sujeto antes del tratamiento con el inhibidor de ROBO2, dicha reducción o grado de prevención es de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, %, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75 %, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o más, según lo medido por cualquier técnica estándar. De manera deseable, la enfermedad renal crónica se reduce significativamente o es indetectable, como se detecta por cualquier método estándar conocido en la técnica, en cuyo caso se considera que se ha tratado la enfermedad renal crónica. Un paciente que está siendo tratado por una enfermedad renal crónica es aquel a quien un médico ha diagnosticado como tal. El diagnóstico puede ser por cualquier medio adecuado conocido por un experto en la técnica. El diagnóstico y la monitorización pueden incluir, por ejemplo, la detección del nivel de proteínas o moléculas específicas en una muestra de orina, sangre o suero, tal como, por ejemplo, albúmina, calcio, colesterol, hemograma completo (CBC), electrolitos, magnesio, fósforo, potasio, sodio, o cualquier combinación de los mismos; ensayos para detectar, por ejemplo, aclaramiento de creatinina; niveles de creatinina; BUN (nitrógeno ureico en sangre); mediante el uso de técnicas o procedimientos específicos, como tomografía computarizada abdominal, resonancia magnética abdominal, ecografía abdominal, biopsia renal, gammagrafía renal, ecografía renal; a través de la detección de cambios en los resultados de ensayos o pruebas para eritropoyetina, PTH; prueba de densidad ósea, o vitamina D; o cualquier combinación de tales métodos y ensayos de detección.

Los términos "sujeto" e "individuo" tal como se usan con respecto a cualquiera de los métodos descritos en este documento se usan de manera intercambiable en este documento, y se refieren a un animal, por ejemplo, un humano, receptor de los inhibidores de ROBO2 descritos en este documento. Para el tratamiento de estados de enfermedad que son específicos para un animal específico como un sujeto humano, el término "sujeto" se refiere a ese animal específico. Los términos "animales no humanos" y "mamíferos no humanos" se usan indistintamente en el presente documento, e incluyen mamíferos como ratas, ratones, conejos, ovejas, gatos, perros, vacas, cerdos y primates no humanos. El término "sujeto" también abarca cualquier vertebrado, incluidos, entre otros, mamíferos, reptiles, anfibios y peces. Sin embargo, ventajosamente, el sujeto es un mamífero tal como un ser humano, u otros mamíferos tales como un mamífero domesticado, por ejemplo, perro, gato, caballo, y similares.

En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el método comprende además administrar al sujeto un agente terapéutico adicional, además del inhibidor de ROBO2. Dicho agente terapéutico adicional puede administrarse junto con el inhibidor de ROBO2. Como se usa en el presente documento, la frase "administrar conjuntamente" o "coadministrar" significa la administración de un inhibidor de ROBO2 descrito en el presente documento y otro compuesto, por ejemplo, un agente terapéutico, por separado, simultáneamente y/o secuencialmente durante un período de tiempo según lo determinado por un cuidador calificado.

En algunas de tales realizaciones, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), un bloqueador del receptor de angiotensina II (ARB), o un antagonista del receptor de mineralocorticoides (MR).

Los inhibidores de la ACE para uso con los inhibidores de ROBO2 descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, benazepril (comercializado en los Estados Unidos como LOTENSIN™), captopril (comercializado en los Estados Unidos Como CAPOTEN™), enalapril/enalaprilato (comercializado en los Estados Unidos como VASOTEC™ oral e inyectable), fosinopril (comercializado en los Estados Unidos como MONOPRIL™), lisinopril

- (comercializado en los Estados Unidos como ZESTRIL™ y PRINIVIL™), moexipril (comercializado en los Estados Unidos como UNIVASC™), perindopril (comercializado en los Estados Unidos como ACEON™), quinapril (comercializado en los Estados Unidos como ACCUPRIL™), ramipril (comercializado en los Estados Unidos como ALTACE™) y trandolapril (comercializado en los Estados Unidos como MAVIK™). Los ARB para uso con los inhibidores de ROBO2 descritos en el presente documento incluyen candesartán (comercializado en los Estados Unidos como ATACAND™), irbesartán (comercializado en los Estados Unidos como AVAPRO™), olmesartán (comercializado en los Estados Unidos como BENICAR™), losartán (comercializado en los Estados Unidos como COZAAR™), valsartán (comercializado en los Estados Unidos como DIOVAN™), telmisartán (comercializado en los Estados Unidos como MICARDIS™) y eprosartán (comercializado en los Estados Unidos como TEVETEN™).
- En algunas realizaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en el presente documento, el método comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de un diurético, además del inhibidor de ROBO2. Los diuréticos incluyen, pero no se limitan a, torsemida (comercializada en los Estados Unidos como DEMADDEX™), furosemida (comercializada en los Estados Unidos como LASIX™), bumetanida (comercializada en los Estados Unidos como BUMEX™), ácido etacrínico (comercializado en los Estados Unidos como EDECRIN™), torsemida (comercializada en los Estados Unidos como DEMADDEX™), amilorida (comercializada en los Estados Unidos como MIDAMOR™), acetazolamida (comercializada en los Estados Unidos como DIAMOX™), pamabrom (comercializada en los Estados Unidos como AQUA-BAN™), manitol (comercializado en los Estados Unidos como ARIDOL™ u OSMITROL™), traimitreno (comercializado en los Estados Unidos como DYRENIUM™), espironolactona (comercializada en los Estados Unidos como ALDACTONE™), amilorida (comercializada en los Estados Unidos como MIDAMOR™), indapamida (comercializada en los Estados Unidos como LOZOL™), hidroclorotiazida (comercializada en los Estados Unidos como HYDRODIURIL™), metolazona (comercializada en los Estados Unidos como ZAROXOLYN™ o MYKROX™), metilclotiazida (comercializada en los Estados Unidos como AQUATENSEN™ o ENDURON™), hidrocloroazida (comercializada en los Estados Unidos como AQUAZIDE H™ o ESIDRIX™ o MICROZIDE™), clorotiazida (comercializada en los Estados Unidos como DIURIL™), bendroflumetiazida (comercializada en los Estados Unidos como NATURETIN™), politiazida (comercializada en los Estados Unidos como RENESE™), hidroflumetiazida (comercializada en los Estados Unidos como SALURON™) y clorhidralidona (comercializada en los Estados Unidos como THALITONE™). Para obtener una lista completa, véase también, por ejemplo, Physician's Desk Reference, Edición 2012, PDR Network (2011).
- Como se usa en el presente documento, con respecto a cualquiera de las composiciones y métodos que comprenden inhibidores de ROBO-2 o tratamientos combinados de los mismos descritos en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento", "que trata" o "mejoría" se refieren a tratamientos terapéuticos, en el que el objeto es revertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o detener la progresión o gravedad de una afección asociada con una enfermedad o trastorno. El término "tratar" incluye reducir o aliviar al menos un efecto adverso o síntoma de una afección, enfermedad o trastorno asociado con una enfermedad renal crónica, tal como, entre otras, la nefropatía diabética. El tratamiento generalmente es "efectivo" si se reducen uno o más síntomas o marcadores clínicos. Alternativamente, el tratamiento es "efectivo" si la progresión de una enfermedad se reduce o se detiene. Es decir, el "tratamiento" incluye no solo la mejoría de los síntomas o marcadores, sino también un cese de al menos una disminución del progreso o un empeoramiento de los síntomas que se esperaría en ausencia de un tratamiento. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, el alivio de uno o más síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado de la enfermedad estabilizado (es decir, sin empeoramiento), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejoría o paliación del estado de la enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. El término "tratamiento" de una enfermedad también incluye proporcionar alivio de los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (incluido el tratamiento paliativo).
- El término "cantidad efectiva", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un inhibidor de ROBO-2 descrito en el presente documento, necesario para aliviar al menos uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando, y se relaciona con una cantidad suficiente de una composición farmacológica para proporcionar el efecto deseado. El término "cantidad terapéuticamente eficaz", por lo tanto, se refiere a una cantidad del inhibidor de ROBO-2 descrito en el presente documento, utilizando los métodos descritos en este documento, que es suficiente para proporcionar un efecto particular cuando se administra a un sujeto típico. Una cantidad efectiva como se usa en este documento también incluiría una cantidad suficiente para retrasar el desarrollo de un síntoma de la enfermedad, alterar el curso de una enfermedad sintomática (por ejemplo, pero sin limitarse a, retardar la progresión de un síntoma de la enfermedad), o revertir un síntoma de la enfermedad. Por lo tanto, no es posible especificar la "cantidad efectiva" exacta. Sin embargo, para cualquier caso dado, un experto en la técnica puede determinar una "cantidad efectiva" apropiada utilizando solo la experimentación rutinaria.
- Las cantidades efectivas, la toxicidad y la eficacia terapéutica pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva) en el 50% de la población). La dosificación puede variar según la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD50/ED50. Se prefieren las composiciones y métodos que exhiben grandes índices terapéuticos. Una dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Además, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluya la IC50 (es decir, la concentración del inhibidor de ROBO-2 que se describe en este documento, que logra una inhibición media máxima

de la función o actividad medida) según se determine. En cultivo celular, o en un modelo animal apropiado. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. Los efectos de cualquier dosis particular pueden controlarse mediante un bioensayo adecuado. La dosis puede ser determinada por un médico y ajustada, según sea necesario, para adaptarse a los efectos observados del tratamiento. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad renal crónica, aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de un inhibidor de ROBO2 descrito en este documento es un intervalo de dosificación candidato inicial para la administración al sujeto, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o por infusión continua.

#### Modos de Administración

Los inhibidores de ROBO2 o los tratamientos combinados de los mismos descritos en este documento pueden administrarse a un sujeto que lo necesite por cualquier vía apropiada que dé como resultado un tratamiento eficaz en el sujeto. Como se usa en este documento, los términos "administrar" e "introducir" se usan de manera intercambiable y se refieren a la colocación de un inhibidor de ROBO-2 en un sujeto mediante un método o ruta que resulta en una localización al menos parcial de dichos agentes en un sitio deseado, de tal manera que se produzca un efecto o efectos deseados.

En algunas realizaciones, el inhibidor de ROBO2 se administra a un sujeto que tiene una enfermedad renal crónica mediante cualquier modo de administración que administre el agente sistémicamente o a una superficie o objetivo deseado, y puede incluir, pero no se limita a, administración por inyección, infusión, instilación e inhalación. En la medida en que los agentes polipeptídicos puedan protegerse de la inactivación en el intestino, también se contemplan formas de administración oral. "Inyección" incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcutánea, subcutánea, subcuticular, intracapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebroespinal, e intraesternal. En algunas realizaciones, los inhibidores de ROBO-2 para uso en los métodos descritos en el presente documento se administran mediante infusión o inyección intravenosa.

Las frases "administración parenteral" y "administrada parenteralmente" como se usan en este documento, se refieren a modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, usualmente por inyección. Las frases "administración sistémica", "administrada sistémicamente", "administración periférica" y "administrada periféricamente" como se usan en este documento se refieren a la administración del inhibidor de ROBO-2, que no sea directamente en un sitio objetivo, tejido u órgano, como un sitio tumoral, de modo que ingrese al sistema circulatorio del sujeto y, por lo tanto, esté sujeto al metabolismo y otros procesos similares.

Para el uso clínico de los métodos descritos en el presente documento, la administración de los inhibidores de ROBO-2 descritos en el presente documento puede incluir una formulación en composiciones farmacéuticas o formulaciones farmacéuticas para administración parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa; mucosa, por ejemplo, intranasal; ocular, u otro modo de administración. En algunas realizaciones, los inhibidores de ROBO-2 descritos en el presente documento pueden administrarse junto con cualquier compuesto portador, material o composición farmacéuticamente aceptable que dé como resultado un tratamiento eficaz en el sujeto. Por lo tanto, una formulación farmacéutica para uso en los métodos descritos en este documento puede contener un inhibidor de ROBO-2, como se describe en este documento, en combinación con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación razonable de riesgo/beneficio. La frase "portador farmacéuticamente aceptable" como se usa en este documento significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, solvente, medio, material de encapsulación, auxiliar de fabricación (por ejemplo, lubricante, talco, estearato de magnesio, calcio o zinc, o ácido estérico), o material de encapsulación de disolvente, involucrado en el mantenimiento de la estabilidad, solubilidad o actividad de un inhibidor de ROBO-2. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (8) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (9) glicoles, tales como propilenglicol; (10) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol (PEG); (11) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (12) agar; (13) agentes reguladores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (14) ácido algínico; (15) agua libre de pirógenos; (16) solución salina isotónica; (17) solución de Ringer; (19) soluciones reguladas de pH; (20) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; (21) agentes de relleno, como polipéptidos y aminoácidos (22) componentes séricos, como albúmina sérica, HDL y LDL; (23) alcoholes C2-C12, tales como etanol; y (24) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas. Los agentes liberadores, agentes de recubrimiento, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en la formulación. Los términos tales como "excipiente", "portador", "portador farmacéuticamente aceptable" o similares se usan indistintamente en este documento.

Los inhibidores de ROBO-2 descritos en el presente documento pueden formularse especialmente para la administración del compuesto a un sujeto en forma sólida, líquida o de gel, incluidos los adaptados para lo siguiente: (1) administración parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular, inyección intravenosa o epidural como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida; (2) aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, ungüento o un parche o aerosol de liberación controlada que se aplica sobre la piel; (3) por vía intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, como pesario, crema o espuma; (4) ocularmente; (5) transdérmicamente; (6) transmucosa; o (79) por vía nasal. Además, un inhibidor de ROBO-2 puede implantarse en un paciente o inyectarse utilizando un sistema de administración de medicamentos. Véase, por ejemplo, Urquhart, y colaboradores, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24: 199-236 (1984); Lewis, ed. "Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals" (Plenum Press, Nueva York, 1981); Patente de Estados Unidos N° 3.773.919; y la patente de Estados Unidos N° 35 3.270.960.

A continuación se describen realizaciones adicionales de las formulaciones y modos de administración de las composiciones que comprenden los inhibidores de ROBO-2 descritos en el presente documento, que pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento.

Formas de dosificación parenteral. Las formas de dosificación parenteral de los inhibidores de ROBO-2 también pueden administrarse a un sujeto con una afección renal crónica por varias vías, que incluyen, entre otras, subcutánea, intravenosa (incluida la inyección de bolos), intramuscular e intraarterial. Dado que la administración de formas de dosificación parenteral por lo general evita las defensas naturales del paciente contra los contaminantes, las formas de dosificación parenteral son preferiblemente estériles o pueden esterilizarse antes de la administración a un paciente. Los ejemplos de formas de dosificación parenteral incluyen, pero no se limitan a, soluciones listas para inyección, productos secos listos para disolverse o suspendidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable para inyección, suspensiones listas para inyección, formas de dosificación parenteral de liberación controlada y emulsiones.

Los expertos en la técnica conocen bien los vehículos adecuados que pueden usarse para proporcionar formas de dosificación parenteral de la divulgación. Los ejemplos incluyen, sin limitación: agua estéril; agua para inyección USP; solución salina; solución de glucosa; vehículos acuosos tales como, entre otros, inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio e inyección de Ringer lactato; vehículos miscibles con agua tales como, pero sin limitación, alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol; y vehículos no acuosos tales como, pero no limitados a, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y benzoato de bencilo.

En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un inhibidor de ROBO2 se formulan para ser adecuadas para la administración oral, por ejemplo, como formas de dosificación discretas, tales como, entre otras, comprimidos (incluidos, sin limitación, comprimidos marcados o recubiertos), píldoras, cápsulas para chupar, cápsulas, comprimidos masticables, paquetes de polvo, cápsulas lisas, trociscos, obleas, aerosoles o líquidos, tales como, entre otros, jarabes, elixires, soluciones o suspensiones en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite. Dichas composiciones contienen una cantidad predeterminada de la sal farmacéuticamente aceptable de los compuestos descritos, y pueden prepararse por métodos farmacéuticos bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase en general, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing, Easton, Pa. (1990).

Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan las formas unitarias de dosis orales sólidas más ventajosas, en cuyo caso se utilizan excipientes farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse con técnicas estándar acuosas o no acuosas. Estas formas de dosificación se pueden preparar por cualquiera de los métodos de la farmacia. En general, las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación se preparan mezclando de manera uniforme e íntima el ingrediente o ingredientes activos con vehículos líquidos, vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego moldeando el producto en la presentación deseada si es necesario. En algunas realizaciones, las formas de dosificación oral no se usan para el agente antibiótico.

Las formas de dosificación oral típicas de las composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un inhibidor de ROBO2 se preparan combinando la sal farmacéuticamente aceptable del inhibidor de ROBO2 en una mezcla íntima con al menos un excipiente de acuerdo con técnicas de composición farmacéutica convencionales. Los excipientes pueden tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de la composición deseada para la administración. Por ejemplo, los excipientes adecuados para uso en formas de dosis orales líquidas o en aerosol incluyen, pero no se limitan a, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservantes y agentes colorantes. Los ejemplos de excipientes adecuados para uso en formas de dosificación oral sólidas (por ejemplo, polvos, comprimidos, cápsulas y comprimidos) incluyen, entre otros, almidones, azúcares, celulosa microcristalina, caolín, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, ligantes y agentes desintegrantes.

Los aglutinantes adecuados para uso en las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, almidón de maíz, almidón de patata u otros almidones, gelatina, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, alginato de sodio, ácido alginico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (por ejemplo, etilcelulosa, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa cálcica, carboximetilcelulosa sódica), polivinilpirrolidona, metilcelulosa, almidón pregelatinizado, hidroxipropil metil celulosa, (por ejemplo, Nos. 2208, 2906, 2910), celulosa microcristalina y mezclas de los mismos.

Los ejemplos de cargas adecuadas para uso en las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen, pero no están limitados a, talco, carbonato de calcio (por ejemplo, gránulos o polvo), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextranos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado y mezclas de los mismos. El aglutinante o la carga en composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento está presente típicamente en aproximadamente 50 a aproximadamente 99 por ciento en peso de la composición farmacéutica.

Los desintegrantes se usan en las formulaciones farmacéuticas orales descritas en el presente documento para proporcionar comprimidos que se desintegran cuando se exponen a un ambiente acuoso. Se debe usar una cantidad suficiente de desintegrante que no sea ni muy escasa ni demasiado para alterar perjudicialmente la liberación del ingrediente o ingredientes activos para formar formas de dosificación oral sólidas de los inhibidores de ROBO2 descritos en este documento. La cantidad de desintegrante utilizada varía en función del tipo de formulación, y es fácilmente discernible para los expertos en la técnica. Los desintegrantes que se pueden usar para formar formulaciones farmacéuticas orales incluyen, entre otros, agar, ácido algínico, carbonato de calcio, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, polacrilina potásica, almidón glicolato sódico, almidón de patata o tapioca, otros almidones, almidón pregelatinizado, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas y sus mezclas.

Los lubricantes que pueden usarse para formar formulaciones farmacéuticas orales de los inhibidores de ROBO2 descritos en el presente documento, incluyen, pero no se limitan a, estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, laurilsulfato de sodio, talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja), estearato de zinc, oleato de etilo, laurato de etilo, agar, y mezclas de los mismos. Los lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice siloide (AEROSIL® 200, fabricado por WR Grace Co. de Baltimore, Md.), un aerosol coagulado de sílice sintética (comercializado por Degussa Co. de Piano, Tex.), CAB O-SIL® (un producto de dióxido de silicio pirógeno vendido por Cabot Co. de Boston, Mass.), y mezclas de los mismos. Si se usan, los lubricantes se usan típicamente en una cantidad de menos de aproximadamente 1 por ciento en peso de las composiciones farmacéuticas o formas de dosificación en las que se incorporan.

En otras realizaciones, se proporcionan formulaciones farmacéuticas y formas de dosificación sin lactosa, en las que dichas composiciones contienen preferiblemente poca o ninguna lactosa u otros mono o disacáridos. Como se usa en este documento, el término "sin lactosa" significa que la cantidad de lactosa presente, si existe, es insuficiente para aumentar sustancialmente la velocidad de degradación de un ingrediente activo. Las composiciones sin lactosa de la divulgación pueden comprender excipientes que son bien conocidos en la técnica y se enumeran en la USP (XXI)/NF (XVI).

Las formulaciones orales de los inhibidores de ROBO2 también abarcan, en algunas realizaciones, composiciones farmacéuticas anhidras y formas de dosificación que comprenden los inhibidores de ROBO2 descritos en el presente documento como ingredientes activos, ya que el agua puede facilitar la degradación de algunos compuestos. Por ejemplo, la adición de agua (por ejemplo, 5%) es ampliamente aceptada en las técnicas farmacéuticas como un medio para simular el almacenamiento a largo plazo con el fin de determinar características como la vida útil o la estabilidad de las formulaciones a lo largo del tiempo. Véase, por ejemplo, Jens T. Carstensen, *Drug Stability: Principles & Practice*, 379-80 (2ª ed., Marcel Dekker, NY, N.Y.: 1995). Las composiciones farmacéuticas anhidras y las formas de dosificación descritas en el presente documento pueden prepararse utilizando ingredientes anhidros o que contienen poca humedad y condiciones de baja humedad o baja humedad. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden lactosa y al menos un ingrediente activo que comprende una amina primaria o secundaria son preferiblemente anhidras si se espera un contacto sustancial con la humedad y/o la humedad durante la fabricación, envasado y/o almacenamiento. Las composiciones anhidras se envasan preferiblemente utilizando materiales que se sabe que evitan la exposición al agua, de manera que pueden incluirse en kits de formulaciones adecuadas. Los ejemplos de envases adecuados incluyen, entre otros, láminas herméticamente selladas, plásticos, recipientes de dosis unitaria (por ejemplo, viales) con o sin desecantes, envases blíster y envases de tiras.

Formulaciones en aerosol. Un inhibidor de ROBO-2 puede envasarse en un contenedor de aerosol presurizado junto con propelentes adecuados, por ejemplo, propelentes de hidrocarburos tales como propano, butano o isobutano con adyuvantes convencionales. Un inhibidor de ROBO-2 también se puede administrar en una forma no presurizada, tal como en un nebulizador o atomizador. Un inhibidor de ROBO-2 también se puede administrar directamente a las vías respiratorias en forma de polvo seco, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador.

Las composiciones en polvo adecuadas incluyen, a modo de ilustración, preparaciones en polvo de un inhibidor de ROBO-2, completamente entremezcladas con lactosa, u otros polvos inertes aceptables para la administración intrabronquial. Las composiciones en polvo pueden administrarse a través de un dispensador de aerosol o encerradas en una cápsula rompible que puede ser insertada por el sujeto en un dispositivo que pincha la cápsula y expulsa el polvo en una corriente constante adecuada para inhalación. Las composiciones pueden incluir propelentes, surfactantes y codisolventes y pueden llenarse en recipientes de aerosol convencionales que están cerrados por una válvula dosificadora adecuada.

Los aerosoles para el suministro al tracto respiratorio son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Adjei, A. y Garren, J. *Pharm. Res.*, 1: 565-569 (1990); Zanen, P. y Lamm, J.-W. *J. Int. J. Pharm.*, 114: 111-115 (1995); Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," en *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 6:273-313 (1990); Anderson y colaboradores, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 140: 1317-1324 (1989)) y tienen potencial para el suministro sistémico de péptidos y proteína igualmente (Patton y Platz, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 8: 179-196 (1992)); Timsina et. al., *Int. J. Pharm.*, 101: 1-13 (1995); y Tansey, I. P., *Spray Technol. Market*, 4: 26-29 (1994); French, D. L., Edwards, D. A. y Niven, R. W., *Aerosol Sci.*, 27: 769-783 (1996); Visser, J., *Powder Technology* 58: 1-10 (1989)); Rudt, S. y R. H. Muller, *J. Controlled Release*, 22: 263-272 (1992); Tabata, Y. y Y. Ikada, *Biomed. Mater. Res.*, 22: 837-858 (1988); Wall, D. A., *Drug Delivery*, 2: 10 1-20 1995); Patton, J. y Platz, R., *Adv. Drug Del. Rev.*, 8: 179-196 (1992); Bryon, P., *Adv. Drug. Del. Rev.*, 5: 107-132 (1990); Patton, J. S., y colaboradores, *Controlled Release*, 28: 15 79-85 (1994); Damms, B. y Bains, W., *Nature Biotechnology* (1996); Niven, R. W., y colaboradores, *Pharm. Res.*, 12(9): 1343-1349 (1995); y Kobayashi, S., y colaboradores, *Pharm. Res.*, 13(1): 80-83 (1996).

Las formulaciones de los inhibidores de ROBO-2 descritos en el presente documento abarcan además composiciones farmacéuticas anhidras y formas de dosificación que comprenden los compuestos descritos como ingredientes activos, ya que el agua puede facilitar la degradación de algunos compuestos. Por ejemplo, la adición de agua (por ejemplo, 5%) es ampliamente aceptada en las técnicas farmacéuticas como un medio para simular el almacenamiento a largo plazo con el fin de determinar características como la vida útil o la estabilidad de las formulaciones a lo largo del tiempo. Véase, por ejemplo, Jens T. Carstensen, *Drug Stability: Principles & Practice*, 379-80 (2ª ed., Marcel Dekker, NY, N.Y.: 1995). Las composiciones farmacéuticas anhidras y las formas de dosificación de la divulgación se pueden preparar usando ingredientes anhidros o que contienen poca humedad y condiciones de humedad baja o bajo contenido de agua. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden lactosa y al menos un ingrediente activo que comprende una amina primaria o secundaria son preferiblemente anhidras si se espera un contacto sustancial con la humedad y/o el agua durante la fabricación, envasado y/o almacenamiento. Las composiciones anhidras se envasan preferiblemente utilizando materiales que se sabe que evitan la exposición al agua, de manera que pueden incluirse en kits de formularios adecuados. Los ejemplos de envases adecuados incluyen, entre otros, láminas herméticamente selladas, plásticos, recipientes de dosis unitaria (por ejemplo, viales) con o sin desecantes, envases de blíster y envases de tiras.

Formas de dosificación de liberación controlada y retardada. En algunas realizaciones de los aspectos descritos en el presente documento, se puede administrar un inhibidor de ROBO-2 a un sujeto por medios de liberación controlada o retardada. Idealmente, el uso de una preparación de liberación controlada de diseño óptimo en el tratamiento médico se caracteriza porque se emplea un mínimo de sustancia farmacéutica para curar o controlar la afección en un período mínimo de tiempo. Las ventajas de las formulaciones de liberación controlada incluyen: 1) actividad extendida del fármaco; 2) frecuencia de dosificación reducida; 3) mayor cumplimiento del paciente; 4) uso de menos fármaco total; 5) reducción de los efectos secundarios locales o sistémicos; 6) minimización de la acumulación de fármacos; 7) reducción en las fluctuaciones del nivel sanguíneo; 8) mejora en la eficacia del tratamiento; 9) reducción de la potenciación o pérdida de actividad farmacológica; y 10) mejora en la velocidad de control de enfermedades o condiciones. (Kim, Chong-ju, *Controlled Release Dosage Form Design*, 2 (Technomic Publishing, Lancaster, Pa.: 2000)). Las formulaciones de liberación controlada se pueden usar para controlar el inicio de acción, la duración de la acción, los niveles plasmáticos dentro de la ventana terapéutica y los niveles máximos en sangre de un compuesto de fórmula (I). En particular, se pueden usar formas o formulaciones de dosificación de liberación controlada o prolongada para garantizar que se logre la máxima eficacia de un compuesto de fórmula (I) al mismo tiempo que se minimizan los posibles efectos adversos y problemas de seguridad, que pueden ocurrir tanto a partir de una dosis insuficiente a medicamento (es decir, ir por debajo de los niveles terapéuticos mínimos), así como sobrepasar el nivel de toxicidad para el medicamento.

Se puede adaptar una variedad de formas de dosificación, formulaciones y dispositivos conocidos de liberación controlada o extendida para su uso con los inhibidores de ROBO-2 descritos en el presente documento. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las patentes de Estados Unidos N°: 3.845.770; 3.916.899; 3.536.809; 3.598.123; 4.008.719; 5.674.533; 5.059.595; 5.591.767; 5.120.548; 5.073.543; 5.639.476; 5.354.556; 5.733.566; y 6.365.185 B1. Estas formas de dosificación se pueden usar para proporcionar una liberación lenta o controlada de uno o más ingredientes activos usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa, otras matrices de polímeros, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos (tales como OROS® (Alza Corporation, Mountain View, Calif., Estados Unidos), recubrimientos multicapa, micropartículas, liposomas o microesferas o una combinación de los mismos para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variables. Además, los materiales de intercambio iónico se pueden usar para preparar formas de sales adsorbidas inmovilizadas de los compuestos descritos y, por lo tanto, efectuar la administración controlada del fármaco. Los ejemplos de intercambiadores de aniones específicos incluyen, entre otros, DUOLITE® A568 y DUOLITE® AP143 (Rohm & Haas, Spring House, Pa., Estados Unidos).

En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, un inhibidor de ROBO-2 para uso en los métodos descritos en este documento se administra a un sujeto mediante liberación sostenida o en pulsos. La terapia de pulso no es una forma de administración discontinua de la misma cantidad de una composición a lo largo del tiempo, sino que comprende la administración de la misma dosis de la composición a una frecuencia reducida o la administración de dosis reducidas. Las administraciones de liberación sostenida o de pulso son particularmente preferidas cuando el trastorno ocurre continuamente en el sujeto, por ejemplo, cuando el sujeto tiene enfermedad renal

crónica. Cada dosis de pulso puede reducirse y la cantidad total de un inhibidor de ROBO-2 descrito en este documento administrada en el transcurso del tratamiento al sujeto o paciente se minimiza.

El intervalo entre pulsos, cuando sea necesario, puede ser determinado por un experto en la técnica. A menudo, el intervalo entre pulsos puede calcularse administrando otra dosis de la composición cuando la composición o el componente activo de la composición ya no es detectable en el sujeto antes de la administración del siguiente pulso. Los intervalos también pueden calcularse a partir de la vida media *in vivo* de la composición. Los intervalos pueden calcularse como mayores que la vida media *in vivo*, o 2, 3, 4, 5 e incluso 10 veces mayores que la vida media de la composición. Diversos métodos y aparatos para composiciones pulsantes por infusión u otras formas de administración al paciente se describen en las patentes de Estados Unidos N° 4.747.825; 4.723.958; 4.948.592; 4.965.251 y 5.403.590.

En algunas realizaciones, pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida que comprenden el inhibidor de ROBO-2. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el inhibidor, en las cuales las matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), poliláctidos (patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que comprenden los inhibidores de ROBO-2 a usar para la administración *in vivo* son preferiblemente estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través, por ejemplo, de membranas de filtración estériles y otros métodos conocidos por los expertos en la técnica.

También se proporcionan en este documento, en algunos aspectos, ensayos, métodos y sistemas para determinar si un individuo tiene una enfermedad renal crónica o una predisposición para una enfermedad renal crónica o proteinuria con base en los perfiles de expresión o información de secuencia de ROBO2 como un biomarcador indicativo de enfermedad renal crónica o una predisposición por una enfermedad renal crónica o proteinuria. Como se demuestra en el presente documento, ROBO2 es útil como biomarcador para identificar a un sujeto con enfermedad renal crónica o con alto riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria o para monitorear los efectos del tratamiento sobre la progresión de la enfermedad renal crónica o proteinuria.

Como se usa en el presente documento, un "biomarcador" se refiere a una biomolécula orgánica que está presente diferencialmente en una muestra tomada de un sujeto de un estado fenotípico (por ejemplo, que tiene una enfermedad) en comparación con otro estado fenotípico (por ejemplo, que no tiene la enfermedad). Un biomarcador está presente diferencialmente entre diferentes estados fenotípicos si se calcula que la media o mediana del nivel de expresión del biomarcador en los diferentes grupos es estadísticamente significativo. Las pruebas comunes de significancia estadística incluyen, entre otras, la prueba t, ANOVA, Kruskal-Wallis, Wilcoxon, Mann-Whitney y la razón de probabilidades. Los biomarcadores, solos o en combinación, proporcionan medidas de riesgo relativo de que el sujeto  $\alpha$  pertenece a un estado fenotípico u otro. Como tales, son útiles como marcadores para la enfermedad (diagnóstico), la eficacia terapéutica de un fármaco (teranósticos) y la toxicidad del fármaco.

La expresión de ROBO2 para uso en los ensayos descritos en el presente documento puede detectarse mediante cualquier método adecuado, incluida la detección de los niveles de proteína o la detección de los niveles de expresión de ARNm. El polipéptido ROBO2 se puede detectar en cualquier forma que se pueda encontrar en una muestra biológica obtenida de un sujeto, o en cualquier forma que pueda resultar de la manipulación de la muestra biológica (por ejemplo, como resultado del procesamiento de la muestra). Las formas modificadas de ROBO2 pueden incluir proteínas modificadas que son un producto de variantes alélicas, variantes de empalme, modificación postraducciona (por ejemplo, glicosilación, escisión proteolítica (por ejemplo, fragmentos de una proteína original), glicosilación, fosforilación, lipidación, oxidación, metilación, cisteinilación, sulfonación, acetilación y similares), oligomerización, desoligomerización (para separar monómeros de una forma multimérica de la proteína), desnaturalización y similares.

Los ensayos descritos en el presente documento pueden diseñarse para detectar todas las formas o formas particulares de ROBO2. Cuando se desee, la diferenciación entre diferentes formas de ROBO2, por ejemplo, diferentes isoformas, se puede lograr mediante el uso de métodos de detección que dependen de las características físicas que difieren entre las formas, por ejemplo, diferente peso molecular, diferente tamaño molecular, presencia/ausencia de diferentes epítopos, y similares.

Por consiguiente, se proporcionan en este documento, en algunos aspectos, ensayos para el diagnóstico de un sujeto que tiene enfermedad renal crónica o riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria, comprendiendo el ensayo: medir el nivel de proteína o ácido nucleico de ROBO2 en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde si el nivel de ROBO2 en la muestra biológica del sujeto está en el mismo nivel o mayor que (por ejemplo, mayor que por una cantidad estadísticamente significativa) un nivel de referencia de umbral para ROBO2, el sujeto probablemente está en riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria o tiene enfermedad renal crónica. Por ejemplo, un aumento en el nivel de ROBO2 en más de aproximadamente el 10%, o más de aproximadamente el 20%, o más de

aproximadamente el 30%, o más de aproximadamente el 40%, o más de aproximadamente el 50%, o más de aproximadamente el 60%, o más, en comparación con un nivel de umbral de referencia de ROBO2. En algunas realizaciones, el aumento en el nivel de ROBO2 es al menos una desviación estándar mayor que, o al menos dos desviaciones estándar, o más, mayor que una mediana o nivel de umbral de referencia promedio de ROBO2. Dichos niveles de referencia de la mediana o la media de ROBO2 pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de cinco o más muestras obtenidas de sujetos que no tienen enfermedad renal crónica o proteinuria, o de cinco o más muestras obtenidas del mismo sujeto en diferentes puntos de tiempo.

En algunas realizaciones de estos ensayos, la cantidad de ROBO2 medida en una muestra biológica se compara con un nivel de umbral de referencia, o una muestra biológica de referencia, tal como una muestra biológica obtenida de un control normal de la misma edad (por ejemplo, un sujeto de la misma edad que no tiene riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria, o un sujeto sano, por ejemplo, un individuo sano).

En algunas realizaciones, los ensayos, sistemas y kits como se describe en el presente documento también son útiles para controlar un curso de tratamiento que se administra a un sujeto. Por ejemplo, uno puede medir el nivel de ROBO2 en una muestra biológica en el sujeto en un primer punto de tiempo (por ejemplo, t1) y comparar con el nivel de umbral de referencia del biomarcador ROBO2, y si el nivel medido para ROBO2 es el mismo o mayor que el nivel de referencia, al sujeto se le puede administrar un tratamiento o régimen terapéutico apropiado para retrasar o reducir la aparición de enfermedad renal crónica o proteinuria, por ejemplo, aumentar el ejercicio, reducir la presión cardíaca, ajustar la dieta, etc. como se describe en los métodos de este documento, y luego el nivel del panel de la proteína biomarcadora ROBO2 se puede medir en un segundo (por ejemplo, t2) y puntos de tiempo subsiguientes (por ejemplo, t3, t4, t5, t5...etc.), y se puede comparar con los niveles de tROBO2 en uno o más puntos de tiempo (por ejemplo, en t1 o cualquier otro punto de tiempo posterior) o los umbrales de referencia de ROBO2 para determinar si el tratamiento terapéutico o tratamiento o régimen médico para el tratamiento para reducir el riesgo, retrasar o reducir la aparición de enfermedad renal crónica o proteinuria es efectiva. En algunas de tales realizaciones, los ensayos, sistemas y kits que se describen en el presente documento se pueden usar para monitorear un tratamiento terapéutico en un sujeto sintomático (por ejemplo, un sujeto que se sabe que tiene enfermedad renal crónica o proteinuria), donde un tratamiento eficaz puede ser una disminución de ROBO2 en el sujeto, o alternativamente los ensayos, sistemas y kits como se describe en el presente documento se pueden usar para monitorear el efecto del tratamiento profiláctico en un sujeto asintomático (por ejemplo, para prevenir la enfermedad renal crónica o proteinuria que ocurre en un sujeto), por ejemplo, donde se ha identificado que el sujeto tiene riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria de acuerdo con los métodos descritos en este documento, u otros conocidos en la técnica, o debido a razones hereditarias, por ejemplo.

El término "muestra" como se usa en el presente documento generalmente se refiere a cualquier material que contenga ácido nucleico, ya sea ADN o ARN, o aminoácidos. En general, dicho material estará en forma de muestra de sangre, muestra de heces, muestra de tejido, células, bacterias, sección de histología o frotis bucal. Las muestras pueden prepararse, por ejemplo, pueden ser frescas, fijas, congeladas o incrustadas en parafina. El término "muestra biológica" como se usa en el presente documento se refiere a una célula o población de células o una cantidad de tejido o fluido de un sujeto. La mayoría de las veces, la muestra se ha extraído de un sujeto, pero el término "muestra biológica" también puede referirse a las células o tejidos analizados *in vivo*, es decir, sin eliminación del sujeto. A menudo, una "muestra biológica" contendrá células del animal, pero el término también puede referirse a material biológico no celular, como las fracciones no celulares de sangre, saliva u orina, que pueden usarse para medir los niveles de expresión génica. Las muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, biopsias de tejidos, raspados, sangre total, plasma, suero, orina, saliva, cultivo celular o líquido cefalorraquídeo. Las muestras biológicas también incluyen biopsias de tejidos, cultivos celulares. Una muestra biológica o muestra de tejido puede referirse a una muestra de tejido o líquido aislado de un individuo, que incluye, entre otros, orina, sangre, plasma, suero, biopsia de riñón, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, aspiración del pezón, líquido linfático, las secciones externas de la piel, tracto respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, células (incluidas, entre otras, células sanguíneas), tumores, órganos y también muestras de un constituyente de cultivo celular *in vitro*. Constituyente de la cultura. En algunas realizaciones, cuando se obtiene una muestra de orina, la muestra de orina se centrifuga para sedimentar las células renales, en las que se pueden realizar los ensayos y métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la muestra es de una biopsia de riñón, tal como una biopsia con aguja gruesa de un riñón o una porción del mismo, tal como una muestra de podocitos. Además, se utilizan muestras de aspirado con aguja fina. En algunas realizaciones, las muestras biológicas pueden prepararse, por ejemplo, las muestras biológicas pueden ser frescas, fijadas, congeladas o embebidas en parafina. La muestra se puede obtener retirando una muestra de células de un sujeto, pero también se puede lograr usando células previamente aisladas (por ejemplo, aisladas por otra persona), o realizando los métodos descritos en el presente documento *in vivo*.

El término "expresión", como se usa en el presente documento, se refiere de manera intercambiable a la expresión de un polipéptido o proteína o la expresión de un polinucleótido o la expresión de un gen. La expresión también se refiere a la expresión de proteínas modificadas previamente a la traducción y modificadas posteriormente a la traducción, así como a la expresión alternativamente de moléculas pre-ARNm, moléculas de ARNm empalmadas y maduras. La expresión de un polinucleótido se puede determinar, por ejemplo, midiendo la producción de moléculas de transcripción de ARN, por ejemplo, niveles de transcripción de ARN mensajero (ARNm). La expresión de una proteína o polipéptido se puede determinar, por ejemplo, mediante inmunoensayo utilizando un anticuerpo o anticuerpos que se unen con el polipéptido. El término "codificar" tal como se aplica a los polinucleótidos se refiere a un polinucleótido

que se dice que "codifica" un polipéptido o proteína si, en su estado nativo o cuando se manipula mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, puede transcribirse para producir el ARN que se puede traducir en una secuencia de aminoácidos para generar el polipéptido y/o un fragmento del mismo. La cadena antisentido es el complemento de dicho ácido nucleico, y la secuencia codificante se puede deducir de él. El término "expresado de forma endógena" o "expresión endógena" se refiere a la expresión de un producto génico a niveles normales y bajo regulación normal para ese tipo de célula.

Los métodos de detección que se pueden usar con los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento para medir los niveles de proteína o ácido nucleico de ROBO2 en una muestra o muestra biológica incluyen métodos ópticos, métodos electroquímicos (técnicas de voltametría y amperometría), microscopía de fuerza atómica, y métodos de radiofrecuencia, por ejemplo, espectroscopia de resonancia multipolar. Los métodos ópticos incluyen microscopía, tanto confocal como no confocal, detección de fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, absorbancia, reflectancia, transmitancia y birrefringencia o índice de refracción (por ejemplo, resonancia de plasmón de superficie, elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guía de onda de acoplamiento de rejilla o interferometría).

En aquellas realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento en los que se determina el nivel de proteína ROBO2, tal como, por ejemplo, el nivel de una proteína de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3, se puede usar cualquier enfoque proteómico comúnmente conocido por personas con experiencia ordinaria en la técnica para medir el nivel de proteínas biomarcadoras en una muestra biológica. La medición puede ser cuantitativa o cualitativa, siempre que la medición sea capaz de determinar o indicar si el nivel de proteína ROBO2 en la muestra biológica es igual, superior o inferior a un valor umbral de referencia para la proteína ROBO2.

El nivel medido de proteína ROBO2 puede, en algunas realizaciones, ser una medida primaria del nivel de proteína ROBO2 que mide la cantidad de proteína ROBO2 en sí, tal como mediante la detección del número de moléculas de proteína ROBO2 en la muestra) o puede ser, en algunas realizaciones, una medida secundaria de la proteína ROBO2 (una medida a partir de la cual la cantidad de proteína ROBO2 se puede deducir, pero no necesariamente, como una medida de la actividad funcional o una medida de ácido nucleico, tal como el ARNm, que codifica la proteína ROBO2). Los datos cualitativos también pueden derivarse u obtenerse de mediciones primarias.

En algunas realizaciones de los ensayos y métodos descritos en el presente documento, los niveles de proteína ROBO2 pueden medirse utilizando una tecnología de medición basada en afinidad. "Afinidad" como se refiere a un anticuerpo es un término bien entendido en la técnica y significa el grado, o fuerza, de unión del anticuerpo al compañero de unión, tal como un biomarcador como se describe en el presente documento (o epítipo del mismo). La afinidad se puede medir y/o expresar de varias formas conocidas en la técnica, que incluyen, entre otras, la constante de disociación en equilibrio ( $K_D$  o  $K_d$ ), la constante de disociación en equilibrio aparente ( $K_{D,0}$  o  $K_{d,0}$ ) y la IC50 (cantidad necesaria para efectuar una inhibición del 50% en un ensayo de competición; se usan de manera intercambiable en este documento con "150"). Se entiende que, para los fines de esta invención, una afinidad es una afinidad promedio para una población dada de anticuerpos que se unen a un epítipo.

La tecnología de medición basada en afinidad utiliza una molécula que se une específicamente a la proteína biomarcadora que se está midiendo (un "reactivo de afinidad", como un anticuerpo o aptámero), aunque también pueden utilizarse otras tecnologías, como las tecnologías basadas en espectroscopia (por ejemplo, desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo, espectroscopía MALDI-TOF) o ensayos que miden la bioactividad (por ejemplo, ensayos que miden la mitogenicidad de los factores de crecimiento). Las tecnologías basadas en afinidad para el uso con los ensayos y métodos descritos en el presente documento pueden incluir ensayos basados en anticuerpos (inmunoensayos) y ensayos que utilizan aptámeros (moléculas de ácido nucleico que se unen específicamente a otras moléculas), tales como ELONA. Además, también se contemplan ensayos que utilizan tanto anticuerpos como aptámeros (por ejemplo, un ensayo en formato en sándwich que utiliza un anticuerpo para la captura y un aptámero para la detección). Una amplia variedad de ensayos basados en afinidad también se conoce en la técnica.

Los ensayos basados en afinidad típicamente utilizan al menos un epítipo derivado de la proteína biomarcadora, es decir, ROBO2, y muchos formatos de ensayo basados en afinidad utilizan más de un epítipo (por ejemplo, dos o más epítopos están involucrados en los ensayos de formato en "sándwich"; al menos un epítipo se usa para capturar la proteína biomarcadora, y al menos un epítipo diferente se usa para detectar el marcador).

Los ensayos basados en afinidad pueden estar en formatos de reacción directa o de competición, utilizar formatos de tipo sándwich y además pueden ser heterogéneos (por ejemplo, utilizar soportes sólidos) u homogéneos (por ejemplo, tienen lugar en una sola fase) y/o utilizar inmunoprecipitación. Muchos ensayos implican el uso de reactivo de afinidad marcado (por ejemplo, anticuerpo, polipéptido o aptámero); Las etiquetas pueden ser, por ejemplo, moléculas enzimáticas, fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivas o colorantes. También se conocen los ensayos que amplifican las señales de la sonda; ejemplos de los cuales son ensayos que utilizan biotina y avidina, e inmunoensayos marcados y mediados por enzimas, como los ensayos ELISA y ELONA. Por ejemplo, las concentraciones de biomarcadores de muestras de fluidos biológicos se pueden medir mediante el ensayo LUMINEX® o ELISA. Cualquiera de los biomarcadores o reactivos específicos para el biomarcador se puede unir a una superficie y los niveles se pueden medir directa o indirectamente.

En algunas realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento, los niveles de proteína ROBO2 pueden medirse utilizando una tecnología de medición basada en afinidad de inmunoensayo.

Las tecnologías de inmunoensayo pueden incluir cualquier tecnología de inmunoensayo que pueda medir cuantitativa o cualitativamente el nivel de proteína ROBO2 en una muestra biológica. Las tecnologías de inmunoensayo adecuadas incluyen, pero no se limitan a radioinmunoensayo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos en "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (utilizando etiquetas coloidales de oro, enzimas o radioisótopos, por ejemplo), análisis de transferencia Western, inmunoprecipitaciones, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de inmunoelectroforesis, ensayos de fluoroinmunoensayo (FiA), ensayos de inmunoradiometría (IRMA), ensayos de inmunoenzimometría (IEMA), ensayos de inmunoluminiscencia y ensayos de inmunofluorescencia (Madersbacher S, Berger P. Antibodies and immunoassays. Methods 2000;21:41-50), ensayo quimioluminiscente, inmuno-PCR y ensayo de transferencia Western. Del mismo modo, los ensayos basados en aptámeros que pueden medir cuantitativa o cualitativamente el nivel de un biomarcador en una muestra biológica se pueden usar en los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento. En general, los aptámeros pueden sustituirse por anticuerpos en casi todos los formatos de inmunoensayo, aunque los aptámeros permiten formatos de ensayo adicionales (como la amplificación de aptámeros unidos utilizando tecnología de amplificación de ácido nucleico tal como la PCR (patente de Estados Unidos N° 4.683.202) o la amplificación isotérmica con cebadores compuestos (patentes de Estados Unidos N° 6.251.639 y 6.692.918).

En algunas realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento, en los que los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando una tecnología de medición basada en afinidad de inmunoensayo, el inmunoensayo se realiza midiendo el grado de interacción proteína/anticuerpo de la interacción biomarcador/anticuerpo. Se puede usar cualquier método conocido de inmunoensayo.

En algunas realizaciones, un compañero de unión, por ejemplo, un anticuerpo o un ligando que se une a la proteína ROBO2 en el ensayo de unión, es preferiblemente un compañero de unión específico marcado, pero no necesariamente un anticuerpo. El compañero de enlace generalmente se marca a sí mismo, pero alternativamente puede detectarse por una reacción secundaria en la que se genera una señal, por ejemplo, de otra sustancia marcada.

Por lo tanto, el anticuerpo que se une específicamente a la proteína ROBO2 se puede usar en los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento para determinar la presencia y/o cantidad de la proteína ROBO2 en una muestra biológica, que se puede usar para detectar el aumento o disminución de la concentración de proteína ROBO2 presente en una muestra diagnóstica. Dichos anticuerpos pueden generarse por cualquiera de los métodos bien conocidos en el campo de los inmunodiagnósticos. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos anti-proteína ROBO2 para cualquier estado biológicamente relevante de la proteína. Así, por ejemplo, podrían elevarse contra la forma no glicosilada de la proteína ROBO2, que existe en el cuerpo en forma glicosilada, o contra un péptido que porta un epítipo relevante de la proteína ROBO2.

En algunas realizaciones de estos ensayos, método y sistemas, se puede usar una forma de ensayo amplificada, por lo que se produce una "señal" mejorada a partir de un nivel relativamente bajo de proteína a detectar. Una forma particular de un inmunoensayo amplificado es un ensayo quimioluminiscente mejorado. Por ejemplo, el anticuerpo está marcado con peroxidasa de rábano picante, que participa en una reacción quimioluminiscente con luminol, un sustrato de peróxido y un compuesto que potencia la intensidad y la duración de la luz emitida, típicamente el 4-yodofenol o el ácido 4-hidroxicinámico.

En algunas realizaciones de estos ensayos, método y sistemas, se puede usar un inmunoensayo amplificado que comprende inmuno-PCR. En esta técnica, el anticuerpo está unido covalentemente a una molécula de ADN arbitrario que comprende cebadores de PCR, por lo que el ADN con el anticuerpo unido a él se amplifica por la reacción en cadena de la polimerasa. Véase E. R. Hendrickson y colaboradores, Nucleic Acids Research 23: 522-529 (1995).

Por consiguiente, en todas las realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento, el nivel de proteína ROBO2 se puede determinar utilizando un agente de unión a proteínas, también denominado en el presente documento "entidad de unión a proteínas" o se puede utilizar un "reactivo de afinidad", en particular, anticuerpos. Por ejemplo, los reactivos de afinidad, en particular, los anticuerpos tales como los anticuerpos anti-biomarcadores se pueden usar en un inmunoensayo, particularmente en un ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). En realizaciones en las que el nivel de una proteína biomarcadora se puede medir en una muestra biológica usando métodos comúnmente conocidos en la técnica, y que incluyen, por ejemplo, pero sin limitarse a, escisión química o enzimática de isoformas, proteínas, isoformas, inmunotransferencias, análisis inmunohistoquímico, ELISA, y espectrometría de masas.

En algunas realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando el "ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)". ELISA es una técnica para detectar y medir la concentración de un antígeno utilizando una forma marcada (por ejemplo, ligada a enzimas) del anticuerpo. Existen diferentes formas de ELISA, que son bien conocidas por los expertos en la técnica. Las técnicas estándar conocidas en la técnica para ELISA se describen en "Methods in Immunodiagnosis", 2a Edición, Rose y

Bigazzi, eds. John Wiley & Sons, 1980; Campbell y colaboradores, "Methods and Immunology", W. A. Benjamin, Inc., 1964; y Oellerich, M. 1984, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 22: 895-904.

En algunas realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando un ensayo ELISA de tipo sándwich. En un "ELISA tipo sándwich", un anticuerpo (por ejemplo, un anti-enzima) se enlaza a una fase sólida (es decir, una placa de microtitulación) y se expone a una muestra biológica que contiene antígeno (por ejemplo, una enzima). La fase sólida se lava luego para eliminar el antígeno no unido. Un anticuerpo marcado (por ejemplo, ligado a una enzima) se une al antígeno unido (si está presente) formando un sándwich anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Por consiguiente, utilizando este método, un primer anticuerpo para la proteína ROBO2 se une a la fase sólida, tal como un pozo de una placa de microtitulación de plástico, y se incuba con la muestra y con un segundo anticuerpo marcado específico para la proteína ROBO2 que se va a analizar. Ejemplos de enzimas que pueden unirse al anticuerpo son la fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano picante, la luciferasa, la ureasa y la B-galactosidasa. El anticuerpo unido a la enzima reacciona con un sustrato para generar un producto de reacción coloreado que se puede medir.

En algunas realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando un ensayo de captura de anticuerpos o un ELISA competitivo. En un "ELISA competitivo", el anticuerpo se incuba con una muestra que contiene antígeno (es decir, enzima). La mezcla antígeno-anticuerpo luego se pone en contacto con una fase sólida (por ejemplo, una placa de microtitulación) que está recubierta con antígeno (es decir, enzima). Cuanto más antígeno esté presente en la muestra, menor será el anticuerpo libre que estará disponible para unirse a la fase sólida. Luego se agrega un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, unido a una enzima) a la fase sólida para determinar la cantidad de anticuerpo primario unido a la fase sólida. Por consiguiente, en algunas de tales realizaciones, se permite que una muestra de prueba biológica se una a una fase sólida, y se puede agregar el anticuerpo anti-proteína ROBO2 (por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a la proteína ROBO2) y dejar que se una. Después de lavar el material no unido, la cantidad de anticuerpo unido a la fase sólida se determina utilizando un segundo anticuerpo marcado, anti- respecto al primero.

En algunas realizaciones de estos ensayos, método y sistemas, una etiqueta es preferiblemente una enzima. El sustrato para la enzima puede ser, por ejemplo, formador de color, fluorescente o quimioluminiscente.

En algunas realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando inmunohistoquímica. En un "ensayo de inmunohistoquímica", se analiza una sección de tejido en busca de proteínas específicas exponiendo el tejido a anticuerpos que son específicos para la proteína que se está analizando. Luego, los anticuerpos se visualizan mediante cualquiera de varios métodos para determinar la presencia y cantidad de la proteína presente. Ejemplos de métodos utilizados para visualizar anticuerpos son, por ejemplo, a través de enzimas enlazadas a los anticuerpos (por ejemplo, luciferasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante o beta-galactosidasa), o métodos químicos (por ejemplo, DAB/sustrato-cromógeno). La muestra luego se analiza microscópicamente, lo más preferiblemente por microscopía de luz de una muestra teñida con una tinción que se detecta en el espectro visible, utilizando cualquiera de una variedad de tales métodos de tinción y reactivos conocidos por los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando radioinmunoensayos. Un radioinmunoensayo es una técnica para detectar y medir la concentración de un antígeno, es decir, ROBO2, usando una forma del antígeno marcada (por ejemplo, marcada de forma radiactiva o fluorescente). Los ejemplos de marcadores radiactivos para antígenos incluyen <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C y <sup>125</sup>I. La concentración de ROBO2 en una muestra biológica se mide haciendo que la ROBO2 en la muestra biológica compita con la ROBO2 marcada (por ejemplo, en forma radiactiva) para unirse al anticuerpo para ROBO2. Para asegurar la unión competitiva entre el ROBO2 marcada y la ROBO2 no marcada, la ROBO2 marcada está presente en una concentración suficiente para saturar los sitios de unión del anticuerpo. Cuanto mayor sea la concentración de ROBO2 en la muestra, menor será la concentración de ROBO2 marcada que se unirá al anticuerpo.

En algunas realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento, los niveles de proteína ROBO2 se miden usando un ensayo inmunoradiométrico (IRMA). IRMA es un inmunoensayo en el que el reactivo del anticuerpo está marcado radiactivamente. Un IRMA requiere la producción de un conjugado de antígeno multivalente, mediante técnicas como la conjugación a una proteína, por ejemplo, albúmina de suero de conejo (RSA). El conjugado de antígeno multivalente debe tener al menos 2 residuos de antígeno por molécula y los residuos de antígeno deben estar a una distancia suficiente para permitir la unión de al menos dos anticuerpos al antígeno. Por ejemplo, en un IRMA, el conjugado de antígeno multivalente se puede unir a una superficie sólida tal como una esfera de plástico. El antígeno de "muestra" sin marcar y el anticuerpo con el antígeno que está marcado radiactivamente se agregan a un tubo de ensayo que contiene la esfera recubierta con conjugado de antígeno multivalente. El antígeno en la muestra compite con el conjugado de antígeno multivalente por los sitios de unión del anticuerpo con el antígeno. Después de un período de incubación apropiado, los reactivos no unidos se eliminan mediante lavado y se determina la cantidad de radioactividad en la fase sólida. La cantidad de anticuerpo radiactivo unido es inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra.

Se pueden usar otras técnicas para detectar el nivel de proteína ROBO2 en una muestra biológica según la preferencia del médico, y en base a la presente divulgación y el tipo de muestra biológica (es decir, plasma, orina, muestra de

tejido, etc.). Una de tales técnicas es la transferencia Western (Towbin y colaboradores, Proc. Nat. Acad. Sci. 76: 4350 (1979)), en la que una muestra tratada adecuadamente se procesa en un gel de SDS-PAGE antes de transferirla a un soporte sólido, tal como un filtro de nitrocelulosa. Los anticuerpos anti-ROBO2 marcados de forma detectable o las moléculas de unión a proteínas pueden utilizarse para evaluar el nivel de proteína ROBO2, donde la intensidad de la señal de la etiqueta detectable corresponde a la cantidad de proteína ROBO2. Los niveles de la cantidad de proteína ROBO2 presente también se pueden cuantificar, por ejemplo, por densitometría.

En algunas realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento, los niveles de proteína ROBO2 se miden usando espectrometría de masas como MALDI/TOF (tiempo de vuelo), SELDI/TOF, cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas (HPLC-MS), electroforesis capilar-espectrometría de masas, espectrometría de resonancia magnética nuclear, o espectrometría de masas en tándem (por ejemplo, MS/MS, MS/MS/MS, ESI-MS/MS, etc.). Véanse, por ejemplo, las solicitudes de patente de Estados Unidos N°. 20030199001, 20030134304, 20030077616.

En algunas de tales realizaciones, estas metodologías se pueden combinar con las máquinas, los sistemas informáticos y los medios para producir un sistema automatizado para determinar el nivel de proteína ROBO2 en una muestra biológica y el análisis para producir un informe imprimible que identifique, por ejemplo, el nivel de proteína ROBO2 en una muestra biológica. En algunos casos, la medición del nivel de ROBO2 se realiza de forma remota desde los módulos de determinación y comparación.

Los métodos de espectrometría de masas son bien conocidos en la técnica y se han utilizado para cuantificar y/o identificar biomoléculas, tales como proteínas (véase, por ejemplo, Li y colaboradores (2000) *Tibtech* 18: 151-160; Rowley y colaboradores (2000) *Methods* 20: 383-397; y Kuster y Mann (1998) *Curr. Opin. Structural Biol.* 8: 393-400). Además, se han desarrollado técnicas de espectrometría de masas que permiten al menos una nueva secuenciación parcial de proteínas aisladas. Chait y colaboradores, *Science* 262: 89-92 (1993); Keough y colaboradores, *Proc. Natl Acad Sci. Estados Unidos*. 96: 7131-6 (1999); revisado en Bergman, *EXS* 88: 133-44 (2000).

En ciertas realizaciones, se usa un espectrofotómetro de iones en fase gaseosa. En otras realizaciones, se usa para analizar la muestra espectrometría de masas de desorción con láser/ionización. La espectrometría de masas moderna de desorción con láser /ionización ("LDI-MS") se puede practicar en dos variaciones principales: espectrometría de masas de desorción con láser/ionización asistida por matriz ("MALDI"), y desorción con láser/ionización mejorada en la superficie ("SELDI"). En MALDI, el analito se mezcla con una solución que contiene una matriz, y se coloca una gota del líquido en la superficie de un sustrato. La solución de la matriz cristaliza conjuntamente entonces con las moléculas biológicas. El sustrato se inserta en el espectrómetro de masas. La energía del láser se dirige a la superficie del sustrato donde desorbe y ioniza las moléculas biológicas sin fragmentarlas significativamente. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.118.937 (Hillenkamp y colaboradores), y la patente de Estados Unidos N° 5.045.694 (Beavis & Chait).

En SELDI, la superficie del sustrato se modifica para que sea un participante activo en el proceso de desorción. En una variante, la superficie se deriva con adsorbentes y/o reactivos de captura que se unen selectivamente a la proteína de interés. En otra variante, la superficie forma derivados con moléculas absorbentes de energía que no se desorben cuando se golpean con el láser. En otra variante, la superficie forma derivados con moléculas que se unen a la proteína de interés y que contienen un enlace fotolítico que se rompe tras la aplicación del láser. En cada uno de estos métodos, el agente de formación de derivados generalmente se localiza en una ubicación específica en la superficie del sustrato donde se aplica la muestra. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.719.060 y el documento WO 98/59361. Los dos métodos pueden combinarse, por ejemplo, utilizando una superficie de afinidad SELDI para capturar un analito y agregar un líquido que contenga matriz al analito capturado para proporcionar el material absorbente de energía.

Para obtener información adicional con respecto a los espectrómetros de masas, consultar, por ejemplo, *Principles of Instrumental Analysis*, tercera edición, Skoog, Saunders College Publishing, Filadelfia, 1985; y Kirk-Othmer *Encyclopedia of Chemical Technology*, 4ª ed. Vol. 15 (John Wiley & Sons, Nueva York, 1995), págs. 1071-1094.

La detección del nivel de proteína ROBO2 dependerá típicamente de la detección de la intensidad de la señal. Esto, a su vez, puede reflejar la cantidad y el carácter de un polipéptido unido al sustrato. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la intensidad de la señal de los valores máximos de los espectros de una primera muestra y una segunda muestra se puede comparar (por ejemplo, visualmente, mediante análisis computarizado, etc.) para determinar las cantidades relativas de biomoléculas particulares. Los programas de software como el programa Biomarker Wizard (Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, California) se pueden usar para ayudar a analizar los espectros de masas. Los espectrómetros de masas y sus técnicas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando técnicas de electroforesis en gel, en particular SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio), especialmente PAGE bidimensional (2D-PAGE), preferiblemente SDS-PAGE bidimensional (2D-SDS-PAGE). De acuerdo con un ejemplo particular, el ensayo se basa en 2D-PAGE, en particular, utilizando gradientes de pH inmovilizados (IPG) con un intervalo de pH preferiblemente de más de pH 4-9.

En algunas realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando técnicas de electroforesis en gel, en particular, las técnicas mencionadas anteriormente combinadas con otros métodos de separación de proteínas, particularmente los métodos conocidos por los expertos en la técnica, en particular, cromatografía y/o exclusión por tamaño.

- 5 En algunas realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando técnicas de resonancia, en particular, resonancia de plasmón de superficie.

En algunas realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando un biochip de proteína. Un biochip generalmente comprende un sustrato sólido que tiene una superficie sustancialmente plana, a la que se une un reactivo de captura (por ejemplo, un adsorbente o reactivo de afinidad). Con frecuencia, la superficie de un biochip comprende una pluralidad de ubicaciones direccionables que tienen unido un reactivo de captura. El biochip también puede incluir un reactivo de captura unido que sirve como control. Los biochips de proteínas son biochips adaptados para la captura de polipéptidos. Muchos biochips de proteínas se describen en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, los biochips de proteínas producidos por CIPHERGEN Biosystems, Inc. (Fremont, California), Zymo Research (Hayward, California), Invitrogen (Carlsbad, California), Biacore (Uppsala, Suecia) y ProCognition (Berkshire, Reino Unido). Los ejemplos de dichos biochips de proteínas se describen en las siguientes patentes o solicitudes de patente publicadas: patente de Estados Unidos N° 6.225.047 (Hutchens & Yip); patente de Estados Unidos N° 6.537.749 (Kuimelis y Wagner); patente de Estados Unidos N° 6.329.209 (Wagner y colaboradores); publicación internacional PCT No. WO 00156934 (Englert y colaboradores); la publicación internacional PCT N° WO 031048768 (Boutell y colaboradores) y la patente de Estados Unidos N° 5.242.828 (Bergstrom y colaboradores).

Los niveles de umbral de referencia o los valores de los niveles de proteína ROBO2 utilizados para la comparación con el nivel de proteína ROBO2 de un sujeto pueden variar, dependiendo del aspecto o la realización descrita en el presente documento, como se entenderá a lo largo de esta memoria descriptiva, y más adelante. Un valor de umbral de referencia puede basarse en un valor de muestra individual, como por ejemplo, un valor obtenido de una muestra biológica del sujeto que se está analizando, pero en un momento anterior (por ejemplo, en un primer punto de tiempo (t1), por ejemplo, un primer nivel de biomarcador medido, o en un segundo punto de tiempo (t2), por ejemplo). Un valor de umbral de referencia también puede basarse en un conjunto de muestras, por ejemplo, valores obtenidos de muestras de un conjunto de sujetos que se están evaluando. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los valores de umbral de referencia para la proteína ROBO2 se basan en medir el valor del 50% (por ejemplo, la mediana) de la proteína ROBO2 medida en sujetos que se sabe que tienen enfermedad renal crónica o proteinuria. Por ejemplo, los sujetos en el 50% superior (por ejemplo, en o por encima del nivel medio) para la proteína ROBO2 pueden seleccionarse por estar en riesgo de tener enfermedad renal crónica o proteinuria. Los valores de referencia también pueden basarse en un conjunto de muestras que incluyen o excluyen las muestras a ser analizadas. El valor de referencia se puede basar en un gran número de muestras, tal como en la población de sujetos sanos del grupo de la misma edad cronológica, o en sujetos que no tienen o no tienen riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria. En algunas realizaciones, el valor de referencia puede ser al menos una, más típicamente al menos dos, desviaciones estándar por encima de la media o la mediana de cualquiera de estos ensayos o una media o mediana predeterminada.

Para evaluar el riesgo de que un sujeto experimente o tenga enfermedad renal crónica o proteinuria mediante los ensayos, métodos y sistemas como se describe en el presente documento, un "valor de umbral de referencia" es típicamente un nivel de umbral de referencia predeterminado, como la mediana de la proteína ROBO2 en orina, suero o sangre obtenida de una población de sujetos sanos que se encuentran en el grupo de edad cronológica que se corresponde con la edad cronológica del sujeto examinado. Como se indicó anteriormente, en algunas situaciones, las muestras de referencia también pueden ser del mismo género y/o emparejadas según el origen étnico. En algunas realizaciones, el valor umbral de referencia para la proteína ROBO2 es el nivel de la media para ese biomarcador en un tipo de muestra biológica, por ejemplo, orina, sangre, suero, en un panel de sujetos de la misma etnia, por ejemplo, caucásico, negro, hispano, asiático y asiático-indio, pakistaní, Oriente Medio y/o isleño del Pacífico.

Para evaluar el riesgo de que un sujeto experimente o tenga enfermedad renal crónica o proteinuria mediante los ensayos, métodos y sistemas que se describen en este documento, el nivel de umbral de referencia para la proteína ROBO2 puede ser un nivel predeterminado, tal como un promedio o mediana de los niveles obtenidos de una población de sujetos sanos que se encuentran en el grupo de edad cronológica de la misma edad cronológica del sujeto evaluado. Alternativamente, el nivel de umbral de referencia para la proteína ROBO2 puede ser un nivel de referencia histórico para el sujeto en particular que se obtuvo de una muestra derivada del mismo sujeto, pero en un momento anterior, y/o cuando el sujeto no tenía un riesgo de la enfermedad renal crónica o proteinuria. En algunos casos, el nivel de umbral de referencia para la proteína ROBO2 puede ser un nivel de referencia histórico de la proteína ROBO2 para un grupo particular de sujetos que han tenido todos enfermedad renal crónica o proteinuria, debido, por ejemplo, a la diabetes.

En algunas realizaciones, los sujetos sanos se seleccionan como los sujetos de control. En algunas realizaciones, los controles son controles de la misma edad. Se puede utilizar un sujeto sano para obtener una proteína ROBO2 de nivel umbral de referencia, por ejemplo, en una muestra de orina o suero. Un sujeto "sano" o muestra de un sujeto o individuo "sano" tal como se usa en el presente documento es el mismo que entiende comúnmente un experto en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar métodos comúnmente conocidos para evaluar la función renal, como se describe en este

documento, para seleccionar sujetos de control como sujetos sanos para el diagnóstico y los métodos de tratamiento descritos en este documento. En algunas realizaciones, los sujetos con buena salud sin signos o síntomas que sugieran enfermedad renal crónica pueden ser reclutados como sujetos de control sanos. Los sujetos son evaluados con base en evaluaciones extensas consistentes en historia clínica, historia familiar, exámenes físicos y renales realizados por expertos clínicos, pruebas de laboratorio. Los ejemplos de análisis de enfermedad renal crónica y/o proteinuria incluyen, entre otros, la detección del nivel de proteínas o moléculas específicas en una muestra de orina, sangre o suero, como, por ejemplo, albúmina, calcio, colesterol, recuento de sangre completa (CBC), electrolitos, magnesio, fósforo, potasio, sodio o cualquier combinación de los mismos; ensayos para detectar, por ejemplo, eliminación de creatinina; niveles de creatinina; BUN (nitrógeno ureico en sangre); mediante el uso de técnicas o procedimientos específicos, tales como tomografía computarizada abdominal, resonancia magnética abdominal, ecografía abdominal, biopsia renal, gammagrafía renal, ecografía renal; a través de la detección de cambios en los resultados de ensayos o pruebas para eritropoyetina, PTH; prueba de densidad ósea, o vitamina D; o cualquier combinación de tales métodos de detección y ensayos.

Las poblaciones de la misma edad (a partir de las cuales se pueden obtener valores de referencia) son idealmente de la misma edad cronológica que el sujeto o el individuo sometido a prueba, pero también son aceptables las poblaciones emparejadas aproximadamente por edad. Las poblaciones aproximadas por edad pueden estar dentro de 1, 2, 3, 4 o 5 años de la edad cronológica del individuo evaluado, o pueden ser grupos de diferentes edades cronológicas que abarcan la edad cronológica del individuo sometido a prueba.

Un sujeto que se compara con su "grupo de la misma edad cronológica" generalmente se refiere a comparar al sujeto con la misma edad cronológica dentro de un intervalo de 5 a 20 años. Las poblaciones aproximadas por edad pueden estar en incrementos de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 15, o 20 años (por ejemplo, un grupo de "incremento de 5 años" puede servir como fuente de valores de referencia para un sujeto de 62 años puede incluir individuos de 58-62 años, individuos de 59-63 años, individuos de 60-64 años, individuos de 61-65 años o individuos de 62-66 años). En una definición más amplia, donde hay mayores brechas entre los diferentes grupos de edades cronológicas, por ejemplo, cuando hay pocos grupos de edades cronológicas diferentes disponibles para los valores de referencia, y las brechas entre los diferentes grupos de edades cronológicas superan los 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 15, o los incrementos de 20 años descritos en este documento, entonces el "grupo de la misma edad cronológica" puede referirse al grupo de edad que está más cerca de la edad cronológica del sujeto (por ejemplo, cuando los valores de referencia disponible para un grupo de mayor edad (por ejemplo, 80-90 años) y un grupo de menor edad (por ejemplo, 20-30 años), un grupo de la misma edad cronológica para un sujeto de 51 años puede usar el grupo de menor edad (20-30 años), que está más cerca de la edad cronológica del sujeto de prueba, como el nivel de referencia.

Otros factores que deben considerarse al seleccionar sujetos de control incluyen, pero no se limitan a, especie, género, origen étnico, etc. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un nivel de referencia puede ser un nivel de referencia predeterminado, tal como un promedio o mediana de niveles obtenidos de una población de sujetos de control sanos que están emparejados por género con el género del sujeto evaluado. En algunas realizaciones, un nivel de referencia puede ser un nivel de referencia predeterminado, tal como un promedio o la mediana de los niveles obtenidos de una población de sujetos de control sanos que coinciden con la etnia del sujeto evaluado (por ejemplo, caucásico, negro, hispano, asiático y asiático-indio, pakistaní, medio oriente e isleño del Pacífico). En otras realizaciones, tanto la edad cronológica como el género de la población de sujetos sanos se comparan con la edad cronológica y el género del sujeto sometido a prueba, respectivamente. En otras realizaciones, tanto la edad cronológica como la etnia de la población de sujetos sanos se comparan con la edad cronológica y la etnia del sujeto sometido a prueba, respectivamente. En otras realizaciones, la edad cronológica, el género y la etnia de la población de sujetos de control sanos se combinan con la edad cronológica, el género y la etnia del sujeto evaluado, respectivamente.

El proceso de comparar un nivel de proteína ROBO2 en una muestra biológica de un sujeto y un nivel de umbral de referencia para la proteína ROBO2 se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente, apropiada y conocida por un experto en la materia. En general, los valores de los niveles de proteína ROBO2 determinados mediante los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento pueden ser valores cuantitativos (por ejemplo, valores cuantitativos de concentración, como los miligramos de proteína ROBO2 por litro (por ejemplo, mg/L) de muestra, o una cantidad absoluta). Alternativamente, los valores de los niveles de proteína ROBO2 pueden ser cualitativos dependiendo de las técnicas de medición y, por lo tanto, el modo de comparar un valor de un sujeto y un valor de referencia puede variar según la tecnología de medición empleada. Por ejemplo, la comparación se puede realizar inspeccionando los datos numéricos, inspeccionando representaciones de los datos (por ejemplo, inspeccionando representaciones gráficas como gráficos de barras o de líneas), y utilizando desviaciones estándar de, por ejemplo, al menos uno, o al menos dos desviaciones estándar. En un ejemplo, cuando se usa un ensayo cualitativo para medir los niveles de proteína ROBO2, los niveles pueden compararse visualmente comparando la intensidad del producto de reacción coloreado, o comparando datos de mediciones densitométricas o espectrométricas del producto de reacción coloreada (por ejemplo, comparando datos numéricos o datos gráficos, tal como los gráficos de barras, derivados del dispositivo de medición).

Como se describe en el presente documento, los niveles de proteína ROBO2 pueden medirse cuantitativamente (valores absolutos) o cualitativamente (valores relativos). En algunas realizaciones, los valores cuantitativos de los niveles de proteína ROBO2 en las muestras biológicas pueden indicar un nivel dado (o grado) de riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria.

En algunas realizaciones, la comparación se realiza para determinar la magnitud de la diferencia entre los valores de un sujeto y los valores de referencia (por ejemplo, comparando las "veces" o la diferencia porcentual entre los niveles de proteína ROBO2 medidos obtenidos de un sujeto y el valor umbral de referencia de la proteína ROBO2). Un número de veces de diferencia se puede determinar midiendo la concentración absoluta de los niveles de proteína ROBO2, y comparando eso con el valor absoluto con el umbral de referencia del nivel de proteína ROBO2, o el número de veces que se diferencia puede medirse por la diferencia relativa entre un valor de referencia y un valor de muestra, en donde ninguno de los valores es una medida de la concentración absoluta, y/o cuando ambos valores se miden simultáneamente. Por ejemplo, un ELISA mide el contenido absoluto o la concentración de una proteína a partir de la cual se determina el número de veces que cambia en comparación con la concentración absoluta de la misma proteína en la referencia. Como otro ejemplo, una matriz de anticuerpos mide la concentración relativa a partir de la cual se determina el número de veces que cambia. En consecuencia, la magnitud de la diferencia entre el valor medido y el valor de referencia que sugiere o indica un diagnóstico particular dependerá del método que se esté practicando.

Como será evidente para los expertos en la técnica, cuando se toman mediciones repetidas para medir los niveles de proteína ROBO2, los valores medidos de los sujetos pueden compararse con los niveles del umbral de referencia de la proteína ROBO2, y se tienen en cuenta las mediciones repetidas. Las mediciones repetidas se pueden tener en cuenta utilizando la media o la mediana de los valores medidos.

En algunas realizaciones, el proceso de comparación puede ser manual o puede, preferiblemente, automatizarse. Por ejemplo, un dispositivo de ensayo (como un luminómetro para medir señales de quimioluminiscencia) puede incluir circuitos y software que le permitan comparar un valor de un sujeto con un valor de referencia para la proteína ROBO2. Alternativamente, se puede usar un dispositivo separado (por ejemplo, un ordenador digital) para comparar los niveles de proteína ROBO2 medidos de los sujetos y los niveles de umbral de referencia para la proteína ROBO2. Los dispositivos automatizados para comparación pueden incluir valores de referencia almacenados para la proteína ROBO2, o pueden comparar los niveles de proteína ROBO2 medidos de los sujetos con niveles de umbral de referencia para la proteína ROBO2 que se derivan de muestras de referencia medidas simultáneamente.

En algunas realizaciones, un sujeto sometido a prueba para determinar los niveles de proteína ROBO2 se asigna en uno de dos o más grupos (estatus) basándose en los resultados de los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento. Los ensayos, métodos y sistemas de diagnóstico que se describen en este documento pueden utilizarse para clasificar entre varios estados diferentes.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la determinación de si un sujeto tiene un alto riesgo de tener enfermedad renal crónica o proteinuria (estado: bajo riesgo frente a alto riesgo) se realiza usando los ensayos, métodos y sistemas de diagnóstico descritos en el presente documento. Se identifican las cantidades o patrones de biomarcadores de la proteína ROBO2 determinados como característicos de varios estados de riesgo, por ejemplo, alto, medio o bajo. El riesgo de desarrollar enfermedad renal crónica o proteinuria se determina midiendo la proteína ROBO2 sola o en combinación con otros biomarcadores conocidos, y luego presentándolos a un algoritmo de clasificación o comparándolos con una cantidad de referencia (por ejemplo, una cantidad de referencia de corte como se divulga en el presente documento) que se asocia con el nivel de riesgo particular.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan ensayos, métodos y sistemas de diagnóstico para determinar la gravedad o el estado o el riesgo de tener una enfermedad renal crónica o proteinuria en un sujeto. Cada etapa de la enfermedad renal crónica, por ejemplo, tiene una cantidad característica de proteína ROBO2 o cantidades relativas de proteína ROBO2. La etapa de una enfermedad se determina midiendo la proteína ROBO2, sola o en combinación con otros biomarcadores, y luego sometiéndolas a un algoritmo de clasificación o comparándolas con una cantidad de referencia y/o patrón de biomarcadores que se asocia con la etapa particular, por ejemplo, qué tan pronto el sujeto desarrollará probablemente enfermedad renal crónica o proteinuria. Por ejemplo, se puede clasificar entre la probabilidad de tener enfermedad renal crónica o proteinuria dentro de un año (por ejemplo, un pronóstico desfavorable) o un sujeto con probabilidad de tener enfermedad renal crónica o proteinuria en los próximos 5 años.

Las realizaciones adicionales de los ensayos, métodos y sistemas de diagnóstico se refieren a la comunicación de resultados o diagnósticos, o ambos a los técnicos, médicos o pacientes, por ejemplo. En ciertas realizaciones, se usan ordenadores para comunicar los resultados de los análisis o los diagnósticos o ambos a las partes interesadas, por ejemplo, los médicos y sus pacientes. En algunas realizaciones, los ensayos se realizan o los resultados de los ensayos se analizan en un país o jurisdicción que difiere del país o la jurisdicción a la que se comunican los resultados o diagnósticos, por ejemplo. En algunas realizaciones, el riesgo de tener enfermedad renal crónica o proteinuria basada en los niveles de proteína ROBO2 en una muestra biológica del sujeto se comunica al sujeto después de que se obtienen los niveles o el pronóstico. El médico tratante del sujeto puede comunicar el pronóstico o el diagnóstico al sujeto. Alternativamente, el pronóstico o diagnóstico puede enviarse al sujeto por correo electrónico o comunicarse al sujeto por teléfono. Se puede usar un ordenador para comunicar el pronóstico o el diagnóstico por correo electrónico o por teléfono, o a través de Internet, mediante un servicio de acceso seguro para el ingreso de pacientes. En ciertas realizaciones, el mensaje que contiene los resultados del pronóstico o prueba de diagnóstico se puede generar y entregar automáticamente al sujeto utilizando una combinación de hardware y software de ordenador que será familiar para los expertos en telecomunicaciones. En ciertas realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas descritos en el presente documento, todos o algunos de las etapas del método, que incluyen el análisis de muestras, el diagnóstico

de enfermedades y la comunicación de los resultados de los análisis o diagnósticos, se pueden llevar a cabo de jurisdicciones diversas (por ejemplo el extranjero).

En algunas realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas de diagnóstico de calificación o evaluación del riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria descritos en el presente documento, los ensayos, métodos o sistemas comprenden además el manejo del tratamiento del sujeto en función de la determinación del riesgo de tener una enfermedad renal crónica o proteinuria. Dicho manejo incluye las acciones del médico o del clínico luego de determinar el riesgo de los sujetos de tener enfermedad renal crónica o proteinuria. Por ejemplo, si un médico hace un diagnóstico del sujeto con riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria, entonces puede seguir un cierto régimen de tratamiento. Un régimen de tratamiento adecuado puede incluir, sin limitación, un programa de ejercicio supervisado; control de la presión arterial, ingesta de azúcar y/o niveles de lípidos; y terapias farmacológicas. En algunas realizaciones, un diagnóstico de un riesgo de tener enfermedad renal crónica o proteinuria puede ser seguido por pruebas adicionales para determinar si un paciente padece una enfermedad renal crónica, o si el paciente padece una enfermedad relacionada. Además, si la prueba de diagnóstico da un resultado no concluyente sobre el riesgo de un estado de evento adverso importante, es posible que se requieran pruebas adicionales. En algunas realizaciones de los ensayos, métodos y sistemas de diagnóstico de calificación o evaluación del riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria descritos en el presente documento, si un médico hace un diagnóstico de que el sujeto no tiene riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria, entonces no se proporciona tratamiento.

El ensayo y los métodos de detección de ROBO2 descritos en el presente documento pueden automatizarse usando robótica y sistemas dirigidos por ordenador. Se puede inyectar una muestra biológica, tal como una muestra de orina, plasma o sangre, en un sistema, tal como un dispositivo de microfluidos completamente operado por una estación robótica desde la entrada de la muestra hasta la salida del resultado.

Por consiguiente, también se proporciona en el presente documento, en algunos aspectos, sistemas (y medio legible por ordenador para hacer que los sistemas informáticos) realicen un método para determinar si un individuo tiene una enfermedad renal crónica o proteinuria o una predisposición para una enfermedad renal crónica o proteinuria basada en perfiles de expresión o información de secuencia.

En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan sistemas para evaluar si un sujeto tiene o está en riesgo mayor de enfermedad renal crónica o proteinuria, comprendiendo los sistemas: (a) un módulo de determinación configurado para recibir al menos una muestra biológica y realizar al menos un análisis en dicha muestra biológica para medir el nivel de ROBO2 en la muestra biológica o determinar la relación de expresión de ROBO2 con respecto a un nivel predeterminado o de referencia de umbral y para dar salida a dicho nivel medido o relación de expresión; (b) un dispositivo de almacenamiento configurado para almacenar información de salida de datos del módulo de determinación; (c) un módulo de comparación adaptado para recibir información del dispositivo de almacenamiento y comparar los datos almacenados en el dispositivo de almacenamiento con al menos un umbral de referencia de nivel de ROBO2, en donde si el nivel medido de proteína ROBO2 es al menos igual o superior que el nivel de umbral de referencia, el módulo de comparación proporciona información a un módulo de salida de que la muestra biológica está asociada con un sujeto que se desvía del umbral de referencia del biomarcador, y (d) un módulo de salida para mostrar la información al usuario.

En todos los aspectos de la invención, los métodos para determinar los niveles de proteína ROBO2 se pueden realizar utilizando una máquina o sistema automatizado. Dichas máquinas y sistemas generan un informe, tal como mostrar un informe en una pantalla visible o un informe imprimible que indica los niveles de proteína ROBO2 y/o informar un aumento o el mismo como un nivel de umbral de referencia para la proteína ROBO2, y/o si el sujeto del cual se obtuvo la muestra está en riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria.

Por consiguiente, algunas realizaciones descritas en el presente documento también proporcionan una máquina, sistemas informáticos y medios legibles por ordenador para realizar las etapas de (i) determinar los niveles de proteína ROBO2, y (ii) indicar o informar si un sujeto está en riesgo de tener enfermedad renal crónica o proteinuria.

Las realizaciones de estos aspectos se describen a través de módulos funcionales, que se definen mediante instrucciones ejecutables por ordenador grabadas en medios legibles por ordenador y que hacen que un ordenador realice etapas de método cuando se ejecuta. Los módulos se han segregado por función para mayor claridad. Sin embargo, debe entenderse que los módulos no necesitan corresponder a bloques de código discretos y que las funciones descritas pueden llevarse a cabo mediante la ejecución de varias porciones de código almacenadas en diversos medios y ejecutadas en diversos momentos. Además, debe apreciarse que los módulos pueden realizar otras funciones, por lo tanto, los módulos no se limitan a tener ninguna función particular o conjunto de funciones.

El medio legible por ordenador puede ser cualquier medio tangible disponible al que se pueda acceder mediante un ordenador. Los medios legibles por ordenador incluyen medios tangibles volátiles y no volátiles, extraíbles y no removibles implementados en cualquier método o tecnología para el almacenamiento de información, tales como instrucciones legibles por ordenador, estructuras de datos, módulos de programas u otros datos. Los medios legibles por ordenador incluyen, pero no están limitados a, RAM (memoria de acceso aleatorio), ROM (memoria de solo lectura), EPROM (memoria de solo lectura programable y borrrable), EEPROM (memoria de solo lectura programable y borrrable eléctricamente), memoria flash u otra tecnología de memoria, CD-ROM (memoria solo de lectura de disco

compacto), DVD (discos versátiles digitales) u otros medios de almacenamiento óptico, casetes magnéticos, cinta magnética, almacenamiento en disco magnético u otros medios de almacenamiento magnético, otros tipos de memoria volátil y no volátil, y cualquier otro medio tangible que se pueda utilizar para almacenar la información deseada y al que se pueda acceder mediante un ordenador, incluida cualquier combinación adecuada de los anteriores.

5 Los datos legibles por ordenador incorporados en uno o más medios legibles por ordenador, o medio legible por ordenador, pueden definir instrucciones, por ejemplo, como parte de uno o más programas, que, como resultado de ser ejecutados por un ordenador, instruyen al ordenador para realizar una o más de las funciones descritas en el presente documento (por ejemplo, en relación con un sistema o medio legible por ordenador), y/o varias realizaciones, variaciones y combinaciones de las mismas. Dichas instrucciones se pueden escribir en cualquiera de una pluralidad  
10 de lenguajes de programación, por ejemplo, Java, J#, Visual Basic, C, C#, C++, Fortran, Pascal, Eiffel, Basic, lenguaje de ensamblaje COBOL y similares, o cualquiera de una variedad de combinaciones de los mismos. Los medios legibles por ordenador en los que se incorporan dichas instrucciones pueden residir en uno o más de los componentes de cualquiera de los sistemas, o el medio legible por ordenador descrito en el presente documento, puede distribuirse a través de uno o más de dichos componentes, y pueden estar en transición entre ellos.

15 Los medios legibles por ordenador pueden ser transportables de manera tal que las instrucciones almacenadas en ellos pueden cargarse en cualquier recurso de ordenador para implementar los aspectos de la presente invención discutidos en este documento. Además, debe apreciarse que las instrucciones almacenadas en los medios legibles por ordenador, o el medio legible por ordenador, descrito anteriormente, no se limitan a las instrucciones incorporadas como parte de un programa de aplicación que se ejecuta en un ordenador huésped. En vez de eso, las instrucciones  
20 pueden incorporarse como cualquier tipo de código de ordenador (por ejemplo, software o microcódigo) que puede emplearse para programar un ordenador para implementar aspectos de la presente invención. Las instrucciones ejecutables por ordenador se pueden escribir en un lenguaje de ordenador adecuado o en una combinación de varios lenguajes. Los expertos en la técnica conocen los métodos básicos de biología computacional y se describen, por ejemplo, en Setubal y Meidanis y colaboradores, *Introduction to Computational Biology Methods* (PWS Publishing Company, Boston, 1997); Salzberg, Searles, Kasif, (Ed.), *Computational Methods in Molecular Biology*, (Elsevier, Ámsterdam, 1998); Rashidi y Buehler, *Bioinformatics Basics: Application in Biological Science and Medicine* (CRC Press, Londres, 2000) y Ouelette y Bzevanis *Bioinformatics: A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins* (Wiley & Sons, Inc., 2a ed., 2001).

25 Los módulos funcionales de ciertas realizaciones de los aspectos descritos en este documento incluyen un módulo de determinación, un dispositivo de almacenamiento, un módulo de comparación y un módulo de visualización. Los módulos funcionales se pueden ejecutar en uno o varios ordenadores o mediante el uso de una o varias redes o sistemas informáticos.

En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan sistemas informáticos que pueden usarse para determinar si es probable que un sujeto tenga o esté en riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria. En algunas  
35 realizaciones, un sistema informático está conectado a un módulo de determinación y está configurado para obtener datos de salida de un módulo de determinación con respecto a una muestra biológica, donde el módulo de determinación está configurado para detectar los niveles de proteína ROBO2 en una muestra biológica obtenida del sujeto; y donde el sistema informático comprende (a) un dispositivo de almacenamiento configurado para almacenar la salida de datos del módulo de determinación, así como los datos de referencia; donde el dispositivo de  
40 almacenamiento está conectado a (b) un módulo de comparación que, en algunas realizaciones, está adaptado para comparar los datos de salida almacenados en el dispositivo de almacenamiento con los datos de referencia almacenados, y en realizaciones alternativas, adaptado para comparar los datos de salida consigo mismo, donde el módulo de comparación produce datos de informe y está conectado a (c) un módulo de visualización para mostrar una página de contenido recuperado (es decir, datos de informe del módulo de comparación) para el usuario en un  
45 ordenador cliente, en donde el contenido recuperado puede indicar los niveles de ROBO2 y/o la probabilidad de que el sujeto experimente enfermedad renal crónica o proteinuria en el futuro.

En algunas realizaciones, el módulo de determinación tiene instrucciones ejecutables por ordenador para proporcionar datos de expresión, información de secuencia, información relacionada con información de secuencia en forma legible por ordenador. Como se usa en este documento, "información de secuencia" se refiere a cualquier secuencia de  
50 nucleótidos y/o aminoácidos, que incluye, entre otros, secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos de longitud completa, secuencias parciales de nucleótidos y/o aminoácidos, o secuencias mutadas. Además, la información "relacionada con" la información de la secuencia incluye la detección de la presencia o ausencia de una secuencia (por ejemplo, detección de una mutación o eliminación), determinación de la concentración de una secuencia en la muestra (por ejemplo, los niveles de expresión de la secuencia de aminoácidos, o niveles de expresión de nucleótidos (ARN o ADN)), y similares. El término "información de secuencia" pretende incluir la presencia o ausencia de modificaciones postraduccionales (por ejemplo, fosforilación, glicosilación, sumilación, farnesilación y similares).

Como ejemplo, los módulos de determinación para determinar la secuencia de ROBO2 o la información de expresión de ácido nucleico pueden incluir sistemas conocidos para el análisis de secuencia automatizado, incluidos, entre otros,  
60 los escáneres fluorescentes Hitachi FMBIO® y Hitachi FMBIO® II (disponibles a través de Hitachi Genetic Systems, Alameda, California); Sistemas de análisis genéticos de electroforesis totalmente automatizados de 96 capilares SPECTRUMEDIX® SCE 9610 (disponibles a través de SpectruMedix LLC, State College, Pensilvania); secuenciador

de ADN ABI PRISM® 377, secuenciador de ADN ABI® 373, Analizador genético ABI PRISM® 310, Analizador genético ABI PRISM® 3100 y Analizador de ADN ABI PRISM® 3700 (disponibles a través de Applied Biosystems, Foster City, California);, escáneres de fluorescencia SI Molecular Dynamics FLUORIMAGER™ 575, y escáneres fluorescencia Molecular Dynamics FLUORIMAGER™ 595 (disponibles a través de Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra); Sistema de secuenciación de ADN GENOMYXSC™ (disponible a través de Genomix Corporation (Foster City, California); y secuenciador de ADN PHARMACIA ALF™ y Pharmacia ALFEXPRESS™ (disponible a través de Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra).

En algunas realizaciones para determinar la información de la secuencia o de la proteína, los módulos de determinación incluyen sistemas para análisis de proteínas y ADN. Por ejemplo, sistemas de espectrometría de masas que incluyen sistemas de desorción/ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF); sistemas de perfilado de matrices SELDI-TOF-MS ProteinChip, por ejemplo, máquinas con el software CIPHERGEN PROTEIN BIOLOGY SYSTEM II™; sistemas para analizar datos de expresión de genes (véase, por ejemplo, el documento US. 2003/0194711); sistemas para el análisis de expresión basado en matrices, por ejemplo, sistemas de matrices HT y sistemas de matrices de cartucho disponibles a través de Affymetrix (Santa Clara, CA 95051) AutoLoader, COMPLETE GENECHIP® Instrument System, Fluidics Station 450, Hybridization Oven 645, QC Toolbox Software Kit, Scanner 3000 7G, Scanner 3000 7G plus Targeted Genotyping System, Scanner 3000 7G Whole-Genome Association System, GENETITAN™ Instrument, GeneChip® Array Station, HT Array; un sistema automatizado de ELISA (por ejemplo, DSX® o DS2® de Dynax, Chantilly, VA o el ENEASYSTEM III®, TRITURUS®, THE MAGO® Plus); densitómetros (por ejemplo, X-Rite-508-Spectro Densitometer®, el densitómetro HYRYS™ 2); sistemas automatizados de hibridación de fluorescencia in situ (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 6.136.540); sistemas deformación de imágenes en gel 2D acoplados con el software de formación de imágenes 2-D; lectores de microplacas; clasificadores de células activadas por fluorescencia (FACS) (por ejemplo, Citómetro de flujo FACSVantage SE, Becton Dickinson); analizadores de radioisótopos (por ejemplo, contadores de centelleo), o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones de este aspecto y en todos los otros aspectos de la presente invención, se puede usar una variedad de programas y formatos de software para almacenar la información del nivel de proteína del biomarcador en el dispositivo de almacenamiento. Se puede emplear cualquier número de formatos de estructuración de procesadores de datos (por ejemplo, archivo de texto o base de datos) para obtener o crear un medio que haya grabado en él la información de secuencia o información de nivel de expresión.

La información de la expresión de ROBO2 o la información relacionada con la información de la expresión de ROBO2 determinada en el módulo de determinación puede ser leída por el dispositivo de almacenamiento. Tal como se usa en el presente documento, el "dispositivo de almacenamiento" está destinado a incluir cualquier aparato informático o de procesamiento adecuado u otro dispositivo configurado o adaptado para almacenar datos o información. Los ejemplos de aparatos electrónicos adecuados para su uso con la presente invención incluyen aparatos informáticos autónomos, redes de telecomunicaciones de datos, incluidas redes de área local (LAN), redes de área amplia (WAN), sistemas de almacenamiento en la nube, Internet, Intranet y Extranet, y sistemas locales y de procesamiento por ordenador distribuidos. Los dispositivos de almacenamiento también incluyen, pero no se limitan a: medios de almacenamiento magnéticos, tales como disquetes, medios de almacenamiento en discos duros, cintas magnéticas, medios de almacenamiento óptico como CD-ROM, DVD, medios de almacenamiento electrónico como RAM, ROM, EPROM, EEPROM y similares, sistemas de almacenamiento en la nube, discos duros generales e híbridos de estas categorías, tales como los medios de almacenamiento magnético/óptico. El dispositivo de almacenamiento está adaptado o configurado para haber grabado en él información de secuencia o información de nivel de expresión. Dicha información se puede proporcionar en forma digital que se puede transmitir y leer electrónicamente, por ejemplo, a través de Internet, a través de un sistema en la nube, en un disquete, a través de USB (bus serial universal), o a través de cualquier otro modo de comunicación adecuado.

Como se usa en el presente documento, "información de nivel de expresión" se refiere a cualquier información de nivel de expresión de nucleótidos y/o aminoácidos, que incluye pero no se limita a secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos de longitud completa, secuencias parciales de nucleótidos y/o aminoácidos, o secuencias mutadas. Además, la información "relacionada con" la información del nivel de expresión incluye la detección de la presencia o ausencia de una secuencia (por ejemplo, presencia o ausencia de una secuencia de aminoácidos, secuencia de nucleótidos o modificación postraduccional), determinación de la concentración de una secuencia en la muestra (por ejemplo, niveles de secuencia de aminoácidos, o niveles de expresión de nucleótidos (ARN o ADN), o nivel de modificación postraduccional), y similares.

Como se usa en este documento, "almacenado" se refiere a un proceso para codificar información en el dispositivo de almacenamiento. Los expertos en la técnica pueden adoptar fácilmente cualquiera de los métodos actualmente conocidos para grabar información en medios conocidos para generar fabricantes que comprenden la información de secuencia o información de nivel de expresión.

Se puede usar una variedad de programas y formatos de software para almacenar la información de secuencia o información de nivel de expresión en el dispositivo de almacenamiento. Se puede emplear cualquier número de formatos de estructuración de procesadores de datos (por ejemplo, archivo de texto o base de datos) para obtener o crear un medio que haya grabado en él la información de secuencia o información de nivel de expresión.

Al proporcionar información de secuencia o información de nivel de expresión en forma legible por ordenador, se puede usar la información de secuencia o información de nivel de expresión en forma legible en el módulo de comparación para comparar una secuencia específica o perfil de expresión con los datos de referencia dentro del dispositivo de almacenamiento. Por ejemplo, los programas de búsqueda se pueden usar para identificar fragmentos o regiones de las secuencias que coinciden con una secuencia particular (datos de referencia, por ejemplo, información de secuencia obtenida de una muestra de control) o la comparación directa del nivel de expresión determinado puede compararse con el nivel de expresión de los datos de referencia (por ejemplo, información de nivel de expresión obtenida de una muestra de control). La comparación realizada en forma legible por ordenador proporciona un resultado de comparación legible por ordenador que puede ser procesado por una variedad de medios. El contenido basado en el resultado de la comparación se puede recuperar del módulo de comparación para indicar una enfermedad o trastorno específico, tal como enfermedad renal crónica o proteinuria.

En algunas realizaciones, los datos de referencia almacenados en el dispositivo de almacenamiento a leer por el módulo de comparación son datos de secuencia o información de expresión de ROBO2 obtenidos de una muestra biológica de control del mismo tipo que la muestra biológica a analizar. Alternativamente, los datos de referencia son una base de datos, por ejemplo, una parte de la secuencia completa del genoma de un organismo, o una familia de secuencias de proteínas, o un perfil de nivel de expresión (ARN, proteína o péptido). En algunas realizaciones, los datos de referencia son información de secuencia o perfiles de nivel de expresión que son indicativos de una enfermedad o trastorno específico, como enfermedad renal crónica o proteinuria.

En algunas realizaciones, los datos de referencia se registran y anotan electrónicamente o digitalmente desde bases de datos que incluyen, pero no se limitan a, bases de datos de ADN y proteínas del GenBank (NCBI) tales como genoma, EST, SNPS, Traces, Celera, Ventor Reads, lecturas de Watson, HGTS, y similares; bases de datos del Instituto Suizo de Bioinformática, como las bases de datos ENZYME, PROSITE, SWISS-2DPAGE, Swiss-Prot y TrEMBL; el paquete de software Melanie o el servidor ExpASY WWW, y similares; el SWISS-MODEL, Swiss-Shop y otras herramientas computacionales basadas en red; la base de datos de Comprehensive Microbial Resource (disponible a través del Instituto de Investigación Genómica). La información resultante puede almacenarse en una base de datos relacional que puede emplearse para determinar homologías entre los datos de referencia o genes o proteínas dentro y entre los genomas.

Al proporcionar los niveles de ROBO2 en forma legible en el módulo de comparación, se puede usar para comparar con los niveles de umbral de referencia de ROBO2 dentro del dispositivo de almacenamiento. La comparación realizada en forma legible por ordenador proporciona contenido legible por ordenador que puede ser procesado por una variedad de medios.

El "módulo de comparación" puede usar una variedad de programas y formatos de software disponibles para el operativo de comparación para comparar la secuencia de ROBO2 o la información de nivel de expresión determinada en el módulo de determinación para hacer referencia a la secuencia de ROBO2 o los datos de nivel de expresión. En algunas realizaciones, el módulo de comparación está configurado para usar técnicas de reconocimiento de patrones para comparar la secuencia de ROBO2 o los datos de nivel de expresión de una o más entradas a uno o más patrones de datos de referencia. El módulo de comparación puede configurarse utilizando el software existente comercialmente disponible o disponible libremente para comparar patrones, y puede optimizarse para comparaciones de datos particulares que se realicen. El módulo de comparación proporciona información legible por ordenador relacionada con la información de secuencia que puede incluir, por ejemplo, detección de la presencia o ausencia de una secuencia (por ejemplo, detección de una mutación o eliminación (proteína o ADN), información sobre distintos alelos, detección de modificación postraduccional, u omisión o repetición de secuencias); determinación de la concentración de una secuencia en la muestra (por ejemplo, secuencia de aminoácidos/niveles de expresión de proteínas, o niveles de expresión de nucleótidos (ARN o ADN), o niveles de modificación postraduccional), o determinación de un perfil de expresión.

En algunas realizaciones, el módulo de comparación permite la comparación de niveles de ROBO2 a partir de los datos de salida del módulo de determinación con datos de nivel de umbral de referencia para cada ROBO2.

En algunas realizaciones, el módulo de comparación realiza comparaciones con espectros de espectrometría de masas, por ejemplo, las comparaciones de la información de la secuencia del fragmento peptídico pueden llevarse a cabo utilizando espectros procesados en MATLAB con un texto llamado "Qcealign" (véase por ejemplo el documento WO2007/022248) y "Qpeaks" (Spectrum Square Associates, Ithaca, NY), o el software Ciphergen Peaks 2.1™. Luego, los espectros procesados se pueden alinear utilizando algoritmos de alineación que alinean los datos de la muestra con los datos de control utilizando el algoritmo de entropía mínima tomando datos corregidos de línea base (véase, por ejemplo, la publicación WIPO WO2007/022248). El resultado de la comparación puede procesarse adicionalmente calculando las proporciones. Los perfiles de expresión de proteínas pueden ser discernidos.

Se puede usar cualquier software de comparación disponible, incluido, entre otros, el paquete Ciphergen Express (CE) y el Biomarker Patterns Software (BPS), Ciphergen Biosystems, Inc., CA, EE.UU. El análisis comparativo se puede realizar con el software del sistema de chip de proteínas (por ejemplo, la suite The Proteinchip para los laboratorios Bio-Rad).

El módulo de comparación, o cualquier otro módulo descrito en este documento, puede incluir un sistema operativo (por ejemplo, UNIX) en el que se ejecuta un sistema de administración de base de datos relacional, una aplicación de la World Wide Web y un servidor de World Wide Web. La aplicación de la World Wide Web incluye el código ejecutable necesario para generar comandos de lenguaje de base de datos (por ejemplo, comandos del Structured Query Language (SQL)).

En general, los ejecutables incluirán comandos de SQL incorporados. Además, la aplicación World Wide Web puede incluir un archivo de configuración que contiene punteros y direcciones a las diversas entidades de software que conforman el servidor, así como a las diversas bases de datos externas e internas a las que se debe acceder para atender las solicitudes de los usuarios. El archivo de configuración también dirige las solicitudes de recursos del servidor al hardware apropiado, como puede ser necesario si el servidor se distribuye en dos o más ordenadores separados. En algunas realizaciones, el servidor World Wide Web admite un protocolo TCP/IP. Las redes locales como esta a veces se denominan "Intranets". Una ventaja de tales Intranets es que permiten una fácil comunicación con las bases de datos de dominio público que residen en la World Wide Web (por ejemplo, el sitio World Wide Web del GenBank o Swiss Pro). Por lo tanto, en algunas realizaciones preferidas, los usuarios pueden acceder directamente a los datos (a través de enlaces de hipertexto, por ejemplo) que residen en bases de datos de Internet mediante una interfaz HTML proporcionada por navegadores web y servidores web.

En algunas realizaciones, el módulo de comparación compara los perfiles de expresión génica. Por ejemplo, la detección de los perfiles de expresión génica se puede determinar utilizando el software Affymetrix Microarray Suite versión 5.0 (MAS 5.0) (disponible en Affymetrix, Santa Clara, California) para analizar la abundancia relativa de un gen o genes en función de la intensidad de la señal de los conjuntos de sondas, y los archivos de datos MAS 5.0 pueden transferirse a una base de datos y analizarse con el software Microsoft Excel y GeneSpring 6.0 (disponible a través de Agilent Technologies, Santa Clara, California). El algoritmo de detección del software MAS 5.0 se puede usar para obtener una visión general completa de cuántas transcripciones se detectan en muestras dadas y permite un análisis comparativo de 2 o más conjuntos de datos de microarreglos.

En algunas realizaciones, el módulo de comparación compara los perfiles de expresión de proteínas. Se puede usar cualquier software de comparación disponible, incluido, entre otros, el paquete Ciphergen Express (CE) y Biomarker Patterns Software (BPS) (disponible a través de Ciphergen Biosystems, Inc., Freemont, California). El análisis comparativo se puede realizar con el software del sistema de chip de proteínas (por ejemplo, The Proteinchip Suite (disponible a través de Bio-Rad Laboratories, Hercules, California). Los algoritmos para identificar perfiles de expresión pueden incluir el uso de algoritmos de optimización tal como el algoritmo de varianza de la media (por ejemplo, el algoritmo de JMP Genomics disponible a través de JMP Software Cary, Carolina del Norte).

El módulo de comparación proporciona un resultado de comparación legible por ordenador que se puede procesar en forma legible por ordenador según criterios predefinidos, o criterios definidos por un usuario, para proporcionar un contenido basado en parte en el resultado de comparación que se puede almacenar y generar según lo solicite un usuario utilizando un módulo de visualización. El módulo de visualización permite visualizar un contenido basado en parte en el resultado de comparación para el usuario, en el que el contenido es una señal indicativa de una enfermedad renal crónica o proteinuria. Dicha señal puede ser, por ejemplo, una visualización del contenido indicativo de la presencia o ausencia de una enfermedad renal crónica o proteinuria en un monitor de ordenador, una página impresa del contenido que indica la presencia o ausencia de una enfermedad renal crónica o proteinuria de una impresora, o un indicador luminoso o sonoro de la presencia o ausencia de una enfermedad renal crónica o proteinuria.

El contenido basado en el resultado de la comparación puede incluir un perfil de expresión de una o más proteínas, o un perfil de expresión de uno o más genes. En algunas realizaciones, el contenido basado en el resultado de comparación es simplemente una señal indicativa de la presencia o ausencia de una enfermedad renal crónica o proteinuria basada en los niveles de proteína ROBO2.

En algunas realizaciones, el contenido basado en el resultado de comparación se muestra en un monitor de ordenador. En una realización de la invención, el contenido basado en el resultado de comparación se muestra a través de medios imprimibles. En una realización de la invención, el contenido basado en el resultado de comparación se muestra como un indicador luminoso o sonoro. El módulo de visualización puede ser cualquier dispositivo adecuado configurado para recibir desde un ordenador y mostrar información legible por ordenador a un usuario. Entre los ejemplos no limitativos se incluyen, por ejemplo, ordenadores de propósito general como los que se basan en procesadores tipo Intel PENTIUM, ordenadores Apple y tabletas, Motorola PowerPC, Sun UltraSPARC, procesadores PA-RISC de Hewlett-Packard, cualquiera de una variedad de procesadores disponible a través de Advanced Micro Devices (AMD) de Sunnyvale, California, o cualquier otro tipo de procesador, dispositivos de despliegue visual tales como tabletas, teléfonos inteligentes móviles, pantallas planas, tubos de rayos catódicos y similares, así como impresoras de ordenador de varios tipos.

En algunas realizaciones, se usa un navegador de World Wide Web para proporcionar una interfaz de usuario para mostrar el contenido basándose en el resultado de la comparación. Debe entenderse que otros módulos de la invención pueden adaptarse para tener una interfaz de navegador web. A través del navegador web, un usuario puede construir solicitudes para recuperar datos del módulo de comparación. Por lo tanto, el usuario generalmente apunta y hace clic en los elementos de la interfaz de usuario, como los botones, los menús desplegables, las barras de

desplazamiento y elementos similares empleados convencionalmente en las interfaces gráficas de usuario. Las solicitudes así formuladas con el navegador web del usuario se transmiten a una aplicación web que las formatea para producir una consulta que se puede emplear para extraer la información pertinente relacionada con la información de la secuencia, por ejemplo, visualización de una indicación de la presencia o ausencia de mutación o supresión (ADN o proteína); visualización de los niveles de expresión de una secuencia de aminoácidos (proteína); visualización de los niveles de expresión de nucleótidos (ARN o ADN); visualización de la expresión, SNP, o perfiles de mutación, o haplotipos, o visualización de información basada en ellos. En una realización, también se muestra la información de secuencia de los datos de la muestra de referencia.

En algunas realizaciones, el módulo de visualización muestra el resultado de la comparación y si el resultado de la comparación es indicativo de una enfermedad, por ejemplo, si el perfil de expresión de ROBO2 es indicativo de enfermedad renal crónica o proteinuria.

En algunas realizaciones, el contenido basado en el resultado de comparación que se muestra es una señal (por ejemplo, señal positiva o negativa) indicativa de la presencia o ausencia de una enfermedad renal crónica o proteinuria, por lo tanto, solo una indicación positiva o negativa puede ser mostrada.

Por lo tanto, en este documento se proporcionan sistemas (y un medio legible por ordenador para hacer que los sistemas informáticos) realicen ensayos y métodos para determinar si un individuo tiene una enfermedad renal crónica o proteinuria o una predisposición, para una enfermedad renal crónica o una proteinuria con base en perfiles de expresión o información de secuencia.

Los sistemas y el medio legible por ordenador, son meramente una realización ilustrativa de la invención para realizar ensayos y métodos para determinar si un individuo tiene una enfermedad o trastorno específico o una predisposición, para una enfermedad o trastorno específico con base en perfiles de expresión o información de secuencia, y no pretende limitar el alcance de la invención. Las variaciones de los sistemas, y el medio legible por ordenador, son posibles y se pretende que estén dentro del alcance de la invención.

Los módulos del sistema o usados en el medio legible por ordenador, pueden asumir numerosas configuraciones. Por ejemplo, la función puede proporcionarse en una sola máquina o distribuirse en varias máquinas.

Robo2 es una proteína de podocitos localizada en la superficie de células basales de podocitos de ratón

Durante el desarrollo del riñón, el ARNm de *Robo2* se expresa en el mesénquima metanéfrico que rodea el brote ureterico arborizante y luego en el extremo proximal del cuerpo en forma de S (Piper y colaboradores, 2000), la ubicación de los podocitos primordiales. Para investigar si Robo2 también está involucrado en la maduración de los podocitos, además de su papel en la inducción renal temprana, se realizó una hibridación *in situ* y se encontró que el ARNm de *ROBO2* se expresó en la etapa de bucle capilar de glomérulos en desarrollo de embriones de ratón en el día embrionario 16.5 (E16.5) (Figuras 5A y 5B). La proteína Robo2 se hizo detectable por tinción de inmunofluorescencia en el glomérulo en desarrollo alrededor de E14.5 y alcanzó la expresión máxima en E16.5 (Figuras 5C-5E). Aunque la expresión disminuyó después de E17.5 durante el desarrollo (Figura 5F), la expresión específica de Robo2 se mantuvo en glomérulos después del nacimiento y fue detectable en ratones adultos a las 5 semanas de edad (Figuras 5G, 5H, 5L-5M).

Para determinar la localización celular de Robo2 en el glomérulo en desarrollo, se realizó una inmunohistoquímica de doble etiqueta con marcadores específicos del tipo de célula glomerular. Se encontró que la proteína Robo2 se localizaba conjuntamente con nefrina (FIGS. 1A-1C) y podocina (Figuras 1D-1F), dos proteínas asociadas al diafragma de hendidura de podocitos. Robo2 también se expresó conjuntamente en los glomérulos con la proteína adaptadora de interacción con nefrina Nck (Figuras 1G, 1I) y con WT1, un constituyente de los núcleos de los podocitos (Figuras 5H-5K). El etiquetado doble con anticuerpos contra nidógeno, un marcador de membrana basal (Figuras 1J-1L y 1P) y Pecam1, un marcador de células endoteliales (Figuras 1M-1O, 5M) mostró que Robo2 estaba localizado adyacente a la superficie externa de la membrana basal glomerular y ausente en las células endoteliales. La microscopía confocal de alta resolución demostró además que Robo2 subcelular era más abundante en la superficie basal de los podocitos (Figura 1Q). La microscopía electrónica de inmuno-oro de riñones de ratón postnatales con un anticuerpo contra el dominio citoplasmático estableció que Robo2 estaba localizado en procesos base de podocitos cerca de la cara citoplasmática de los diafragmas de hendidura (Figura 1R). Estos resultados demuestran que Robo2 es una proteína de los podocitos y su localización subcelular basal en los procesos base indica que desempeña un papel en la regulación de la estructura del proceso del pie del podocito.

El dominio intracelular Robo2 interactúa directamente con los dominios SH3 de la proteína adaptadora Nck

La unión del dominio extracelular de nefrina conduce a la fosforilación de tirosina de su dominio intracelular por Src quinasas y el reclutamiento del dominio SH2 de la proteína adaptadora Nck, que a su vez induce la polimerización de la actina (Jones y colaboradores, 2006; Verma y colaboradores, 2006). Nck tiene un dominio SH2 en el extremo terminal C y tres dominios SH3 cerca del extremo terminal N. La polimerización de la actina está mediada por los dominios SH3 de Nck (Rivera y colaboradores, 2004), que pueden reclutar varios reguladores del citoesqueleto que incluyen N-WASP y Pak (Jones y colaboradores, 2006). Estudios previos han demostrado que los dominios SH3 del

Dreadlock (Dock) homólogo de Nck de *Drosophila* también interactúa directamente con el dominio intracelular de Robo para inhibir la polimerización de actina (Fan y colaboradores, 2003; Yang y Bashaw, 2006).

Se probó si Nck de mamífero también puede interactuar directamente con Robo2 en el podocito para regular el citoesqueleto de F-actina. Para responder a esta pregunta, se utilizó un ensayo doble híbrido de levadura para examinar si Robo2 interactuó con Nck. Dado que dos Nck de mamífero (es decir, Nck1, Nck2) comparten una estructura y función similares en el desarrollo del riñón (Jones y colaboradores, 2006), se usó Nck1 en este estudio y se observó que el dominio intracelular de Robo2 interactuaba directamente con Nck1 (Figuras 2A-2C). El mapeo del sitio de unión en Robo2 para Nck1 mostró que la secuencia del aminoácido 1085 a 1301, que contiene 4 motivos ricos en prolina, fue crucial para la interacción (Figuras 2A y 2C). La ausencia de esta región rica en prolina impidió su interacción con Nck1 (Figura 2A). El mapeo del sitio de unión en Nck1 para Robo2 mostró que los dos primeros dominios SH3 eran necesarios para su interacción con Robo2 porque la eliminación de uno de los dos o ambos anulaba la interacción (Figura 2B). Por lo tanto, la interacción de Robo2 y Nck1 estaba mediada por dos dominios de proteínas bien caracterizados, los dominios SH3 y los motivos ricos en prolina (Figura 2C). CD2AP, otra proteína adaptadora de podocitos, también tiene tres dominios SH3 en su extremo terminal N (Shih y colaboradores, 2001), pero no se detectó ninguna interacción entre CD2AP y Robo2 ni en los ensayos de doble híbrido de levadura o de precipitación conjunta. Estas observaciones indican que la unión entre Robo2 y Nck1 en el podocito es una interacción específica.

Robo2 de longitud completa forma un complejo con nefrina a través de Nck

Se confirmó la interacción entre Robo2 y Nck mediante ensayos de extracción y precipitación conjunta. Robo2 humano de longitud completa etiquetado con His y myc (His-myc-Robo2) o Robo2 humano etiquetado con His y myc con una eliminación del dominio de unión a Nck1 (His-myc-Robo2-ΔNBD) se expresaron en células HEK. Las células HEK transfectadas se estimularon con medio condicionado con Slit2 (preparado a partir de células transfectadas de manera estable con Slit2) para activar Robo2 y aumentar la unión de Nck (Fan y colaboradores, 2003). Nck fue extraído con His-myc-Robo2 de los lisados de células HEK usando perlas de Ni-NTA pero no con His-myc-Robo2-ΔNBD (Figura 2D). Dado que el dominio SH2 de Nck interactúa con las fosfotirosinas en el dominio citoplasmático de nefrina (NCD) (Jones y colaboradores, 2006; Verma y colaboradores, 2006), se examinó si Robo2 formaba un complejo con nefrina a través de Nck utilizando un ensayo de precipitación conjunta. Para establecer una prueba de principio, se expresaron conjuntamente Robo2 y nefrina en células HEK con Fyn quinasa para aumentar la fosforilación de nefrina (Verma y colaboradores, 2006). La extracción de His-myc-Robo2 de los lisados de células HEK con perlas de Ni-NTA precipitó conjuntamente Nck y nefrina cuando se expresó Fyn (Figura 2E). En el orden inverso, la extracción de His-myc-nefrina precipitó conjuntamente Nck y Robo2 cuando se expresó Fyn quinasa (Figura 2F). Además, los precipitados preparados con el anticuerpo anti-Nck contenían tanto Robo2 como nefrina cuando se sobreexpresó Fyn (Figura 6A). Estos datos indican que nefrina, Nck y Robo2 forman un complejo *in vitro*. Para validar estos hallazgos *in vivo*, se inmunoprecipitó Robo2 de lisados de riñón de ratones recién nacidos y se encontró que Nck y nefrina se precipitaron conjuntamente (Figura 2G). Por el contrario, los precipitados preparados con el anticuerpo anti-nefrina también contenían Nck y Robo2 (Figura 2H). Dado que la nefrina se expresa de forma única en los podocitos, y que Nck y Robo2 también se localizan en estas células en el riñón, estos resultados indican que la nefrina, Nck y Robo2 son capaces de formar un complejo en los podocitos.

Para determinar el papel de Slit2 en la formación del complejo de proteínas Robo2-Nck-nefrina, His-myc-Robo2, nefrina y Fyn se expresaron conjuntamente en células HEK que se estimularon con medio condicionado con Slit2 o medio condicionado de control sin Slit2 antes de la precipitación conjunta (Figura 2I). Se observó que la estimulación con Slit2 aumentaba la unión de Robo2 a Nck y la formación de complejos con nefrina. Ambas relaciones de Nck1 frente a Robo2 y nefrina frente a Robo2 aumentaron después de la estimulación con Slit2 (Figura 2J). De acuerdo con este hallazgo, se observó que Slit2 se expresó fuertemente en glomérulos de ratones recién nacidos (Figuras 6B, 6C).

La señalización de Slit2-Robo2 inhibe la polimerización de actina inducida por nefrina

Dado que Slit une a Robo para reclutar Dock y srGAP para inhibir la polimerización de actina (Fan y colaboradores, 2003), se quiso probar si Robo2 también recluta a Nck para inhibir la polimerización de actina en células de mamíferos, un papel opuesto a la nefrina que promueve la polimerización de actina. Para abordar esta cuestión, se estudió la polimerización de la actina mediante el análisis de colas de F-actina en células que expresan la proteína quimérica CD16/7-NCD como se describió anteriormente (Jones y colaboradores, 2006; Verma y colaboradores, 2006). Este modelo utiliza los dominios extracelular y transmembrana de los receptores Fc de inmunoglobulina humana CD16 y CD7 fusionados al dominio citoplasmático de nefrina (NCD). CD16/7-HA, en el que NCD se reemplazó por una etiqueta HA, se usó como control negativo. Estas proteínas quiméricas se expresaron conjuntamente con Robo2 en células HEK y se agruparon mediante tratamiento con anticuerpo anti-CD16 y un anticuerpo secundario conjugado con rodamina. Primero se examinó si la agrupación del dominio citoplasmático de nefrina podría reclutar a Robo2. Se observó que la unión de CD16/7-NCD llevó a Robo2 a las agrupaciones, ya que la mayoría de Robo2 se localizó conjuntamente con las agrupaciones de CD16/7-NCD (Figuras 6D-6F). Sin embargo, no se observó localización conjunta de Robo2 con el control CD16/7-HA (Figura 6D') ni con el constructo Robo2-ΔNBD (Figura 6E'), en el que se eliminó el dominio de unión a Nck de Robo2 (NBD). Curiosamente, en ausencia de Slit2, la localización conjunta de CD16/7-NCD y Robo2 se redujo significativamente (Figura 6F'). Estos datos proporcionan evidencia adicional de que el dominio citoplasmático de nefrina es capaz de formar complejos con el dominio intracelular de Robo2 en presencia

de Slit2 y valida el modelo para determinar si la formación de un complejo Robo2-Nck-nefrina afecta la polimerización de la actina.

Las células HEK que expresan CD16/7-NCD y Robo2 se estimularon con Slit2 o medio condicionado de control sin Slit2 mientras se agrupaban por el anticuerpo anti-CD16. La polimerización de actina se evaluó cuantificando el número de células HEK con colas de F-actina visibles (Rivera y colaboradores, 2004). Se observó que aproximadamente el 80% de las células agrupadas CD16/7-NCD formaban colas de F-actina que podrían revelarse mediante la tinción con faloidina como se informó anteriormente (Jones y colaboradores, 2006; Verma y colaboradores, 2006). Sin embargo, tras la estimulación con Slit2, el número de células con colas de F-actina se redujo significativamente a aproximadamente el 40% (Figuras 3A y 3C). Solo se observó que unas pocas células contenían colas de F-actina más cortas cuando las proteínas CD16/7-HA de control estaban agrupadas (Figuras 3B y 3C). Para investigar más a fondo si esta inhibición de la polimerización de actina requería Nck, se repitió este ensayo utilizando Robo2 sin dominio de unión a Nck (Robo2-ΔNBD) para determinar si el bloqueo de la unión de Nck a Robo2 evitaría la inhibición de Slit2-Robo2 en la polimerización de actina inducida por nefrina. CD16/7-NCD se expresó conjuntamente con Robo2 de longitud completa (Figura 7A) o Robo2-ΔNBD (Figura 7B) en células HEK. Se observó que la eliminación del dominio de unión de Nck en Robo2 comprometió significativamente la inhibición de Slit2-Robo2 en la polimerización de actina inducida por nefrina (Figura 7C).

El estudio anterior ha demostrado que la nefrina está relacionada con el citoesqueleto de F-actina (Yuan y colaboradores, 2002). Para determinar si la señalización de Slit2-Robo2 podría inhibir la F-actina asociada a la nefrina, se inmunoprecipitaron CD16/7-NCD y CD16/7-HA con anticuerpo anti-CD16 y se examinó la cantidad de F-actina en los precipitados por transferencia Western. Se observó que la abundancia de F-actina asociada con nefrina se redujo significativamente con la estimulación con Slit2 (Figuras 3D y 3E). Al contrario, el ensayo de inmunoprecipitación *in vivo* mostró que la F-actina asociada con nefrina inmunoprecipitada por un anticuerpo anti-nefrina de riñones de ratones nulos recién nacidos de *Robo2* aumentó significativamente en comparación con la de los riñones de ratón heterocigotos de tipo silvestre o *Robo2* (Figuras 3F y 3G). En conjunto, estos resultados indican que la señalización de Slit2-Robo2 inhibe la polimerización de actina inducida por nefrina.

La pérdida de Robo2 en podocitos causa alteración en la estructura del proceso del pie en ratones

Nosotros y otros hemos demostrado previamente que casi todos los ratones nulos homocigotos para Robo2 con antecedentes genéticos mixtos mueren poco después del nacimiento debido a un fenotipo CAKUT severo (Grieshammer y colaboradores, 2004; Lu y colaboradores, 2007; Wang y colaboradores, 2011). Después de criar ratones con un alelo mutante *Robo2*<sup>del5</sup> durante cinco generaciones en un antecedente genético C57BL/6, el apareamiento de padres heterocigotos *Robo2*<sup>del5/+</sup> reveló tres ratones nulos homocigotos para *Robo2*<sup>del5/del5</sup> que sobrevivieron hasta 3 semanas (entre un total de 160 ratones analizados al destete). Para determinar si se requirió *Robo2* para la formación del proceso del pie de podocitos durante el desarrollo, se examinó la ultra estructura de los glomérulos en ratones nulos *Robo2* al nacimiento y 3 semanas de edad. Aunque el cuerpo del podocito, los procesos base y el diafragma de hendidura se formaron al nacer, la microscopía electrónica de transmisión mostró un desplazamiento del proceso del pie focal en ratones nulos homocigotos para *Robo2*<sup>del5/del5</sup> recién nacidos (Figuras 8A-8F). Mediante microscopía electrónica de barrido, se observaron procesos base interdigitales irregulares en ratones nulos homocigotos para *Robo2*<sup>del5/del5</sup> al nacer y 3 semanas de edad (Figuras 4A-4H). Estos hallazgos indican que se requiere *Robo2* para el modelado normal del proceso del pie de podocitos durante el desarrollo del riñón.

Para examinar el papel de *Robo2* en el mantenimiento de la estructura del proceso del pie en glomérulos maduros, se generaron ratones con desactivación de *Robo2* específicos de podocitos mediante el cruce condicional de ratones *Robo2*<sup>flox/flox</sup> con ratones heterocigóticos *Robo2*<sup>del5/+</sup>; *Tg*<sup>Nphs2-Cre/+</sup> que portan un transgén podocina-cre. Se analizaron 20 ratones mutantes *Robo2* específicos de podocitos con el genotipo *Robo2*<sup>del5/flox</sup>; *Tg*<sup>Nphs2-Cre/+</sup> y 20 ratones de la camada hasta de un año de edad. Los ratones con desactivación de *Robo2* específicos de podocitos fueron viables y fértiles. Sin embargo, mostraron procesos base de podocitos inusualmente amplios y un desplazamiento del proceso del pie segmentario focal en un mes (Figuras 4I-4M). A las 6 semanas de edad, los ratones mutantes desarrollaron una microalbuminuria significativa, que se detectó mediante análisis ELISA y transferencia Western (Figuras 4N y 4O). Además, la microscopía electrónica de barrido reveló defectos en el modelado del proceso del pie en ratones con desactivación de *Robo2* específica de podocitos. En lugar de procesos base secundarios interdigitantes tipo cremallera ordenada en ratones de tipo silvestre con desactivación de *Robo2* específica de podocitos mostraron un modelado de interdigitación del proceso base irregular y desorganizado al mes (Figuras 8G-8J). Estos defectos se hicieron más evidentes con el tiempo. A los siete meses de edad, se observaron procesos base abiertamente desorganizados, más cortos y serpenteantes en ratones con desactivación de *Robo2* específica de podocitos (Figuras 8K-8N), que eran similares al fenotipo de ratones nulos para *Robo2* de tres semanas de edad. Aunque los ratones con desactivación de *Robo2* específica de podocitos mostraron un número normal de podocitos, la deposición de la matriz aumentó significativamente en los glomérulos (Figuras 8O-8T, Tablas 1 y 2). Estos cambios morfológicos indican que *Robo2* desempeña un papel en la regulación y el mantenimiento de la estructura del proceso del pie del podocito glomerular.

La pérdida de *Robo2* alivia el defecto estructural de los podocitos en ratones nulos para nefrina

Los ratones homocigotos con nefrina desarrollan un fenotipo característico con dilatación del espacio de Bowman, procesos base anormalmente amplios, ausencia de diafragmas de hendidura glomerular y proteinuria significativa

(Done y colaboradores, 2008; Hamano y colaboradores, 2002). Dado que Robo2 formó un complejo con nefrina, y la señalización de Slit2-Robo2 inhibió la polimerización de actina inducida por nefrina, nos preguntamos si la pérdida de Robo2 modificaría el fenotipo de podocitos en ratones con nefrina nula. Para probar esta hipótesis de una posible interacción genética entre Robo2 y nefrina, se generaron tanto ratones con desactivación de *Robo2*<sup>-/-</sup>; *Nphs1*<sup>-/-</sup> de línea germinal como con desactivación de Robo2-nefrina doble *Robo2*<sup>flox/flox</sup>; *Tg*<sup>Nphs2-Cre/+</sup>; *Nphs1*<sup>-/-</sup> específica de podocitos. Al igual que los ratones homocigotos sencillos *Nphs1*<sup>-/-</sup>, ambos ratones con desactivación doble *Robo2*<sup>-/-</sup>; *Nphs1*<sup>-/-</sup> (4/4, 100%) y *Robo2*<sup>flox/flox</sup>; *Tg*<sup>Nphs2-Cre/+</sup>; *Nphs1*<sup>-/-</sup> (3/3, 100%) murieron dentro de las 10 horas posteriores al nacimiento. El análisis histológico, sin embargo, reveló que la morfología de los glomérulos en los ratones homocigotos dobles para *Robo2*<sup>-/-</sup>; *Nphs1*<sup>-/-</sup> aparecía relativamente normal en comparación con el fenotipo en ratones homocigotos para nefrina simple *Nphs1*<sup>-/-</sup>, que tenían un espacio de Bowman dilatado (Figuras 8U-8X). El número de glomérulos con el espacio de Bowman dilatado se redujo significativamente en ratones homocigotos dobles para *Robo2*<sup>-/-</sup>; *Nphs1*<sup>-/-</sup> (2/55, 3,6%) comparados con ratones nulos solo para nefrina (31/122, 25,4%) (Figuras 8Y y Tabla 3). Además, el análisis de la ultraestructura glomerular mediante microscopía electrónica de barrido mostró que la estructura del proceso del pie de podocitos interdigitante se observó en solo 1 (6,67%) de los 15 glomérulos de ratones homocigotos solo para nefrina (Figuras 4P y 4Q) en comparación con 100% en homocigotos sencillos *Robo2*<sup>-/-</sup> (Figuras 4T y 4U) y controles de tipo silvestre (Figura 4V y 4W). Sorprendentemente, el patrón interdigitación de los procesos base de podocitos se restauró en 12 (75%) de los 16 glomérulos de riñones de ratones recién nacidos homocigotos dobles para *Robo2*<sup>-/-</sup>; *Nphs1*<sup>-/-</sup> (Figuras 4R y 4S, Tabla 4) lo que indica que una pérdida concomitante de Robo2 y nefrina alivió el fenotipo estructural del proceso del pie de podocitos en estos ratones. Estos hallazgos indican que las interacciones físicas Robo2-Nck-nefrina descritas anteriormente tienen un efecto sustancial en la morfología del proceso del pie del podocito *in vivo* cuando los niveles de expresión de Robo2 y nefrina están alterados genéticamente.

Los podocitos exhiben un grado notable de plasticidad. Durante el desarrollo, se diferencian de simples células epiteliales cuboidales en células elaboradas que contienen procesos que reconocemos como podocitos maduros (Reeves y colaboradores, 1978). Esta plasticidad se conserva después de la maduración. Se ve más gráficamente como el desplazamiento reversible del proceso del pie después de la neutralización de la carga superficial experimental con sulfato de protamina y la restauración con heparina (Seiler y colaboradores, 1975) y durante la recaída y remisión de proteinuria en niños con enfermedad de cambio mínimo (Nachman y colaboradores, 2008). Los cambios más sutiles en los procesos del pie probablemente se producen en condiciones fisiológicas en respuesta a señales positivas y negativas en forma de estímulos hemodinámicos, hormonales o paracrinos. Dada la abundancia de F-actina en los procesos del pie, es probable que, sin desear estar ligados o limitados por la teoría, tales estímulos provoquen esos cambios sutiles en respuesta a señales positivas y negativas transducidas al citoesqueleto de F-actina. Unas señales positivas demasiado desequilibradas pueden conducir a un fenotipo de enfermedad. De hecho, aunque todavía no se ha identificado un ligando fisiológico, está claro que la agrupación y la fosforilación de la nefrina inducen la polimerización de la actina mediante el reclutamiento de Nck, un mecanismo que puede estar involucrado en la proteinuria inducida en ratas por un anticuerpo monoclonal nefritogénico al dominio extracelular de nefrina (Topham y colaboradores, 1999) y en casos de síndrome nefrótico congénito que desarrollan autoanticuerpos anti-nefrina después del trasplante renal (Patrakka y colaboradores, 2002).

Nuestros estudios descritos en este documento revelan otro nivel de regulación negativa de la polimerización de la actina de podocitos en la que Robo2, cuando está unido por Slit, inhibe la polimerización de la actina inducida por nefrina. Se propone, sin desear estar ligados o limitados por la teoría, que la señalización Slit-Robo2 puede inhibir la polimerización de actina inducida por nefrina para mantener la estructura normal del proceso del pie de podocitos de la siguiente manera: en condiciones fisiológicas (por ejemplo, durante el desarrollo del proceso del pie), la unión de la nefrina conduce a fosforilación de la Y1191/1208/1232 intracelular a la que se une el dominio SH2 de Nck (Jones y colaboradores, 2006; Verma y colaboradores, 2006). Nck, a su vez, recluta reguladores del citoesqueleto tales como N-WASP a través de sus dominios SH3 para promover la polimerización de actina para la extensión o propagación del proceso del pie del podocito (Figura 8Z). La secreción local y la unión de Slit aumentan la interacción de Robo2 con Nck a través de su región rica en prolina y los dos primeros dominios SH3 de Nck. El secuestro de los dos primeros dominios SH3 de Nck por Robo2 inhibiría la polimerización de la actina mediada por nefrina-Nck y disminuiría la F-actina asociada con la nefrina para mantener un citoesqueleto de F-actina dinámico y equilibrado y la estructura normal del proceso del pie de podocitos (Figura 8Z). Además de la inhibición directa de la polimerización de actina inducida por nefrina a través de Nck, la señalización Slit-Robo2 puede inactivar la polimerización de actina a través de otras vías, como el reclutamiento de Ena, Abl, srGAP para regular negativamente el citoesqueleto de F-actina como se informó anteriormente (Bashaw y colaboradores, 2000; Wong y colaboradores, 2001). En ausencia de señalización Slit2-Robo2 (por ejemplo, cuando Robo2 se elimina), se pierden los efectos inhibidores de Robo2 sobre la polimerización inducida por nefrina. Los dominios SH3 de Nck son capaces de interactuar con los reguladores del citoesqueleto secuencia abajo para aumentar la polimerización de la actina (Figura 8Z), lo que puede explicar la estructura alterada del proceso del pie del podocito identificada en los ratones mutantes *Robo2*. Nuestros resultados descritos en el presente documento apoyan por lo tanto un mecanismo por el cual la señalización Slit-Robo puede regular la plasticidad de los podocitos regulando negativamente el citoesqueleto de F-actina, que es similar al papel de la señalización Slit-Robo en el rastreo de conos de crecimiento de axones (Guan y Rao, 2003). El hallazgo patológico de una mayor deposición de matriz en los glomérulos del ratón mutante *Robo2* probablemente representa una respuesta secundaria.

Aunque está claro a partir de nuestros estudios descritos en este documento que Robo2 se localiza en la superficie basal de los podocitos y forma un complejo con otras proteínas de diafragma de hendidura en el proceso del pie establecido a través de su dominio intracelular, sigue siendo incierto si realmente forma parte del diafragma mismo de hendidura. Curiosamente, el dominio extracelular de Robo2 se parece al de la nefrina, que tiene ocho motivos de tipo inmunoglobulina (Ig) y un dominio de fibronectina, mientras que Robo2 tiene cinco motivos de tipo Ig y tres dominios de fibronectina (Figura 8Z) (Tryggvason y colaboradores, 2006). Se ha probado la interacción entre el dominio intracelular de Robo2 y el dominio citoplasmático de la nefrina en el ensayo doble híbrido de levadura. Los datos bioquímicos (Figuras 2E y 2F) tampoco apoyaron una interacción directa entre estos dos receptores *in vitro*. Sin embargo, es posible que el dominio extracelular de Robo2 pueda asociarse con el dominio extracelular de nefrina *in vivo* en las membranas celulares de procesos de pie adyacentes a través de una interacción trans en el diafragma de hendidura.

Se encontró que los ratones con desactivación específica del podocito y nulos homocigotos *Robo2* desarrollaron un patrón de interdigitación del proceso del pie alterado, un fenotipo que es diferente de aquel de los ratones nulos para nefrina (Hamano y colaboradores, 2002; Done, 2008). Esto no es sorprendente ya que la nefrina y Robo2 desempeñan papeles opuestos en la regulación del citoesqueleto de F-actina de podocitos. Mientras que la señalización de nefrina induce la polimerización localizada de actina, la señalización Slit2-Robo2 actúa como un regulador negativo en la polimerización de actina para mantener la plasticidad y dinámica del proceso del pie del podocito. Cabe destacar que se observa un defecto similar en la organización del proceso del pie en ratones en los que se elimina el factor de despolimerización de la actina Cofilin-1, otro regulador negativo del citoesqueleto de F-actina en los podocitos (Garg y colaboradores, 2010). Esto indica que la ausencia de un factor promotor de la polimerización de la actina, como la señalización de nefrina o un factor inhibidor, como la señalización de Robo2, afectará la estructura normal de los podocitos. Por lo tanto, el equilibrio entre los reguladores del citoesqueleto de F-actina positivos y negativos en los podocitos es importante para mantener la estructura normal del proceso del pie. Recuperar este equilibrio al eliminar tanto las señales positivas (nefrina) como las señales negativas (Robo2) puede explicar la restauración de la interdigitación del proceso del pie de podocitos y el fenotipo glomerular más leve en los ratones con desactivación doble de Robo2-nefrina. Nuestros estudios descritos en el presente documento demuestran las funciones duales de la nefrina como un componente esencial del diafragma de hendidura para controlar la permosselectividad glomerular por un lado (Tryggvason y colaboradores, 2006) y como regulador de la morfología del proceso del pie a través de su interacción con el citoesqueleto de actina (Jones y colaboradores, 2006; Verma y colaboradores, 2006) por el otro lado. Mientras que la señalización de Robo2 contrarresta claramente los efectos de señalización positivos de la nefrina en los procesos del pie, queda por determinar si también influye en la integridad del diafragma de hendidura.

Por consiguiente, como se describe en este documento, se ha identificado Robo2 como un nuevo componente de la unión intercelular de podocitos en el riñón. Se han demostrado interacciones entre Robo2 y nefrina mediante técnicas bioquímicas, funcionales y genéticas, y se ha demostrado que la señalización Slit2-Robo2 inhibe la dinámica de actina inducida por nefrina. Estos resultados indican que la señalización de Robo2 actúa como un regulador negativo en la nefrina para modular la arquitectura del proceso del pie de podocitos. Este estudio amplía nuestra comprensión del papel de la señalización Slit-Robo e identifica un nuevo mecanismo de interferencia mediante el cual el receptor de señal de guía Robo podría influir en la dinámica del citoesqueleto de F-actina.

A menos que se defina de otra manera en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente solicitud tendrán los significados que comúnmente entienden los expertos en la técnica a los que pertenece esta divulgación. Debe entenderse que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos particulares, etc., descritos en este documento y como tales pueden variar. La terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones. Las definiciones de términos comunes en inmunología y biología molecular se pueden encontrar en The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 18a Edición, publicado por Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-18-2); Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicada por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); Immunology por Werner Luttmann, publicada por Elsevier, 2006. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se encuentran en Benjamin Lewin, Genes IX, publicado por Jones & Bartlett Publishing, 2007 (ISBN-13: 9780763740634); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., EE.UU. (1982); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., EE.UU. (1989); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, EE.UU. (1986); o Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol.152, S. L. Berger y A. R. Kimmerl Eds., Academic Press Inc., San Diego, EE.UU. (1987); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB) (Fred M. Ausubel, et al., ed., John Wiley y Sons, Inc.), Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, et al., ed., John Wiley and Sons, Inc.) y Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, et al., ed. John Wiley and Sons, Inc.).

Como se usa en el presente documento, el término "que comprende" significa que otros elementos también pueden estar presentes además de los elementos definidos presentados. El uso de "que comprende" indica inclusión en lugar de limitación.

Como se usa en el presente documento, el término "que consiste esencialmente en" se refiere a los elementos requeridos para una realización dada. El término permite la presencia de elementos adicionales que no afectan materialmente las características básicas y novedosas o funcionales de esa realización de la invención.

5 El término "que consiste en" se refiere a composiciones, métodos y componentes respectivos de los mismos como se describe en el presente documento, que son exclusivos de cualquier elemento no mencionado en esa descripción de la realización.

Además, a menos que el contexto lo requiera, los términos en singular incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular. Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referencias al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito en el presente documento y/o que serán evidentes para los expertos en la materia al leer esta descripción y así sucesivamente.

10 Aparte de en los ejemplos operativos, o cuando se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción utilizadas en este documento deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" cuando se usa en relación con porcentajes puede significar  $\pm 1\%$ .

Debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares, etc., descritos en este documento y como tales pueden variar. La terminología utilizada en este documento tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones.

Las realizaciones de los diversos aspectos descritos en el presente documento pueden ilustrarse mediante los siguientes párrafos numerados:

2. Un método para el tratamiento de la enfermedad renal crónica en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de padecer una enfermedad renal crónica una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un inhibidor de ROBO2.

3. Un método para la reducción de la proteinuria en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar a un sujeto que tiene o tiene riesgo de proteinuria una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un inhibidor de ROBO2.

4. El método de cualquiera de los párrafos 1 o 2, en el que el inhibidor de ROBO2 es un anticuerpo bloqueante o un fragmento de unión a antígeno del mismo específico para ROBO2, una molécula antisentido específica para ROBO2, un ARN de interferencia corto (ARNic) específico para ROBO2, un inhibidor de molécula pequeña de ROBO2, un polipéptido inhibidor de ROBO2 o un análogo estructural de ROBO2.

5. El método de cualquiera de los párrafos 1-3, en el que el inhibidor de ROBO2 bloquea o reduce la unión de ROBO2 a SLIT, a Nck, o a ambos.

6. El método de cualquiera de los párrafos 1-4, en el que el inhibidor de ROBO2 es específico para el dominio de unión a SLIT de Ig1, los dominios de unión a SLIT de Ig1 e Ig2, el dominio de unión intracelular a Nck, o cualquier combinación de los mismos.

7. El método del párrafo 3, en el que el polipéptido inhibidor de ROBO2 es una proteína de fusión ROBO2 negativa dominante, un polipéptido que comprende un dominio extracelular de ROBO2 sin el dominio intracelular, o un polipéptido que comprende un dominio intracelular de ROBO2 sin el dominio extracelular.

8. El método de cualquiera de los párrafos 1-6, en el que el sujeto que tiene o está en riesgo de padecer una enfermedad renal crónica tiene nefropatía diabética o presión arterial alta.

9. El método de cualquiera de los párrafos 1-7, que además comprende administrar al sujeto un agente terapéutico adicional.

10. El método del párrafo 8, en el que el agente terapéutico adicional es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) o un bloqueador del receptor de angiotensina II (ARB).

11. Un método que comprende:

a. ensayar una muestra de prueba biológica de un sujeto para determinar un nivel de expresión de polipéptido ROBO2 o un ARN que codifica un polipéptido ROBO2;

b. determinar si el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 en la muestra biológica de prueba está por encima de un nivel de umbral de referencia; y

c. diagnosticar al sujeto como necesitado de tratamiento o terapia para la enfermedad renal crónica.

12. El método del párrafo 10, en el que el ensayo del nivel de expresión del polipéptido ROBO2 se realiza utilizando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo específico para el polipéptido ROBO2.

5 13. El método del párrafo 10, en el que el ensayo del nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 se realiza mediante PCR o un ensayo de hibridación.

14. El método de cualquiera de los párrafos 10-12, en donde la muestra biológica de prueba es una biopsia de riñón, orina, sangre, muestra de suero o células sedimentadas de una muestra de orina.

15. El método de cualquiera de los párrafos 10-13, en el que el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 es al menos 20% superior al nivel de umbral de referencia.

10 16. El método de cualquiera de los párrafos 10-13, en el que el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 es al menos dos desviaciones estándar por encima del nivel de umbral de referencia.

17. Un ensayo que comprende:

15 a. poner en contacto una muestra de prueba biológica aislada de un sujeto con un reactivo que detecta el polipéptido ROBO2 o un ARN que codifica un polipéptido ROBO2; y

b. medir el nivel de polipéptido ROBO2 o un ARN que codifica un polipéptido ROBO2,

c. en el que un mayor nivel de dicho polipéptido ROBO2 o dicho ARN que codifica un polipéptido ROBO2, en relación con una muestra biológica normal, identifica a un sujeto que tiene enfermedad renal crónica y/o progresión de enfermedad renal crónica o proteinuria.

20 18. El ensayo del párrafo 16, en el que la detección del nivel de expresión del polipéptido ROBO2 se realiza utilizando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo específico para el polipéptido ROBO2.

19. El ensayo del párrafo 16, en el que la detección del nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 se realiza mediante PCR o un ensayo de hibridación.

25 20. El ensayo de uno cualquiera de los párrafos 16-18, en el que la muestra biológica de prueba es una biopsia de riñón, orina, sangre, muestra de suero o células sedimentadas de una muestra de orina.

21. El ensayo de uno cualquiera de los párrafos 16-19, en el que el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 está al menos un 20% por encima del nivel de umbral de referencia.

30 22. El ensayo de uno cualquiera de los párrafos 16-19, en el que el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 es al menos dos desviaciones estándar por encima del nivel de umbral de referencia.

23. El ensayo de cualquiera de los párrafos 16-21, en el que el sujeto ha sido diagnosticado con diabetes o presión arterial alta.

35 24. Un sistema para determinar si un sujeto está en riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria, o tiene enfermedad renal crónica que comprende:

a. un módulo de medición configurado para determinar el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 en una muestra biológica obtenida de un sujeto;

40 b. un módulo de comparación configurado para recibir dicho nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 determinado por el módulo de medición y realizar al menos un análisis para determinar si el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del ARN que codifica un polipéptido ROBO2 es mayor que un nivel o proporción de referencia predeterminado, y para proporcionar un contenido recuperado; y

45 c. un módulo de visualización para mostrar un contenido basado en la salida de datos de dicho módulo de comparación, en el que el contenido comprende una señal indicativa de que el nivel de expresión o proporción de polipéptido ROBO2 o ARN es mayor que el nivel o proporción de referencia predeterminado, o una señal indicativa que el nivel o la relación de expresión de ROBO2 no sea mayor que el nivel de referencia o la relación predeterminada.

25. El sistema del párrafo 23, en el que el contenido que se muestra en dicho módulo de visualización comprende además una señal indicativa del sujeto recomendado para recibir un régimen de tratamiento particular.

26. Un sistema para determinar si un sujeto tiene riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria, o tiene enfermedad renal crónica que comprende:
- a. un módulo de determinación configurado para recibir al menos una muestra de prueba obtenida de un sujeto y realizar al menos un análisis en dicha al menos una muestra de prueba para determinar la presencia o ausencia de cualquiera de las siguientes condiciones:
    - i. una relación de expresión de ROBO2 mayor que una relación predeterminada, o
    - ii. un nivel de expresión de ROBO2 mayor que un nivel predeterminado
  - b. un dispositivo de almacenamiento configurado para almacenar la salida de datos de dicho módulo de determinación; y
  - c. un módulo de visualización para mostrar un contenido basado en la salida de datos de dicho módulo de determinación, en el que el contenido comprende una señal indicativa de que la relación de expresión de ROBO2 es mayor que la relación predeterminada o el nivel de ROBO2 mayor que un nivel predeterminado, o una señal indicativa de que la relación de expresión de ROBO2 no es mayor que la relación predeterminada o no mayor que un nivel predeterminado.
27. El sistema del párrafo 25, en el que el contenido que se muestra en dicho módulo de pantalla comprende además una señal indicativa del sujeto recomendado para recibir un régimen de tratamiento particular.
28. Un método para tratar a un sujeto humano con riesgo de enfermedad renal crónica o proteinuria, que comprende administrar un tratamiento o terapia para prevenir la aparición de enfermedad renal crónica o proteinuria en un sujeto humano que se determina que tiene un nivel de proteína ROBO2 superior al nivel de umbral de referencia.
29. El método del párrafo 27, en el que el nivel de proteína ROBO2 está al menos un 20% por encima del nivel de referencia.
30. El método del párrafo 27, en el que el nivel de proteína ROBO2 es al menos dos desviaciones estándar por encima del nivel de referencia.
31. El método de cualquiera de los párrafos 27-29, en el que el tratamiento o terapia para prevenir la aparición de enfermedad renal crónica o proteinuria comprende un inhibidor de ROBO2.
32. El método del párrafo 30, en el que el inhibidor de ROBO2 es un anticuerpo bloqueante o un fragmento de unión a antígeno del mismo específico para ROBO2, una molécula antisentido específica para ROBO2, un ARN interferente corto (ARNic) específico para ROBO2, una pequeña molécula inhibidora de ROBO2, un polipéptido inhibidor de ROBO2, o un análogo estructural de ROBO2.
33. El método de cualquiera de los párrafos 30-31, en el que el inhibidor de ROBO2 bloquea o reduce la unión de ROBO2 a SLIT, a Nck, o a ambos.
34. El método de uno cualquiera de los párrafos 30-32, en el que el inhibidor de ROBO2 es específico para el dominio de unión a SLIT de Ig1, los dominios de unión a SLIT de Ig1 e Ig2, el dominio de unión intracelular a Nck, o cualquier combinación de los mismos.
35. El método del párrafo 31, en el que el polipéptido inhibidor de ROBO2 es una proteína de fusión ROBO2 negativa dominante, un polipéptido que comprende un dominio extracelular de ROBO2 sin el dominio intracelular, o un polipéptido que comprende un dominio intracelular de ROBO2 sin el dominio extracelular.
36. Un inhibidor de ROBO2 para uso en el tratamiento de una enfermedad renal crónica.
37. Un inhibidor de ROBO2 para uso en el tratamiento de la proteinuria.
38. El uso de uno cualquiera de los párrafos 35 o 36, en el que el inhibidor de ROBO2 es un anticuerpo bloqueante o un fragmento de unión a antígeno del mismo específico para ROBO2, una molécula antisentido específica para ROBO2, un ARN interferente corto (ARNic) específico para ROBO2, un inhibidor de molécula pequeña de ROBO2, un polipéptido inhibidor de ROBO2 o un análogo estructural de ROBO2.
39. El uso de cualquiera de los párrafos 35 a 37, en el que el inhibidor de ROBO2 bloquea o reduce la unión de ROBO2 a SLIT, a Nck, o a ambos.
40. El uso de uno cualquiera de los párrafos 35-38, en el que el inhibidor de ROBO2 es específico para el dominio de unión a SLIT de Ig1, los dominios de unión a SLIT de Ig1 e Ig2, el dominio de unión intracelular a Nck, o cualquier combinación de los mismos.

41. El uso del párrafo 37, en el que el polipéptido inhibidor de ROBO2 es una proteína de fusión ROBO2 negativa dominante, un polipéptido que comprende un dominio extracelular de ROBO2 sin el dominio intracelular, o un polipéptido que comprende un dominio intracelular de ROBO2 sin el dominio extracelular.

5 42. El uso de uno cualquiera de los párrafos 35 a 40, en el que la enfermedad renal crónica o la proteinuria es causada por nefropatía diabética o presión arterial alta.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

## Ejemplos

Hibridación *in situ* de tejidos, inmunohistoquímica y microscopía electrónica de inmuno-oro

10 El análisis de hibridación *in situ* se realizó con ribosondas *Robo2* marcadas con digoxigenina como se describió previamente (Grieshammer y colaboradores, 2004). La inmunohistoquímica se realizó en tejidos de riñón embrionario de ratón fijados en paraformaldehído al 4% y en tejidos de riñón de ratón adulto fijados en metanol. Para la microscopía electrónica de inmuno-oro, los riñones de ratón de tipo silvestre se diseccionaron y se fijaron en paraformaldehído-lisina-peryodato (PLP). Se prepararon secciones ultrafinas del riñón de ratón y se incubaron con anticuerpo de cabra anti-Robo2 (DAKO Corporation) y un anticuerpo secundario acoplado a oro coloidal de 10 nm (Ted Pella).

15 Ensayos de doble híbrido de levadura, precipitación conjunta y polimerización de actina

Se utilizó el sistema de doble híbrido de levadura DUPLEX-A™ (OriGene Tech) para caracterizar la interacción de Robo2 y Nckl de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cultivo celular, la precipitación conjunta de proteínas etiquetadas con His y la inmunoprecipitación se llevaron a cabo como se informó anteriormente (Fan y colaboradores, 2003). Para la inmunoprecipitación endógena, se utilizaron riñones de ratones recién nacidos. El entrecruzamiento mediado por el anticuerpo CD16 de las proteínas de fusión CD16/7 y el ensayo de polimerización de actina se realizaron como se describió anteriormente (Jones y colaboradores, 2006; Rivera y colaboradores, 2004; Verma y colaboradores, 2006).

Estudio de ratón con desactivación, microscopía electrónica de barrido y transmisión y análisis glomerular de riñón

25 Los protocolos de ratón fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) en el Centro Médico de la Universidad de Boston (# 14388). La generación y el genotipado del alelo condicional *Robo2*<sup>fllox</sup>, alelo mutante de línea germinal *Robo2*<sup>del5</sup> (también llamado *Robo2* indistintamente en este artículo), y el alelo de tipo silvestre *Robo2*<sup>+</sup> se describieron anteriormente (Lu y colaboradores, 2007; Wang y colaboradores, 2011). Para generar ratones con desactivación doble de *Robo2*-nefrina, se cruzaron ratones *Robo2*<sup>+/-</sup> con ratones *Nphs1*<sup>+/-</sup> que se generaron previamente (Hamano y colaboradores, 2002). Para la microscopía electrónica de transmisión, los riñones se fijaron, se incubaron en glutaraldehído al 2% en cacodilato de sodio 0,15 M, se deshidrataron en etanol graduado, se embebieron en Epon, se seccionaron y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las secciones del riñón ultrafino se examinaron utilizando un microscopio electrónico JEM-1011. Para la microscopía electrónica de barrido, los riñones se prepararon siguiendo el protocolo estándar. Para los estudios patológicos del riñón, los riñones se fijaron en paraformaldehído al 4%, se embebieron en parafina, se seccionaron y se tiñeron usando los métodos estándar de ácido peryódico-Schiff (PAS) o hematoxilina eosina (H&E). Para la cuantificación del número de podocitos, se usó WT1 como marcador nuclear de podocitos y se realizó una tinción con inmunoperoxidasa en secciones de riñón siguiendo el protocolo estándar. Se contaron los núcleos de podocitos positivos para WT1 en cada sección transversal glomerular. Para el análisis de proteinuria, se examinaron muestras de orina "puntuales" de ratones de 6 semanas de edad utilizando un kit de cuantificación de ELISA de albuminuria murina (Exocell) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la varilla de graduada para orina (Multistix, Bayer, IN) como método de cribado.

Hibridación de tejidos *in situ* e inmunohistoquímica

45 El análisis de hibridación *in situ* se realizó con ribosondas de Robo2 marcadas con digoxigenina como se describió previamente (Grieshammer y colaboradores, 2004). El ADNc de *Robo2* se linealizó con *NotI* y las sondas se generaron utilizando el kit de detección y marcación de ADN DIG (Roche Applied Science). La hibridación se realizó en secciones congeladas de riñón embrionario de ratón embebidas en OCT y fijadas en paraformaldehído al 4%. La inmunohistoquímica se realizó en tejidos de riñón embrionario de ratón fijados en paraformaldehído al 4% seguido de crioprotección con sacarosa al 30% (Mugford y colaboradores, 2008) y en tejidos de riñón de ratones adultos fijados en metanol. Los riñones de ratón embebidos en el compuesto OCT se congelaron y se seccionaron usando un criostato a 8-10 µm. Las secciones se tiñeron con anticuerpos primarios y seguido por un anticuerpo secundario apropiado conjugado con FITC o Cy3. Los principales anticuerpos utilizados en este estudio incluyen aquellos contra ROBO2 (R&D System, Abnova, Santa Cruz Biotechnology), nefrina (sintetizada a la medida) (Topham y colaboradores, 1999), Nck (Upstate/Millipore), podocina (Sigma), nidógeno (Santa Cruz Biotechnology), Pecam1 (BD Biosciences), WT1 (Santa Cruz Biotechnology), SLIT2 (Santa Cruz Biotechnology), PDGFR beta (Cell Signaling), Sinaptopodina (Santa Cruz Biotechnology). Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal de barrido láser de disco rotatorio multipunto Perkin Elmer UltraView LCI y un microscopio de barrido láser confocal Zeiss LSM 510 con un objetivo de inmersión en aceite 60x.

## Microscopia Electrónica Inmuno-oro

Los riñones de ratón de tipo silvestre se diseccionaron y se fijaron en paraformaldehído-lisina-peryodato (PLP) a 4°C durante la noche. El tejido se lavó en 1x PBS y se deshidrató en etanol graduado y se embebió en resina LR White (Electron Microscopy Sciences). Se prepararon secciones ultrafinas del riñón de ratón y se transfirieron a rejillas de oro recubiertas con Formvar y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 1% y suero normal de cabra al 5% en 1x PBS. Las secciones luego se incubaron con anticuerpo anti-Robo2 de cabra con una dilución 1:50 en DAKO (DAKO Corporation) a 4°C durante la noche. Se usó suero no inmune como control. Después de tres lavados con 1x PBS, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario IgG acoplado a oro coloidal de 10 nm (Ted Pella) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las secciones finalmente se fijaron posteriormente con glutaraldehído al 1% y se contrastaron con acetato de uranilo. Las secciones se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión JEM-1011 (JEOL, Tokio, Japón) a 80 kV, y las imágenes se adquirieron con un sistema de imágenes digitales AMT (Advanced Microscopy Techniques, Danvers, MA.) y se importaron a Adobe Photoshop. La localización subcelular de Robo2 teñida con partículas de oro en glomérulos se reconoció en micrografías electrónicas digitales en comparación con las micrografías de control teñidas con suero no inmune.

## Ensayo doble híbrido de levadura

Se usó el sistema de doble híbrido de levadura DUPLEX-A™ (OriGene Tech, Rockville, MD) para caracterizar la interacción de Robo2 y Nckl. Los ADNc que codifican el dominio intracelular de Robo2 humana y sus formas truncadas se clonaron en el vector pJG4-5 en los sitios *EcoRI/XhoI* del vector, fusionándolos en el dominio de activación de transcripción de B42. Los ADNc de Nckl humano y sus formas truncadas se clonaron en el vector pEG202 en *EcoRI/XhoI* para fusionarlos al dominio de unión a ADN de LexA. El gen *lacZ* en el constructo pSH18-34 y el gen *LEU2* en el genoma de levadura de la cepa EGY48 se utilizaron como genes informadores. Los constructos pEG202, pSH18-34 y pJG4-5 se transformaron conjuntamente en células EGY48 de levadura. La interacción se consideró positiva si las células de levadura se volvieron azules en presencia de X-gal y crecieron en ausencia de leucina.

## Cultivo celular, constructos de ADN, transfección, precipitación conjunta y análisis de transferencia Western

Las células HEK (293T) se transfectaron a una confluencia del 60% usando transfección con fosfato de calcio. Para hacer proteínas de fusión marcadas con his y myc en el extremo terminal C, se clonaron nefrina humana de longitud completa y Robo2 en el vector pSecTag B (Invitrogen) en los sitios de restricción *HindIII/EcoRI* y *EcoRI/XhoI* respectivamente. Se obtuvo Robo2-ΔNBD al eliminar el dominio de unión a Nck (Figura 2C) usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QUIKCHANGE (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Robo2 y Nckl no etiquetados se clonaron en el vector pCS2 (Addgene) en los sitios *EcoRI/XhoI*, la nefrina en los sitios *HindIII/EcoRI*. Los constructos Slit2 humanos etiquetados con Fyn y myc se han informado previamente (Li y colaboradores, 2008; Wong y colaboradores, 2001). Los constructos CD16/7-NCD y CD16/7-HA también se informaron previamente (Verma y colaboradores, 2006). Para detectar la interacción de Robo2 y Nckl, se expresó Robo2 o Robo2-ΔNBD humano marcado con His y myc en el extremo terminal C en células HEK. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se lisaron en el regulador de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, TX100 al 0,5%, inhibidor de proteasa 1x [pH 8,0]). Los lisados celulares se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C; los sobrenadantes se incubaron con resina Ni-NTA (Qiagen) a 4°C durante 2 horas para precipitar His-Robo2, se usó resina NTA sin Ni como control. La resina se lavó tres veces con regulador de lavado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, TX100 al 0,5% [pH 8,0]) y se calentó a 95°C durante 10 min. Los precipitados se resolvieron en geles de SDS-PAGE y se transfirieron con anticuerpos anti-myc de conejo, anticuerpos monoclonales de conejo anti-Nckl (Cell Signaling) a una dilución de 1: 1000. Para examinar la triple interacción entre Robo2, Nckl y nefrina, se expresaron conjuntamente His-myc-Robo2 o His-myc-Robo2-ΔNBD en células HEK con nefrina humana y Fyn humana. His-myc-Robo2 se precipitó con perlas de Ni-NTA como se describió anteriormente. Para confirmar la interacción triple, His-myc-nefrina se expresó conjuntamente con Robo2, y Fyn en las células HEK y His-myc-nefrina se redujo con perlas de Ni-NTA. Los precipitados se transfirieron con anticuerpos anti-myc policlinal de conejo, anti-Nckl monoclonal de conejo, anti-nefrina policlinal de conejo, anti-Robo2 monoclonal de ratón (R&D Systems) y anti-Fyn policlinal de conejo (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:1000. Para la inmunoprecipitación conjunta de proteínas endógenas, se homogeneizaron los riñones de ratones recién nacidos en el regulador RIPA (Tris 50 mM [pH 7,4], NaCl 150 mM, SDS al 0,1%, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 1 mM, inhibidor de proteasa 1x) en hielo. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se incubó con 1 µg de anticuerpo anti-Robo2 monoclonal de ratón (R&D Systems) durante 1 hora a 4°C. Se utilizó como control IgG de cabra de control (Santa Cruz Biotechnology). Las muestras se mezclaron luego con 30 µL de la suspensión de perlas de agarosa de proteína A/G Plus (Santa Cruz Biotechnology) y se incubaron adicionalmente durante 12 horas a 4°C. Las perlas se lavaron luego tres veces en el regulador RIPA y las proteínas se eluyeron en regulador de carga de proteínas 1x calentando a 95°C durante 10 min. Los precipitados se resolvieron en geles de SDS-PAGE y se transfirieron con anticuerpos anti-Robo2 de ratón, anti-nefrina de conejo y anti-Nckl de conejo como se describió anteriormente. La actina se transfirió con un anticuerpo de ratón anti-beta-actina de Sigma. La intensidad de las bandas se midió usando ImageJ. Para la detección de la proteinuria, las muestras de orina puntuales de ratones se recogieron y se diluyeron con un regulador de carga de proteínas 1x a una dilución de 1:100. Las proteínas de la orina se resolvieron luego en geles de SDS-PAGE y se usó albúmina purificada como control (MP Biomedicals). Los geles se transfirieron con anticuerpo policlinal anti-albúmina de conejo (MP Biomedicals).

## Entrecruzamiento de CD16/7-NCD y ensayo de polimerización de actina

El entrecruzamiento mediado por el anticuerpo CD16 de las proteínas de fusión CD16/7 se ha descrito previamente (Jones y colaboradores, 2006; Rivera y colaboradores, 2004; Verma y colaboradores, 2006). Brevemente, CD16/7-NCD o CD16/7-HA se expresaron conjuntamente en células HEK con Robo2. Después de 24 horas, las células se transfirieron y se sembraron en cubreobjetos de vidrio recubiertos con polilisina durante otras 24 horas. Las células se incubaron luego con 1 µg/mL con anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD16 (Beckman Coulter) durante 30 min a 37°C, se lavaron una vez con DMEM, se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con rodamina (Thermo Scientific) diluido en medio acondicionado con Slit2 (Wong y colaboradores, 2001) o medio de control acondicionado durante 30 min y fijado en paraformaldehído al 4% en 1x PBS. La F-actina se tiñó usando faloidina conjugada con FITC (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los haces de F-actina recientemente formados se adhieren a la nefrina agrupada (CD16/7-NCD) y parecen colas de cometa (es decir, colas de actina en el texto principal) bajo el microscopio de fluorescencia. En este experimento, solo se analizaron los haces de F-actina formados por la agrupación de CD16/7-NCD y unidos a las agrupaciones. Las células con colas de F-actina se contaron y se compararon con el total de células transfectadas con CD16/7-NCD. La fórmula de cuantificación es: Porcentaje% = (número de células transfectadas con colas de F-actina/número total de células transfectadas) × 100. Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio confocal LSM510 con un objetivo de inmersión en aceite 60x.

## Generación y caracterización de ratones con desactivación específica para podocitos de Robo2 y ratones con desactivación doble de Robo2-Nefrina

La generación y el genotipado del alelo condicional *Robo2<sup>lox</sup>*, alelo mutante de línea germinal *Robo2<sup>del5</sup>* (también llamado *Robo2* indistintamente en este artículo), y el alelo de tipo silvestre *Robo2<sup>+</sup>* se describieron anteriormente (Lu y colaboradores, 2007; Wang y colaboradores, 2011). Se siguió el esquema de reproducción estándar para generar ratones con desactivación de *Robo2<sup>del5/lox</sup>;Tg<sup>Nphs2-Cre/+</sup>*, específicos para podocitos de *Robo2*, que portan un alelo *Robo2<sup>del5</sup>* y un alelo *Robo2<sup>lox</sup>*. En este mutante compuesto, la recombinasa Cre específica de podocitos dirigida por el promotor de podocina elimina solo el alelo *Robo2<sup>lox</sup>* para facilitar la penetración de un fenotipo porque el otro alelo, *Robo2<sup>del5</sup>*, se ha eliminado de forma ubicua de la expresión de la línea germinal. La autenticidad de los ratones *Robo2<sup>del5/lox</sup>;Tg<sup>Nphs2-Cre/+</sup>* se determinó mediante el genotipado del ADN de la cola para la presencia de los alelos *Robo2<sup>del5</sup>* y *Robo2<sup>lox</sup>* así como el transgén *Tg<sup>Nphs2-Cre</sup>*. Los ratones *Robo2<sup>lox/+</sup>* de las camadas F2 sin el alelo *Robo2<sup>del5</sup>* y el transgén *Tg<sup>Nphs2-Cre</sup>* se utilizaron como controles. Para generar ratones con desactivación doble de Robo2-nefrina, se cruzaron ratones heterocigotos *Robo2<sup>+/-</sup>* con ratones heterocigotos *Nphs1<sup>+/-</sup>* que se generaron previamente (Hamano y colaboradores, 2002). Después de la generación de ratones heterocigotos dobles *Robo2<sup>+/-</sup>;Nphs1<sup>+/-</sup>*, se realizó el cruce de ratones heterocigotos dobles para generar ratones homocigotos dobles para *Robo2<sup>-/-</sup>;Nphs1<sup>-/-</sup>* así como homocigotos sencillos *Robo1<sup>-/-</sup>*, homocigotos sencillos, *Robo2<sup>-/-</sup>*, y controles de tipo silvestre *Robo2<sup>+/+</sup>;Nphs1<sup>+/+</sup>*. Los protocolos de ratón fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) en el Centro Médico de la Universidad de Boston (# 14388).

## Microscopía electrónica de transmisión y barrido

Para la microscopía electrónica de transmisión, se diseccionaron los riñones de ratones nulos homocigotos para *robo2* y ratones con desactivación específicos para podocitos, se fijaron en PLP a 4°C durante la noche, y luego se incubaron en glutaraldehído al 2% en cacodilato de sodio 0,15 M durante 6 horas. Después de lavar en 1x PBS, los riñones fijados se deshidrataron en etanol graduado, se embebieron en Epon, se seccionaron y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las secciones de riñón ultrafino se prepararon y examinaron utilizando un microscopio electrónico JEM-1011. Las camadas de tipo silvestre se utilizaron como controles. Para la microscopía electrónica de barrido, se prepararon muestras de riñón de ratones nulos homocigotos para *Robo2*, ratones con desactivación específica para podocitos, ratones nulos homocigotos para nefrina y ratones homocigotos dobles para *Robo2*-nefrina, de acuerdo con el protocolo descrito previamente (Friedman y Ellisman, 1981) con modificaciones menores. Brevemente, el riñón se perfundió con glutaraldehído al 2,5% y solución de paraformaldehído al 2% en regulador de cacodilato 0,1 M (fijador de Karnovsky, Electron Microscopy Sciences), y posteriormente se fijó en el fijador de Karnovsky durante 24 horas seguido de una fijación posterior en solución de tetraóxido de osmio al 2% (Electron Microscopy Sciences). Las muestras de riñón se criofracturaron, se deshidrataron y se secaron con hexametildisilazano (Electron Microscopy Sciences). Se tomaron imágenes de las muestras de riñón utilizando un microscopio electrónico de barrido Amray 1000A y Jeol 6340F. Se examinaron tres glomérulos de cada animal para proporcionar imágenes representativas.

## Estudios patológicos de riñón de ratones, cuantificación del número de podocitos y análisis de proteinuria

Para estudios patológicos de riñón, los riñones se diseccionaron y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante la noche, y luego se trataron con una serie de etanol graduada para inclusión en parafina. Los bloques de parafina del riñón se seccionaron a 4 µm usando un micrótopo MT-920 (MICROM) y se tiñeron con los métodos estándar con ácido peryódico-Schiff (PAS) o hematoxilina eosina (H&E). Los glomérulos se examinaron y evaluaron para determinar la deposición de la matriz, la glomeruloesclerosis segmentaria y las dilataciones del espacio de Bowman utilizando un microscopio de luz Olympus BHT equipado con un sistema de cámara digital SPOT. Para la cuantificación del número de podocitos, se usó WT1 como marcador nuclear de podocitos y se realizó una tinción con inmunoperoxidasa en secciones de riñón siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Sandén y colaboradores, 2003). Brevemente, se

5 cortaron secciones de 4 µm de riñón embebidas en parafina de 4 ratones de un año de edad con desactivación específica para podocitos de Robo2<sup>del5/1lox</sup>;Tg<sup>Nphs2-Cre+</sup> y 4 ratones de control de tipo silvestre de la misma edad y se tiñeron con anticuerpo WT1 (Santa Cruz Biotechnology) después de la recuperación del antígeno con microondas. Se utilizaron el anticuerpo secundario biotinilado y el kit Vectastain ABC (Vector Laboratories) para detectar la señal de WT1. Los núcleos de podocitos positivos para WT1 en cada sección transversal glomerular se contaron en un total de 165 glomérulos de cuatro ratones mutantes y 166 glomérulos de cuatro ratones de control. Para el análisis de proteinuria, se examinaron muestras de orina "puntuales" de ratones de 6 semanas de edad utilizando un kit de cuantificación ELISA de albuminuria murina sensible (Exocell) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la varilla graduada de orina (Multistix de Bayer, IN) como método de cribado. La albúmina en orina se normalizó con creatinina para proporcionar una proporción de albúmina/creatinina. La creatinina en la orina se determinó utilizando el kit de detección de creatinina (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La albúmina en orina también se examinó con SDS-PAGE al 12% y se transfirió con anticuerpo anti-albúmina (MP Biomedicals). Los datos de los mutantes y los controles se analizaron utilizando ANOVA de una vía, prueba de t de Student y prueba de Chi cuadrado.

15 Tabla 1. Análisis cuantitativo de glomérulos con aumento de la expansión de matriz en ratones de 2 a 9 meses de edad con desactivación específica para podocitos de Robo2 (mutantes) en comparación con los controles (tipo silvestre)

| Genotipo                    | Ratón # | Edad (meses) | Conteo total de glomérulos | Glomérulos con expansión de matriz mesangial | % de Glomérulos con expansión de matriz mesangial * |
|-----------------------------|---------|--------------|----------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Mutante                     | 4048    | 2            | 96                         | 13                                           | 12,35%                                              |
| Mutante                     | 1721    | 3            | 107                        | 18                                           | 16,82%                                              |
| Mutante                     | 4005    | 6            | 103                        | 17                                           | 16,51 %                                             |
| Mutante                     | 1190    | 7            | 102                        | 20                                           | 19,61 %                                             |
| Mutante                     | 2396    | 9            | 80                         | 14                                           | 17,50%                                              |
| Total de mutantes           |         |              | 488                        | 82                                           | 16,80%                                              |
| Tipo silvestre              | 4058    | 2            | 90                         | 4                                            | 4,44%                                               |
| Tipo silvestre              | 4052    | 3            | 105                        | 6                                            | 5,71 %                                              |
| Tipo silvestre              | 3919    | 6            | 107                        | 4                                            | 3,74%                                               |
| Tipo silvestre              | 1191    | 7            | 103                        | 5                                            | 4,85%                                               |
| Tipo silvestre              | 2385    | 9            | 106                        | 5                                            | 4,72%                                               |
| Total de tipo silvestre     |         |              | 511                        | 24                                           | 4,70%                                               |
| *p < 0,01, n = 5, prueba t. |         |              |                            |                                              |                                                     |

Tabla 2. Análisis cuantitativo de glomérulos con mayor expansión de matriz en ratones de 12 meses de edad con desactivación específica para podocitos de Robo2 (mutantes) en comparación con los controles (tipo silvestre)

| Genotipo | Ratón # | Edad (meses) | Conteo total de glomérulos | Glomérulos con expansión de matriz mesangial | % de Glomérulos con expansión de matriz mesangial * |
|----------|---------|--------------|----------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Mutante  | 1844    | 12           | 136                        | 17                                           | 12,50%                                              |
| Mutante  | 1847    | 12           | 125                        | 18                                           | 14,40%                                              |
| Mutante  | 1877    | 12           | 127                        | 11                                           | 8,66%                                               |
| Mutante  | 1878    | 12           | 132                        | 20                                           | 15,15%                                              |

|                                    |      |    |     |    |        |
|------------------------------------|------|----|-----|----|--------|
| Mutante                            | 1948 | 12 | 142 | 28 | 19,72% |
| Tota de mutantes                   |      |    | 662 | 94 | 14,20% |
| Tipo silvestre                     | 1901 | 12 | 125 | 5  | 4,00%  |
| Tipo silvestre                     | 2429 | 12 | 179 | 8  | 4,47%  |
| Tipo silvestre                     | 2834 | 12 | 154 | 9  | 5,84%  |
| Tipo silvestre                     | 2836 | 12 | 159 | 7  | 4,40%  |
| Tipo silvestre                     | 2837 | 12 | 124 | 5  | 4,03%  |
| Total de tipo silvestre            |      |    | 741 | 34 | 4,59%  |
| * $p < 0,01$ , $n = 5$ , prueba t. |      |    |     |    |        |

Tabla 3. Análisis de la morfología de glomérulos con espacio de Bowman dilatado en ratones recién nacidos homocigotos sencillos para *Nphs1*<sup>-/-</sup> (*Robo2*<sup>+/-</sup>;*Nphs1*<sup>-/-</sup>) comparado con homocigotos dobles para *Robo2*<sup>-/-</sup>;*Nphs1*<sup>-/-</sup> por histología

| Genotipo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Conteo total de glomérulos | Glomérulos con espacio de Bowman dilatado | % de glomérulos con espacio de Bowman dilatado |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>Robo2</i> <sup>+/-</sup> ; <i>Nphs1</i> <sup>-/-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 122                        | 31                                        | 25,4%                                          |
| <i>Robo2</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Nphs1</i> <sup>-/-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 55                         | 2                                         | 3,6%                                           |
| <i>Robo2</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Nphs1</i> <sup>+/-</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 158                        | 3                                         | 1,9%                                           |
| <i>Robo2</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Nphs1</i> <sup>+/+</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 271                        | 1                                         | 0,4%                                           |
| Nota: el glomérulo se calificó como positivo con el espacio de Bowman dilatado si el glomérulo mostró un fenotipo similar al que se muestra en la Figura S4U, y se calificó como negativo si observó un glomérulo similar como se muestra en la Figura 8V-8X. Se analizaron tres ratones de cada genotipo. Se usaron como controles homocigotos sencillos para <i>Robo2</i> <sup>-/-</sup> ( <i>Robo2</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Nphs1</i> <sup>-/-</sup> ) y de tipo silvestre ( <i>Robo2</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Nphs1</i> <sup>+/+</sup> ). |                            |                                           |                                                |

5

Tabla 4. Análisis de la morfología del fenotipo del proceso del pie (FP) interdigitante del podocito glomerular en ratones recién nacidos homocigotos sencillos para *Nphs1*<sup>-/-</sup> (*Robo2*<sup>+/-</sup>;*Nphs1*<sup>-/-</sup>) comparado con homocigotos dobles para

*Robo2*<sup>-/-</sup>;*Nphs1*<sup>-/-</sup> por microscopía electrónica de barrido

| Genotipo                                                  | Conteo total de glomérulos | Glomérulos con estructura FP de interdigitación | % de glomérulos con estructura FP de interdigitación |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <i>Robo2</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Nphs1</i> <sup>-/-</sup> | 15                         | 1                                               | 6,67%                                                |
| <i>Robo2</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Nphs1</i> <sup>-/-</sup> | 16                         | 12                                              | 75%                                                  |
| <i>Robo2</i> <sup>-/-</sup> ; <i>Nphs1</i> <sup>+/-</sup> | 13                         | 13                                              | 100%                                                 |
| <i>Robo2</i> <sup>+/+</sup> ; <i>Nphs1</i> <sup>+/+</sup> | 13                         | 13                                              | 100%                                                 |

10

## Referencias

Bashaw, G. J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T., y Goodman, C. S. (2000). Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell* 101, 703-715.

- Dickson, B. J., y Gilestro, G. F. (2006). Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 651-675.
- Done, S. C., Takemoto, M., He, L., Sun, Y., Hultenby, K., Betsholtz, C., y Tryggvason, K. (2008). Nephrin is involved in podocyte maturation but not survival during glomerular development. *Kidney Int* 73, 697-704.
- 5 Fan, X., Labrador, J. P., Hing, H., y Bashaw, G. J. (2003). Slit stimulation recruits Dock and Pak to the roundabout receptor and increases Rac activity to regulate axon repulsion at the CNS midline. *Neuron* 40, 113-127.
- Faul, C., Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Kim, K., y Mundel, P. (2007). Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 17, 428-437.
- 10 Furness, P. N., Hall, L. L., Shaw, J. A., y Pringle, J. H. (1999). Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 14, 1234-1237.
- Garg, P., Verma, R., Cook, L., Soofi, A., Venkatareddy, M., George, B., Mizuno, K., Gurniak, C., Witke, W., y Holzman, L. B. (2010). Actin-depolymerizing factor cofilin-1 is necessary in maintaining mature podocyte architecture. *J Biol Chem* 285, 22676-22688.
- 15 Grieshammer, U., Le, M., Plump, A. S., Wang, F., Tessier-Lavigne, M., y Martin, G. R. (2004). SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev Cell* 6, 709-717.
- Guan, K. L., y Rao, Y. (2003). Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat Rev Neurosci* 4, 941-956.
- Hamano, Y., Grunkemeyer, J. A., Sudhakar, A., Zeisberg, M., Cosgrove, D., Morello, R., Lee, B., Sugimoto, H., y Kalluri, R. (2002). Determinants of vascular permeability in the kidney glomerulus. *J Biol Chem* 277, 31154-31162.
- 20 Jones, N., Blasutig, I. M., Eremina, V., Ruston, J. M., Bladt, F., Li, H., Huang, H., Larose, L., Li, S. S., Takano, T., y colaboradores (2006). Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* 440, 818-823.
- Lu, W., van Eerde, A. M., Fan, X., Quintero-Rivera, F., Kulkarni, S., Ferguson, H. L., Kim, H., Fan, Y., Xi, Q., Li, Q. G., y colaboradores (2007). Disruption of ROBO2 is associated with urinary tract anomalies and confers risk of vesicoureteral reflux. *Am J Hum Genet* 80, 616-632.
- 25 Nachman, P. H., Jennette, J. C., y Falk, R. J. (2008). Primary glomerular disease. En Brenner & Rector's The Kidney, B. M. Brenner, ed. (Philadelphia, Saunders), páginas 987-1066.
- Patrakka, J., Ruotsalainen, V., Reponen, P., Qvist, E., Laine, J., Holmberg, C., Tryggvason, K., y Jalanko, H. (2002). Recurrence of nephrotic syndrome in kidney grafts of patients with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type: role of nephrin. *Transplantation* 73, 394-403.
- 30 Piper, M., Anderson, R., Dwivedy, A., Weinl, C., van Horck, F., Leung, K. M., Cogill, E., y Holt, C. (2006). Signaling mechanisms underlying Slit2-induced collapse of *Xenopus* retinal growth cones. *Neuron* 49, 215-228.
- Piper, M., Georgas, K., Yamada, T., y Little, M. (2000). Expression of the vertebrate Slit gene family and their putative receptors, the Robo genes, in the developing murine kidney. *Mech Dev* 94, 213-217.
- 35 Reeves, W., Caulfield, J. P., y Farquhar, M. G. (1978). Differentiation of epithelial foot processes and filtration slits: sequential appearance of occluding junctions, epithelial polyanion, and slit membranes in developing glomeruli. *Lab Invest* 39, 90-100.
- Rivera, G. M., Briceno, C. A., Takeshima, F., Snapper, S. B., y Mayer, B. J. (2004). Inducible clustering of membrane-targeted SH3 domains of the adaptor protein Nck triggers localized actin polymerization. *Curr Biol* 14, 11-22.
- 40 Seiler, M. W., Venkatachalam, M. A., y Cotran, R. S. (1975). Glomerular epithelium: structural alterations induced by polycations. *Science* 189, 390-393.
- Shih, N. Y., Li, J., Cotran, R., Mundel, P., Miner, J. H., y Shaw, A. S. (2001). CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol* 159, 2303-2308.
- Topham, P. S., Kawachi, H., Haydar, S. A., Chugh, S., Addona, T. A., Charron, K. B., Holzman, L. B., Shia, M., Shimizu, F., y Salant, D. J. (1999). Nephritogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular domain of rat nephrin. *J Clin Invest* 104, 1559-1566.
- Tryggvason, K., Patrakka, J., y Wartiovaara, J. (2006). Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 354, 1387-1401.

- Verma, R., Kovari, I., Soofi, A., Nihalani, D., Patrie, K., y Holzman, L. B. (2006). Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest* 116, 1346-1359.
- 5 Wang, H., Li, Q., Liu, J., Mendelsohn, C., Salant, D. J., y Lu, W. (2011). Noninvasive assessment of antenatal hydronephrosis in mice reveals a critical role for Robo2 in maintaining anti-reflux mechanism. *PLoS One* 6, e24763.
- Wong, K., Ren, X. R., Huang, Y. Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S. M., Mei, L., y colaboradores (2001). Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* 107, 209-221.
- 10 Yuan, H., Takeuchi, E., y Salant, D. J. (2002). Podocyte slit-diaphragm protein nephrin is linked to the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F585-591.
- Friedman, P. L., y Ellisman, M. H. (1981). Enhanced visualization of peripheral nerve and sensory receptors in the scanning electron microscope using cryofracture and osmium-thiocarbohydrazide-osmium impregnation. *J Neurocytol* 10, 111-131.
- 15 Li, X., Gao, X., Liu, G., Xiong, W., Wu, J., y Rao, Y. (2008). Netrin signal transduction and the guanine nucleotide exchange factor DOCK180 in attractive signaling. *Nat Neurosci* 11, 28-35.
- Mugford, J. W., Sipila, P., Kobayashi, A., Behringer, R. R., y McMahon, A. P. (2008). Hoxd11 specifies a program of metanephric kidney development within the intermediate mesoderm of the mouse embryo. *Dev Biol* 319, 396-405.
- 20 Sanden, S. K., Wiggins, J. E., Goyal, M., Riggs, L. K., y Wiggins, R. C. (2003). Evaluation of a thick and thin section method for estimation of podocyte number, glomerular volume, and glomerular volume per podocyte in rat kidney with Wilms' tumor-1 protein used as a podocyte nuclear marker. *J Am Soc Nephrol* 14, 2484-2493.
- Listado de Secuencias
- <110> BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATION
- <120> SEÑALIZACIÓN DE SLIT-ROBO PARA EL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO DE UNA ENFERMEDAD DE RIÑÓN
- 25 <130> 701586-072811-PCT
- <140> PCT/US2013/020280
- <141> 2013-01-04
- <150> 61/583,379
- <151> 2012-01-05
- 30 <160> 6
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 1394
- <212> PRT
- 35 <213> Homo sapiens
- <400> 1

# ES 2 714 700 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Arg | Arg | His | Glu | Arg | Val | Thr | Arg | Arg | Met | Trp | Thr | Trp | Ala | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Pro | Gly | Leu | Leu | Met | Met | Thr | Val | Val | Phe | Trp | Gly | His | Gln | Gly | Asn | 20  | 25  | 30  |     |
| Gly | Gln | Gly | Gln | Gly | Ser | Arg | Leu | Arg | Gln | Glu | Asp | Phe | Pro | Pro | Arg | 35  | 40  | 45  |     |
| Ile | Val | Glu | His | Pro | Ser | Asp | Val | Ile | Val | Ser | Lys | Gly | Glu | Pro | Thr | 50  | 55  | 60  |     |
| Thr | Leu | Asn | Cys | Lys | Ala | Glu | Gly | Arg | Pro | Thr | Pro | Thr | Ile | Glu | Trp | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Tyr | Lys | Asp | Gly | Glu | Arg | Val | Glu | Thr | Asp | Lys | Asp | Asp | Pro | Arg | Ser | 85  | 90  | 95  |     |
| His | Arg | Met | Leu | Leu | Pro | Ser | Gly | Ser | Leu | Phe | Phe | Leu | Arg | Ile | Val | 100 | 105 | 110 |     |
| His | Gly | Arg | Arg | Ser | Lys | Pro | Asp | Glu | Gly | Ser | Tyr | Val | Cys | Val | Ala | 115 | 120 | 125 |     |
| Arg | Asn | Tyr | Leu | Gly | Glu | Ala | Val | Ser | Arg | Asn | Ala | Ser | Leu | Glu | Val | 130 | 135 | 140 |     |
| Ala | Leu | Leu | Arg | Asp | Asp | Phe | Arg | Gln | Asn | Pro | Thr | Asp | Val | Val | Val | 145 | 150 | 155 | 160 |

# ES 2 714 700 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| Ala | Ala | Gly | Glu | Pro | Ala | Ile | Leu | Glu | Cys | Gln | Pro | Pro | Arg | Gly | His |  |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |  |
| Pro | Glu | Pro | Thr | Ile | Tyr | Trp | Lys | Lys | Asp | Lys | Val | Arg | Ile | Asp | Asp |  |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |  |
| Lys | Glu | Glu | Arg | Ile | Ser | Ile | Arg | Gly | Gly | Lys | Leu | Met | Ile | Ser | Asn |  |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |  |
| Thr | Arg | Lys | Ser | Asp | Ala | Gly | Met | Tyr | Thr | Cys | Val | Gly | Thr | Asn | Met |  |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |  |
| Val | Gly | Glu | Arg | Asp | Ser | Asp | Pro | Ala | Glu | Leu | Thr | Val | Phe | Glu | Arg |  |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |  |
| Pro | Thr | Phe | Leu | Arg | Arg | Pro | Ile | Asn | Gln | Val | Val | Leu | Glu | Glu | Glu |  |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |  |
| Ala | Val | Glu | Phe | Arg | Cys | Gln | Val | Gln | Gly | Asp | Pro | Gln | Pro | Thr | Val |  |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |  |
| Arg | Trp | Lys | Lys | Asp | Asp | Ala | Asp | Leu | Pro | Arg | Gly | Arg | Tyr | Asp | Ile |  |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |  |
| Lys | Asp | Asp | Tyr | Thr | Leu | Arg | Ile | Lys | Lys | Thr | Met | Ser | Thr | Asp | Glu |  |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |  |
| Gly | Thr | Tyr | Met | Cys | Ile | Ala | Glu | Asn | Arg | Val | Gly | Lys | Met | Glu | Ala |  |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |  |
| Ser | Ala | Thr | Leu | Thr | Val | Arg | Ala | Pro | Pro | Gln | Phe | Val | Val | Arg | Pro |  |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |  |
| Arg | Asp | Gln | Ile | Val | Ala | Gln | Gly | Arg | Thr | Val | Thr | Phe | Pro | Cys | Glu |  |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |  |
| Thr | Lys | Gly | Asn | Pro | Gln | Pro | Ala | Val | Phe | Trp | Gln | Lys | Glu | Gly | Ser |  |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |  |
| Gln | Asn | Leu | Leu | Phe | Pro | Asn | Gln | Pro | Gln | Gln | Pro | Asn | Ser | Arg | Cys |  |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |  |
| Ser | Val | Ser | Pro | Thr | Gly | Asp | Leu | Thr | Ile | Thr | Asn | Ile | Gln | Arg | Ser |  |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |  |
| Asp | Ala | Gly | Tyr | Tyr | Ile | Cys | Gln | Ala | Leu | Thr | Val | Ala | Gly | Ser | Ile |  |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |  |  |

# ES 2 714 700 T3

Leu Ala Lys Ala Gln Leu Glu Val Thr Asp Val Leu Thr Asp Arg Pro  
 420 425 430  
 Pro Pro Ile Ile Leu Gln Gly Pro Ala Asn Gln Thr Leu Ala Val Asp  
 435 440 445  
 Gly Thr Ala Leu Leu Lys Cys Lys Ala Thr Gly Asp Pro Leu Pro Val  
 450 455 460  
 Ile Ser Trp Leu Lys Glu Gly Phe Thr Phe Pro Gly Arg Asp Pro Arg  
 465 470 475 480  
 Ala Thr Ile Gln Glu Gln Gly Thr Leu Gln Ile Lys Asn Leu Arg Ile  
 485 490 495  
 Ser Asp Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Val Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu  
 500 505 510  
 Thr Ser Trp Ser Ala Val Leu Asp Val Thr Glu Ser Gly Ala Thr Ile  
 515 520 525  
 Ser Lys Asn Tyr Asp Leu Ser Asp Leu Pro Gly Pro Pro Ser Lys Pro  
 530 535 540  
 Gln Val Thr Asp Val Thr Lys Asn Ser Val Thr Leu Ser Trp Gln Pro  
 545 550 555 560  
 Gly Thr Pro Gly Thr Leu Pro Ala Ser Ala Tyr Ile Ile Glu Ala Phe  
 565 570 575  
 Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser Trp Gln Thr Val Ala Asn His Val Lys  
 580 585 590  
 Thr Thr Leu Tyr Thr Val Arg Gly Leu Arg Pro Asn Thr Ile Tyr Leu  
 595 600 605  
 Phe Met Val Arg Ala Ile Asn Pro Gln Gly Leu Ser Asp Pro Ser Pro  
 610 615 620  
 Met Ser Asp Pro Val Arg Thr Gln Asp Ile Ser Pro Pro Ala Gln Gly  
 625 630 635 640  
 Val Asp His Arg Gln Val Gln Lys Glu Leu Gly Asp Val Leu Val Arg  
 645 650 655  
 Leu His Asn Pro Val Val Leu Thr Pro Thr Thr Val Gln Val Thr Trp

# ES 2 714 700 T3

| 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Val | Asp | Arg | Gln | Pro | Gln | Phe | Ile | Gln | Gly | Tyr | Arg | Val | Met | Tyr |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |
| Arg | Gln | Thr | Ser | Gly | Leu | Gln | Ala | Thr | Ser | Ser | Trp | Gln | Asn | Leu | Asp |
|     |     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |
| Ala | Lys | Val | Pro | Thr | Glu | Arg | Ser | Ala | Val | Leu | Val | Asn | Leu | Lys | Lys |
|     |     | 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |
| Gly | Val | Thr | Tyr | Glu | Ile | Lys | Val | Arg | Pro | Tyr | Phe | Asn | Glu | Phe | Gln |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |
| Gly | Met | Asp | Ser | Glu | Ser | Lys | Thr | Val | Arg | Thr | Thr | Glu | Glu | Ala | Pro |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |
| Ser | Ala | Pro | Pro | Gln | Ser | Val | Thr | Val | Leu | Thr | Val | Gly | Ser | Tyr | Asn |
|     |     |     | 755 |     |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     | 765 |     |
| Ser | Thr | Ser | Ile | Ser | Val | Ser | Trp | Asp | Pro | Pro | Pro | Pro | Pro | Asp | His |
|     |     |     | 770 |     |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     | 780 |     |
| Asn | Gly | Ile | Ile | Gln | Glu | Tyr | Lys | Ile | Trp | Cys | Leu | Gly | Asn | Glu | Thr |
|     |     |     |     | 785 |     |     |     |     | 790 |     |     |     |     | 800 |     |
| Arg | Phe | His | Ile | Asn | Lys | Thr | Val | Asp | Ala | Ala | Ile | Arg | Ser | Val | Ile |
|     |     |     |     | 805 |     |     |     |     | 810 |     |     |     |     | 815 |     |
| Ile | Gly | Gly | Leu | Phe | Pro | Gly | Ile | Gln | Tyr | Arg | Val | Glu | Val | Ala | Ala |
|     |     |     | 820 |     |     |     |     |     | 825 |     |     |     |     | 830 |     |
| Ser | Thr | Ser | Ala | Gly | Val | Gly | Val | Lys | Ser | Glu | Pro | Gln | Pro | Ile | Ile |
|     |     |     | 835 |     |     |     |     |     | 840 |     |     |     |     | 845 |     |
| Ile | Gly | Arg | Arg | Asn | Glu | Val | Val | Ile | Thr | Glu | Asn | Asn | Asn | Ser | Ile |
|     |     |     | 850 |     |     |     |     |     | 855 |     |     |     |     | 860 |     |
| Thr | Glu | Gln | Ile | Thr | Asp | Val | Val | Lys | Gln | Pro | Ala | Phe | Ile | Ala | Gly |
|     |     |     |     | 865 |     |     |     |     | 870 |     |     |     |     | 875 |     |
| Ile | Gly | Gly | Ala | Cys | Trp | Val | Ile | Leu | Met | Gly | Phe | Ser | Ile | Trp | Leu |
|     |     |     |     | 885 |     |     |     |     | 890 |     |     |     |     | 895 |     |
| Tyr | Trp | Arg | Arg | Lys | Lys | Arg | Lys | Gly | Leu | Ser | Asn | Tyr | Ala | Val | Thr |
|     |     |     |     | 900 |     |     |     |     | 905 |     |     |     |     | 910 |     |

# ES 2 714 700 T3

Phe Gln Arg Gly Asp Gly Gly Leu Met Ser Asn Gly Ser Arg Pro Gly  
 915 920 925

Leu Leu Asn Ala Gly Asp Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Ala Asp Ser Trp  
 930 935 940

Pro Ala Thr Ser Leu Pro Val Asn Asn Ser Asn Ser Gly Pro Asn Glu  
 945 950 955 960

Ile Gly Asn Phe Gly Arg Gly Asp Val Leu Pro Pro Val Pro Gly Gln  
 965 970 975

Gly Asp Lys Thr Ala Thr Met Leu Ser Asp Gly Ala Ile Tyr Ser Ser  
 980 985 990

Ile Asp Phe Thr Thr Lys Thr Ser Tyr Asn Ser Ser Ser Gln Ile Thr  
 995 1000 1005

Gln Ala Thr Pro Tyr Ala Thr Thr Gln Ile Leu His Ser Asn Ser  
 1010 1015 1020

Ile His Glu Leu Ala Val Asp Leu Pro Asp Pro Gln Trp Lys Ser  
 1025 1030 1035

Ser Ile Gln Gln Lys Thr Asp Leu Met Gly Phe Gly Tyr Ser Leu  
 1040 1045 1050

Pro Asp Gln Asn Lys Gly Asn Asn Gly Gly Lys Gly Gly Lys Lys  
 1055 1060 1065

Lys Lys Asn Lys Asn Ser Ser Lys Pro Gln Lys Asn Asn Gly Ser  
 1070 1075 1080

Thr Trp Ala Asn Val Pro Leu Pro Pro Pro Pro Val Gln Pro Leu  
 1085 1090 1095

Pro Gly Thr Glu Leu Glu His Tyr Ala Val Glu Gln Gln Glu Asn  
 1100 1105 1110

Gly Tyr Asp Ser Asp Ser Trp Cys Pro Pro Leu Pro Val Gln Thr  
 1115 1120 1125

Tyr Leu His Gln Gly Leu Glu Asp Glu Leu Glu Glu Asp Asp Asp  
 1130 1135 1140

Arg Val Pro Thr Pro Pro Val Arg Gly Val Ala Ser Ser Pro Ala  
 1145 1150 1155

# ES 2 714 700 T3

|     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Ile | Ser  | Phe | Gly | Gln | Gln | Ser  | Thr | Ala | Thr | Leu | Thr  | Pro | Ser | Pro |
|     | 1160 |     |     |     |     | 1165 |     |     |     |     | 1170 |     |     |     |
| Arg | Glu  | Glu | Met | Gln | Pro | Met  | Leu | Gln | Ala | His | Leu  | Asp | Glu | Leu |
|     | 1175 |     |     |     |     | 1180 |     |     |     |     | 1185 |     |     |     |
| Thr | Arg  | Ala | Tyr | Gln | Phe | Asp  | Ile | Ala | Lys | Gln | Thr  | Trp | His | Ile |
|     | 1190 |     |     |     |     | 1195 |     |     |     |     | 1200 |     |     |     |
| Gln | Ser  | Asn | Asn | Gln | Pro | Pro  | Gln | Pro | Pro | Val | Pro  | Pro | Leu | Gly |
|     | 1205 |     |     |     |     | 1210 |     |     |     |     | 1215 |     |     |     |
| Tyr | Val  | Ser | Gly | Ala | Leu | Ile  | Ser | Asp | Leu | Glu | Thr  | Asp | Val | Ala |
|     | 1220 |     |     |     |     | 1225 |     |     |     |     | 1230 |     |     |     |
| Asp | Asp  | Asp | Ala | Asp | Asp | Glu  | Glu | Glu | Ala | Leu | Glu  | Ile | Pro | Arg |
|     | 1235 |     |     |     |     | 1240 |     |     |     |     | 1245 |     |     |     |
| Pro | Leu  | Arg | Ala | Leu | Asp | Gln  | Thr | Pro | Gly | Ser | Ser  | Met | Asp | Asn |
|     | 1250 |     |     |     |     | 1255 |     |     |     |     | 1260 |     |     |     |
| Leu | Asp  | Ser | Ser | Val | Thr | Gly  | Lys | Ala | Phe | Thr | Ser  | Ser | Gln | Arg |
|     | 1265 |     |     |     |     | 1270 |     |     |     |     | 1275 |     |     |     |
| Pro | Arg  | Pro | Thr | Ser | Pro | Phe  | Ser | Thr | Asp | Ser | Asn  | Thr | Ser | Ala |
|     | 1280 |     |     |     |     | 1285 |     |     |     |     | 1290 |     |     |     |
| Ala | Leu  | Ser | Gln | Ser | Gln | Arg  | Pro | Arg | Pro | Thr | Lys  | Lys | His | Lys |
|     | 1295 |     |     |     |     | 1300 |     |     |     |     | 1305 |     |     |     |
| Gly | Gly  | Arg | Met | Asp | Gln | Gln  | Pro | Ala | Leu | Pro | His  | Arg | Arg | Glu |
|     | 1310 |     |     |     |     | 1315 |     |     |     |     | 1320 |     |     |     |
| Gly | Met  | Thr | Asp | Glu | Glu | Ala  | Leu | Val | Pro | Tyr | Ser  | Lys | Pro | Ser |
|     | 1325 |     |     |     |     | 1330 |     |     |     |     | 1335 |     |     |     |
| Phe | Pro  | Ser | Pro | Gly | Gly | His  | Ser | Ser | Ser | Gly | Thr  | Ala | Ser | Ser |
|     | 1340 |     |     |     |     | 1345 |     |     |     |     | 1350 |     |     |     |
| Lys | Gly  | Ser | Thr | Gly | Pro | Arg  | Lys | Thr | Glu | Val | Leu  | Arg | Ala | Gly |
|     | 1355 |     |     |     |     | 1360 |     |     |     |     | 1365 |     |     |     |
| His | Gln  | Arg | Asn | Ala | Ser | Asp  | Leu | Leu | Asp | Ile | Gly  | Tyr | Met | Gly |
|     | 1370 |     |     |     |     | 1375 |     |     |     |     | 1380 |     |     |     |
| Ser | Asn  | Ser | Gln | Gly | Gln | Phe  | Thr | Gly | Glu | Leu |      |     |     |     |
|     | 1385 |     |     |     |     | 1390 |     |     |     |     |      |     |     |     |

# ES 2 714 700 T3

<211> 8374

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

gcgctggagg agggaggcgg aaggacagcg ctgcgccacc acccgaggga gggagcgcg 60
tagctgcagg caggggaggg agaggaaaga aaaggaagga cggctcccag acagagagt 120
ggagaaaccg gggagcagcg ggagcagcag gtccgggggg agctgttccg ctgcgctgcc 180
ctcgttattc acacggacgc tgcggagctt cccagggctg cttccctgtc cccctgggtg 240
gaggctgccg tctaaacctg actccagagt ttaagatgca atggccagaa gacatgaacg 300
tgtcactaga aggatgtgga catgggctcc gggactgttg atgatgactg tgggtgtttg 360
gggtcatcag gggaatggac aaggccaagg atcgcgtctt cgccaggagg actttcccc 420
gcggattgtg gagcatcctt ccgatgtcat cgtctctaag ggcgagccca cgactctgaa 480
ctgcaaggcg gagggccggc caacgcccac cattgagtgg tacaagatg gggagcgagt 540
gggagactgac aaggacgatc cccggtccca caggatgctt ctgccagcg gatccttatt 600
cttcttgccg atcgtgcacg ggcgcaggag taaacctgat gaaggaagct acgtttgtgt 660
tgcgaggaac tatcttggtg aagcagttag tcgaaatgcg tctctggaag tggcattgtt 720
acgagatgac ttccgacaaa accccacaga tgttgtagtg gcagctggag agcctgcaat 780
cctggagtgc cagcctcccc ggggacaccc agaaccacc atctactgga aaaaagacaa 840
agttcgaatt gatgacaagg aagaaagaat aagtatccgt ggtggaaaac tgatgatctc 900
caataaccag aaaagtgatg cagggatgta tacttgtgtt ggtaccaata tgggtggaga 960
aagggacagt gaccagcag agctgactgt ctttgaacga cccacatttc tcaggaggcc 1020
aattaaccag gtggtactgg aggaagaagc tgtagaattt cgttgtcaag tccaaggaga 1080
tcctcaacca actgtgaggt ggaaaaagga tgatgcagac ttgccaagag gaaggtatga 1140
catcaaagac gattacacac taagaattaa aaagaccatg agtacagatg aaggcaccta 1200
tatgtgtatt gctgagaatc gggttggaaa aatggaagcc tctgctacac tcaccgtccg 1260
agctcccca cagtttgtgg ttcgccaag agatcagatt gttgctcaag gtcgaacagt 1320
gacatttccc tgtgaaacta aaggaaaccc acagccagct gttttttggc agaaagaagg 1380
cagccagaac ctacttttcc caaaccaacc ccagcagccc aacagtagat gctcagtgtc 1440
accaactgga gacctacaa tcaccaacat tcaacgttcc gacgcgggtt actacatctg 1500
ccaggcttta actgtggcag gaagcatttt agcaaaagct caactggagg ttactgatgt 1560
tttgacagat agacctccac ctataattct acaaggccca gccaaacaaa cgctggcagt 1620
ggatggtaca gcgttactga aatgtaaagc cactggtgat cctcttcctg taattagctg 1680

```

# ES 2 714 700 T3

|             |             |            |             |             |             |      |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| gttaaaggag  | ggatttactt  | ttccgggtag | agatccaaga  | gcaacaattc  | aagagcaagg  | 1740 |
| cacactgcag  | attaagaatt  | tacggatttc | tgatactggc  | acttatactt  | gtgtggctac  | 1800 |
| aagttcaagt  | ggagagactt  | cctggagtgc | agtgtcggat  | gtgacagagt  | ctggagcaac  | 1860 |
| aatcagtaaa  | aactatgatt  | taagtgcctt | gccagggcca  | ccatccaaac  | cgcaggtcac  | 1920 |
| tgatgttact  | aagaacagtg  | tcaccttgct | ctggcagcca  | ggtacccctg  | gaacccttcc  | 1980 |
| agcaagtgca  | tatatcattg  | aggctttcag | ccaatcagt   | agcaacagct  | ggcagaccgt  | 2040 |
| ggcaaaccat  | gtaaagacca  | ccctctatac | tgtaagagga  | ctgcggccca  | atacaatcta  | 2100 |
| cttattcatg  | gtcagagcga  | tcaaccccc  | aggtctcagt  | gacccaagtc  | ccatgtcaga  | 2160 |
| tcctgtgcgc  | acacaagata  | tcagcccacc | agcacaagga  | gtggaccaca  | ggcaagtgca  | 2220 |
| gaaagagcta  | ggagatgtcc  | ttgtccgtct | tcataatcca  | gttgtgtctga | ctcccaccac  | 2280 |
| ggttcaggtc  | acatggacgg  | ttgatcgcca | accccagttt  | atccaaggct  | accgagtgat  | 2340 |
| gtatcgtcag  | acttcaggtc  | tcgaggcgac | atcttcgtgg  | cagaatttag  | atgccaaagt  | 2400 |
| cccgaactgaa | cgaagtgctg  | tcttagtcaa | cctgaaaaag  | ggggtgactt  | atgaaattaa  | 2460 |
| agtacggcca  | tattttaatg  | agttccaagg | aatggatagt  | gaatctaaaa  | cggttcgtac  | 2520 |
| tactgaagaa  | gccccaaagt  | ccccaccaca | gtctgtcact  | gtactgacag  | ttggaagcta  | 2580 |
| caatagcaca  | agtatttagt  | tttcctggga | tcctcctcct  | ccagatcacc  | agaatggaat  | 2640 |
| tatccaagaa  | tacaagatct  | ggtgtctagg | aaatgaaacg  | cgattccata  | tcaacaaaac  | 2700 |
| tgtggatgca  | gccattcggg  | ccgtaataat | tggtggatta  | ttcccaggta  | ttcaataaccg | 2760 |
| ggtagagggt  | gcagctagta  | ccagtgcagg | ggttggagta  | aagagtgagc  | cacagccaat  | 2820 |
| aataatcggg  | agacgcaatg  | aagttgtcat | tactgaaaac  | aataacagca  | taactgagca  | 2880 |
| aatcactgat  | gtggtgaagc  | aaccagcctt | tatagctggg  | attggtgggt  | cctgctgggt  | 2940 |
| aattctgatg  | ggttttagca  | tatggttgta | ttggcgaaga  | aagaagagga  | agggactcag  | 3000 |
| taattatgct  | gttacgtttc  | aaagaggaga | tggaggacta  | atgagcaatg  | gaagccgtcc  | 3060 |
| aggtcttctc  | aatgctgggt  | atcccagcta | tccatggctt  | gctgattctt  | ggccagccac  | 3120 |
| gagcttgcca  | gtaaataata  | gcaacagtgg | cccaaataag  | attggaaatt  | ttggccgtgg  | 3180 |
| agatgtgctg  | ccaccagttc  | caggccaagg | ggataaaaaca | gcaacgatgc  | tctcagatgg  | 3240 |
| agccatttat  | agtagcattg  | acttcactac | caaaaccagt  | tacaacagtt  | ccagccaaat  | 3300 |
| aacacaggct  | accccatatg  | ccacgacaca | gatcttgcat  | tccaacagca  | tacatgaatt  | 3360 |
| ggctgtcgat  | ctgcctgatc  | cacaatggaa | aagctcaatt  | cagcaaaaaa  | cagatctgat  | 3420 |
| gggatttggt  | tattctctac  | ctgatcagaa | caaaggtaac  | aatggtggga  | aaggtggaaa  | 3480 |
| aaagaagaaa  | aataaaaaact | cttctaacc  | acagaaaaac  | aatggatcca  | cttgggccaa  | 3540 |

# ES 2 714 700 T3

|             |             |             |            |            |            |      |
|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| tgccccctcta | cctccccccc  | cagtcacagcc | ccttcctggc | acggagctgg | aacactatgc | 3600 |
| agtggaacaa  | caagaaaatg  | gctatgacag  | tgatagctgg | tgcccaccat | tgccagtaca | 3660 |
| aacttactta  | caccaaggtc  | tggaagatga  | actggaagaa | gatgatgata | gggtcccaac | 3720 |
| acctcctgtt  | cgaggcgtgg  | cttcttctcc  | tgctatctcc | tttgacagc  | agtccactgc | 3780 |
| aactcttact  | ccatccccac  | gggaagagat  | gcaacccatg | ctgcaggctc | acctggatga | 3840 |
| gttgacaaga  | gcctatcagt  | ttgatatagc  | aaaacaaaca | tggcacattc | aaagcaataa | 3900 |
| tcaacctcca  | cagcctccag  | ttccaccgtt  | aggttatgtg | tctggagcct | tgatttctga | 3960 |
| tttggaaacg  | gatgttgacg  | atgatgatgc  | cgacgacgaa | gaggaagctt | tagaaatccc | 4020 |
| caggccccctg | agagcactgg  | accagactcc  | tggatccagc | atggacaatc | tagacagctc | 4080 |
| tgtgacagga  | aaagccttta  | cctcctctca  | aagacctcga | cctaccagcc | cattttctac | 4140 |
| tgacagtaac  | accagtgcag  | ccctgagtca  | aagtcagagg | cctcggccca | ctaaaaaaca | 4200 |
| caagggaggg  | cggtatggacc | aacaaccagc  | attgcctcat | cgaagggag  | gaatgacaga | 4260 |
| tgaggaggcc  | ttgtgcccct  | atagcaagcc  | cagtttccca | tctccaggtg | gccacagctc | 4320 |
| atcaggaaca  | gcttcttcta  | agggatccac  | tggacctagg | aaaaccgagg | tggtgagagc | 4380 |
| agggccaccag | cgcaatgcc   | gagaccttct  | tgacatagga | tatatgggct | ccaacagtca | 4440 |
| aggacagttt  | acaggtgaat  | tatagtaaat  | gagaggagac | atacaaagct | gctctgaagg | 4500 |
| accatcaggt  | ccggactcat  | ggaagtgatg  | actctaaaca | gtgcaatgaa | caatttattt | 4560 |
| atgtactatt  | aaaagaactg  | taaatgcaat  | gtaaagacac | acagccacac | atatcccaca | 4620 |
| gatattttca  | ttgtgttctt  | ctcttaagta  | caccacccac | cttaactctt | tcttgtcagg | 4680 |
| agtatataaa  | aaagaaagaa  | aacaaaactc  | gccctacagg | aagaaaagga | ttctcctctg | 4740 |
| tatataattt  | cttttgtgca  | ttgctatgca  | agctcactct | ttttagctct | gctcatatta | 4800 |
| ttgtctgttc  | ttattggtct  | gttgactat   | atgtgaatta | ataggctgtg | gtgccatata | 4860 |
| ttaactttta  | attgtgtaac  | ttttatgttt  | aaattttgca | ctgcaatttt | atttggtgat | 4920 |
| aagcacaaat  | ctctactcct  | catgacatga  | agaaaaagac | tgaatgtgaa | gggagtttct | 4980 |
| gtactgtaag  | ctagattgga  | taatgatggc  | tgtaacaaat | catgttagat | ggttttcagt | 5040 |
| tgggggtgtag | aaataggaag  | atgcaaagga  | acaatgggtg | tggcaaagtc | ttctttgaat | 5100 |
| atcagggact  | gagtcaataa  | aaaaaatagt  | agaaagggtg | cttttactat | tgacaaaagc | 5160 |
| cggggtcaaa  | aaaagtagtt  | taagtcttaa  | gactgaatat | gcattaaagt | atgcaggtag | 5220 |
| caaagatgta  | ataaatgtgc  | ttaaaaaaag  | aaattaaagt | tttatttaga | atcaatttta | 5280 |
| cctgtcattg  | taattgaccc  | atctgagaat  | tacaataagc | aagaggaaat | taaggtgttt | 5340 |
| tgcaagagct  | gtatttatat  | tacagttttt  | taaaaacatt | ttctgaatta | tcgtaattaa | 5400 |
| gctctccaac  | tcgttaagtc  | agaatataat  | atgaagttcc | ccaaggaaac | gaacaaaatg | 5460 |

# ES 2 714 700 T3

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| aactctagaa tatctagcaa atagttaaag aagcaattta ttattagggc atactcgggc   | 5520 |
| tgtttcctaaa tataaactct attgcaatat cttatttcat ctttctaata catgtacagt  | 5580 |
| gcacactaga ggatagagct gcatcactta aattcatgac ttaaaaaata atacagttta   | 5640 |
| tatacaactt gtttttttatt tgattaagaa gtgaagttta cgccacccaa tgtatagcca  | 5700 |
| aattgtacgt gcttaaaaaa cagtgccgag agtatgttca gttcgcagta agtagattta   | 5760 |
| ttggaataaa tattctatgg tacatttctca gaaattggct tccaactaaa atacgtttga  | 5820 |
| cccattttga ataaggaaat tgaaaagaaa aattttaaag gagaaaaaa tgcatgttta    | 5880 |
| taaaactttt aaataaaaacc agaccttgta agtggacatt aataattgtc ctgcctcatt  | 5940 |
| tgttttcacg actttgacaa caagaagttc ctgaacatta gtcagtgtatg ctcagaataa  | 6000 |
| atgtgacttt gaaatatatg ttagctactg tacatgtata gtcagtcaag tagaagagga   | 6060 |
| ccttcctgaa attcccactt gtgacatttt cccatgggtt tcctacacaa tcttaaattt   | 6120 |
| tattttctgtc tatacttttct caaatttttc ctatgataag ttcagttggt ggtactcttc | 6180 |
| taaaaatatt caacgtgatt aggatcagtt ctaaaatacg ggacctctt gagtgacaat    | 6240 |
| tcgcactcca tgcattattg gctcagtagc caatttttgt cacgtcgtta taacaaggag   | 6300 |
| atgacataat taaacatttc catcctttct attccctgag actgcatcag cacaggcaag   | 6360 |
| tatagaatgt aatgttcttc atgggcccc aacagctttt ggtgccatgt aatttatttc    | 6420 |
| ttcgtgaag agaaaaagaa ttctgagaca cagttattaa accctttatc aactttctac    | 6480 |
| catcagtgcc tgaattctaa tgcagtgtga tttctctggg acaaagagac tgaggaagat   | 6540 |
| gaaaagtttc ttcaaagagt gaatacatac ttattcacia ctctaggatg tgaggacttt   | 6600 |
| aaatatctct ttatgaagtt ccctgcctaa cctcttttcta tttaaaggca aacaaatttc  | 6660 |
| gaagaggttt tgtgttccct ctttatgttt ctctatgacc cagtttagtc taaaacctta   | 6720 |
| gttcattaca tatacaacac atagcctttg atccctggta actggcaggt gttggtgatt   | 6780 |
| aataaaccaa ggcttcaaag tgaagtatgt gtgtgcagat gacttttgga ataacgtggg   | 6840 |
| catagcatca taccttctctg attgtcttca gcatataaaa attaaactgtt gtagttaaaa | 6900 |
| ttatgtcagt gcagagcttg tggttacttg gaatgttctt tcagaatagt ccatgttgcc   | 6960 |
| tattaaacct agtttttaaac acattgggca gtcaatttat gcacccaaaa taccacctc   | 7020 |
| aggtagattg agggcaagat aaaatgctgt atgtagctat acaaaggaat tcagaaacat   | 7080 |
| tactggaaag caaagccttt gtcagcttgc tactgacaaa gtagtaaaaa gctactaatc   | 7140 |
| agtgttgagt cagatgtcaa cagaaaaata caaatacctt tgagagccac agcagtttct   | 7200 |
| cgtttcatag ccgattcaat gaatatgatt agaaattcac tgagctcact cttgcaggtt   | 7260 |
| taaatggagg cctgcataag gactgcaaga ggaaatctgg gtgggagaga atgtaatctg   | 7320 |

# ES 2 714 700 T3

```

atcttgcaact cataggcaat gctgcaatgc aatcatgtcc aatacaagca cagcttcatt      7380
cataacagga aacgtcttct ttgggaaaat agctctattg gtgcccaaac tcagggtatgc      7440
cagtgtatgc aggtggagtc gccctacccc tcttccaaac atgtcctgtg agatttttaa      7500
aataagatgg gatagtacag gggcatgaaa agaattgatt ccttcacagg atttgaatcc      7560
agttcaaggg agaatgtaga aaattcaaaa ccaacatata aggtatcaca caaccaagaa      7620
aagtaaaacc attgcaagtt tacttgcggt gagtacaaaa cagatttaaat ggtgttctat      7680
gtcatagttt aatgctctgg gtattttaa atgttttcaa caggatttga gttgaaagtt      7740
tgtaatgtgc tttgatggaa cacctctcaa tttctattca ataaacttat gtaattgtcc      7800
attgacaata taatgataac agtaccattg aactctaaac tgtggtttat cttcactact      7860
gggaagcaac tgtgcatcag tattaagat atgcagaaac ataatttca ctaatttgtt      7920
catctgcttc tgtatattgt ttatggaatt acatggcaag aactgttcta aagcaacatg      7980
tctttccaca ttattttaga ggtgaaatta cttttgtttt gcttctctat aatgtgtact      8040
tcaaataaaa caccatactt ttttctaaaa aaagatgttc aatttactaa tttttttaa      8100
tctcataatt taaaaagcat ttgttgtgat tttaaagtgt tgcaagaaaa gggattttgt      8160
ggccgtgggt agacttttta tactttgttt tatagatgga ttttttttaa ctgtagtttg      8220
tttaagtcac caagcagcat ccaaaatctt aatgtgtttc atttgatgtt gttagatcag      8280
agaagaaatt ggcataaaat cggttaatag tattgtcaaa gaattgtgta ttgtgtactc      8340
actgggaaaa aataaaatat attcacattt caaa      8374

```

<210> 3

<211> 1378

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

```

Met Ser Leu Leu Met Phe Thr Gln Leu Leu Leu Cys Gly Phe Leu Tyr
1          5          10          15

Val Arg Val Asp Gly Ser Arg Leu Arg Gln Glu Asp Phe Pro Pro Arg
20          25          30

Ile Val Glu His Pro Ser Asp Val Ile Val Ser Lys Gly Glu Pro Thr
35          40          45

Thr Leu Asn Cys Lys Ala Glu Gly Arg Pro Thr Pro Thr Ile Glu Trp
50          55          60

Tyr Lys Asp Gly Glu Arg Val Glu Thr Asp Lys Asp Asp Pro Arg Ser
65          70          75          80

```

# ES 2 714 700 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Arg | Met | Leu | Leu | Pro | Ser | Gly | Ser | Leu | Phe | Phe | Leu | Arg | Ile | Val | 85  | 90  | 95  |
| His | Gly | Arg | Arg | Ser | Lys | Pro | Asp | Glu | Gly | Ser | Tyr | Val | Cys | Val | Ala | 100 | 105 | 110 |
| Arg | Asn | Tyr | Leu | Gly | Glu | Ala | Val | Ser | Arg | Asn | Ala | Ser | Leu | Glu | Val | 115 | 120 | 125 |
| Ala | Leu | Leu | Arg | Asp | Asp | Phe | Arg | Gln | Asn | Pro | Thr | Asp | Val | Val | Val | 130 | 135 | 140 |
| Ala | Ala | Gly | Glu | Pro | Ala | Ile | Leu | Glu | Cys | Gln | Pro | Pro | Arg | Gly | His | 145 | 150 | 155 |
| Pro | Glu | Pro | Thr | Ile | Tyr | Trp | Lys | Lys | Asp | Lys | Val | Arg | Ile | Asp | Asp | 165 | 170 | 175 |
| Lys | Glu | Glu | Arg | Ile | Ser | Ile | Arg | Gly | Gly | Lys | Leu | Met | Ile | Ser | Asn | 180 | 185 | 190 |
| Thr | Arg | Lys | Ser | Asp | Ala | Gly | Met | Tyr | Thr | Cys | Val | Gly | Thr | Asn | Met | 195 | 200 | 205 |
| Val | Gly | Glu | Arg | Asp | Ser | Asp | Pro | Ala | Glu | Leu | Thr | Val | Phe | Glu | Arg | 210 | 215 | 220 |
| Pro | Thr | Phe | Leu | Arg | Arg | Pro | Ile | Asn | Gln | Val | Val | Leu | Glu | Glu | Glu | 225 | 230 | 235 |
| Ala | Val | Glu | Phe | Arg | Cys | Gln | Val | Gln | Gly | Asp | Pro | Gln | Pro | Thr | Val | 245 | 250 | 255 |
| Arg | Trp | Lys | Lys | Asp | Asp | Ala | Asp | Leu | Pro | Arg | Gly | Arg | Tyr | Asp | Ile | 260 | 265 | 270 |
| Lys | Asp | Asp | Tyr | Thr | Leu | Arg | Ile | Lys | Lys | Thr | Met | Ser | Thr | Asp | Glu | 275 | 280 | 285 |
| Gly | Thr | Tyr | Met | Cys | Ile | Ala | Glu | Asn | Arg | Val | Gly | Lys | Met | Glu | Ala | 290 | 295 | 300 |
| Ser | Ala | Thr | Leu | Thr | Val | Arg | Ala | Pro | Pro | Gln | Phe | Val | Val | Arg | Pro | 305 | 310 | 315 |
| Arg | Asp | Gln | Ile | Val | Ala | Gln | Gly | Arg | Thr | Val | Thr | Phe | Pro | Cys | Glu | 325 | 330 | 335 |

# ES 2 714 700 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Thr | Lys | Gly | Asn | Pro | Gln | Pro | Ala | Val | Phe | Trp | Gln | Lys | Glu | Gly | Ser |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |  |
| Gln | Asn | Leu | Leu | Phe | Pro | Asn | Gln | Pro | Gln | Gln | Pro | Asn | Ser | Arg | Cys |  |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |  |
| Ser | Val | Ser | Pro | Thr | Gly | Asp | Leu | Thr | Ile | Thr | Asn | Ile | Gln | Arg | Ser |  |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |
| Asp | Ala | Gly | Tyr | Tyr | Ile | Cys | Gln | Ala | Leu | Thr | Val | Ala | Gly | Ser | Ile |  |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |  |
| Leu | Ala | Lys | Ala | Gln | Leu | Glu | Val | Thr | Asp | Val | Leu | Thr | Asp | Arg | Pro |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |  |
| Pro | Pro | Ile | Ile | Leu | Gln | Gly | Pro | Ala | Asn | Gln | Thr | Leu | Ala | Val | Asp |  |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     |     | 430 |     |  |
| Gly | Thr | Ala | Leu | Leu | Lys | Cys | Lys | Ala | Thr | Gly | Asp | Pro | Leu | Pro | Val |  |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |  |
| Ile | Ser | Trp | Leu | Lys | Glu | Gly | Phe | Thr | Phe | Pro | Gly | Arg | Asp | Pro | Arg |  |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |  |
| Ala | Thr | Ile | Gln | Glu | Gln | Gly | Thr | Leu | Gln | Ile | Lys | Asn | Leu | Arg | Ile |  |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |  |
| Ser | Asp | Thr | Gly | Thr | Tyr | Thr | Cys | Val | Ala | Thr | Ser | Ser | Ser | Gly | Glu |  |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |  |
| Thr | Ser | Trp | Ser | Ala | Val | Leu | Asp | Val | Thr | Glu | Ser | Gly | Ala | Thr | Ile |  |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |  |
| Ser | Lys | Asn | Tyr | Asp | Leu | Ser | Asp | Leu | Pro | Gly | Pro | Pro | Ser | Lys | Pro |  |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |  |
| Gln | Val | Thr | Asp | Val | Thr | Lys | Asn | Ser | Val | Thr | Leu | Ser | Trp | Gln | Pro |  |
|     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |  |
| Gly | Thr | Pro | Gly | Thr | Leu | Pro | Ala | Ser | Ala | Tyr | Ile | Ile | Glu | Ala | Phe |  |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |  |
| Ser | Gln | Ser | Val | Ser | Asn | Ser | Trp | Gln | Thr | Val | Ala | Asn | His | Val | Lys |  |
|     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |  |
| Thr | Thr | Leu | Tyr | Thr | Val | Arg | Gly | Leu | Arg | Pro | Asn | Thr | Ile | Tyr | Leu |  |
|     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |  |

# ES 2 714 700 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Met | Val | Arg | Ala | Ile | Asn | Pro | Gln | Gly | Leu | Ser | Asp | Pro | Ser | Pro | 595 | 600 | 605 |
| Met | Ser | Asp | Pro | Val | Arg | Thr | Gln | Asp | Ile | Ser | Pro | Pro | Ala | Gln | Gly | 610 | 615 | 620 |
| Val | Asp | His | Arg | Gln | Val | Gln | Lys | Glu | Leu | Gly | Asp | Val | Leu | Val | Arg | 625 | 630 | 635 |
| Leu | His | Asn | Pro | Val | Val | Leu | Thr | Pro | Thr | Thr | Val | Gln | Val | Thr | Trp | 645 | 650 | 655 |
| Thr | Val | Asp | Arg | Gln | Pro | Gln | Phe | Ile | Gln | Gly | Tyr | Arg | Val | Met | Tyr | 660 | 665 | 670 |
| Arg | Gln | Thr | Ser | Gly | Leu | Gln | Ala | Thr | Ser | Ser | Trp | Gln | Asn | Leu | Asp | 675 | 680 | 685 |
| Ala | Lys | Val | Pro | Thr | Glu | Arg | Ser | Ala | Val | Leu | Val | Asn | Leu | Lys | Lys | 690 | 695 | 700 |
| Gly | Val | Thr | Tyr | Glu | Ile | Lys | Val | Arg | Pro | Tyr | Phe | Asn | Glu | Phe | Gln | 705 | 710 | 715 |
| Gly | Met | Asp | Ser | Glu | Ser | Lys | Thr | Val | Arg | Thr | Thr | Glu | Glu | Ala | Pro | 725 | 730 | 735 |
| Ser | Ala | Pro | Pro | Gln | Ser | Val | Thr | Val | Leu | Thr | Val | Gly | Ser | Tyr | Asn | 740 | 745 | 750 |
| Ser | Thr | Ser | Ile | Ser | Val | Ser | Trp | Asp | Pro | Pro | Pro | Pro | Asp | His | Gln | 755 | 760 | 765 |
| Asn | Gly | Ile | Ile | Gln | Glu | Tyr | Lys | Ile | Trp | Cys | Leu | Gly | Asn | Glu | Thr | 770 | 775 | 780 |
| Arg | Phe | His | Ile | Asn | Lys | Thr | Val | Asp | Ala | Ala | Ile | Arg | Ser | Val | Ile | 785 | 790 | 795 |
| Ile | Gly | Gly | Leu | Phe | Pro | Gly | Ile | Gln | Tyr | Arg | Val | Glu | Val | Ala | Ala | 805 | 810 | 815 |
| Ser | Thr | Ser | Ala | Gly | Val | Gly | Val | Lys | Ser | Glu | Pro | Gln | Pro | Ile | Ile | 820 | 825 | 830 |
| Ile | Gly | Arg | Arg | Asn | Glu | Val | Val | Ile | Thr | Glu | Asn | Asn | Asn | Ser | Ile |     |     |     |

# ES 2 714 700 T3

| 835 |      |     |     |     | 840 |      |      |     |     | 845 |      |      |     |     |     |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|
| Thr | Glu  | Gln | Ile | Thr | Asp | Val  | Val  | Lys | Gln | Pro | Ala  | Phe  | Ile | Ala | Gly |
| 850 |      |     |     |     |     | 855  |      |     |     |     | 860  |      |     |     |     |
| Ile | Gly  | Gly | Ala | Cys | Trp | Val  | Ile  | Leu | Met | Gly | Phe  | Ser  | Ile | Trp | Leu |
| 865 |      |     |     |     | 870 |      |      |     |     | 875 |      |      |     |     | 880 |
| Tyr | Trp  | Arg | Arg | Lys | Lys | Arg  | Lys  | Gly | Leu | Ser | Asn  | Tyr  | Ala | Val | Thr |
|     |      |     |     | 885 |     |      |      |     | 890 |     |      |      |     | 895 |     |
| Phe | Gln  | Arg | Gly | Asp | Gly | Gly  | Leu  | Met | Ser | Asn | Gly  | Ser  | Arg | Pro | Gly |
|     |      |     | 900 |     |     |      |      | 905 |     |     |      |      | 910 |     |     |
| Leu | Leu  | Asn | Ala | Gly | Asp | Pro  | Ser  | Tyr | Pro | Trp | Leu  | Ala  | Asp | Ser | Trp |
|     |      | 915 |     |     |     |      | 920  |     |     |     |      | 925  |     |     |     |
| Pro | Ala  | Thr | Ser | Leu | Pro | Val  | Asn  | Asn | Ser | Asn | Ser  | Gly  | Pro | Asn | Glu |
|     | 930  |     |     |     |     | 935  |      |     |     |     | 940  |      |     |     |     |
| Ile | Gly  | Asn | Phe | Gly | Arg | Gly  | Asp  | Val | Leu | Pro | Pro  | Val  | Pro | Gly | Gln |
| 945 |      |     |     |     | 950 |      |      |     |     | 955 |      |      |     |     | 960 |
| Gly | Asp  | Lys | Thr | Ala | Thr | Met  | Leu  | Ser | Asp | Gly | Ala  | Ile  | Tyr | Ser | Ser |
|     |      |     |     | 965 |     |      |      |     | 970 |     |      |      |     | 975 |     |
| Ile | Asp  | Phe | Thr | Thr | Lys | Thr  | Ser  | Tyr | Asn | Ser | Ser  | Ser  | Gln | Ile | Thr |
|     |      |     | 980 |     |     |      |      | 985 |     |     |      |      | 990 |     |     |
| Gln | Ala  | Thr | Pro | Tyr | Ala | Thr  | Thr  | Gln | Ile | Leu | His  | Ser  | Asn | Ser | Ile |
|     |      | 995 |     |     |     |      | 1000 |     |     |     |      | 1005 |     |     |     |
| His | Glu  | Leu | Ala | Val | Asp | Leu  | Pro  | Asp | Pro | Gln | Trp  | Lys  | Ser | Ser |     |
|     | 1010 |     |     |     |     | 1015 |      |     |     |     | 1020 |      |     |     |     |
| Ile | Gln  | Gln | Lys | Thr | Asp | Leu  | Met  | Gly | Phe | Gly | Tyr  | Ser  | Leu | Pro |     |
|     | 1025 |     |     |     |     | 1030 |      |     |     |     | 1035 |      |     |     |     |
| Asp | Gln  | Asn | Lys | Gly | Asn | Asn  | Gly  | Gly | Lys | Gly | Gly  | Lys  | Lys | Lys |     |
|     | 1040 |     |     |     |     | 1045 |      |     |     |     | 1050 |      |     |     |     |
| Lys | Asn  | Lys | Asn | Ser | Ser | Lys  | Pro  | Gln | Lys | Asn | Asn  | Gly  | Ser | Thr |     |
|     | 1055 |     |     |     |     | 1060 |      |     |     |     | 1065 |      |     |     |     |
| Trp | Ala  | Asn | Val | Pro | Leu | Pro  | Pro  | Pro | Pro | Val | Gln  | Pro  | Leu | Pro |     |
|     | 1070 |     |     |     |     | 1075 |      |     |     |     | 1080 |      |     |     |     |

# ES 2 714 700 T3

|      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Gly  | Thr | Glu | Leu | Glu | His | Tyr  | Ala | Val | Glu | Gln | Gln  | Glu | Asn | Gly |
| 1085 |     |     |     |     |     | 1090 |     |     |     |     | 1095 |     |     |     |
| Tyr  | Asp | Ser | Asp | Ser | Trp | Cys  | Pro | Pro | Leu | Pro | Val  | Gln | Thr | Tyr |
| 1100 |     |     |     |     |     | 1105 |     |     |     |     | 1110 |     |     |     |
| Leu  | His | Gln | Gly | Leu | Glu | Asp  | Glu | Leu | Glu | Glu | Asp  | Asp | Asp | Arg |
| 1115 |     |     |     |     |     | 1120 |     |     |     |     | 1125 |     |     |     |
| Val  | Pro | Thr | Pro | Pro | Val | Arg  | Gly | Val | Ala | Ser | Ser  | Pro | Ala | Ile |
| 1130 |     |     |     |     |     | 1135 |     |     |     |     | 1140 |     |     |     |
| Ser  | Phe | Gly | Gln | Gln | Ser | Thr  | Ala | Thr | Leu | Thr | Pro  | Ser | Pro | Arg |
| 1145 |     |     |     |     |     | 1150 |     |     |     |     | 1155 |     |     |     |
| Glu  | Glu | Met | Gln | Pro | Met | Leu  | Gln | Ala | His | Leu | Asp  | Glu | Leu | Thr |
| 1160 |     |     |     |     |     | 1165 |     |     |     |     | 1170 |     |     |     |
| Arg  | Ala | Tyr | Gln | Phe | Asp | Ile  | Ala | Lys | Gln | Thr | Trp  | His | Ile | Gln |
| 1175 |     |     |     |     |     | 1180 |     |     |     |     | 1185 |     |     |     |
| Ser  | Asn | Asn | Gln | Pro | Pro | Gln  | Pro | Pro | Val | Pro | Pro  | Leu | Gly | Tyr |
| 1190 |     |     |     |     |     | 1195 |     |     |     |     | 1200 |     |     |     |
| Val  | Ser | Gly | Ala | Leu | Ile | Ser  | Asp | Leu | Glu | Thr | Asp  | Val | Ala | Asp |
| 1205 |     |     |     |     |     | 1210 |     |     |     |     | 1215 |     |     |     |
| Asp  | Asp | Ala | Asp | Asp | Glu | Glu  | Glu | Ala | Leu | Glu | Ile  | Pro | Arg | Pro |
| 1220 |     |     |     |     |     | 1225 |     |     |     |     | 1230 |     |     |     |
| Leu  | Arg | Ala | Leu | Asp | Gln | Thr  | Pro | Gly | Ser | Ser | Met  | Asp | Asn | Leu |
| 1235 |     |     |     |     |     | 1240 |     |     |     |     | 1245 |     |     |     |
| Asp  | Ser | Ser | Val | Thr | Gly | Lys  | Ala | Phe | Thr | Ser | Ser  | Gln | Arg | Pro |
| 1250 |     |     |     |     |     | 1255 |     |     |     |     | 1260 |     |     |     |
| Arg  | Pro | Thr | Ser | Pro | Phe | Ser  | Thr | Asp | Ser | Asn | Thr  | Ser | Ala | Ala |
| 1265 |     |     |     |     |     | 1270 |     |     |     |     | 1275 |     |     |     |
| Leu  | Ser | Gln | Ser | Gln | Arg | Pro  | Arg | Pro | Thr | Lys | Lys  | His | Lys | Gly |
| 1280 |     |     |     |     |     | 1285 |     |     |     |     | 1290 |     |     |     |
| Gly  | Arg | Met | Asp | Gln | Gln | Pro  | Ala | Leu | Pro | His | Arg  | Arg | Glu | Gly |
| 1295 |     |     |     |     |     | 1300 |     |     |     |     | 1305 |     |     |     |
| Met  | Thr | Asp | Glu | Glu | Ala | Leu  | Val | Pro | Tyr | Ser | Lys  | Pro | Ser | Phe |
| 1310 |     |     |     |     |     | 1315 |     |     |     |     | 1320 |     |     |     |

# ES 2 714 700 T3

Pro Ser Pro Gly Gly His Ser Ser Ser Gly Thr Ala Ser Ser Lys  
1325 1330 1335

Gly Ser Thr Gly Pro Arg Lys Thr Glu Val Leu Arg Ala Gly His  
1340 1345 1350

Gln Arg Asn Ala Ser Asp Leu Leu Asp Ile Gly Tyr Met Gly Ser  
1355 1360 1365

Asn Ser Gln Gly Gln Phe Thr Gly Glu Leu  
1370 1375

<210> 4

<211> 8689

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ctcctctctt ttggaaccg gagaggtgga gggagggcaa caccgctgca aaggagaggc   | 60   |
| ccgccaagtc tgcccgctg caaagtgttg ctttgacaca ttcttattat ggaagttaag   | 120  |
| taaaaatata gacatattaa aaaataactc cggacgtgga gctgctacgg agaaggaaac  | 180  |
| cgggggaaaag aaaaccagta ggcaggccaa tggtttttcg gcagcgcgct ggcaagtgtg | 240  |
| tggaacactt tctaggaatt aggtcttttc ctcccccttc atcatcttga cttctgaagg  | 300  |
| aagaacttgg ctttggattg cagtggagcc taaggagaga gggtagaca cactcgaata   | 360  |
| atccctctgg ctgggctgaa tttgtggaa tttaggaagc cagagtgtg gaaatacagc    | 420  |
| agcctttgaa gtaccctctg ttaatttgga tggatctcag tgtgccccgt tcgagacctc  | 480  |
| tccaccaacc ctttctgatc ttgcgatttg ctcttcttga ctttaattag tatctaggaa  | 540  |
| agtctaaact ttggacctac ctcttttttt gatactcatt tttgtacttt tgctctctgg  | 600  |
| gattggtttc ttaaagaatc tggatccttt ttaatgtgc aaaatgagtc tgctgatgtt   | 660  |
| tacacaacta ctgctctgtg gattttttata tggtcgggtt gatggatcgc gtcttcgcca | 720  |
| ggaggacttt cccccgcgga ttgtggagca tccttcogat gtcacgtctc ctaagggcga  | 780  |
| gcccacgact ctgaactgca aggcggaggg ccggccaacg cccaccattg agtggtagaa  | 840  |
| agatggggag cgagtggaga ctgacaagga cgatccccgg tcccacagga tgcttctgcc  | 900  |
| cagcggatcc ttattcttct tgcgcatcgt gcacggggcg aggagtaaac ctgatgaagg  | 960  |
| aagctacgtt tgtgttgca ggaactatct tgggtgaagca gtgagtcgaa atgcgtctct  | 1020 |
| ggaagtggca ttgttacgag atgacttccg acaaaacccc acagatgttg tagtggcagc  | 1080 |
| tggagagcct gcaatcctgg agtgccagcc tccccgggga caccagaac ccaccatcta   | 1140 |
| ctggaaaaaa gacaaagttc gaattgatga caaggaagaa agaataagta tccgtggtgg  | 1200 |

# ES 2 714 700 T3

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| aaaactgatg atctccaata ccaggaaaag tgatgcaggg atgtatactt gtgttggtac  | 1260 |
| caatatggtg ggagaaaggg acagtgaccc agcagagctg actgtctttg aacgacccac  | 1320 |
| atttctcagg aggccaatta accagggtgt actggaggaa gaagctgtag aatttcgttg  | 1380 |
| tcaagtccaa ggagatcctc aaccaactgt gaggtggaaa aaggatgatg cagacttgcc  | 1440 |
| aagaggaagg tatgacatca aagacgatta cacactaaga attaaaaaga ccatgagtac  | 1500 |
| agatgaaggc acctatatgt gtattgctga gaatcgggtt ggaaaaatgg aagcctctgc  | 1560 |
| tacactcacc gtccgagctc cccacagtt tgtggttcgg ccaagagatc agattgttgc   | 1620 |
| tcaaggtcga acagtgacat ttccctgtga aactaaagga aaccacagc cagctgtttt   | 1680 |
| ttggcagaaa gaaggcagcc agaactact tttcccaaac caacccagc agcccaacag    | 1740 |
| tagatgctca gtgtcaccaa ctggagacct cacaatcacc aacattcaac gtccgacgc   | 1800 |
| gggttactac atctgccagg ctttaactgt ggcaggaagc attttagcaa aagctcaact  | 1860 |
| ggaggttact gatgttttga cagatagacc tccacctata attctacaag gccagccaa   | 1920 |
| ccaaacgctg gcagtggatg gtacagcgtt actgaaatgt aaagccactg gtgatcctct  | 1980 |
| tcctgtaatt agctgggtta aggagggtt tacttttccg ggtagagatc caagagcaac   | 2040 |
| aattcaagag caaggcacac tgcagattaa gaatttacgg atttctgata ctggcactta  | 2100 |
| tacttgtgtg gctacaagtt caagtggaga gacttcctgg agtgcagtgc tggatgtgac  | 2160 |
| agagtctgga gcaacaatca gtaaaaacta tgatttaagt gacctgccag ggccaccatc  | 2220 |
| caaaccgcag gtcactgatg ttactaagaa cagtgtcacc ttgtcctggc agccaggtac  | 2280 |
| ccctggaacc cttccagcaa gtgcatatat cattgaggct ttcagccaat cagtgagcaa  | 2340 |
| cagctggcag accgtggcaa accatgtaaa gaccacccctc tatactgtaa gaggactgcg | 2400 |
| gccaataca atctacttat tcatggtcag agcgatcaac cccaaggctc tcagtgaccc   | 2460 |
| aagtcccatg tcagatcctg tgcgcacaca agatatcagc ccaccagcac aaggagtgga  | 2520 |
| ccacaggcaa gtgcagaaag agctaggaga tgtccttgct cgtcttcata atccagttgt  | 2580 |
| gctgactccc accacggttc aggtcacatg gacggttgat cgccaacccc agtttatcca  | 2640 |
| aggctaccga gtgatgtatc gtcagacttc aggtctgcag gcgacatctt cgtggcagaa  | 2700 |
| tttagatgcc aaagtccga ctgaacgaag tgctgtctta gtcaacctga aaaagggggt   | 2760 |
| gacttatgaa attaaagtac ggccatattt taatgagttc caaggaatgg atagtgaatc  | 2820 |
| taaaacgggt cgtactactg aagaagcccc aagtgcccc aacagctctg tcaactgtact  | 2880 |
| gacagttgga agctacaata gcacaagtat tagtgtttcc tgggatcctc ctctccaga   | 2940 |
| tcaccagaat ggaattatcc aagaatacaa gatctgggtg ctaggaaatg aaacgcgatt  | 3000 |
| ccatatcaac aaaactgtgg atgcagccat tcgggtccgta ataattggtg gattattccc | 3060 |
| aggtattcaa taccgggtag aggttgacgc tagtaccagt gcaggggttg gagtaaagag  | 3120 |

# ES 2 714 700 T3

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| tgagccacag ccaataataa tcgggagacg caatgaagtt gtcattactg aaaacaataa  | 3180 |
| cagcataact gagcaaatca ctgatgtggt gaagcaacca gcctttatag ctggtattgg  | 3240 |
| tggtgcctgc tgggtaattc tgatgggttt tagcatatgg ttgtattggc gaagaaagaa  | 3300 |
| gaggaagggg ctcagtaatt atgctgttac gtttcaaaga ggagatggag gactaatgag  | 3360 |
| caatggaagc cgtccaggtc ttctcaatgc tggatgatccc agctatccat ggcttgctga | 3420 |
| ttcttgggcca gccacgagct tgccagtaaa taatagcaac agtggcccaa atgagattgg | 3480 |
| aaattttggc cgtggagatg tgctgccacc agttccaggc caaggggata aaacagcaac  | 3540 |
| gatgctctca gatggagcca tttatagtag cattgacttc actacaaaa ccagttacaa   | 3600 |
| cagttccagc caaataaacac aggctacccc atatgccacg acacagatct tgcattccaa | 3660 |
| cagcatacat gaattggctg tcgatctgcc tgatccacaa tggaaaagct caattcagca  | 3720 |
| aaaaacagat ctgatgggat ttggttattc tctacctgat cagaacaaag gtaacaatgg  | 3780 |
| tgggaaaggt ggaaaaaaga agaaaaataa aaactcttct aaaccacaga aaaacaatgg  | 3840 |
| atccacttgg gccaatgtcc ctctacctcc cccccagtc cagccccttc ctggcacgga   | 3900 |
| gctggaacac tatgcagtgg aacaacaaga aaatggctat gacagtgata gctggtgccc  | 3960 |
| accattgcca gtacaaactt acttacacca aggtctggaa gatgaactgg aagaagatga  | 4020 |
| tgatagggtc ccaacacctc ctgttcgagg cgtggcttct tctcctgcta tctccttgg   | 4080 |
| acagcagtc actgcaactc ttactccatc cccacgggaa gagatgcaac ccatgctgca   | 4140 |
| ggctcacctg gatgagttga caagagccta tcagtttgat atagcaaaac aaacatggca  | 4200 |
| cattcaaagc aataatcaac ctccacagcc tccagttcca ccgttaggtt atgtgtctgg  | 4260 |
| agccttgatt tctgatttgg aaacggatgt tgcagatgat gatgccgacg acgaagagga  | 4320 |
| agcttttagaa atccccaggc ccctgagagc actggaccag actcctggat ccagcatgga | 4380 |
| caatctagac agctctgtga caggaaaagc ctttacctcc tctcaaagac ctcgacctac  | 4440 |
| cagcccattt tctactgaca gtaacaccag tgcagccctg agtcaaagtc agaggcctcg  | 4500 |
| gccactaaa aaacacaagg gagggcggat ggaccaacaa ccagcattgc ctcatcgaag   | 4560 |
| ggaaggaatg acagatgagg aggccttggg gccctatagc aagcccagtt tcccatctcc  | 4620 |
| aggtggccac agctcatcag gaacagcttc ttctaaggga tccactggac ctaggaaaac  | 4680 |
| cgagggtgtg agagcaggcc accagcgcaa tgccagcgac cttcttgaca taggatatat  | 4740 |
| gggctccaac agtcaaggac agtttacagg tgaattatag taaatgagag gagacataca  | 4800 |
| aagctgctct gaaggaccat caggtccgga ctcatggaag tgatgactct aaacagtgca  | 4860 |
| atgaacaatt tatttatgta ctattaaaag aactgtaaat gcaatgtaaa gacacacagc  | 4920 |
| cacacatatc ccacagatat tttcattgtg ttcttctctt aagtacacca cccaccttaa  | 4980 |

# ES 2 714 700 T3

|            |            |            |             |            |            |      |
|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| ctctttcttg | tcaggagtat | ataaaaaaga | aagaaaacaa  | aactcgccct | acaggaagaa | 5040 |
| aaggattctc | ctctgtatat | aatttctttt | gtgcattgct  | atgcaagctc | actcttttta | 5100 |
| gctctgctca | tattattgtc | tgttcttatt | ggtctgttgt  | actatatgtg | aattaatagg | 5160 |
| ctgtggtgcc | atatattaac | ttttaattgt | gtaactttta  | tgtttaaatt | ttgcactgca | 5220 |
| attttatttg | gtgataagca | caaatctcta | ctcctcatga  | catgaagaaa | aagactgaat | 5280 |
| gtgaagggag | tttctgtact | gtaagctaga | ttggataatg  | atggctgtaa | caaatcatgt | 5340 |
| tagatggttt | tcagttgggg | tgtagaaata | ggaagatgca  | aaggaacaat | ggtgttggca | 5400 |
| aagtcttctt | tgaatatcag | ggactgagtc | aataaaaaaa  | atagtagaaa | ggtggctttt | 5460 |
| actattgaca | aaagccgggg | tcaaaaaaag | tagtttaagt  | cttaagactg | aatatgcatt | 5520 |
| aaagtatgca | ggtagcaaag | atgtaataaa | tttgcttaaa  | aaaagaaatt | aaagttttat | 5580 |
| ttagaatcaa | ttttacctgt | cattgtaatt | gacccatctg  | agaattacaa | taagcaagag | 5640 |
| gaaattaagg | tgttttgcaa | gagctgtatt | tatattacag  | ttttttaaaa | acattttctg | 5700 |
| aattatcgta | attaagctct | ccaactcggt | aagtcagaat  | ataatatgaa | gttccccaag | 5760 |
| gaaacgaaca | aatgaactc  | tagaatatct | agcaaatagt  | taaagaagca | atttattatt | 5820 |
| agggcatact | cgggctgttt | ccaaatataa | actctattgc  | aatatcttat | ttcatctttc | 5880 |
| taatacatgt | acagtgcaca | ctagaggata | gagctgcac   | acttaaattc | atgacttaaa | 5940 |
| aaataataca | gtttatatac | aacttgtttt | ttatttgatt  | aagaagtgaa | gtttacgcca | 6000 |
| cccaatgtat | agccaaattg | tacgtgctta | aaaaacagtg  | ccgagagtat | gttcagttcg | 6060 |
| cagtaagtag | atttattgga | ataaatattc | tatggtacat  | tctcagaaat | tggcttccaa | 6120 |
| ctaaaatacg | tttgacccat | tttgaataag | gaaattgaaa  | agaaaaattt | aaaaggagaa | 6180 |
| aaaaatgcat | gtttataaac | tttttaataa | aaaccagacc  | ttgtaagtgg | acattaataa | 6240 |
| ttgtcctgcc | tcatttgttt | tcacgacttt | gacaacaaga  | agttcctgaa | cattagtcac | 6300 |
| gtatgctcag | aataaatgtg | actttgaaat | atatgttagc  | tactgtacat | gtatagtcag | 6360 |
| tcaagtagaa | gaggaccttc | ctgaaattcc | cacttggtgac | attttcccat | gggtttccta | 6420 |
| cacaatctta | aattttattt | ctgtctatac | tttctcaaat  | ttttcctatg | ataagttcag | 6480 |
| ttgttggtac | tcttctaaaa | atattcaacg | tgattaggat  | cagttctaaa | atacgggacc | 6540 |
| cctttgagtg | acaattcgca | ctccatgcat | tattggctca  | gtagccaatt | tttgtcacgt | 6600 |
| cgttataaca | aggagatgac | ataattaaac | atttccatcc  | tttctattcc | ctgagactgc | 6660 |
| atcagcacag | gcaagtatag | aatgtaatgt | tcttcatggg  | ccccaccagc | tttttggtgc | 6720 |
| catgtaattt | atttcttgc  | tgaagagaaa | aagaattctg  | agacacagtt | attaaaccct | 6780 |
| ttatcaactt | tctaccatca | gtgcctgaat | tctaatagcag | tgtgatttct | ctgggacaaa | 6840 |
| gagactgagg | aagatgaaaa | gtttcttcaa | agagtgaata  | catacttatt | cacaactcta | 6900 |

# ES 2 714 700 T3

ggatgtgagg actttaata tctctttatg aagttccctg cctaacctct ttctatttaa 6960  
 aggcaaacia atttcgaaga ggttttgtgt tccctcttta tgtttctcta tgaccagtt 7020  
 tagtctaaaa ccttagttca ttacatatac aacacatagc ctttgatccc tggtaactgg 7080  
 caggtgttgg tgattaataa accaaggctt caaagtgaag tatgtgtgtg cagatgactt 7140  
 ttggaataac gtgggcatag catcatacct tcctgattgt cttcagcata taaaaattaa 7200  
 ctgtttagt taaaattatg tcagtgcaga gcttgtggtt acttggaatg ttctttcaga 7260  
 atagtccatg ttgcctatta aacctagttt taaacacatt gggcagtcaa tttatgcacc 7320  
 caaaatatca ccctcaggta gattgagggc aagataaaat gctgtatgta gctatacaaa 7380  
 ggaattcaga aacattactg gaaagcaaag cctttgtcag cttgctactg acaaagtagt 7440  
 aaaaagctac taatcagtgt tgagtcagat gtcaacagaa aaatacaaat acctatgaga 7500  
 gccacagcag tttctcgttt catagccgat tcaatgaata tgattagaaa ttcactgagc 7560  
 tcactcttgc aggtttaaat ggaggcctgc ataaggactg caagaggaaa tctgggtggg 7620  
 agagaatgta atctgatctt gcactcatag gcaatgctgc aatgcaatca tgtccaatac 7680  
 aagcacagct tcattcataa caggaaacgt cttctttggg aaaatagctc tattggtgcc 7740  
 caaactcagg tatgccagtg tatgcagggt gagtcgccct acccctcttc caaacatgtc 7800  
 ctgtgagatt tttaaaataa gatgggatag tacaggggca tgaaaagaat tgattccttc 7860  
 acaggatttg aatccagttc aaggggagaat gtagaaaatt caaaaccaac atataaggta 7920  
 tcacacaacc aagaaaagta aaaccattgc aagtttactt gcgttgagta caaacagat 7980  
 ttaatggtgt tctatgtcat agtttaatgc tctgggtatt taaatatggt ttcaacagga 8040  
 tttgagttga aagtttgtaa tgtgctttga tggaacacct ctcaatttct attcaataaa 8100  
 cttatgtaat tgtccattga caatataatg ataacagtac cattgaactc taaactgtgg 8160  
 tttatcttca ctactgggaa gcaactgtgc atcagtatta aagatatgca gaaacataat 8220  
 attcactaat ttgttcatct gcttctgtat attgtttatg gaattacatg gcaagaactg 8280  
 ttctaaagca acatgtcttt ccacattatt ttagagggtga aattactttt gttttgcttc 8340  
 tctataatgt gtacttcaaa tgaaacacca tacttttttc taaaaaaga tgttcaattt 8400  
 actaattttt ttaaattctca taatttaaaa agcatttggt gtgattttta agtggtgcaa 8460  
 gaaaagggat tttgtggccg tgggtagact ttttatactt tgttttatag atggattttt 8520  
 tttactgta gtttgtttaa gtcaccaagc agcatccaaa atcttaatgt gtttcatttg 8580  
 atgttgtag atcagagaag aaattggcat aaaatcggtt aatagtattg tcaaagaatt 8640  
 gtgtattgtg tactcactgg gaaaaaataa aatatattca catttcaaa 8689

<210> 5

<211> 216

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

# ES 2 714 700 T3

<400> 5

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Glu | Leu | Glu | His | Tyr | Ala | Val | Glu | Gln | Gln | Glu | Asn | Gly | Tyr | Asp | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Ser | Asp | Ser | Trp | Cys | Pro | Pro | Leu | Pro | Val | Gln | Thr | Tyr | Leu | His | Gln | 20  | 25  | 30  |     |
| Gly | Leu | Glu | Asp | Glu | Leu | Glu | Glu | Asp | Asp | Asp | Arg | Val | Pro | Thr | Pro | 35  | 40  | 45  |     |
| Pro | Val | Arg | Gly | Val | Ala | Ser | Ser | Pro | Ala | Ile | Ser | Phe | Gly | Gln | Gln | 50  | 55  | 60  |     |
| Ser | Thr | Ala | Thr | Leu | Thr | Pro | Ser | Pro | Arg | Glu | Glu | Met | Gln | Pro | Met | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Leu | Gln | Ala | His | Leu | Asp | Glu | Leu | Thr | Arg | Ala | Tyr | Gln | Phe | Asp | Ile | 85  | 90  | 95  |     |
| Ala | Lys | Gln | Thr | Trp | His | Ile | Gln | Ser | Asn | Asn | Gln | Pro | Pro | Gln | Pro | 100 | 105 | 110 |     |
| Pro | Val | Pro | Pro | Leu | Gly | Tyr | Val | Ser | Gly | Ala | Leu | Ile | Ser | Asp | Leu | 115 | 120 | 125 |     |
| Glu | Thr | Asp | Val | Ala | Asp | Asp | Asp | Ala | Asp | Asp | Glu | Glu | Glu | Ala | Leu | 130 | 135 | 140 |     |
| Glu | Ile | Pro | Arg | Pro | Leu | Arg | Ala | Leu | Asp | Gln | Thr | Pro | Gly | Ser | Ser | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Met | Asp | Asn | Leu | Asp | Ser | Ser | Val | Thr | Gly | Lys | Ala | Phe | Thr | Ser | Ser | 165 | 170 | 175 |     |
| Gln | Arg | Pro | Arg | Pro | Thr | Ser | Pro | Phe | Ser | Thr | Asp | Ser | Asn | Thr | Ser | 180 | 185 | 190 |     |
| Ala | Ala | Leu | Ser | Gln | Ser | Gln | Arg | Pro | Arg | Pro | Thr | Lys | His | Lys | Gly | 195 | 200 | 205 |     |
| Gly | Arg | Met | Asp | Gln | Gln | Pro | Ala | 210 | 215 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 6

<211> 217

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

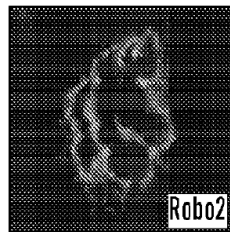
<400> 6

# ES 2 714 700 T3

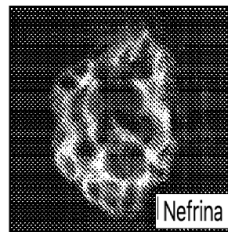
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Glu | Leu | Glu | His | Tyr | Ala | Val | Glu | Gln | Gln | Glu | Asn | Gly | Tyr | Asp | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Ser | Asp | Ser | Trp | Cys | Pro | Pro | Leu | Pro | Val | Gln | Thr | Tyr | Leu | His | Gln | 20  | 25  | 30  |     |
| Gly | Leu | Glu | Asp | Glu | Leu | Glu | Glu | Asp | Asp | Asp | Arg | Val | Pro | Thr | Pro | 35  | 40  | 45  |     |
| Pro | Val | Arg | Gly | Val | Ala | Ser | Ser | Pro | Ala | Ile | Ser | Phe | Gly | Gln | Gln | 50  | 55  | 60  |     |
| Ser | Thr | Ala | Thr | Leu | Thr | Pro | Ser | Pro | Arg | Glu | Glu | Met | Gln | Pro | Met | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Leu | Gln | Ala | His | Leu | Asp | Glu | Leu | Thr | Arg | Ala | Tyr | Gln | Phe | Asp | Ile | 85  | 90  | 95  |     |
| Ala | Lys | Gln | Thr | Trp | His | Ile | Gln | Ser | Asn | Asn | Gln | Pro | Pro | Gln | Pro | 100 | 105 | 110 |     |
| Pro | Val | Pro | Pro | Leu | Gly | Tyr | Val | Ser | Gly | Ala | Leu | Ile | Ser | Asp | Leu | 115 | 120 | 125 |     |
| Glu | Thr | Asp | Val | Ala | Asp | Asp | Asp | Ala | Asp | Asp | Glu | Glu | Glu | Ala | Leu | 130 | 135 | 140 |     |
| Glu | Ile | Pro | Arg | Pro | Leu | Arg | Ala | Leu | Asp | Gln | Thr | Pro | Gly | Ser | Ser | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Met | Asp | Asn | Leu | Asp | Ser | Ser | Val | Thr | Gly | Lys | Ala | Phe | Thr | Ser | Ser | 165 | 170 | 175 |     |
| Gln | Arg | Pro | Arg | Pro | Thr | Ser | Pro | Phe | Ser | Thr | Asp | Ser | Asn | Thr | Ser | 180 | 185 | 190 |     |
| Ala | Ala | Leu | Ser | Gln | Ser | Gln | Arg | Pro | Arg | Pro | Thr | Lys | Lys | His | Lys | 195 | 200 | 205 |     |
| Gly | Gly | Arg | Met | Asp | Gln | Gln | Pro | Ala | 210 | 215 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

**REIVINDICACIONES**

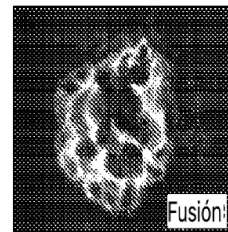
1. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de ROBO2 que inhibe la actividad biológica de ROBO2, en la que el inhibidor de ROBO2 es una proteína ROBO2 soluble que comprende un polipéptido de fusión que comprende los dominios de unión a SLIT de Ig1 e Ig2 de ROBO2 sin dominio de ROBO2 intracelular.
- 5 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el inhibidor de ROBO2 previene o reduce la unión del polipéptido ROBO2 a SLIT2, a Nck, o a ambos.
3. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el dominio de unión a SLIT de IgS1 comprende los residuos de aminoácidos 46-145 de la SEQ ID NO: 1 o los residuos de aminoácidos 30-129 de la SEQ ID NO: 3.
- 10 4. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el dominio de unión a SLIT de Ig2 comprende los residuos de aminoácidos 151-237 de la SEQ ID NO: 1 o los residuos de aminoácidos 135-221 de la SEQ ID NO: 3.
5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la proteína ROBO2 soluble comprende los residuos de aminoácidos 30-129 y los residuos de aminoácidos 135-221 de la SEQ ID NO: 3.
- 15 6. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene o está en riesgo de una enfermedad renal crónica o proteinuria.
7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la enfermedad renal crónica o proteinuria es causada por nefropatía diabética o presión arterial alta.



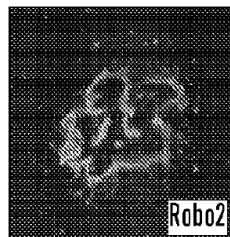
**FIG. 1A**



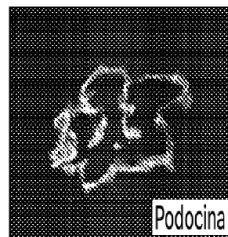
**FIG. 1B**



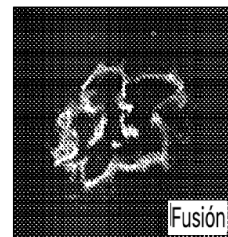
**FIG. 1C**



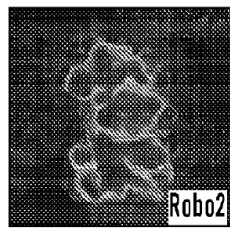
**FIG. 1D**



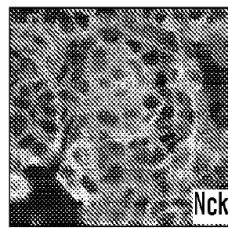
**FIG. 1E**



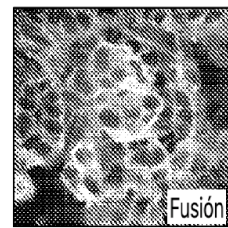
**FIG. 1F**



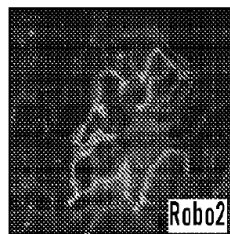
**FIG. 1G**



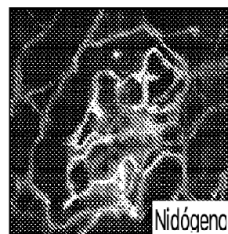
**FIG. 1H**



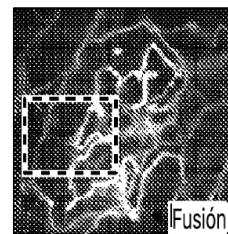
**FIG. 1I**



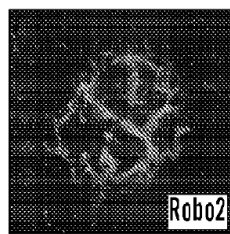
**FIG. 1J**



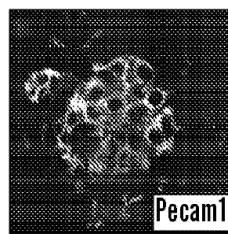
**FIG. 1K**



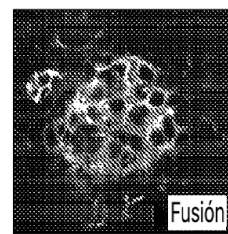
**FIG. 1L**



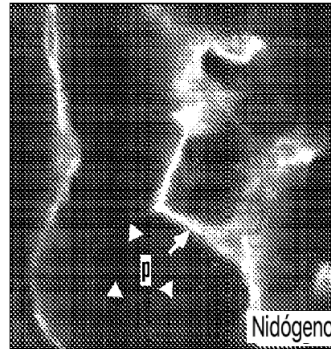
**FIG. 1M**



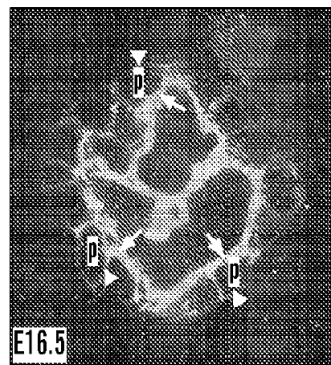
**FIG. 1N**



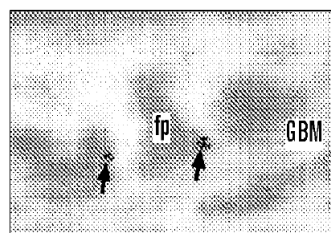
**FIG. 1O**



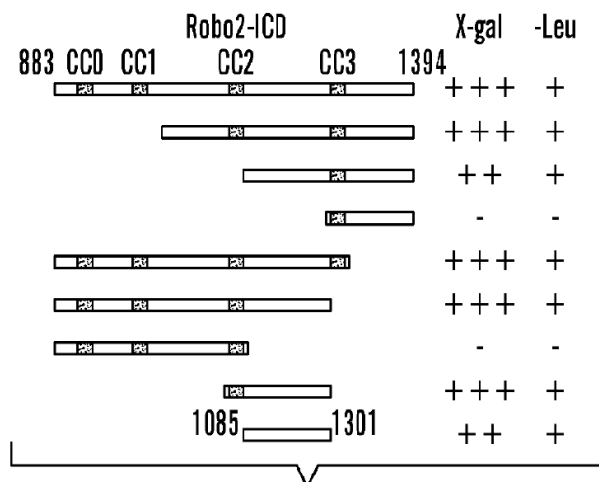
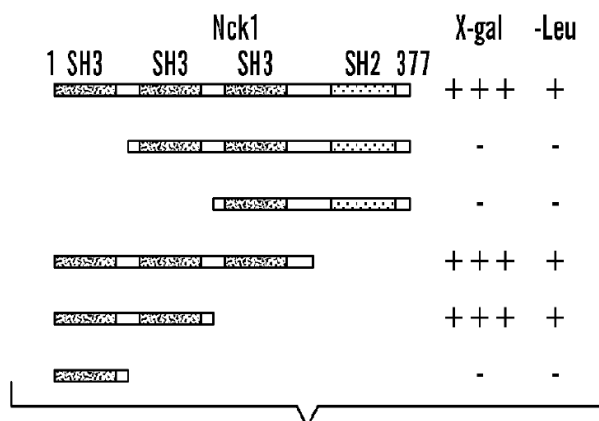
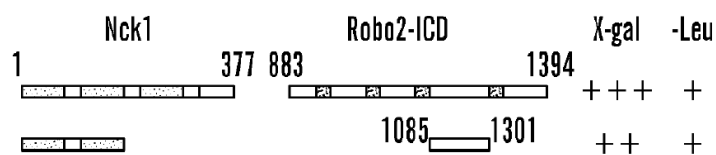
**FIG. 1P**



**FIG. 1Q**

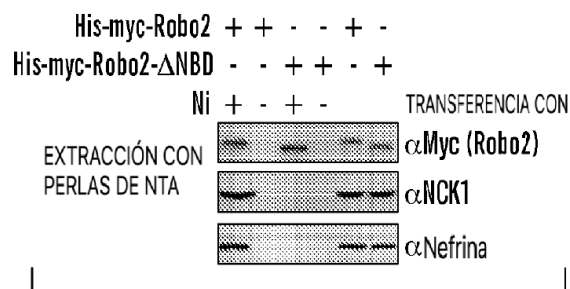


**FIG. 1R**

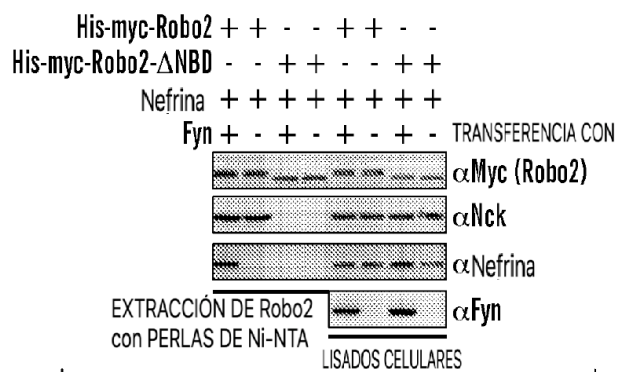
**FIG. 2A****FIG. 2B**

TELEHYAVEQQENGYSWCPPLPVQTYLHQGLEDELEEDDDRVPPTPPVRGVASSPA  
 ISFGQQSTATLTSPREEMQPMQLQAHLDLTRYQFDIAKQTWHIQSNNQPPQPPVPPL  
 GYVSGALISDLETDVADDDADDEEEALEIPRPLRALDQTPGSSMDNLDSSVTGKAFTSS  
 QRPRPTSPFSTDSNTSAALSQSQRPRPTKHKGGRMDQQPA

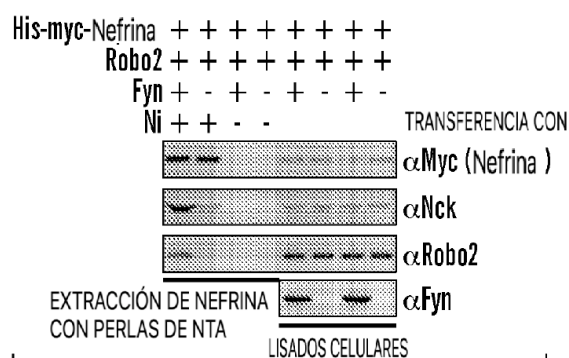
**FIG. 2C**



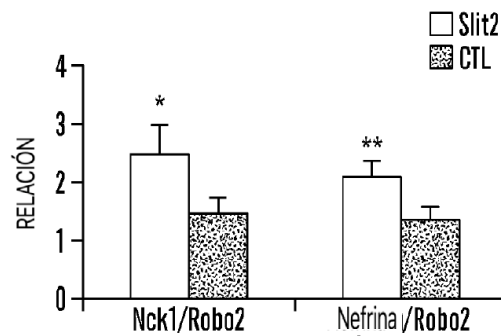
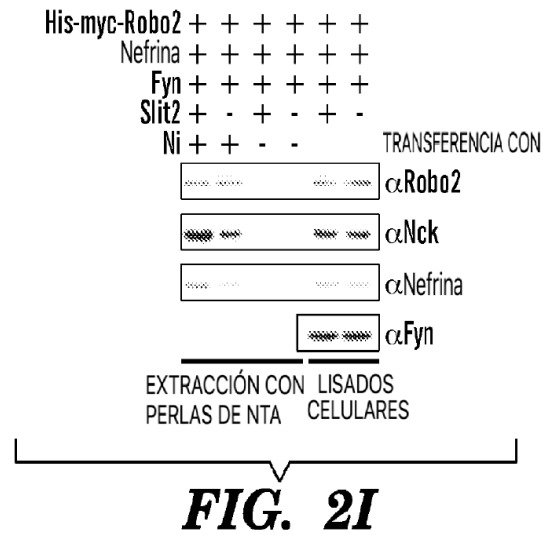
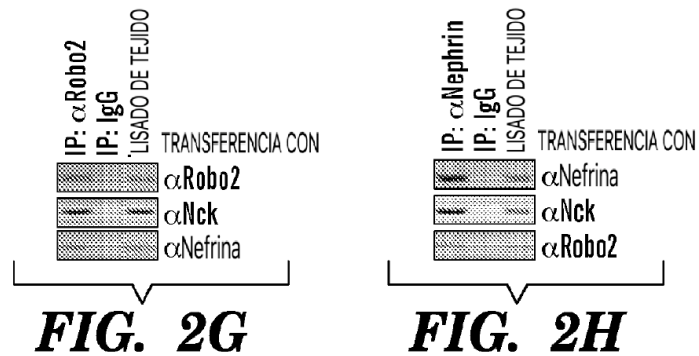
**FIG. 2D**

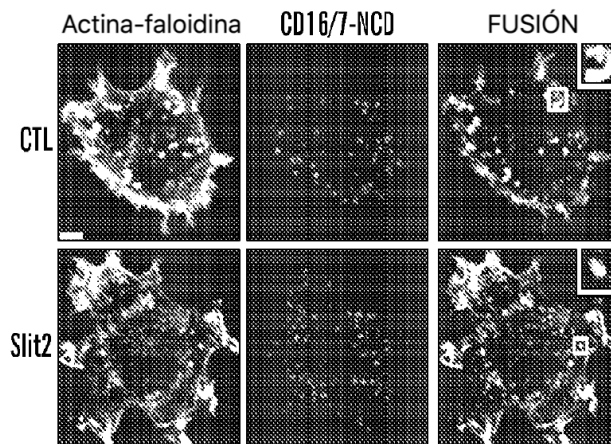


**FIG. 2E**

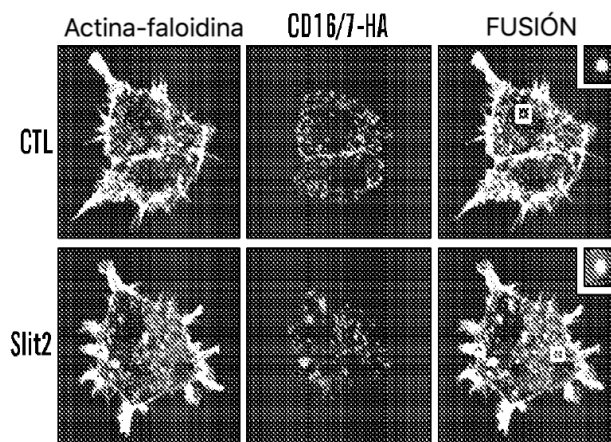


**FIG. 2F**

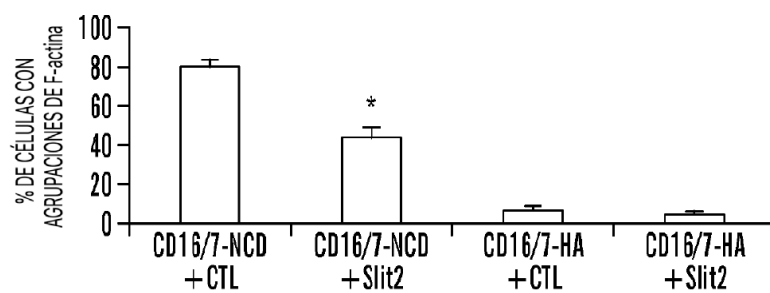




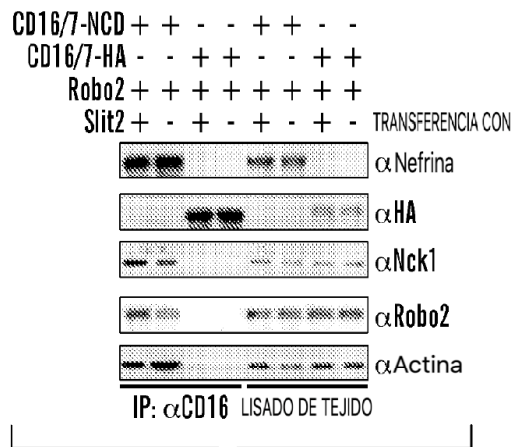
**FIG. 3A**



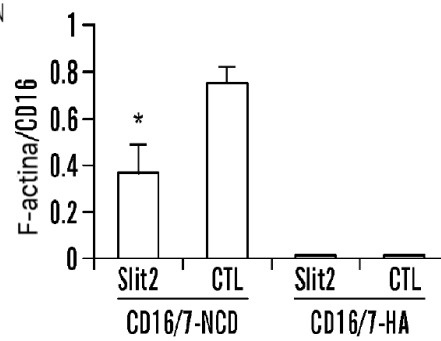
**FIG. 3B**



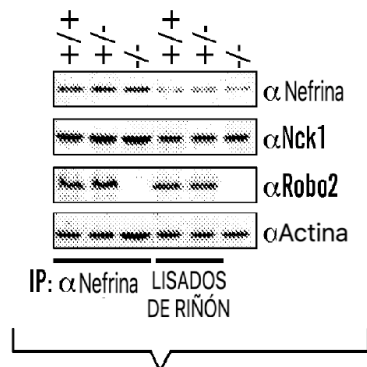
**FIG. 3C**



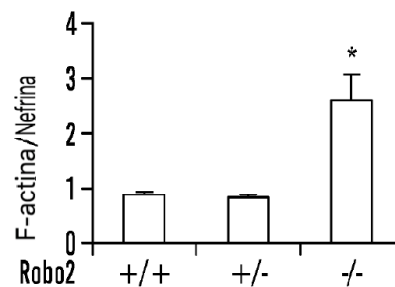
**FIG. 3D**



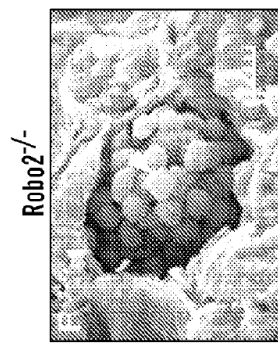
**FIG. 3E**



**FIG. 3F**



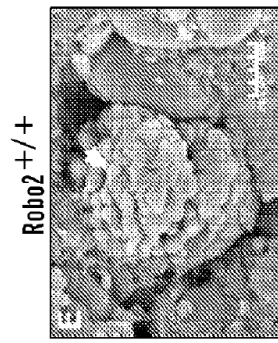
**FIG. 3G**



Robo2<sup>-/-</sup>

3 SEMANAS

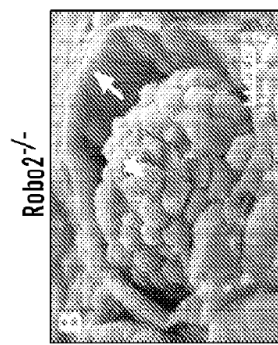
**FIG. 4F**



Robo2<sup>+/+</sup>

3 SEMANAS

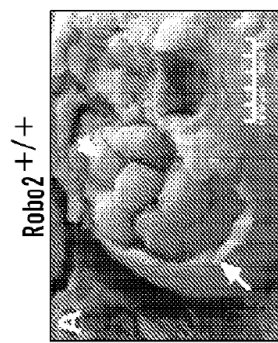
**FIG. 4E**



Robo2<sup>-/-</sup>

RECIENTE NACIDO

**FIG. 4B**



Robo2<sup>+/+</sup>

RECIENTE NACIDO

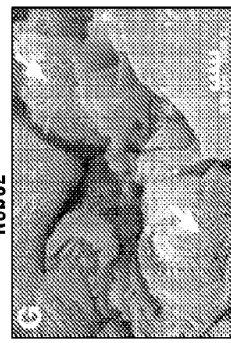
**FIG. 4A**



Robo2<sup>-/-</sup>

3 SEMANAS

**FIG. 4H**



Robo2<sup>+/+</sup>

3 SEMANAS

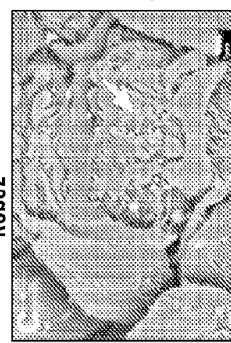
**FIG. 4G**



Robo2<sup>-/-</sup>

RECIENTE NACIDO

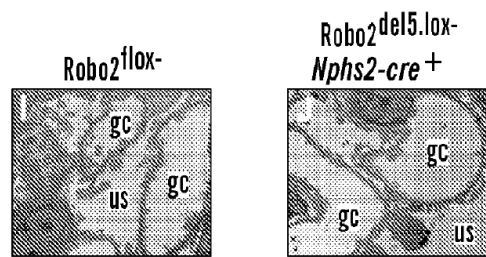
**FIG. 4D**



Robo2<sup>+/+</sup>

RECIENTE NACIDO

**FIG. 4C**



**FIG. 4I**

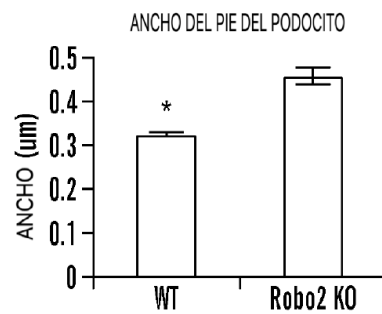
**FIG. 4J**



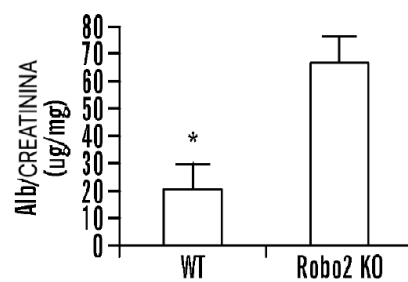
**FIG. 4K**



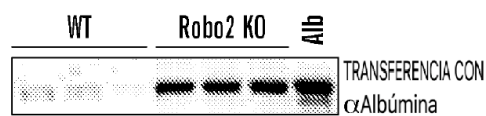
**FIG. 4L**



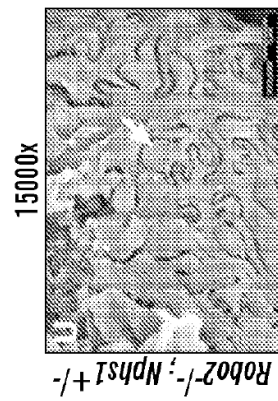
**FIG. 4M**



**FIG. 4N**



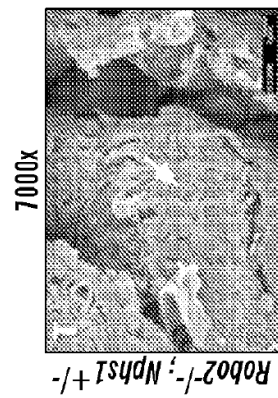
**FIG. 4O**



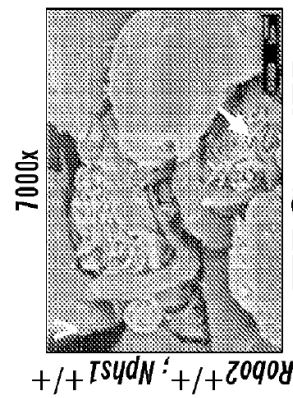
**FIG. 4U**



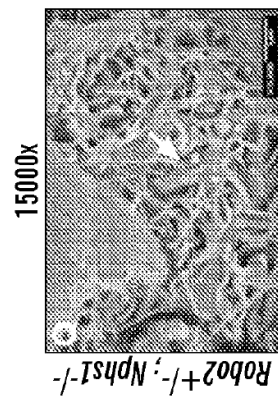
**FIG. 4W**



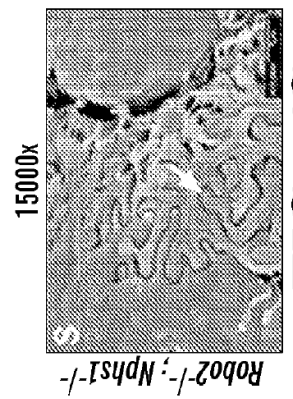
**FIG. 4T**



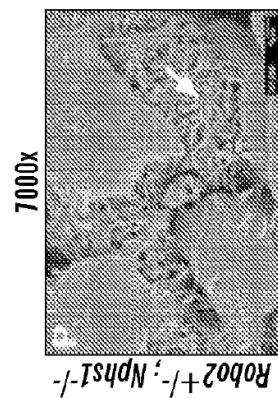
**FIG. 4V**



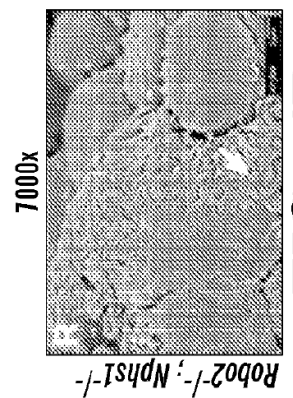
**FIG. 4Q**



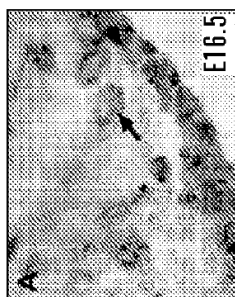
**FIG. 4S**



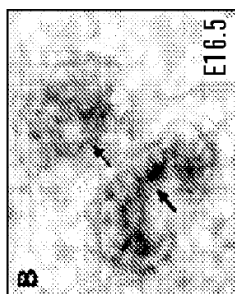
**FIG. 4P**



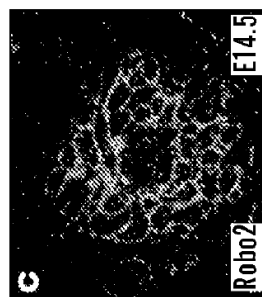
**FIG. 4R**



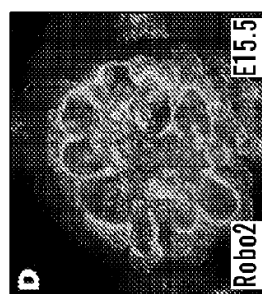
**FIG. 5A**



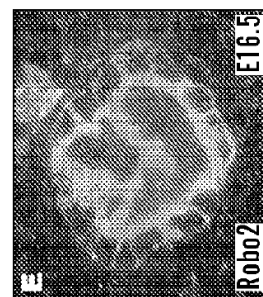
**FIG. 5B**



**FIG. 5C**



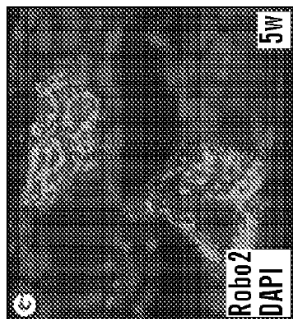
**FIG. 5D**



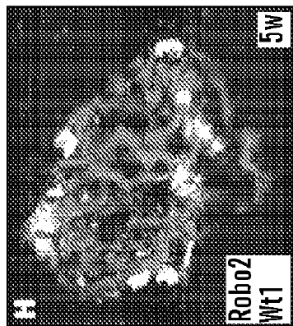
**FIG. 5E**



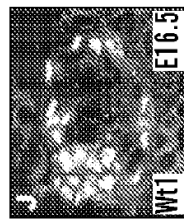
**FIG. 5F**



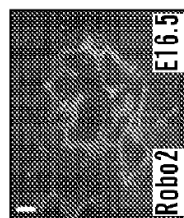
**FIG. 5G**



**FIG. 5H**



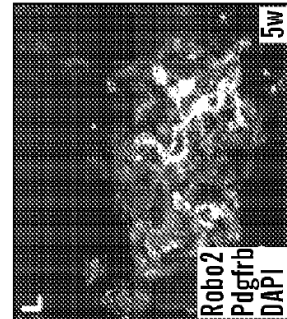
**FIG. 5I**



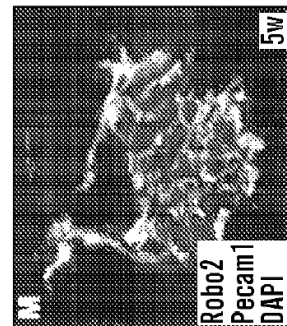
**FIG. 5J**



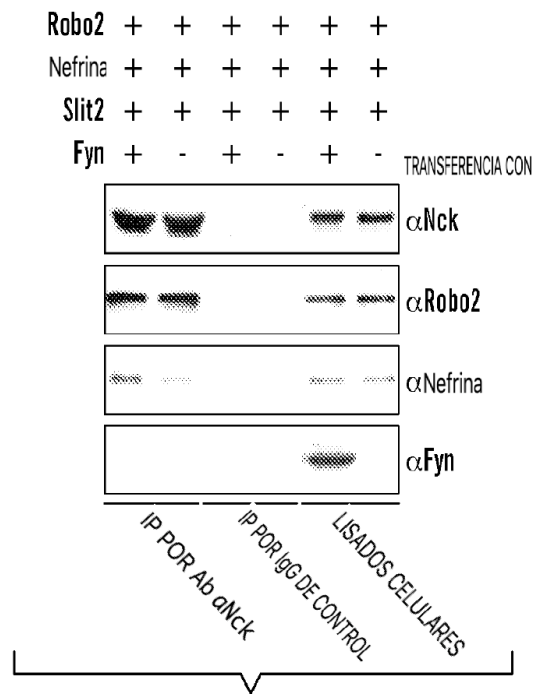
**FIG. 5K**



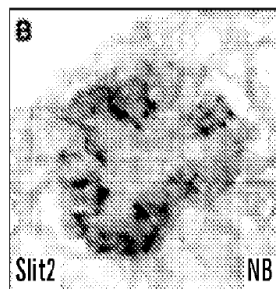
**FIG. 5L**



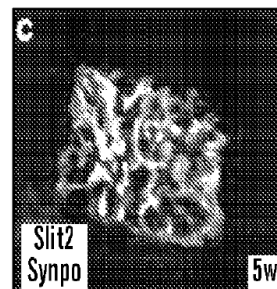
**FIG. 5M**



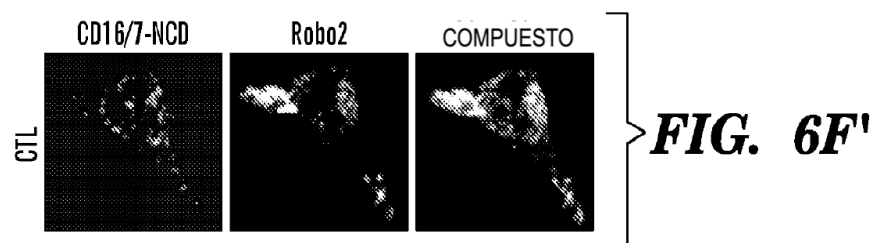
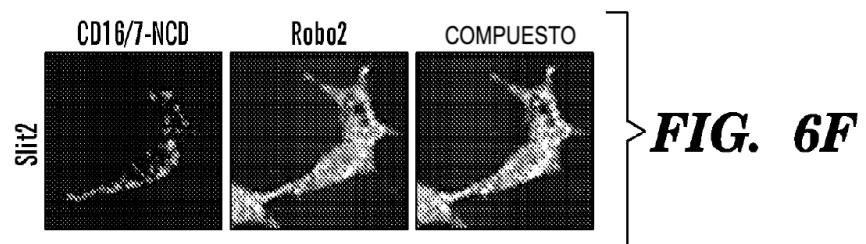
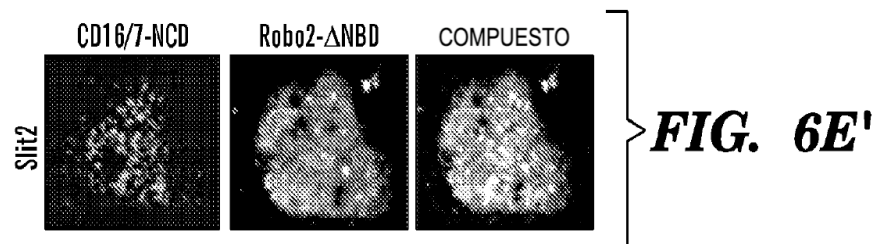
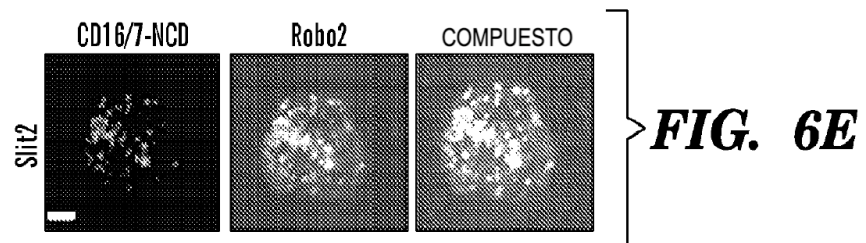
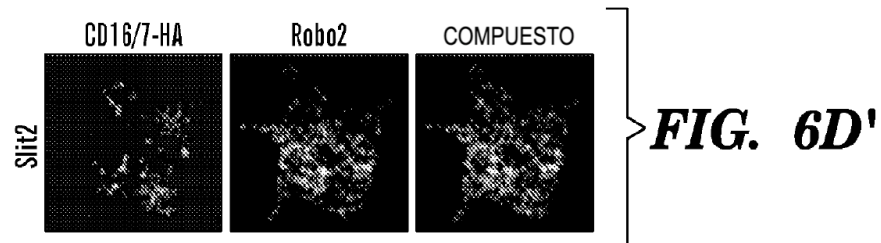
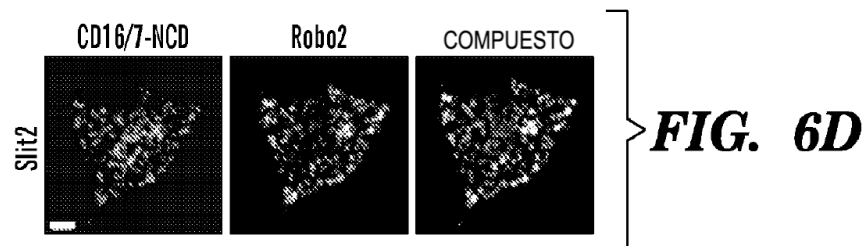
**FIG. 6A**

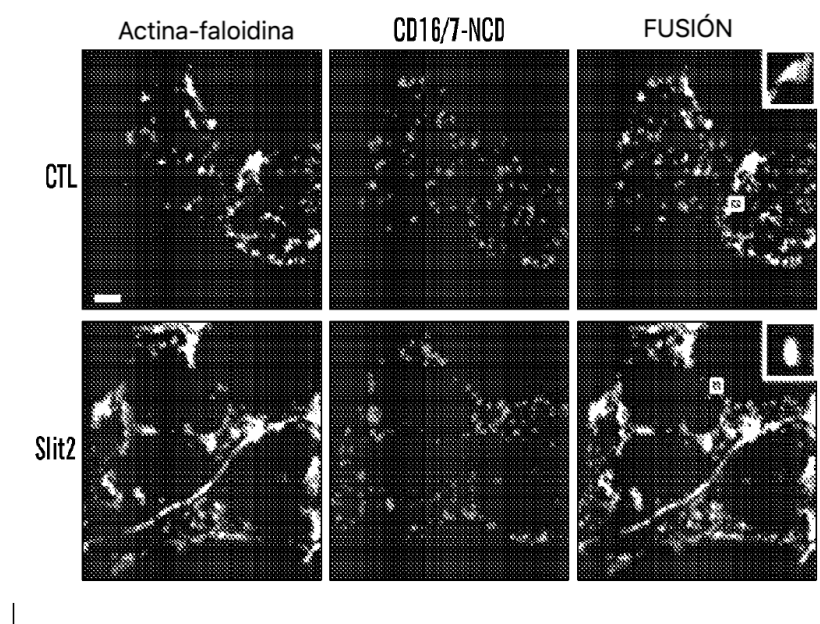


**FIG. 6B**

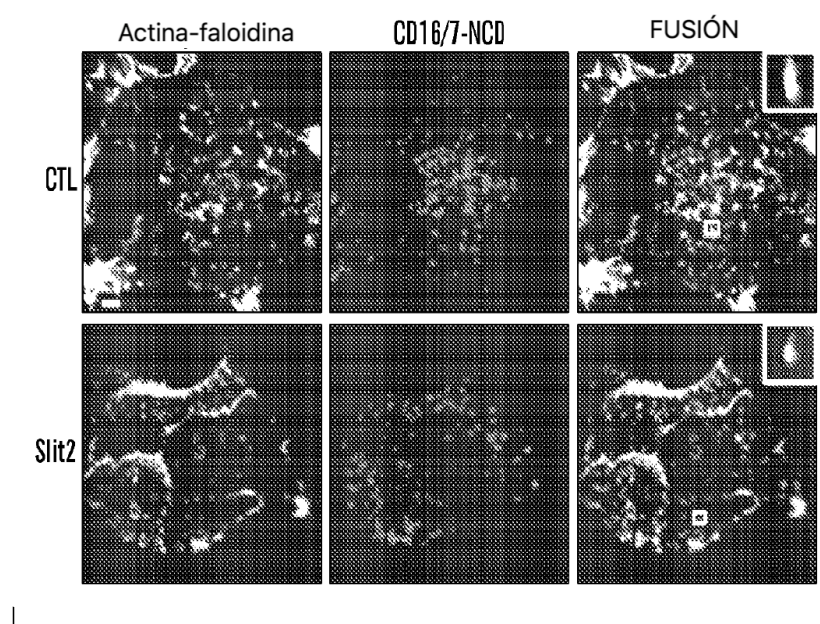


**FIG. 6C**

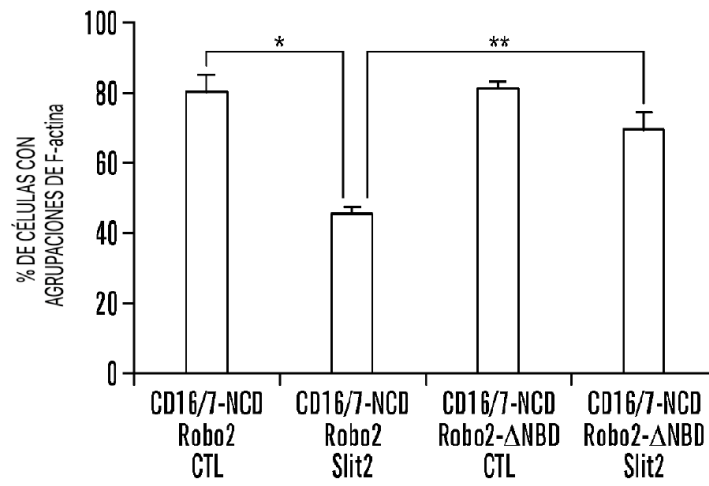




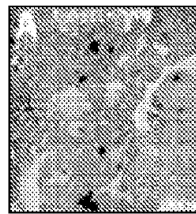
**FIG. 7A**



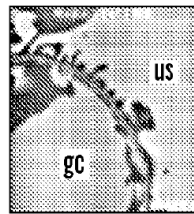
**FIG. 7B**



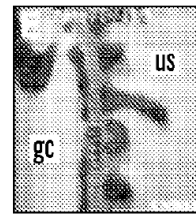
**FIG. 7C**



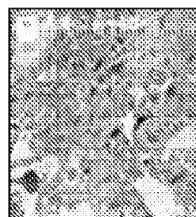
**FIG. 8A**



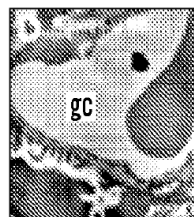
**FIG. 8C**



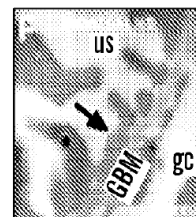
**FIG. 8E**



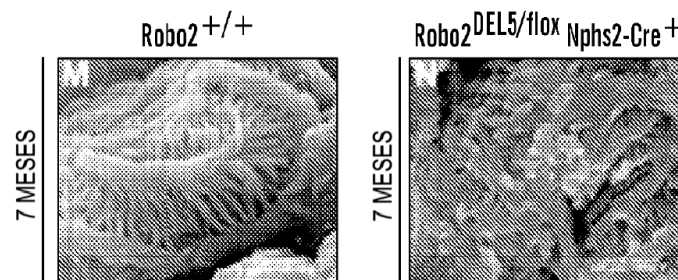
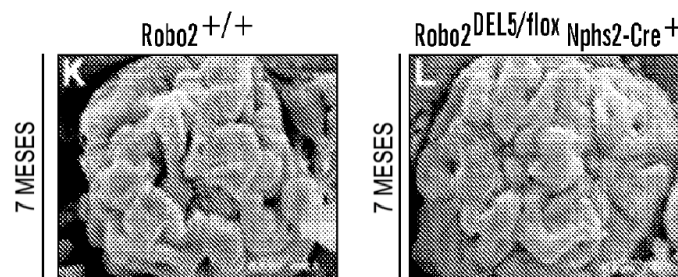
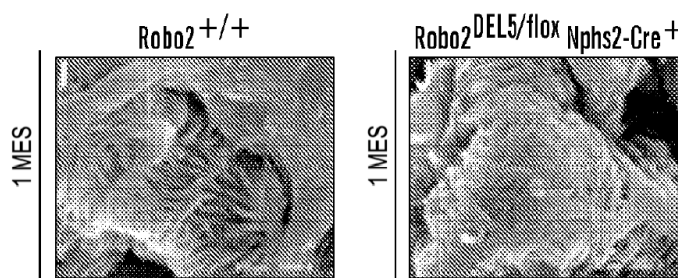
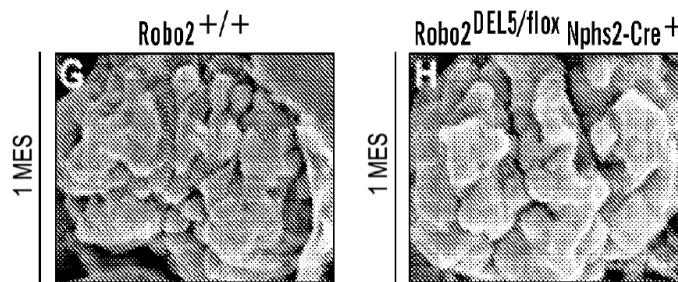
**FIG. 8B**

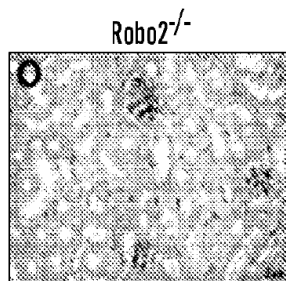


**FIG. 8D**

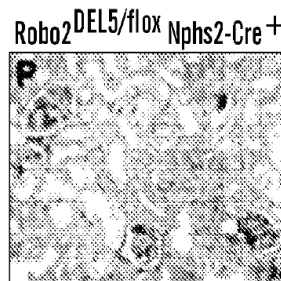


**FIG. 8F**

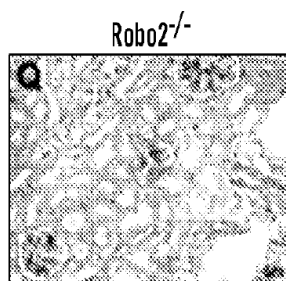




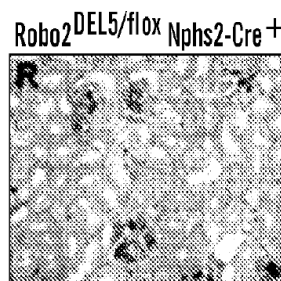
**FIG. 8O**



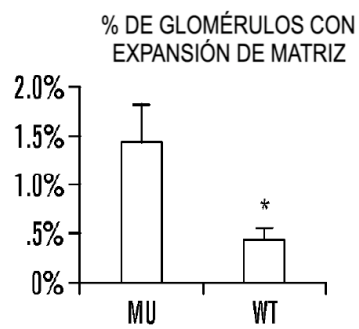
**FIG. 8P**



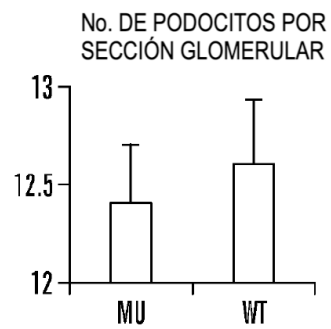
**FIG. 8Q**



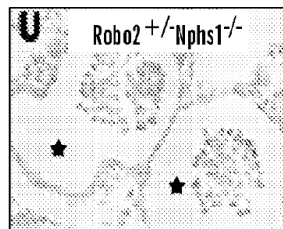
**FIG. 8R**



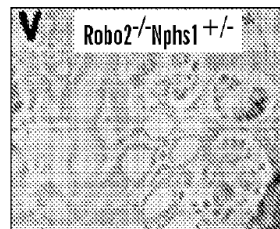
**FIG. 8S**



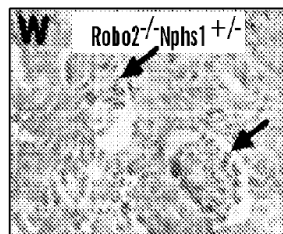
**FIG. 8T**



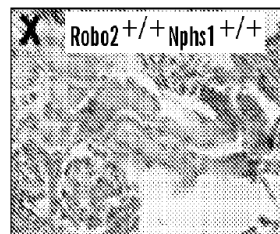
**FIG. 8U**



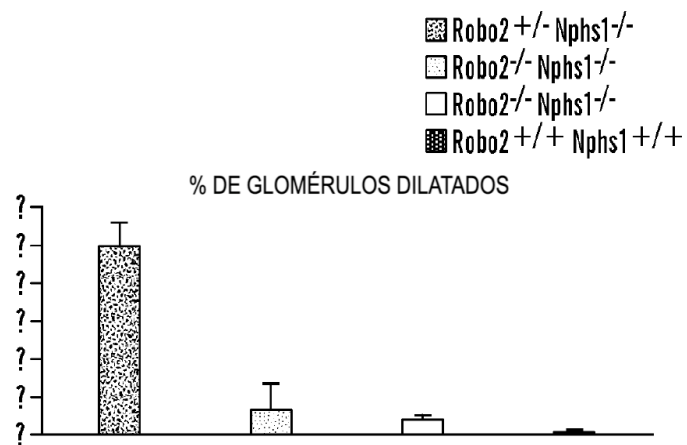
**FIG. 8V**



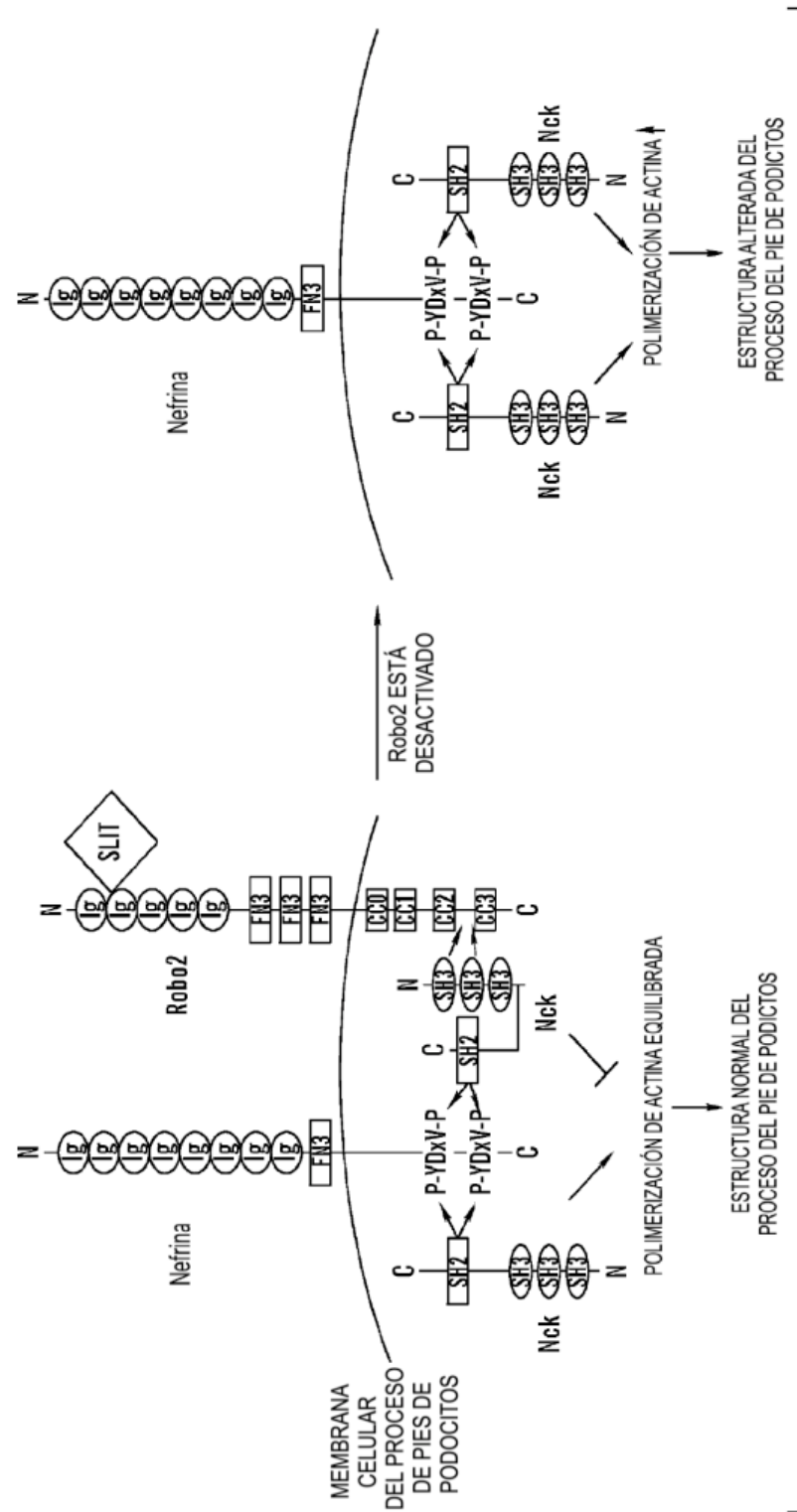
**FIG. 8W**



**FIG. 8X**



**FIG. 8Y**



**FIG. 8Z**