

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 999 146**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2017** **PCT/US2017/018753**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.08.2017** **WO17147087**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2017** **E 17757080 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2024** **EP 3419665**

54 Título: **Métodos de tratamiento para la fibrosis dirigidos a SMOC2**

30 Prioridad:

25.02.2016 US 201662299618 P

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

24.02.2025

73 Titular/es:

THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(100.00%)
75 Francis Street
Boston, MA 02115, US

72 Inventor/es:

VAIDYA, VISHAL S. y
GERARDUZZI, CASIMIRO

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 999 146 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de tratamiento para la fibrosis dirigidos a SMOC2

Reivindicación de prioridad

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud provisional estadounidense N.º 62/299.618, presentada el 25 de febrero de 2016.

Investigación o desarrollo patrocinados por el gobierno federal

Esta invención se ha realizado con apoyo del Gobierno en virtud de la Subvención N.º ES017543 concedida por los Institutos Nacionales de Salud. El Gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

Campo técnico

En esta especificación se describen los agentes que se dirigen a la proteína modular secretada de unión al calcio 2 (SMOC2) para el uso en métodos de tratamiento de la fibrosis, por ej., la fibrosis renal.

Antecedentes

La fibrosis es una respuesta de reparación aberrante a una lesión tisular crónica (1). El mecanismo de reparación relativamente conservado hace de la fibrosis una característica final común de casi todas las enfermedades inflamatorias crónicas de órganos, contribuyendo a la morbilidad y mortalidad de aproximadamente la mitad del mundo industrializado (1). El riñón es conocido por su alta susceptibilidad a las lesiones relacionadas, en parte, con sus elevadas concentraciones de toxinas filtradas y la predisposición a la isquemia, así como a la sepsis, lo que lo hace especialmente susceptible a la fibrosis (2).

Petersen et al., *Kidney International*, vol. 73, n.º 6, (2008), páginas 705-715, describe la administración de GW788388, un inhibidor de las quinasas receptoras de tipo I y II de TGF- β , en un modelo de ratón para la nefropatía diabética avanzada. El estudio demuestra que se previene la regulación al alza mediada por TGF- β de la deposición excesiva de ECM renal y, por tanto, hay una reducción de la fibrosis renal.

Resumen

La proteína secretada modular de unión al calcio 2 (SMOC2) pertenece a la familia SPARC (Proteína secretada ácida y rica en cisteína) de proteínas matricelulares cuyos miembros son conocidos por modular las interacciones célula-matriz. Como aquí se informa, SMOC2 se regula al alza en las células epiteliales tubulares renales de ratones y seres humanos tras una fibrosis. Utilizando ratones manipulados genéticamente con técnicas de sobreexpresión o *knockdown* de SMOC2, se demostró que SMOC2 está críticamente implicada en la progresión de la fibrosis renal. Sin querer ceñirnos a la teoría, los resultados sugieren que, desde el punto de vista mecánico, SMOC2 activa una transición de los fibroblastos a miofibroblastos (FMT) para estimular la formación de fibras contráctiles, la proliferación, la migración y la producción de matriz extracelular. Además, la focalización de SMOC2 mediante siRNA dio como resultado la atenuación de la transición FMT mediada por TGF β 1 *in vitro* y una mejora de la fibrosis renal en ratones. Estos hallazgos implican a SMOC2 como una molécula de señalización clave en el secretoma patológico de un riñón dañado, y la focalización de SMOC2 ofrece una nueva estrategia terapéutica para inhibir la fibrosis renal mediada por FMT.

Se trata, por tanto, de inhibidores de la proteína secretada modular de unión al calcio 2 (SMOC2) para el uso en el tratamiento de la fibrosis renal en un sujeto, donde el inhibidor es un anticuerpo monoclonal o una porción de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a o un ácido nucleico inhibidor que focaliza un transcrito de SMOC2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal o la porción de unión a antígeno del mismo es quimérico, humanizado o totalmente humano.

En algunas realizaciones, el inhibidor es un ácido nucleico inhibidor que focaliza un transcrito de SMOC2.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico inhibidor se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótidos antisentido, pequeños ARN de interferencia (siRNA, por sus siglas en inglés), y pequeños ARN en horquilla (shRNA por sus siglas en inglés).

En algunas realizaciones, y como se indica en las reivindicaciones, el ácido nucleico inhibidor está modificado, por ej., comprende un esqueleto modificado, por ej., un esqueleto de amida o morfolino, o comprende uno o más nucleósidos modificados, por ej., comprende al menos un nucleósido bloqueado.

En algunas realizaciones, el sujeto padece una enfermedad renal crónica, síndrome metabólico, reflujo vesicoureteral, fibrosis renal tubulointersticial, diabetes (incluyendo nefropatía diabética) y nefritis glomerular (NG).

En algunas realizaciones, la NG es glomeruloesclerosis segmentaria focal y glomerulonefritis membranosa o NG mesangiocapilar.

Salvo que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos aquí utilizados tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención. En la presente especificación se describen los métodos y materiales para el uso de la presente invención; también pueden utilizarse otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos y no pretenden ser limitativos. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluyendo las definiciones.

Se desprenderán otras características y ventajas de la invención a partir de la siguiente descripción detallada y de las figuras, así como de las reivindicaciones.

Descripción de las ilustraciones

Figuras 1A-F. SMOC2 está altamente regulada en ratones y humanos con fibrosis renal. Se realizó inmunotinción cuantitativa para SMOC2 y α SMA en secciones de riñón obtenidas de ratones en el día 7 después de (A) obstrucción ureteral unilateral (UUO) o (B) inyección de ácido fólico (AF) (n=5; aumento 20X). Para el modelo de UUO, también se incluyó tejido del riñón contralateral (CoK) del día 14. La cuantificación relativa de la inmunofluorescencia de SMOC2 y α SMA representada en un gráfico de cajas, se realizó utilizando imágenes representativas de 5 campos visuales para cada tejido analizado. (C, D) Técnica de Western blot representativo (n=5/condición; Densitometría Figura 7C (UUO) y 7D (AF)) de la expresión de SMOC2, α SMA, colágeno 1 α 1 y fibronectina utilizando muestras de riñón obtenidas de ratones sometidos a 7 y 14 días de UUO o AF. (E) Inmunotinción cuantitativa para SMOC2 y α SMA en riñones humanos con fibrosis patológica subyacente a la enfermedad renal crónica (ERC) (n=5) y pacientes no fibróticos (n=5). La cuantificación relativa de la inmunofluorescencia de SMOC2 y α SMA representada en un gráfico de cajas se realizó utilizando imágenes representativas de 5 campos visuales para cada tejido analizado. (F) Se midieron los niveles urinarios de SMOC2 y de la molécula de lesión renal-1 (KIM-1) normalizados en la creatinina urinaria en pacientes con ERC (n=13) comparado con voluntarios sanos (n=13). Los gráficos de caja describen la media (línea dentro de la caja), los cuartiles superior e inferior (límites de la caja) y los valores mínimo y máximo (barras). *P < 0,05 determinado por la prueba-t. Flechas amarillas, túbulos. Flechas blancas, intersticio.

Figuras 2A-G. Los ratones con sobreexpresión de SMOC2 son más susceptibles a la fibrosis renal que los ratones de tipo salvaje. (A) Confirmación de la sobreexpresión de SMOC2 en ratones transgénicos SMOC2 (SMOC2 Tg) mediante PCR (arriba, cebadores específicos para reconocer el inserto Tg) y técnica Western blot (abajo). (B) Western blot representativo (n=5/condición; densitometría en Figura 10B) de α SMA, colágeno 1 α 1, fibronectina y SMOC2 utilizando muestras de riñón obtenidas de ratones SMOC2 Tg y tipo salvaje (WT) sometidos a 7 y 14 días de obstrucción ureteral unilateral (UUO). (C) Tinción inmunofluorescente para α SMA en CoK y riñones fibróticos de ratones de tipo salvaje (WT) y SMOC2 Tg el día 7 tras UUO (n=5/condición, 5 campos visuales/tejido). (D) Western blot (n=5/condición; densitometría en Figura 11B) de α SMA, colágeno 1 α 1, fibronectina y SMOC2 utilizando muestras de riñón obtenidas de ratones SMOC2 Tg y tipo salvaje (WT) sometidos a 7 y 14 días de ácido fólico (AF). (E) Tinción de inmunofluorescencia para α SMA de riñones normales y fibróticos de ratones WT y SMOC2 Tg el día 7 después de AF (n=5/condición, 10 campos visuales/tejido). (F) Tinción con rojo Picrosirius (n=5/condición, 10 campos visuales/tejido) y tricrómico de Masson (n=5/condición, 5 campos visuales/tejido) de riñones tratados con CoK frente a riñones tratados con UUO 7 y 14 días. (G) Tinción con rojo Picrosirius y tricrómico de Masson de riñones normales frente a riñones tratados con AF 7 y 14 días (n=5/condición, 5 campos visuales/tejido). Las imágenes de microscopía confocal y óptica se aumentaron por 20X. Las cuantificaciones relativas de las imágenes se representan como gráficos de cajas, que describen la media (línea dentro de la caja), los cuartiles superior e inferior (límites de la caja) y los valores mínimo y máximo (barras). *P < 0,05 (CoK (UUO) o Normal (AF)) y #P < 0,05 (WT en el punto temporal respectivo) determinado por análisis de varianza (ANOVA) unidireccional con análisis post-hoc de Tukey.

Figuras 3A-G. SMOC2 induce una transición de fibroblasto a miofibroblasto. (A) La secuencia de ARN se realizó utilizando riñones de SMOC2 Tg y ratones WT el día 7 después del tratamiento con UUO. Se muestran las visualizaciones del mapa de árbol REVIGO para las categorías de ontología génica (OG) enriquecidas. Los términos de OG altamente similares para "componentes celulares" se agrupan y visualizan mediante diferentes colores y tamaños de los rectángulos utilizando la similitud semántica y los valores-p de enriquecimiento. Western blots de α SMA, colágeno 1 α 1 y fibronectina de fibroblastos primarios de riñón humano privados de suero (B, n=3/condición; densitometría en Figura 12C) y fibroblastos NIH3T3 (C, n=3/condición; densitometría en Figura 12D) tratados con 10 ng/mL de SMOC2 con/sin TGF β 1. (D) Tras 1 h de pretratamiento con anticuerpos, SMOC2 o TGF β 1 se trató con células NIH3T3 privadas de suero durante 24 h y después se comprobaron los marcadores fibróticos convencionales, mientras que el anticuerpo de integrina β 1 se pretrató con células NIH3T3 y luego se trató con SMOC2 (n=3/condición; densitometría en Figura 12E). (E) Los fibroblastos de NIH3T3 se transfectaron con SMOC2-MYC, control de vector vacío o control negativo MGP-MYC y luego se inmunoprecipitaron con un anticuerpo MYC- (arriba) o integrina- (abajo). Western blots de experimentos de inmunoprecipitación representativos. (F) Western blot representativo para Fosfo(P)-

Quinasa de Adhesión Focal (FAK) Y925, Cadena Ligera de P-Miosina (MLC) Ser19 y P-Paxilina Tyr18 de células NIH3T3 tratadas con 10 ng/mL de SMOC2 o 5 ng/mL de TGF β 1 durante 60 minutos (n=5/condición; densitometría en Figura 12H). (G) Tinción con faloidina de F-Actina después de que las células NIH3T3 fueran tratadas 24 h con 10 ng/mL de SMOC2 o 5 ng/mL de TGF β 1 (n=3). Los gráficos de caja describen la media (línea dentro de la caja), los cuartiles superior e inferior (límites de la caja) y los valores mínimo y máximo (barras). *P < 0,05 determinado por la prueba-t.

Figura 3H-M. SMOC2 induce las propiedades de las actividades miofibroblásticas. (H) Visualización de mapa de árbol REVIGO para términos de GO altamente similares que describen "procesos biológicos" significativamente diferentes entre SMOC2 Tg y ratones WT. (I) Ensayo de regeneración celular (*scratch*) realizado en células NIH3T3 tratadas 24 h con 10 ng/ml de SMOC2. Porcentaje de curación representado en el gráfico (n=5, 3 campos visuales/condición; aumento 10X, 50pM). (J) Ensayo de Cámara de Boyden realizado en células NIH3T3 tratadas 24 h con 10 ng/ml de SMOC2. (K) Se trataron células NIH3T3 durante 24 h con/sin 10 ng/mL de SMOC2, luego se tripsinizaron y se sembraron. Una hora después, se lavaron las células no adheridas y se cuantificó el número de células a efectos de adherencia (n=3). (L) La actividad metabólica de las células NIH3T3 de control y tratadas con 10 ng/mL de SMOC2 se midió a lo largo del tiempo mediante el ensayo MTT (n=5). (M) Los fibroblastos de NIH3T3 se trataron 24 h con/sin 10 ng/ml de SMOC2 y la proliferación celular se evaluó mediante marcado EdU y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) (n=5). Los gráficos de caja describen la media (línea dentro de la caja), los cuartiles superior e inferior (límites de la caja) y los valores mínimo y máximo (barras). *P < 0,05 determinado por la prueba-t.

Figuras 4A-D. La inhibición genética de SMOC2 limita la fibrosis renal inducida por ácido fólico en ratones. (A) Confirmación de la delección de SMOC2 en ratones knockout SMOC2 (SMOC2 KO) mediante PCR (arriba, cebadores de PCR específicos para reconocer el inserto knock-in) y Western blot (abajo). (B) Western blot representativo (n=4/grupo; densitometría en Figura 14) de α SMA, colágeno 1 α 1, fibronectina y expresión de SMOC2 utilizando muestras de riñón obtenidas el día 7 de ratones SMOC2 KO y tipo salvaje (WT) sometidos a tratamiento de ácido fólico (AF). (C) Tinción de α SMA inmunofluorescente de riñones de ratones KO y WT al inicio y el día 7 tras el tratamiento con AF (n=4/grupo). (D) Tinción tricrómica de Masson de riñones normales y tratados con AF obtenidos el día 7 de ratones KO y WT. La cuantificación de las imágenes se representa en forma de gráficos de caja (n=4/condición, 10 campos visuales/ratón), que describen la media (línea dentro de la caja), los cuartiles superior e inferior (límites de la caja) y los valores mínimo y máximo (barras). *P < 0,05 (WT normal) y #P < 0,05 (WT en tratamiento respectivo) determinado por análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con análisis post-hoc de Tukey.

Figuras 5A-C. La inhibición genética de SMOC2 limita la fibrosis renal inducida por UUU en ratones. (A) Western blot representativo (n=5/grupo; densitometría en Figura 15) de α SMA, colágeno 1 α 1, fibronectina y expresión de SMOC2 utilizando muestras de riñón obtenidas el día 7 de ratones SMOC2 KO y tipo salvaje (WT) sometidos a tratamiento de UUU. (B) Imágenes (n=3/grupo; 5 campos visuales por cada tejido analizado) de la tinción SMA inmunofluorescente α de riñones de KO y WT de ratones normales y día 7 de ratones sometidos a UUU. La cuantificación relativa se representa en un diagrama de cajas como unidades arbitrarias. (C) Tinción tricrómica de Masson de riñones normales y UUU día 7 de ratones WT y KO. Las imágenes de la tinción tricrómica de Masson son representativas de 5-10 campos visuales de cada tejido analizado. La cuantificación se representa en un diagrama de cajas como unidades arbitrarias (ratones n=5-6, 5-10 campos visuales/ratones). Los gráficos de caja describen la media (línea dentro de la caja), los cuartiles superior e inferior (límites de la caja) y los valores mínimo y máximo (barras). *P < 0,05 (WT CoK) y #P < 0,05 (WT en UUU respectivo) determinado por análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con análisis post-hoc de Tukey.

Figuras 6A-D. El silenciamiento de SMOC2 reduce los marcadores fibróticos inducidos de TGF β 1 *in vitro* y la fibrosis renal inducida por ácido fólico en ratones. (A) Esquema del procedimiento experimental para células NIH3T3 transfectadas con siRNA de SMOC2. Tras 24 h de tratamiento con siRNA de SMOC2 o siRNA aleatorizado (ssiRNA), los fibroblastos NH43T3 se trataron con o sin TGF β 1 durante 24 h. Se realizó un Western blot representativo (n=3/condición; densitometría en Figura 17) para la expresión de SMOC2, α SMA, colágeno 1 α 1 y fibronectina. (B) Esquema del procedimiento experimental para ratones C57BL/6 inyectados con siRNA o ssiRNA de SMOC2 tratados con/sin ácido fólico (AF). Los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con 30 μ g/200 μ L de siRNA o ssiRNA de SMOC2 4 horas antes y 2, 4 y 6 días después de una inyección intraperitoneal de 250 mg/kg de AF. Se realizó un Western blot representativo (n=5/grupo; densitometría en Figura 19) para SMOC2, α SMA, colágeno 1 α 1 y fibronectina. (C) Tinción inmunofluorescente de α SMA de riñones obtenidos de ratones al inicio y en el día 7 después de AF ya sea tratados con ssiRNA o con siRNA de SMOC2 (n=5). (D) Tinción tricrómica de Masson de riñones normales y tratados con AF obtenidos en el día 7 tras la administración de ssiRNA o siRNA de SMOC2. Las imágenes de microscopía óptica y confocal están aumentadas 20X; barras de escala, 50 μ M. La cuantificación de las imágenes se representa en forma de gráfico de caja (n=5/condición, 10 campos visuales/ratón), que describen la media (línea dentro de la caja), los cuartiles superior e inferior (límites de la caja) y los valores mínimo y máximo (barras). *P < 0,05 (ssiRNA + vehículo) y #P < 0,05 (tratamiento respectivo de ssiRNA) determinados por análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con análisis post-hoc de Tukey.

Figuras 7A-D. Cuantificación de la expresión de la proteína SMOC2 junto con marcadores fibróticos. Niveles de SMOC2 en ratones tratados con AF mediante (A) qPCR y (B) Western blot. Los ratones fueron (C) sometidos a obstrucción ureteral unilateral (UUO) o (D) tratados con ácido fólico (AF), por vía intraperitoneal, y se sacrificaron a los 7 y 14 días. Se realizó análisis Western blot en lisados de tejido renal para medir los marcadores fibróticos establecidos como la α -actina de músculo liso (α SMA), colágeno 1 α 1 y fibronectina. Para el modelo UUO, también se incluyeron lisados de tejido de riñón contralateral (CoK). Los datos de la densitometría son representativos de las imágenes Western blot de la Figura 1B (UUO) y la Figura 1C (AF), que se normalizaron con respecto al modelo simulado/vehículo y representan la media $\pm$ SEM (error estándar de la media) (n = 5 ratones/grupo/punto temporal). *P < 0,05 determinado por la prueba-t.

Figuras 8A-B. TGF β 1 induce la expresión de SMOC2 en fibroblastos y células epiteliales. Se incubaron células NIH3T3 (A, n=4) y HPTEC (B, n=3) con 10 ng/mL de TGF β 1 durante 24 h. La expresión de proteínas de las dianas indicadas se determinó mediante Western blot. Los datos de la densitometría son relativos a los niveles de control, normalizados mediante GAPDH y representan la media $\pm$ SEM. *P < 0,05 determinado por la prueba-t.

Figuras 9A-C. Cuantificación de la expresión de la proteína SMOC2 junto con marcadores fibróticos en ratones de tipo silvestre y transgénicos SMOC2. (A) Densitometría para la expresión de SMOC2 en ratones SMOC2 Tg y de tipo salvaje (WT) (n = 4). (B) Los ratones SMOC2 Tg y de tipo salvaje (WT) fueron sometidos a obstrucción ureteral unilateral (UUO), y la expresión proteica de las muestras de tejido renal recogidas a los 7 y 14 días tras la UUO se evaluó mediante Western blot para SMOC2. (C) Se evaluaron ratones SMOC2 Tg y WT tratados con ácido fólico (AF) y expresión proteica de α SMA, colágeno 1 α 1, fibronectina y SMOC2 mediante Western blot a partir de muestras de tejido renal recogidas a los 7 y 14 días post administración de AF. La densitometría es representativa de las imágenes Western blot de la Figura 2B (UUO) y la Figura 2D (AF), que se normalizaron con respecto al modelo simulado/vehículo y representan la media $\pm$ SEM (error estándar de la media) (n = 3-4 ratones/grupo/punto temporal). *P < 0,05 determinado por la prueba-t.

Figuras 10A-B. Cuantificación de los niveles de ARNm y proteína de SMOC2 junto con marcadores fibróticos en ratones tras la obstrucción ureteral unilateral. Los ratones SMOC2 Tg y de tipo salvaje (WT) fueron sometidos a obstrucción ureteral unilateral (UUO) y sacrificados a los 7 y 14 días. (A) Se realizaron rtPCR cuantitativa y (B) análisis de Western blot en lisados de tejido renal para medir la expresión de α SMA, colágeno 1 α 1, y fibronectina (datos de densitometría de Western blots de la Figura 2B). También se incluyeron lisados de tejido renal contralateral. La expresión se normalizó con respecto al gen de mantenimiento de GAPDH y los valores se representan como relación de cambio en la expresión genética con respecto a la normalidad en el WT. Media $\pm$ SEM (n=5 ratones/grupo/punto temporal). *P < 0,05 (WT normal) y #P < 0,05 (WT en el punto temporal respectivo) determinado por análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con análisis post-hoc de Tukey.

Figuras 11A-B. Cuantificación de los niveles de ARNm de SMOC2 y proteínas con marcadores fibróticos en ratones tras la administración de ácido fólico. Los ratones SMOC2 Tg y de tipo salvaje (WT) fueron sometidos a tratamiento con ácido fólico (AF), por vía intraperitoneal, y luego sacrificados a los 7 y 14 días. (A) Se realizaron rtPCR cuantitativa y (B) análisis de Western blot en lisados de tejido renal para medir la expresión de α SMA, colágeno 1 α 1, y fibronectina (datos de densitometría de Western blots de la Figura 2D). Los datos cuantitativos son relativos a los niveles normales de WT, normalizados mediante GAPDH. Media $\pm$ SEM (n=5 ratones/grupo/punto temporal). *P < 0,05 (WT normal) y #P < 0,05 (WT en el punto temporal respectivo) determinado por análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con análisis post-hoc de Tukey.

Figuras 12A-J. Perfil *in vitro* de SMOC2 recombinante en células NIH3T3. (A) Células NIH3T3 privadas de suero tratadas con concentraciones variables de SMOC2 durante 24 horas y posterior medición de la expresión de α SMA, colágeno 1 α 1 y fibronectina mediante Western blot. (B) Imágenes de Western blot con su respectiva densitometría (n = 4) que muestran marcadores fibróticos de fibroblastos primarios quiescentes de riñón humano tratados con 10 ng/mL de SMOC2 o 5 ng/mL de TGF β 1 durante 24 h. (C) Datos de la densitometría de la Figura 3B que muestran el tratamiento con SMOC2 durante 48 h en fibroblastos primarios de riñón humano (n = 3). (D) En comparación con TGF β profibrótica (10 ng/mL), los datos de densitometría de la Figura 3C Western blots muestran los niveles de expresión de los marcadores de miofibroblastos α SMA, colágeno 1 α 1 y fibronectina de fibroblastos NIH3T3 privados de suero tratados durante 24 h con 10 ng/mL de SMOC2 (n = 3). (E) Datos de densitometría que representan el bloqueo de anticuerpos de la Figura 3D (n = 3). (F) Titulación (ajuste de dosis) de bloqueo de anticuerpos de células NIH3T3 tratadas con SMOC2. Imágenes de Western blot con densitometría respectiva (H) que muestran las señales fosfoactivadoras profibróticas Phospho(P)-Focal Adhesion Kinase (FAK) Y925, P-Myosin Light Chain (MLC) Ser19 y P-Paxillin Tyr118 de fibroblastos NIH3T3 quiescentes tratados con 10 ng/mL de SMOC2 o 5 ng/mL de TGF β 1 durante 45 min (H izquierda, densitometría; n = 5) y 60 minutos (H derecha, datos de densitometría de Western blots de la Figura 3F; n=5). (J) Cuantificación de la densidad de células NIH3T3 en el área de la herida de un ensayo de migración a lo largo de un periodo de tiempo. (K) Se midió la actividad metabólica de las células NIH3T3 tratadas con diversas concentraciones de SMOC2 a lo largo de un periodo de tiempo mediante el ensayo MTT (n=5). Los datos de la densitometría son

relativos a los niveles de control, normalizados mediante GAPDH y representan la media $\pm$ SEM. *P < 0,05 determinado por la prueba-t. #P < 0,05 (Control en punto temporal respectivo).

Figuras 13A-G. Los fibroblastos transfectados de SMOC2 adquieren un fenotipo activo. Cuantificación de la expresión de ARN (A) y expresión de proteínas (B) de SMOC2 mediante rtPCR y Western blot en células NIH3T3 transfectadas con pCMV y pCMV-SMOC2. Los datos cuantitativos de rtPCR y densitometría son relativos a los niveles de control de pCMV, normalizados por GAPDH y representan la media $\pm$ SEM (ARN n=3, 2 réplicas técnicas; Proteína n=3). (C) La actividad metabólica de las células NIH3T3 transfectadas con control pCMV y pCMV-SMOC2 se midió mediante el ensayo MTT a lo largo de los días indicados (n=12/punto temporal, % respecto al día 1). (D) La influencia de la transfección de SMOC2 sobre los fibroblastos en la cicatrización de heridas se analizó mediante un ensayo de regeneración celular. Células dispersas igualmente fueron sometidas a un raspado para evaluar la capacidad de restauración entre las células NIH3T3 transfectadas 24 h post-SMOC2 y su control pCMV. La diferencia en la cicatrización se calculó como porcentaje de células transfectadas pCMV-SMOC2 sobre células transfectadas pCMV. Las imágenes representativas (10X; barra de escala = 50 μ m) se tiñeron con azul de metileno a las 24 h para aumentar el contraste. (E) Las células NIH3T3 se transfectaron con pCMV o pCMV-SMOC2 durante 24 horas. La proliferación celular y la progresión del ciclo celular se midieron mediante marcado EdU y posterior análisis del ciclo celular por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). (F) El potencial de migración de las células NIH3T3 transfectadas con SMOC2 se evaluó mediante el ensayo de cámara de Boyden para determinar el porcentaje de células que migraban. (G) Las células NIH3T3 fueron transfectadas con pCMV y pCMV-SMOC2 durante 24h, tras lo cual las células fueron recogidas mediante tripsina y sembradas. Una hora después, se lavaron las células no adheridas y se cuantificó el número de células a efectos de adherencia (n=3). *P < 0,05 determinado por la prueba-t.

Figura 14 Cuantificación de Western blots para marcadores fibróticos en ratones SMOC2 knockout (KO) y tipo salvaje tratados con ácido fólico. Los datos de densitometría que representan la Figura 5B son relativos a ratones normales tipo salvaje (WT), normalizados en GAPDH y representan la media $\pm$ SEM (n = 4). *P < 0,05 (WT normal) y #P < 0,05 (WT en tratamiento respectivo) determinado por análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con análisis post-hoc de Tukey.

Figura 15. Cuantificación de Western blots para SMOC2 y marcadores fibróticos en ratones SMOC2 knockout (KO) y tipo salvaje sometidos a cirugía de UUO. Los datos de la densitometría que se representan en la Figura 6A son relativos a ratones CoK de tipo salvaje (WT), normalizados en GAPDH y representan la media $\pm$ SEM (n = 5). *P < 0,05 (WT CoK) y #P < 0,05 (WT en tratamiento respectivo) determinado por análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con análisis post-hoc de Tukey.

Figura 16. Rendimiento de siRNAs de SMOC2 en células NIH3T3. Células NIH3T3 tratadas con diferentes siRNAs de SMOC2 durante 24 h y medición para la producción de SMOC2 mediante Western blot.

Figura 17. Cuantificación de Western blots para el tratamiento de fibroblastos de siRNA de SMOC2. Los datos de densitometría representados en la Figura 7A son relativos a las células NIH3T3 transfectadas con ssiRNA no tratadas, normalizadas mediante GAPDH y representan la media $\pm$ SEM (n=3). *P < 0,05 (células de ssiRNA no tratadas) y #P < 0,05 (células de ssiRNA en tratamiento respectivo) determinado por análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con análisis post-hoc de Tukey.

Figura 18. Enriquecimiento de siRNA en los riñones de ratones tras inyección intravenosa en la vena de la cola. Los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con 30 μ g/200 μ L de siRNA o ssiRNA de SMOC2 4 h antes y 2, 4 y 6 días y sacrificados el día 7. Los oligonucleótidos de siRNA fueron sintetizados como conjugado de fluoresceína; después, visualizados para evaluar la aportación de siRNA por microscopía confocal a 40X y 20X. Las imágenes son representativas de 10 campos visuales/ratón (n=5 ratones/grupo). La cuantificación se representa en un gráfico de barras como unidades arbitrarias (media $\pm$ SEM, n=5 ratones/grupo, 10 campos visuales/ratones).

Figura 19. Cuantificación de Western blots para ratones tratados con siRNA de SMOC2 seguido de administración de ácido fólico. Los datos de la densitometría representados en la Figura 7B son relativos a ratones inyectados con ssiRNA no tratados, normalizados en GAPDH y representan la media $\pm$ SEM (n=5). *P < 0,05 (ssiRNA normal) y #P < 0,05 (ssiRNA en tratamiento respectivo) determinado por análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con análisis post-hoc de Tukey.

Descripción detallada

La fibrosis renal es el fenómeno fisiopatológico común de la mayoría de enfermedades renales crónicas progresivas (3, 4). Los eventos fibróticos en el riñón se definen específicamente por el depósito excesivo de una matriz extracelular (ECM) patológica en el espacio intersticial entre los túbulos y capilares peritubulares, interfiriendo con su intercambio normal de toxinas y nutrientes (5). Los miofibroblastos son ampliamente reconocidos como las células efectoras responsables de la fibrosis, ya que se consideran las células productoras de ECM dominantes que se originan a través

de la activación de fibroblastos residentes por exposición a factores profibróticos, esencialmente proteínas de TGFβ1 y ECM (6-9). Inhibir los factores que regulan este bucle autopropagador de producción de ECM y activación de miofibroblastos representa un enfoque lógico para abordar la fibrosis renal, que sigue siendo una necesidad médica no cubierta.

Mediante la secuenciación del ARN, se identificó que la proteína modular secretada de unión al calcio 2 (SMOC2) se encontraba entre los genes mayormente regulados al alza en los riñones de ratones sometidos a fibrosis renal progresiva crónica inducida por ácido fólico (10 y WO2015/138532, publicado el 17 de septiembre, 2015); sin embargo, hasta ahora se desconocía si esta regulación al alza era perjudicial o protectora. SMOC2 pertenece a la familia SPARC (proteína secretada ácida y rica en cisteína) de proteínas matricelulares cuyos miembros son conocidos por su secreción en el espacio extracelular para interactuar no sólo con proteínas de la matriz estructural, sino también con receptores de la superficie celular, factores de crecimiento, proteasas y otros efectores bioactivos para modular las interacciones célula-matriz y la función celular (11). Mecánicamente, aparte de su papel en la señalización del ensamblaje de la matriz extracelular, se ha planteado la hipótesis de que SMOC2 sirva como diana para controlar la angiogénesis en el crecimiento tumoral y la isquemia miocárdica (12, 13). Dado que no existe información sobre la relevancia funcional de la regulación al alza de SMOC2 tras el daño renal, el objetivo de este estudio era investigar si la inducción de SMOC2 en el riñón regula el inicio y la progresión de la fibrosis renal y si la modulación genética o farmacológica de SMOC2 es capaz de prevenir la fibrosis.

La composición del estroma y la organización de las proteínas ECM son características integrales de señalización que dictan la causa y el efecto de la activación persistente de los fibroblastos, la fibrosis patológica subyacente (19) y, como consecuencia, la pérdida continuada de la estructura normal del tejido. El presente estudio respalda sistemáticamente la noción de que el factor matricelular de SMOC2 es mínimo en condiciones normales, pero se regula al alza tras la lesión renal para acabar participando en la respuesta adversa de la fibrosis. Aportamos pruebas de que 1) la expresión de SMOC2 es significativamente inducida en los riñones de ratones y humanos tras la fibrosis, independientemente del mecanismo de inicio de la fibrosis; 2) SMOC2 interviene de forma crítica en la progresión de la fibrosis renal, ya que los ratones transgénicos que sobreexpresan SMOC2 presentan un aumento significativo de la fibrosis tubulointersticial, mientras que los ratones knockout SMOC2 están protegidos frente al desarrollo de la fibrosis renal; 3) La inhibición de SMOC2 *in vitro* e *in vivo* usando siRNA protege de la progresión de la fibrosis, lo que sugiere que SMOC2 es una posible diana terapéutica para la fibrosis renal; y 4) Mecánicamente, SMOC2 activa la señalización de ensamblaje de la matriz en los fibroblastos para estimular la formación de fibras contráctiles, la proliferación, la migración y la producción de ECM, características típicas de la transición a miofibroblastos, que son las células efectoras en la fibrosis.

Transformación de fibroblastos a miofibroblastos (FMT)

La transformación de fibroblastos en miofibroblastos (FMT) es una fase esencial en el desarrollo de la fibrosis debido al papel central que desempeñan los miofibroblastos en la producción de colágeno y fibronectina. Como aquí se demuestra, SMOC2 es una molécula de señalización clave en el secretoma patológico de un riñón dañado, cuya presencia continua lleva a la fibrosis. Sin querer ceñirnos a la teoría, dado que la vía de TGFβ es una vía distintiva de FMT, descubrimos inicialmente que era capaz de aumentar SMOC2 *in vitro* en fibroblastos y células epiteliales, además de descubrir que la ablación de SMOC2 atenuaba significativamente la FMT inducida por TGFβ, lo que convierte a SMOC2 en un posible contribuyente patológico a la fibrosis posterior de TGFβ. Aunque SMOC2 no se ha asociado previamente con ninguna forma de fibrosis, su miembro familiar SPARC se ha estudiado ampliamente en múltiples tipos de fibrosis. Se observó que el nivel de expresión de SPARC aumentaba en pacientes con fibrosis pulmonar, renal, hepática y dérmica (20). Además, los ratones cero SPARC presentaban una deposición de colágeno significativamente menor en la piel, el corazón, los pulmones y el riñón tras la inducción de estímulos fibróticos (20). Aunque tanto SPARC como SMOC2 fomentan la fibrosis, lo más probable es que difieran en su mecanismo de acción para mediar en la interacción entre ECM y la célula. SPARC es conocida por su unión al colágeno y el procesamiento postsintético y ensamblaje del colágeno en estructuras de agrupamiento (21, 22); sin embargo, la estructura de SMOC2 carece de sitios de unión de colágeno como SPARC para mediar los mismos efectos. Esto implicaría un mecanismo de acción diferente en el que cada miembro SPARC tiene su función respectiva en el desarrollo de la fibrosis.

SMOC2

Existen dos isoformas de SMOC2 en humanos; la secuencia de la proteína precursora de la isoforma 1 está en GenBank en NP_071421.1 (codificada por NM_022138.2), y la secuencia del precursor de la isoforma 2 está disponible en GenBank en NP_001159884.1 (codificado por NM_001166412.1). La isoforma 2 es más corta que la 1 debido a un sitio de empalme alternativo en el marco en la región codificante central. El identificador de secuencia RefSeqGene es NG_032781.1 (rango 5001-231844).

SMOC2 se expresa en el corazón, músculo, bazo y ovarios (23) y su patrón de expresión durante el desarrollo sugiere que puede mediar en la señalización intercelular y la diferenciación específica de tipos celulares durante el desarrollo de las gónadas y el tracto reproductor (24). Aunque detectamos de forma similar la expresión de SMOC2 en riñones normales (23), la sobreexpresión de SMOC2 en ratones en ausencia de daño no dispuso al riñón de ratón a una fibrosis espontánea; sin embargo, la sobreexpresión de SMOC2 en los ratones transgénicos aceleró una respuesta fibrótica sobre el tipo salvaje sólo después de la lesión. Mecánicamente, se ha demostrado que SMOC2 actúa en diversos tipos celulares, por ejemplo: estimulando la migración y adhesión de queratinocitos a través de la interacción de integrinas ($\alpha v \beta 6$ y $\alpha v \beta 6$) (23); en células endoteliales, donde SMOC2 potencia las respuestas de mitogénesis y angiogénesis inducidas por VEGF y FGF (25); y en fibroblastos, donde SMOC2 regula la progresión del ciclo celular a través de la actividad de la quinasa enlazada a integrina y la expresión de ciclinaD1 (26). Las proteínas matriciales están implicadas en la regulación de las interacciones entre los componentes de ECM y las integrinas de la superficie celular (27). Los heterodímeros $\alpha \beta$ de las integrinas traducen los cambios en las señales de ECM en el fibroblasto para inducir la transformación FMT (6, 28). Esta vía mecanosensible que subyace a la FMT puede resumirse en un proceso en cascada de 3 niveles usando los siguientes marcadores asociados (14): FAK-P, MLC-P y Pax-P.

En resumen, hemos descubierto una nueva vía en la patogénesis de la fibrosis renal iniciada por la proteína matricelular SMOC2. Demostramos que SMOC2 es crítica para el desarrollo de la fibrosis renal al estimular la señalización del ensamblaje de la matriz, la quimiotaxis y la transición de los miofibroblastos. También aportamos pruebas convincentes que sugieren que el silenciamiento de SMOC2 para limitar la fibrosis tiene potencial como enfoque terapéutico de un proceso de enfermedad que aún no ha dado resultados prometedores.

Un inhibidor de SMOC2 para el uso en el tratamiento profiláctico de la fibrosis renal en un sujeto

Los inhibidores aquí descritos pueden utilizarse para el tratamiento profiláctico de la fibrosis renal en un sujeto. La fibrosis renal puede ser consecuencia de diversas enfermedades y agresiones en los riñones. Ejemplos de tales enfermedades y agresiones incluyen la enfermedad renal crónica, el síndrome metabólico, el reflujo vesicoureteral, la fibrosis renal tubulointersticial, la diabetes (incluyendo la nefropatía diabética), y la nefritis glomerular (NG) resultante, incluyendo entre otras, la glomeruloesclerosis segmentaria focal y la glomerulonefritis membranosa, y la NG mesangiocapilar. Dado que la fibrosis renal está asociada a la pérdida de vasos sanguíneos, se produce una isquemia secundaria que también puede dar lugar a enfermedad glomerular con pérdida de la función glomerular. Independientemente de la causa primaria, las agresiones a los riñones pueden provocar fibrosis renal y la pérdida concomitante de la función renal. (Schena, F. and Gesualdo, L., Pathogenic Mechanisms of Diabetic Nephropathy, J. Am. Soc. Nephrol., 16: S30-33 (2005); Whaley-Connell, A., and Sower, J R., Chronic Kidney Disease and the Cardiometabolic Syndrome, J. Clin. Hypert., 8(4): 546-48 (2006)). Las afecciones asociadas a la fibrosis renal incluyen, entre otras, la nefropatía diabética, enfermedad renal crónica, enfermedad renal en fase terminal, lupus eritematoso sistémico, vasculitis, nefropatía IgA, otras enfermedades autoinmunes, enfermedades paraproteicas, diabetes. Dado que la enfermedad renal crónica asociada a la fibrosis renal es un factor de riesgo muy importante para las enfermedades cardiovasculares, sería evidente para un experto que una terapéutica que previniera o redujera la fibrosis renal tendría un efecto beneficioso sobre las enfermedades cardíacas y vasculares en todo el organismo. Una afección asociada a la fibrosis renal, incluyendo la propia fibrosis renal, puede diagnosticarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ej., mediante un análisis de sangre que mida el nivel de productos de desecho como la creatinina y la urea, un análisis de orina para buscar anomalías, una prueba que mida el nivel de expresión del gen o la proteína SMOC2 (véase, por ej., WO2015/138532), una prueba de obtención de imágenes mediante ultrasonidos (ecografía) para evaluar la estructura y el tamaño del riñón, o una biopsia renal.

En algunas realizaciones, el trastorno es una enfermedad renal crónica. Tal como se usa aquí, "enfermedad renal crónica" o "ERC" se refiere a la pérdida progresiva de la función renal a lo largo del tiempo. En algunos casos, la ERC se caracteriza por hiperfosfatemia (es decir, $> 4,6$ mg/dl) o tasas de filtración glomerular bajas (es decir, < 90 ml/minuto por $1,73$ m² de superficie corporal). Sin embargo, muchos pacientes con ERC pueden tener niveles séricos de fosfato normales junto con una reducción sostenida del índice de filtración glomerular durante 3 o más meses, o una tasa TFG (tasa de filtración glomerular) normal junto con evidencia sostenida de una anomalía estructural del riñón. En algunas realizaciones, un sujeto con ERC puede ser un sujeto con: i) una reducción sostenida de la TFG < 60 ml/min por $1,73$ m² de superficie corporal durante 3 o más meses; o ii) una anomalía estructural o funcional de la función renal durante 3 o más meses incluso en ausencia de una TFG reducida. Las anomalías estructurales o anatómicas del riñón podrían definirse como microalbuminuria persistente o proteinuria o hematuria o presencia de quistes renales, entre otras.

Los síntomas habituales de la enfermedad renal crónica son cansancio, náuseas, aliento con olor a orina, dolor de huesos, piel anormalmente oscura o clara, picores, síndrome de las piernas inquietas, sangre en las heces, facilidad para la aparición de hematomas, edema maleolar y edema periférico. La enfermedad renal crónica puede diagnosticarse, por ej., mediante la historia clínica, un hemograma completo, el nivel de BUN (nitrógeno ureico en sangre) o el nivel de creatinina, el flujo y escaneado renal y la ecografía renal. En algunas realizaciones, se identifica que el sujeto tiene un nivel elevado de SMOC2, por ej., mediante un método descrito en WO2015138532.

Generalmente, los métodos incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de SMOC2 como se describe en esta especificación, a un sujeto que necesita dicho tratamiento, o que se ha determinado que lo necesita. Los inhibidores de SMOC2 incluyen anticuerpos que se unen a e inhiben SMOC2, así como ácidos nucleicos inhibidores dirigidos al ARNm de SMOC2.

Tal como se usa en este contexto, "tratar" significa mejorar al menos un síntoma de los trastornos asociados a la fibrosis renal. A menudo, la fibrosis renal provoca un aumento de los niveles de BUN o creatinina, hiperfosfatemia y/o bajas tasas de filtración glomerular; por tanto, un tratamiento puede dar lugar a una reducción de los niveles de BUN, fosfato o creatinina, y a un retorno o aproximación a la función renal normal, por ej., tasas de filtración glomerular de al menos 90 ml/minuto por 1,73 m² de superficie corporal. La administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto aquí descrito para el tratamiento de una afección asociada a la fibrosis renal producirá una disminución de la fibrosis, detectable mediante ultrasonidos (ecografía).

En algunas realizaciones, los sujetos tratados mediante un método aquí descrito no padecen cáncer de colon, degeneración macular asociada a la edad, vitíligo o enfermedad pulmonar.

Anticuerpos

Los usos aquí descritos pueden incluir el uso de anticuerpos contra la proteína Smoc2. El término "anticuerpo", tal como se usa aquí, se refiere a una molécula de inmunoglobulina o a una porción de unión a antígeno de la misma. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulina que se unen al antígeno son los fragmentos F(ab) y F(ab')₂, que conservan la capacidad de unirse al antígeno. El anticuerpo puede ser policlonal, monoclonal, recombinante, quimérico, desimmunizado o humanizado, totalmente humano, no humano, (por ej., murino), o anticuerpo monocatenario. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene función efectora y puede fijar el complemento. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una capacidad reducida o nula de unirse a un receptor Fc. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un isotipo o subtipo, fragmento u otro mutante, que no admite la unión a un receptor Fc, por ej., tiene una región de unión al receptor Fc mutagenizada o suprimida. Los métodos para fabricar anticuerpos y fragmentos de los mismos son conocidos en la técnica, véase, por ej., Harlow et. al., editors, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988); Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, (N.Y. Academic Press 1983); Howard and Kaser, *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook* (CRC Press; 1ª edición, 13 dic., 2006); Kontermann and Diibel, *Antibody Engineering Volumen 1* (Springer Protocols) (Springer; 2ª ed., 21 mayo, 2010); Lo, *Antibody Engineering: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology) (Humana Press; Nov 10, 2010); and Diibel, *Handbook of Therapeutic Antibodies: Technologies, Emerging Developments and Approved Therapeutics*, (Wiley-VCH; 1ª edición 7 septiembre, 2010). Los anticuerpos útiles en los presentes métodos incluyen los que se unen específicamente a Smoc2 (es decir, no se unen a dianas distintas de Smoc2) e inhiben la activación de fibroblastos a miofibroblastos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede acoplarse a un agente detectable o de obtención de imágenes. Dichos agentes son bien conocidos en la técnica e incluyen agentes paramagnéticos, marcadores bioluminiscentes o fluorescentes (por ej., GFP, FITC, rodamina o Rojo Texas), isótopos radiactivos y agentes colorimétricos/enzimáticos (por ej., HRP, B-galactosidasa). En una realización preferida, el anticuerpo se acopla con un agente paramagnético, por ej., una nanopartícula paramagnética, por ej., nanopartículas de óxido de hierro reticulado (CLIO); véase, por ej., US 20110046004; Josephson et al., *Bioconj. Chern.*, 10(2): 186-91 (1999).

Ácidos nucleicos inhibidores

Los ácidos nucleicos inhibidores útiles en los presentes usos y composiciones incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de ARN de interferencia (ARNi) monocatenarios o bicatenarios tales como compuestos de siRNA, bases modificadas/ácidos nucleicos bloqueados (LNAs), ácidos nucleicos peptídicos (PNAs), y otros compuestos oligoméricos u oligonucleótidos miméticos que hibridan con al menos una porción del ácido nucleico SMOC2 diana y modulan su función. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos inhibidores incluyen ARN antisentido, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden enlaces modificados, ARN de interferencia (RNAi), ARN de interferencia corto (siRNA); un ARN micro de interferencia (miRNA); un ARN temporal pequeño (stRNA); o un ARN corto en horquilla (shRNA); activación génica inducida por ARN pequeño (RNAa); ARNs activadores pequeños (saRNAs), o combinaciones de los mismos. Véase, por. ej, WO 2010040112.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos inhibidores tienen una longitud de 10 a 50, 10 a 20, 10 a 25, 13 a 50 o 13 a 30 nucleótidos. Un experto en la materia apreciará que esto incluye ácidos nucleicos inhibidores que tienen secciones complementarias de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 nucleótidos de longitud, o cualquier rango de los mismos. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos inhibidores tienen 15 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos inhibidores tienen de 12 o 13 a 20, 25 o 30 nucleótidos de longitud. Un experto en la materia apreciará que esto incluye ácidos nucleicos inhibidores que tienen porciones complementarias de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud, o cualquier rango dentro de

los mismos (porciones complementarias se refiere a aquellas porciones de los ácidos nucleicos inhibidores que son complementarias a la secuencia diana).

Los ácidos nucleicos inhibidores útiles en los presentes métodos son suficientemente complementarios al ARN diana, es decir, hibridan suficientemente bien y con suficiente especificidad, para proporcionar el efecto deseado. "Complementario" se refiere a la capacidad de emparejamiento, mediante enlace de hidrógeno, entre dos secuencias que comprenden bases naturales o no naturales o análogas de las mismas. Por ejemplo, si una base en una posición de un ácido nucleico inhibidor es capaz de formar un enlace de hidrógeno con una base en la posición correspondiente de un ARN, se considera que las bases son complementarias entre sí en esa posición. No se requiere una complementariedad del 100 %.

Se pueden utilizar métodos rutinarios para diseñar un ácido nucleico inhibidor que se una a la secuencia SMOC2 con suficiente especificidad. En algunas realizaciones, los métodos incluyen el uso de métodos bioinformáticos conocidos en la técnica para identificar regiones de estructura secundaria, por ej., una, dos o más estructuras de tallo-bucle, o pseudoknots, y seleccionar esas regiones como diana con un ácido nucleico inhibidor. Por ejemplo, se pueden utilizar métodos de "*walking de genes*" para optimizar la actividad inhibidora del ácido nucleico; por ejemplo, se puede preparar una serie de oligonucleótidos de 10-30 nucleótidos que abarquen la longitud de un ARN diana y después probar su actividad. Opcionalmente, pueden dejarse huecos, por ej. de 5-10 nucleótidos o más, entre las secuencias diana para reducir el número de oligonucleótidos sintetizados y testados. El contenido de GC se sitúa preferentemente entre el 30-60 %. Siempre que sea posible, deben evitarse las series contiguas de tres o más Gs o Cs (por ej., puede no ser posible con oligonucleótidos muy cortos (por ej., de unos 9-10 nt)).

En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico inhibidoras pueden diseñarse para dirigirse a una región específica de la secuencia de ARN. Por ejemplo, puede dirigirse a una región funcional específica, por ej., una región que comprenda un motivo de localización de ARN conocido (es decir, una región complementaria al ácido nucleico diana sobre el que actúa el ARN). Alternativamente, o además, se pueden seleccionar regiones altamente conservadas, por ej., regiones identificadas alineando secuencias de especies dispares como primates (por ej., humanos) y roedores (por ej., ratones) y buscar regiones con altos grados de identidad. El porcentaje de identidad puede determinarse de forma rutinaria utilizando herramientas básicas de búsqueda de alineación local (programas BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656), por ej., utilizando los parámetros por defecto.

Una vez que se han identificado una o más regiones, segmentos o sitios diana, por ej., dentro de una secuencia SMOC2 conocida en la técnica o contemplada en el presente documento, se eligen compuestos de ácido nucleico inhibitorios que sean suficientemente complementarios a la diana, es decir, que hibriden suficientemente bien y con suficiente especificidad (es decir, que no se unan sustancialmente a otros ARN no diana), para proporcionar el efecto deseado.

En el contexto de esta invención, hibridación significa enlace de hidrógeno, que puede ser enlace de hidrógeno Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertido, entre bases nucleosídicas o nucleotídicas complementarias. Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleobases complementarias que se emparejan mediante la formación de enlaces de hidrógeno. Complementario, tal como se usa aquí, se refiere a la capacidad de emparejamiento preciso entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en una posición determinada de un oligonucleótido es capaz de formar un enlace de hidrógeno con un nucleótido en la misma posición de una molécula de ARN, se considera entonces que el ácido nucleico inhibidor y el ARN son complementarios entre sí en esa posición. Los ácidos nucleicos inhibidores y el ARN son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí. Por tanto, "específicamente hibridable" y "complementario" son términos que se utilizan para indicar un grado suficiente de complementariedad o emparejamiento preciso de forma que se produzca una unión estable y específica entre el ácido nucleico inhibidor y el ARN diana. Por ejemplo, si una base en una posición de un ácido nucleico inhibidor es capaz de formar un enlace de hidrógeno con una base en la posición correspondiente de un ARN, se considera que las bases son complementarias entre sí en esa posición. No se requiere una complementariedad del 100 %.

Se entiende en la técnica que una secuencia de ácido nucleico complementaria no necesita ser 100 % complementaria a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Una secuencia complementaria de ácido nucleico para los fines de los presentes métodos es específicamente hibridable cuando la unión de la secuencia a la molécula de ARN diana interfiere con la función normal del ARN diana para causar una pérdida de actividad, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica de la secuencia a secuencias de ARN no diana en condiciones en las que se desea una unión específica, por ej., en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que los ensayos se realizan en condiciones adecuadas de rigurosidad. Por ejemplo, la concentración de sal estricta será ordinariamente inferior a unos 750 mM de NaCl y 75 mM de citrato trisódico, preferiblemente inferior a unos 500 mM de NaCl y 50 mM de citrato trisódico, y más preferiblemente inferior a unos 250 mM de NaCl y 25 mM de citrato trisódico. La hibridación de baja rigurosidad puede obtenerse en ausencia de un disolvente orgánico, por ej., formamida, mientras que la hibridación de

alta rigurosidad puede obtenerse en presencia de al menos un 35 % de formamida, y más preferiblemente de al menos un 50 % de formamida. Las condiciones estrictas de temperatura incluirán ordinariamente temperaturas de al menos unos 30°C, más preferentemente de al menos unos 37°C, y más preferentemente de al menos unos 42°C. La variación de los parámetros adicionales, como el tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ej., dodecilsulfato sódico (SDS), y la inclusión o exclusión de ADN portador, son bien conocidas por los expertos en la materia. Los diversos niveles de rigor se consiguen combinando estas condiciones según sea necesario. En una realización preferida, la hibridación tendrá lugar a 30°C en 750 mM de NaCl, 75 mM de citrato trisódico y 1 % de SDS. En una realización más preferida, la hibridación tendrá lugar a 37°C en 500 mM de NaCl, 50 mM de citrato trisódico, 1 % de SDS, 35 % de formamida y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado (ssDNA). En una realización más preferida, la hibridación tendrá lugar a 42°C en 250 mM de NaCl, 25 mM de citrato trisódico, 1 % de SDS, 50 % de formamida y 200 µg/ml de ssDNA. Los expertos en la materia podrán apreciar fácilmente variaciones útiles de estas condiciones.

Para la mayoría de las aplicaciones, los pasos de lavado que siguen a la hibridación también variarán en términos de rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad del lavado pueden definirse por la concentración de sal y por temperatura. Como en el caso anterior, la rigurosidad del lavado puede aumentarse disminuyendo la concentración de sal o aumentando la temperatura. Por ejemplo, la concentración de sal estricta para los pasos de lavado será preferiblemente inferior a unos 30 mM de NaCl y 3 mM de citrato trisódico, y más preferiblemente inferior a unos 15 mM de NaCl y 1,5 mM de citrato trisódico. Las condiciones de temperatura estrictas para los pasos de lavado incluirán ordinariamente una temperatura de al menos unos 25°C, más preferiblemente de al menos unos 42°C, y aún más preferiblemente de al menos unos 68°C. En una realización preferida, los pasos de lavado se producirán a 25°C en 30 mM de NaCl, 3 mM de citrato trisódico, y 0,1 % de SDS. En una realización más preferida, los pasos de lavado se producirán a 42°C en 15 mM de NaCl, 1,5 mM de citrato trisódico y 0,1 % de SDS. En una realización más preferida, los pasos de lavado ocurrirán a 68°C en 15 mM de NaCl, 1,5 mM de citrato trisódico, y 0,1 % de SDS. Los expertos en la materia podrán apreciar fácilmente otras variaciones de estas condiciones. Las técnicas de hibridación son bien conocidas por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Benton y Davis (Science 196:180, 1977); Grunstein y Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001); Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York); and Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

En general, los ácidos nucleicos inhibidores útiles en los usos aquí descritos tienen al menos un 80 % de complementariedad de secuencia con una región diana dentro del ácido nucleico diana, por ej., 90 %, 95 % o 100 % de complementariedad de secuencia con la región diana dentro de un ARN. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de las 20 nucleobases del oligonucleótido antisentido son complementarias, y por tanto hibridarían específicamente, en una región diana representaría un 90 % de complementariedad. El porcentaje de complementariedad de un ácido nucleico inhibidor con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse de forma rutinaria utilizando herramientas básicas de búsqueda de alineación local (programas BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656). Los ácidos nucleicos inhibidores que hibridan con un ARN pueden identificarse mediante la experimentación rutinaria. En general, los ácidos nucleicos inhibidores deben conservar la especificidad para su diana, es decir, no deben unirse directamente a transcritos distintos de la diana prevista ni afectar significativamente a los niveles de expresión.

Para más información sobre ácidos nucleicos inhibidores, véase US2010/0317718 (oligos antisentido); US2010/0249052 (ácido ribonucleico bicatenario (dsRNA)); US2009/0181914 y US2010/0234451 (LNA); US2007/0191294 (análogos de siRNA); US2008/0249039 (siRNA modificado); y WO2010/129746 y WO2010/040112 (ácidos nucleicos inhibidores).

Antisentido

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos inhibidores son oligonucleótidos antisentido. Los oligonucleótidos antisentido suelen estar diseñados para bloquear la expresión de una diana de ADN o ARN uniéndose a la diana y deteniendo la expresión a nivel de transcripción, traducción o empalme. Los oligonucleótidos antisentido de la presente invención son secuencias complementarias de ácido nucleico diseñadas para hibridar bajo condiciones estrictas a un ARN. Así pues, se eligen oligonucleótidos que sean suficientemente complementarios a la diana, es decir, que hibriden suficientemente bien y con suficiente especificidad, para ofrecer el efecto deseado.

siRNA/shRNA

En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que es complementaria a un ARN de SMOC2 puede ser un ARN de interferencia, incluyendo entre otros, un ARN de interferencia pequeño ("siRNA") o un ARN en horquilla pequeño ("shRNA"). Los métodos para construir ARNs de interferencia son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ARN de interferencia puede ensamblarse a partir de dos oligonucleótidos separados, donde una cadena es la cadena sentido y la otra es la cadena antisentido, donde las cadenas antisentido y sentido son autocomplementarias (es decir, cada cadena comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de la

otra cadena); es decir, como cuando la cadena antisentido y la cadena sentido forman una estructura dúplex o bicatenaria); la cadena antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana o una porción de la misma (es decir, un gen no deseado) y la cadena sentido comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una porción de la misma. Alternativamente, el ARN de interferencia se ensambla a partir de un solo oligonucleótido, en el que las regiones sentido y antisentido autocomplementarias se enlazan mediante uno o varios enlaces basados o no en ácidos nucleicos. El ARN de interferencia puede ser un polinucleótido con una estructura secundaria dúplex, dúplex asimétrica, en horquilla o en horquilla asimétrica, con regiones sentido y antisentido autocomplementarias, donde la región antisentido comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico diana separada o una porción de la misma y la región sentido tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o a una porción de la misma. El interferente puede ser un polinucleótido circular monocatenario que tiene dos o más estructuras de bucle y un tallo que comprende regiones sentido y antisentido autocomplementarias, donde la región antisentido comprende la secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana o una porción de la misma y la región sentido tiene secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una porción de la misma, y donde el polinucleótido circular puede procesarse *in vivo* o *in vitro* para generar una molécula de siRNA activa capaz de mediar en la interferencia del ARN.

En algunas realizaciones, la región codificante del ARN de interferencia codifica una molécula de ARN autocomplementaria que tiene una región sentido, una región antisentido y una región en bucle. Dicha molécula de ARN, cuando se expresa deseablemente forma una estructura en "horquilla", que aquí se denomina un "shRNA" (por sus siglas en inglés). La región de bucle suele tener entre 2 y 10 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la región de bucle tiene entre 6 y 9 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la región sentido y la región antisentido tienen entre 15 y 20 nucleótidos de longitud. Tras el procesamiento postranscripcional, el ARN en horquilla pequeño se convierte en siRNA mediante un proceso de escisión mediado por la enzima Dicer, que pertenece a la familia de las RNasas III. El siRNA es capaz entonces de inhibir la expresión de un gen con el que comparte homología. Para más detalles, véase Brummelkamp et al., *Science* 296:550-553, (2002); Lee et al., *Nature Biotechnol.*, 20, 500-505, (2002); Miyagishi y Taira, *Nature Biotechnol* 20:497-500, (2002); Paddison et al. *Genes & Dev.* 16:948-958, (2002); Paul, *Nature Biotechnol*, 20, 505-508, (2002); Sui, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(6), 5515-5520, (2002); Yu et al. *Proc NatlAcadSci USA* 99:6047- 6052, (2002).

La reacción de escisión del ARN diana guiada por los siRNAs es altamente específica de la secuencia. En general, para la inhibición se prefiere siRNA que contenga secuencias de nucleótidos idénticas a una porción del ácido nucleico diana. Sin embargo, no se requiere una identidad de secuencia del 100 % entre el siRNA y el gen diana para poner en práctica la presente invención. Así, la invención tiene la ventaja de ser capaz de tolerar las variaciones de secuencia que podrían esperarse debido a una mutación genética, polimorfismo de cepa o divergencia evolutiva. Por ejemplo, las secuencias de siRNA con inserciones, deleciones y mutaciones de un solo punto en relación con la secuencia diana también han resultado efectivas para la inhibición. Alternativamente, las secuencias de siRNA con sustituciones o inserciones análogas de nucleótidos pueden ser efectivas para la inhibición. En general, los siRNAs deben conservar la especificidad para su diana, es decir, no deben unirse directamente a transcritos distintos de la diana prevista ni afectar significativamente a los niveles de expresión.

Ribozimas

También pueden utilizarse moléculas enzimáticas de ácido nucleico trans-escindidoras; estas han demostrado ser prometedoras como agentes terapéuticos para enfermedades humanas (Usman & McSwiggen, 1995 *Ann. Rep. Med. Chern.* 30, 285-294; Christoffersen and Marr, 1995 *J. Med. Chern.* 38, 2023-2037). Las moléculas enzimáticas de ácido nucleico pueden diseñarse para escindir dianas específicas de ARN en el fondo del ARN celular. Esta escisión hace que el ARN deje de ser funcional.

En general, los ácidos nucleicos enzimáticos con actividad de escisión de ARN actúan uniéndose primero a un ARN diana. Dicha unión se produce a través de la porción de unión a la diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una porción enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Así, el ácido nucleico enzimático primero reconoce y luego se une a un ARN diana mediante el emparejamiento de bases complementarias y, una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de dicho ARN diana destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de que un ácido nucleico enzimático se haya unido y escindido a su ARN diana, se libera de ese ARN para buscar otra diana y puede unirse y escindir nuevas dianas repetidamente.

Se han usado diversos enfoques, como las estrategias de selección (evolución) *in vitro* (Orgel, 1979, *Proc. R. Soc. London*, B 205, 435) para desarrollar nuevos catalizadores de ácidos nucleicos capaces de catalizar diversas reacciones, como la escisión y ligadura de enlaces fosfodiéster y enlaces amida, (Joyce, 1989, *Gene*, 82, 83-87; Beaudry et al., 1992, *Science* 257, 635-641; Joyce, 1992, *Scientific American* 267, 90-97; Breaker et al, 1994, *TIBTECH*

12, 268; Bartel et al, 1993, Science 261 :1411-1418; Szostak, 1993, TIBS 17, 89-93; Kumar et al, 1995, FASEB J., 9, 1183; Breaker, 1996, Curr. Op. Biotech., 1, 442). El desarrollo de ribozimas con una actividad catalítica óptima contribuiría significativamente a cualquier estrategia que emplee ribozimas de escisión de ARN con el propósito de regular la expresión génica. La ribozima en cabeza de martillo, por ejemplo, funciona con una tasa catalítica (kcat) de aproximadamente 1 min^{-1} en presencia de concentraciones saturantes (10 nM) del cofactor Mg^{2+} . Se ha demostrado que una ribozima artificial de "ARN ligasa" cataliza la correspondiente reacción de automodificación con una velocidad de aproximadamente 100 min^{-1} . Además, se sabe que ciertas ribozimas en cabeza de martillo modificadas que tienen brazos de unión de sustrato hecho de ADN catalizan la escisión del ARN con velocidades de cambio múltiples que se aproximan a 100 min^{-1} .

Ácidos nucleicos inhibidores modificados

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos inhibidores utilizados en los métodos aquí descritos están modificados, por ej., comprenden uno o más enlaces o bases modificados. Entre las bases modificadas se encuentran el fosforotioato, el metilfosfonato, los ácidos nucleicos peptídicos o las moléculas de ácido nucleico bloqueado (LNA). Algunos ácidos nucleicos inhibidores están totalmente modificados, mientras que otros son quiméricos y contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una de ellas formada por al menos un nucleótido. Estos ácidos nucleicos inhibidores contienen típicamente al menos una región de nucleótidos modificados que confiere una o más propiedades beneficiosas (como, por ejemplo, una mayor resistencia a las nucleasas, una mayor absorción en las células, una mayor afinidad de unión a la diana) y una región que es un sustrato para las enzimas capaces de escindir los híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. Los ácidos nucleicos inhibidores quiméricos de la invención pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/u oligonucleótidos miméticos como se ha descrito anteriormente. Tales compuestos también se han denominado en la técnica híbridos o *gapmers*. En algunas realizaciones, el oligonucleótido es un *gapmer* (contiene un tramo central (gap) de monómeros de ADN suficientemente largo para inducir la escisión de la RNasa H, flanqueado por bloques de nucleótidos modificados LNA; véase, por ej., Stanton et al., Nucleic Acid Ther. 2012. 22: 344-359; Nowotny et al., Cell, 121:1005-1016, 2005; Kurreck, European Journal of Biochemistry 270:1628-1644, 2003; FLuiter et al., Mol Biosyst. 5(8):838-43, 2009). En algunas realizaciones, el oligonucleótido es un mezclador (incluye tramos cortos alternados de LNA y ADN; Naguibneva et al., Biomed Pharmacother. 2006 Nov; 60(9):633-8; Ørom et al., Gene. 2006 May 10; 372():137-41). Las patentes estadounidenses representativas que detallan la preparación de tales estructuras híbridas comprenden, entre otras, las patentes estadounidenses n.º 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico inhibidor comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, más preferentemente un nucleótido modificado 2'-O-alquilo, 2'-O-alquilo-O-alquilo o 2'-fluoro. En otras realizaciones preferidas, las modificaciones del ARN incluyen las modificaciones 2'-fluoro, 2'-amino y 2' O-metil en la ribosa de las pirimidinas, residuos abásicos o una base invertida en el extremo 3' del ARN. Tales modificaciones se incorporan rutinariamente a los oligonucleótidos y se ha demostrado que estos oligonucleótidos tienen una T_m más alta (es decir, una mayor afinidad de unión a la diana) que los 2'-desoxioligonucleótidos frente a una diana determinada.

Se ha demostrado que las diversas modificaciones de nucleótidos y nucleósidos hacen que el oligonucleótido al que se incorporan sea más resistente a la digestión por nucleasas que el oligodeoxinucleótido nativo; estos oligos modificados sobreviven intactos durante más tiempo que los oligonucleótidos no modificados. Ejemplos específicos de oligonucleótidos modificados incluyen aquellos que comprenden esqueletos modificados, por ejemplo, fosforotioatos, fosfotriesteres, metilfosfonatos, enlaces interazúcar de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o enlaces interazúcar heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Los más preferentes son los oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y aquellos con esqueletos de heteroátomo, en particular $\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2$, $\text{CH-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2$ (conocido como esqueleto de metileno(metilimino) o MMI), esqueletos de $\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2$ y $\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2$, donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como O-P-O-CH_2 ; esqueletos amida (véase De Mesmaeker et al. Ace. Chem. Res. 1995, 28:366-374); estructuras de esqueleto de morfolino (véase Summerton and Weller, Pat. estadounidense N.º 5.034.506); esqueleto de ácido nucleico peptídico (PNA) (donde el esqueleto fosfodiéster del oligonucleótido se sustituye por un esqueleto de poliamida, y los nucleótidos se unen directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza del esqueleto de poliamida, véase Nielsen et al., Science 1991, 254, 1497). Los enlaces que contienen fósforo incluyen, entre otros, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriesteres, aminoalquilfosfotriesteres, fosfonatos de metilo y otros alquilo que comprenden fosfonatos de 3'alquilo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que comprenden 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriesteres, y boranofosfatos con enlaces normales 3'-5', análogos de éstos con enlaces 2'-5', y aquellos con polaridad invertida donde los pares adyacentes de las unidades nucleósidas están enlazados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'; véanse las patentes estadounidenses n.º 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

Los compuestos oligoméricos basados en morfolinos se describen en Dwaine A. Braasch y David R. Corey, *Biochemistry*, 2002, 41(14), 4503-4510; Genesis, volumen 30, edición 3, 2001; Heasman, J., *Dev. Biol.*, 2002, 243, 209-214; Nasevicius et al., *Nat. Genet.*, 2000, 26, 216-220; Lacerra et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 97, 9591-9596; y patente estadounidense N.º 5.034.506, publicada el 23 de julio, 1991.

Los miméticos de oligonucleótidos de ácido nucleico ciclohexenilo se describen en Wang et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 8595-8602.

Los esqueletos de los oligonucleótidos modificados que no incluyen un átomo de fósforo tienen esqueletos formados por enlaces internucleósidos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleósidos mixtos de heteroátomos y alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos comprenden los que tienen enlaces morfolinos (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metileno formacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenoimino y metilenoimidazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen componentes mixtos N, O, S y CH₂; véanse las patentes estadounidenses n.º 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

También pueden incluirse una o más fracciones de azúcar sustituidas, por ej., una de las siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃, OCH₃, O(CH₂)_n CH₃, O(CH₂)_n NH₂ o O(CH₂)_n CH₃ donde n es de 1 a aproximadamente 10; Cl a ClO alquilo inferior, alcoxialcoxi, alquilo inferior sustituido, alquilarilo o aralquilo; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo *reporter*; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietil)] (Martin et al, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486). Otras modificaciones preferidas son 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-propoxi (2'-OCH₂CH₂CH₃) y 2'-fluoro (2'-F). También pueden realizarse modificaciones similares en otras posiciones del oligonucleótido, en particular en la posición 3' del azúcar del nucleótido terminal 3' y en la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

Los ácidos nucleicos inhibidores también pueden incluir, adicional o alternativamente, modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo denominadas en la técnica simplemente "bases"). Tal como se usan aquí, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen nucleobases que se encuentran con poca frecuencia o de forma transitoria en los ácidos nucleicos naturales, por ej., hipoxantina, 6-metiladenina, pirimidinas 5-Me, en particular 5-metilcitosina (también denominada 5-metil-2' desoxicitosina y a menudo denominada en la técnica 5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC), HMC glucosil y HMC gentobiosil, así como nucleobases sintéticas, por ej., 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-deazaguanina, N⁶ (6-aminohexil)adenina y 2,6- diaminopurina. Kornberg, A., *DNA Replication*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1980, pp75- 77; Gebeyehu, G., et al. *Nucl. Acids Res.* 1987, 15:4513). También puede incluirse una base "universal" conocida en la técnica, por ej., la inosina. Se ha demostrado que las sustituciones 5-Me-C aumentan la estabilidad dúplex del ácido nucleico en 0,6-1,2<0>C. (Sanghvi, Y. S., en Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Ratón, 1993, pp. 276-278) y actualmente son las sustituciones de base preferidas.

No es necesario que todas las posiciones de un oligonucleótido determinado estén uniformemente modificadas y, de hecho, más de una de las modificaciones mencionadas puede incorporarse en un solo oligonucleótido o incluso en un solo nucleósido dentro de un oligonucleótido.

En algunas realizaciones, tanto un azúcar como un enlace internucleósido, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótidos se sustituyen por grupos nuevos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Uno de estos compuestos oligoméricos, un oligonucleótido mimético que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación, es el ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos de PNA, el azúcar-esqueleto de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto que contiene amida, por ejemplo, un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida del esqueleto. Patentes representativas estadounidenses que detallan la preparación de compuestos de PNA comprenden, entre otras, las patentes estadounidenses n.º 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. En Nielsen et al, *Science*, 1991, 254, 1497-1500 puede encontrarse más información sobre los compuestos de PNA.

Los ácidos nucleicos inhibidores también pueden incluir una o más modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo denominadas en la técnica simplemente "bases"). Tal como se usan aquí, las nucleobases "no modificadas"

o "naturales" comprenden las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas comprenden otras nucleobases sintéticas y naturales como la 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquílicos de la adenina y la guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de la adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudo-uracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

Además, las nucleobases comprenden las divulgadas en la Patente estadounidense N.º 3.687.808, las divulgadas en 'The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering', páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed., John Wiley & Sons, 1990, las divulgadas por Englisch et al. John Wiley & Sons, las divulgadas por Englisch et al., 'Angewandte Chemie, International Edition', 1991, 30, página 613, y las divulgadas por Sanghvi, Y. S., Capítulo 15, 'Antisense Research and Applications', páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Entre ellas se incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad dúplex del ácido nucleico en 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. y Lebleu, B., eds, 'Antisense Research and Applications', CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y actualmente son las sustituciones de base preferidas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietil. Las nucleobases modificadas se describen en la patente estadounidense n.º 3.687.808, así como 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.596.091; 5.614.617; 5.750.692, y 5.681.941.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos inhibidores están químicamente enlazados a una o más fracciones o conjugados que mejoran la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Dichas fracciones incluyen, entre otras, fracciones lipídicas como una fracción de colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chern. Let., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ej., hexil-S-tritilol (Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chern. Let., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ej., dodecandiol o residuos de undecilo (Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ej., di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido acético adamantano (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), una fracción de palmitil (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), o una fracción de colesterol octadecilamina o hexilamino-carbonil-t-oxi (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937). Véanse también las patentes estadounidenses n.º 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

Estas fracciones o conjugados pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales, tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la invención incluyen intercaladores, moléculas *reporter*, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros y grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la captación, potencian la resistencia a la degradación y/o refuerzan la hibridación específica de secuencias con el ácido nucleico diana. Los grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o excreción de los compuestos de la presente invención. Los grupos de conjugados representativos se divulgan en la Solicitud Internacional de Patente N.º PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre, 1992, y en la Patente estadounidense N.º 6.287.860. Las fracciones conjugadas incluyen, entre otras, fracciones lipídicas como una fracción de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ej., hexil-5-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ej., dodecandiol o residuos de undecilo, un fosfolípido, por ej., di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido acético adamantano, una fracción de palmitil, o una fracción de colesterol octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxi. Véanse, por ej., las Patentes estadounidenses N.º 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538;

5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

Ácidos nucleicos bloqueados (LNAs)

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos inhibidores modificados utilizados en los métodos aquí descritos comprenden moléculas de ácido nucleico bloqueado (LNA), por ej., incluyendo [alfa]-L-LNAs. Los LNAs comprenden análogos de ácido ribonucleico donde el anillo de ribosa está "bloqueado" por un puente de metileno entre el 2'-oxígeno y el 4'-carbono - es decir, oligonucleótidos que contienen al menos un monómero de LNA, es decir, un nucleótido 2'-O,4'-C'-C-metileno-β-D-ribofuranosil. Las bases de LNA forman pares de bases Watson-Crick estándar, pero la configuración bloqueada aumenta la velocidad y la estabilidad de la reacción de emparejamiento de bases (Jepsen et al., *Oligonucleotides*, 14, 130-146 (2004)). Los LNAs también tienen una mayor afinidad para emparejarse con el ARN que con el ADN. Estas propiedades hacen que los LNAs sean especialmente útiles como sondas para la hibridación fluorescente in situ (FISH) y la hibridación genómica comparativa, como herramientas de *knockdown* para miRNAs y como oligonucleótidos antisentido para seleccionar ARNm u otros ARNs, por ej., los ARNs aquí descritos.

Las moléculas de LNA pueden incluir moléculas que comprenden 10-30, por ej., 12-24, por ej., 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos en cada cadena, donde una de las cadenas es sustancialmente idéntica, por ej., al menos 80 % (o más, por ej., 85 %, 90 %, 95 % o 100 %) idéntica, por ej., con 3, 2, 1 o 0 nucleótidos no coincidentes, a una región diana en el ARN. Las moléculas de LNA pueden sintetizarse químicamente utilizando los métodos conocidos en la técnica.

Las moléculas de LNA se pueden diseñar utilizando cualquier método conocido en la técnica; se conocen algunos algoritmos y están disponibles comercialmente (por ej., en Internet, por ejemplo, en exiqon.com). Véase, por ej., You et al., *Nuc. Acids. Res.* 34:e60 (2006); McTigue et al., *Biochemistry* 43:5388-405 (2004); and Levin et al., *Nuc. Acids. Res.* 34:e142 (2006). Por ejemplo, se pueden utilizar métodos de "*walking de genes*", similares a los utilizados para diseñar oligos antisentido, para optimizar la actividad inhibidora del LNA; por ejemplo, se puede preparar una serie de oligonucleótidos de 10-30 nucleótidos que abarquen la longitud de un ARN diana y después testar la actividad. Opcionalmente, pueden dejarse huecos, por ej. de 5-10 nucleótidos o más, entre LNAs para reducir el número de oligonucleótidos sintetizados y testados. El contenido de GC se sitúa preferentemente entre el 30-60 %. Las directrices generales para diseñar LNAs son conocidas en la técnica; por ejemplo, las secuencias de LNA se unirán muy estrechamente a otras secuencias de LNA, por lo que es preferible evitar la complementariedad significativa dentro de un LNA. En la medida de lo posible, deben evitarse los tramos contiguos de más de cuatro residuos de LNA (por ejemplo, puede que no sea posible con oligonucleótidos muy cortos (por ej., de unos 9-10 nt)). En algunas realizaciones, los LNAs son xilo-LNAs.

Para más información sobre los LNA, véanse las Patentes estadounidenses N.º 6.268.490; 6.734.291; 6.770.748; 6.794.499; 7.034.133; 7.053.207; 7.060.809; 7.084.125; y 7.572.582; y la publicación previa a la concesión en EE. UU N.º 20100267018; 20100261175; y 20100035968; Koshkin et al. *Tetrahedron* 54, 3607-3630 (1998); Obika et al. *Tetrahedron Lett.* 39, 5401-5404 (1998); Jepsen et al., *Oligonucleotides* 14:130-146 (2004); Kauppinen et al., *Drug Disc. Today* 2(3):287-290 (2005); and Ponting et al., *Cell* 136(4):629-641 (2009), y referencias citadas en las mismas.

Fabricación y uso de ácidos nucleicos inhibidores

Las secuencias de ácido nucleico utilizadas para poner en práctica los métodos aquí descritos, ya sean ARN, ADNc, ADN genómico, vectores, virus o híbridos de los mismos, pueden aislarse de diversas fuentes, modificarse genéticamente, amplificarse y/o expresarse/generarse de forma recombinante. Las secuencias de ácidos nucleicos recombinantes pueden aislarse individualmente o clonarse y probarse para una actividad deseada. Puede utilizarse cualquier sistema de expresión recombinante, incluyendo, por ejemplo, sistemas de expresión *in vitro*, bacterianos, fúngicos, de mamíferos, levaduras, insectos o células vegetales.

Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención pueden insertarse en vectores administrables y expresarse a partir de unidades de transcripción dentro de los vectores. Los vectores recombinantes pueden ser plásmidos de ADN o vectores virales. La generación de la construcción vectorial puede conseguirse usando cualquier técnica de ingeniería genética adecuada establecida en la técnica, incluyendo entre otras, las técnicas estándar de PCR, síntesis de oligonucleótidos, digestión con endonucleasas de restricción, ligación, transformación, purificación de plásmidos y secuenciación de ADN, por ejemplo como se describe en Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (1989)), Coffin et al. (*Retroviruses*. (1997)) and "*RNA Viruses: A Practical Approach*" (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000)). Como será evidente para un experto en la materia, se dispone de una variedad de vectores adecuados para transferir los ácidos nucleicos de la invención a las células. La selección de un vector apropiado para

administrar ácidos nucleicos y la optimización de las condiciones para la inserción del vector de expresión seleccionado en la célula, entran dentro de las competencias de un experto en la materia sin necesidad de experimentación excesiva. Los vectores virales comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene secuencias para la producción de virus recombinantes en una célula de empaquetamiento. Los vectores virales que expresan los ácidos nucleicos de la invención se pueden construir en base a esqueletos virales, incluyendo, entre otros, un retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociado, virus de la viruela o alfavirus. Los vectores recombinantes capaces de expresar los ácidos nucleicos de la invención pueden administrarse como se describe en esta especificación y persistir en las células diana (por ej., transformantes estables).

Las secuencias de ácidos nucleicos utilizadas para poner en práctica esta invención pueden sintetizarse *in vitro* mediante técnicas de síntesis química conocidas, como se describe, por ej., en Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; Patente estadounidense N.º 4.458.066.

Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención pueden estabilizarse contra la degradación nucleolítica, por ejemplo, mediante la incorporación de una modificación, por ej., una modificación de nucleótidos. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos de la invención pueden incluir un fosforotioato al menos en el primer, segundo o tercer enlace internucleotídico en el extremo 5' o 3' de la secuencia de nucleótidos. Otro ejemplo, la secuencia del ácido nucleico puede incluir un nucleótido 2'-modificado, por ej., un 2'-desoxi, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metil, 2'-O-metoxietil (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropil (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetil (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE), o 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA). En otro ejemplo, la secuencia del ácido nucleico puede incluir al menos un nucleótido modificado 2'-O-metil, y en algunas realizaciones, todos los nucleótidos incluyen una modificación 2'-O-metil. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos están "bloqueados", es decir, comprenden análogos de ácidos nucleicos en los que el anillo de ribosa está "bloqueado" por un puente de metileno que conecta el átomo 2'-O y el átomo 4'-C (véase, por ej., Kaupinnen et al., Drug Disc. Today 2(3):287-290 (2005); Koshkin et al., J. Am. Chem. Soc., 120(50): 13252-13253 (1998)). Para modificaciones adicionales, véase US 20100004320, US 20090298916, y US 20090143326.

Las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos utilizadas para poner en práctica esta invención, tales como, por ej., subclonación, sondas de marcado (por ej., marcado de cebadores aleatorios utilizando polimerasa de Klenow, traducción de Nick, amplificación), secuenciación, hibridación y similares están bien descritas en la literatura científica y de patentes, véase, por ej., Sambrook et al., *Molecular Cloning; A Laboratory Manual 3d ed.* (2001); *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds. (John Wiley & Sons, Inc., New York 2010); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); *Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation*, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

Composiciones farmacéuticas

Los usos aquí descritos pueden incluir la administración de composiciones y formulaciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos inhibidores o secuencias de ácidos nucleicos diseñadas para seleccionar el ARN de SMOC2.

En algunas realizaciones, las composiciones se formulan con un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas pueden administrarse por vía parenteral, tópica, oral o local, en la forma de aerosol o transdérmica. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de cualquier manera y pueden administrarse en distintas formas de dosificación unitarias dependiendo de la afección o enfermedad y el grado de enfermedad, la condición médica general de cada paciente, el método de administración preferido resultante y similares. Los detalles sobre las técnicas de formulación y administración de productos farmacéuticos están bien descritos en la literatura científica y de patentes; véase, por ej., *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st ed., 2005.

Los ácidos nucleicos inhibidores pueden administrarse solos o como un componente de una formulación farmacéutica (composición). Los compuestos se pueden formular para la administración, de cualquier forma conveniente para el uso en medicina humana o veterinaria. También pueden estar presentes en las composiciones agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, como lauril sulfato sódico y estearato de magnesio, así como colorantes, agentes desmoldeantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

Las formulaciones de las composiciones de la invención incluyen las adecuadas para la administración intradérmica, por inhalación, oral/nasal, tópica, parenteral, rectal y/o intravaginal. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica farmacéutica. La cantidad de principio activo (por ej., secuencias de ácido nucleico de la presente invención) que puede combinarse con un material portador para producir una única forma de dosificación variará en función del huésped que se esté tratando, el modo particular de administración, por ej., intradérmica o por inhalación. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una única forma de dosificación será generalmente

aquella cantidad del compuesto que produzca un efecto terapéutico, por ej., una respuesta humoral o de células T específica del antígeno.

Las formulaciones farmacéuticas pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica de fabricación de productos farmacéuticos. Dichos fármacos pueden contener agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes y conservantes. Una formulación puede ser una mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que sean adecuados para la fabricación. Las formulaciones pueden incluir uno o más diluyentes, emulsionantes, conservantes, tampones, excipientes, etc., y pueden presentarse en forma de líquidos, polvos, emulsiones, polvos liofilizados, aerosoles, cremas, lociones, formulaciones de liberación controlada, comprimidos, píldoras, geles, parches, implantes, etc.

Las formulaciones farmacéuticas para administración oral pueden formularse utilizando portadores farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica en las dosis apropiadas y adecuadas. Dichos portadores permiten que los productos farmacéuticos se formen en formas de dosificación unitarias como comprimidos, píldoras, polvos, grageas, cápsulas, líquidos, pastillas, geles, jarabes, pastas, suspensiones, etc., adecuadas para la ingestión por parte del paciente. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden formularse como un excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir compuestos adicionales adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o grageas. Los excipientes sólidos adecuados son rellenos de carbohidratos o proteínas, por ej., azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata u otras plantas; celulosa, como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa sódica; y gomas, incluyendo arábica y tragacanto; y proteínas, por ej., gelatina y colágeno. Pueden añadirse agentes desintegradores o solubilizantes, como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido alginico o una sal de los mismos, como el alginato sódico. Las cápsulas Push-fit pueden contener agentes activos mezclados con un relleno o aglutinantes como lactosa o almidones, lubricantes como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los agentes activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes.

Las suspensiones acuosas pueden contener un agente activo (por ej., secuencias de ácido nucleico de la invención) en forma de mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas, por ej., para inyecciones intradérmicas acuosas. Dichos excipientes incluyen un agente de suspensión, como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia, y agentes dispersantes o humectantes como un fosfátido natural (por ej., lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso (p. ej., estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (p. ej., oxiacetanol de heptadecaetileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol (p. ej., monooleato de sorbitol polioxietileno), o un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol anhídrido (por ej., monooleato de sorbitán polioxietileno). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes, como etilo o n-propilo, p-hidroxibenzoato, uno o más colorantes, uno o más aromatizantes y uno o más edulcorantes, como sacarosa, aspartamo o sacarina. Las formulaciones pueden ajustarse a efectos de osmolaridad.

En algunas realizaciones, se utilizan productos farmacéuticos con base de aceite para la administración de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención. Las suspensiones con base de aceite pueden formularse suspendiendo un agente activo en un aceite vegetal, como aceite de arachis, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral como parafina líquida; o una mezcla de estos. Véase, por ej., la Patente estadounidense N.º 5.716.928, que describe el uso de aceites esenciales o componentes de aceites esenciales para aumentar la biodisponibilidad y reducir la variabilidad interindividual e intraindividual de compuestos farmacéuticos hidrófobos de administración oral (véase también la Patente estadounidense N.º 5.858.401). Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, como cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes edulcorantes para proporcionar una preparación oral más apetecible, como glicerol, sorbitol o sacarosa. Estas formulaciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante, como el ácido ascórbico. Como ejemplo de vehículo oleoso inyectable, véase Minto (1997) J. Pharmacol. Exp. Ther. 281:93-102.

Las formulaciones farmacéuticas también pueden presentarse en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral, como los descritos antes, o una mezcla de los mismos. Entre los agentes emulsionantes adecuados se incluyen gomas naturales, como la goma acacia y la goma tragacanto, fosfátidos naturales, como la lecitina de soja, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, como el monooleato de sorbitán, y productos de condensación de estos ésteres parciales con óxido de etileno, como el monooleato de sorbitán polioxietileno. La emulsión también puede contener agentes edulcorantes y aromatizantes, como en la formulación de jarabes y elixires. Tales formulaciones también pueden contener un demulcente, un conservante o un colorante. En realizaciones alternativas, estas emulsiones inyectables de aceite en agua de la invención comprenden un aceite de parafina, un monooleato de sorbitán, un monooleato de sorbitán etoxilado y/o un trioleato de sorbitán etoxilado.

Los compuestos farmacéuticos también pueden administrarse por vía intranasal, intraocular e intravaginal, incluyendo supositorios, insuflaciones, polvos y formulaciones en aerosol (para ejemplos de inhaladores esteroideos, véase, por ej., Rohatagi (1995) J. Clin. Pharmacol. 35:1187-1193; Tjwa (1995) Ann. Allergy Asthma Immunol. 75:107- 111). Las fórmulas de supositorios pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperaturas normales pero líquido a temperaturas corporales y que, por tanto, se funda en el cuerpo para liberar el fármaco. Tales materiales son la manteca de cacao y los polietilenglicoles.

En algunas realizaciones, los compuestos farmacéuticos pueden administrarse por vía transdérmica, por vía tópica, formulados como bastoncillos aplicadores, soluciones, suspensiones, emulsiones, geles, cremas, pomadas, pastas, jaleas, tinturas, polvos y aerosoles.

En algunas realizaciones, los compuestos farmacéuticos también pueden administrarse como microesferas de liberación lenta en el organismo. Por ejemplo, las microesferas pueden administrarse mediante inyección intradérmica del fármaco que se libera lentamente por vía subcutánea; véase Rao (1995) J. Biomater Sci. Polym. Ed. 7:623-645; como formulaciones de gel biodegradables e inyectables, véase, por ej., Gao (1995) Pharm. Res. 12:857-863 (1995); o, como microesferas para la administración oral, véase, por ej., Eyles (1997) J. Pharm. Pharmacol. 49:669-674.

En algunas realizaciones, los compuestos farmacéuticos pueden administrarse por vía parenteral, ya sea por administración intravenosa (IV) o administración en una cavidad corporal o lumen de un órgano. Estas formulaciones pueden comprender una solución del agente activo disuelto en un portador farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse son el agua y la solución de Ringer, un cloruro sódico isotónico. Además, pueden emplearse aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para ello, puede emplearse cualquier aceite no volátil suave, incluyendo los mono o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables también pueden utilizarse ácidos grasos como el ácido oleico. Estas soluciones son estériles y generalmente están libres de materias indeseables. Estas formulaciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales y conocidas. Las formulaciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, como agentes de ajuste del pH y tamponadores, agentes de ajuste de la toxicidad, por ej., acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato sódico y similares. La concentración de agente activo en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente en función de los volúmenes de fluidos, viscosidades, peso corporal y similares, de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado y las necesidades del paciente. Para la administración intravenosa, la formulación puede ser una preparación inyectable estéril, como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión puede formularse utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una suspensión en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable parenteralmente, como una solución de 1,3- butanodiol. La administración también se puede hacer mediante bolo o infusión continua (por ej., introducción prácticamente ininterrumpida en un vaso sanguíneo durante un periodo de tiempo determinado).

En algunas realizaciones, los compuestos farmacéuticos y las formulaciones pueden liofilizarse. Las formulaciones liofilizadas estables que comprenden un ácido nucleico inhibidor pueden elaborarse liofilizando una solución que consta de un producto farmacéutico de la invención y un agente de carga, por ej., manitol, trehalosa, rafinosa y sacarosa o mezclas de los mismos. Un proceso para preparar una formulación liofilizada estable puede incluir liofilizar una solución de aprox. 2,5 mg/mL de proteína, aprox. 15 mg/mL de sacarosa, aprox. 19 mg/mL de NaCl, y un tampón de citrato sódico con un pH superior a 5,5 pero inferior a 6,5. Véase, por ej., U.S. 20040028670.

Las composiciones y formulaciones pueden administrarse mediante el uso de liposomas. Usando liposomas, en particular cuando la superficie de los liposomas porta ligandos específicos para las células diana, o se dirigen preferentemente a un órgano específico, se puede concentrar la administración del agente activo en las células diana *in vivo*. Véase, por ej., las Patentes estadounidenses N.º 6.063.400; 6.007.839; Al-Muhammed (1996) J. Microencapsul. 13:293-306; Chonn (1995) Curr. Opin. Biotechnol. 6:698-708; Ostro (1989) Am. J. Hosp. Pharm. 46:1576-1587. Tal como se usa en la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta de lípidos anfifílicos dispuestos en una bicapa o bicapas. Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada de un material lipofílico y un interior acuoso que contiene la composición a administrar. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que se cree que interactúan con moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. Se cree que los liposomas sensibles al pH o cargados negativamente atrapan el ADN en lugar de formar un complejo con él. Se han utilizado liposomas catiónicos y no catiónicos para administrar ADN a las células.

Los liposomas también pueden incluir liposomas "estabilizados estéricamente", es decir, liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados. Cuando se incorporan a los liposomas, estos lípidos especializados dan lugar a liposomas con tiempos de vida en circulación mejorados en relación con los liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente son aquellos en los que parte de la porción lipídica formadora de vesículas del liposoma comprende uno o más glicolípidos o está derivatizada con uno o más polímeros

hidrófilos, como una fracción de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen con más detalle en la Patente estadounidense N.º 6.287.860.

Las formulaciones de la invención pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En algunas realizaciones, para aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un sujeto que necesita reducir los niveles de triglicéridos, o que está en riesgo de padecer o padece un trastorno aquí descrito, en una cantidad suficiente para curar, aliviar o detener parcialmente las manifestaciones clínicas del trastorno o sus complicaciones; esto se puede denominar una cantidad terapéuticamente eficaz. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran en una cantidad suficiente para reducir los niveles séricos de triglicéridos en el sujeto.

La cantidad de composición farmacéutica adecuada para lograr esto es una dosis terapéuticamente eficaz. La pauta de dosificación y las cantidades efectivas para este uso, es decir, el régimen de dosificación, dependerán de diversos factores, como la fase de la enfermedad o afección, la gravedad de la enfermedad o afección, el estado general de salud del paciente, el estado físico del paciente, la edad y otros factores similares. Al calcular el régimen de dosificación para un paciente, también se tiene en cuenta el modo de administración.

El régimen de dosificación también tiene en cuenta parámetros farmacocinéticos conocidos en la técnica, es decir, la tasa de absorción, biodisponibilidad, metabolismo, aclaramiento y similares de los agentes activos (véase, por ej., Hidalgo-Aragones (1996) *J. Steroid Mol. Biol.* 58:611-617; Groning (1996) *Pharmazie* 51:337-341; Fotherby (1996) *Contraception* 54:59-69; Johnson (1995) *J. Pharm. Sci.* 84:1144-1146; Rohatagi (1995) *Pharmazie* 50:610-613; Brophy (1983) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24:103-108; *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª ed., 2005). El estado de la técnica permite al clínico determinar el régimen de dosificación para cada paciente individual, agente activo y enfermedad o afección tratada. Las directrices proporcionadas para composiciones similares utilizadas como productos farmacéuticos pueden utilizarse como guía para determinar el régimen de dosificación, es decir, la pauta de dosis y los niveles de dosificación, administrados practicando los métodos de la invención que sean correctos y apropiados.

Pueden administrarse una o varias formulaciones dependiendo, por ejemplo, de la dosis y la frecuencia requeridas y toleradas por el paciente, el grado y la cantidad del efecto terapéutico generado después de cada administración (por ej., efecto sobre el tamaño o el crecimiento del tumor), y similares. Las formulaciones deben proporcionar una cantidad suficiente de agente activo para tratar, prevenir o mejorar eficazmente afecciones, enfermedades o síntomas.

En realizaciones alternativas, las formulaciones farmacéuticas para la administración oral se sitúan en una cantidad diaria de entre 1 y 100 o más mg por kilogramo de peso corporal al día. A diferencia de la administración oral, pueden utilizarse dosis más bajas en el torrente sanguíneo, en una cavidad corporal o en el lumen de un órgano. Pueden utilizarse dosis sustancialmente más altas en la administración tópica u oral o al administrar en forma de polvos, aerosoles o inhalación. Los métodos reales para preparar formulaciones administrables por vía parenteral o no parenteral serán conocidos o evidentes para los expertos en la materia y se describen con más detalle en publicaciones como *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª ed., 2005.

Diversos estudios han notificado el éxito de la dosificación en mamíferos utilizando secuencias complementarias de ácidos nucleicos. Véase, por ejemplo, Esau C., et al., (2006) *Cell Metabolism*, 3(2):87-98; Kriitzfeldt J., et al., (2005) *Nature* 438, 685-689; Elmen J., et al., (2008) *Nature* 452, 896-899.

Tratamientos combinados

Los usos aquí descritos pueden incluir el uso de tratamientos estándar además del inhibidor de SMOC2. Los tratamientos para la fibrosis renal y/o la enfermedad renal crónica son conocidos en la técnica e incluyen, a modo de ejemplo entre otros, la diálisis; el trasplante; una dieta baja en proteínas; un inhibidor de ACE (por ej. perindopril, captopril, enalapril, lisinopril, o ramipril); un bloqueante de los receptores de la angiotensina II (ARB) (por ej., Losartán, irbesartán, olmesartán, candesartán, valsartán, fimasartán o telmisartán); control de lípidos (por ej., estatinas); suplementos de vitamina D; control del fósforo; control de la anemia (por ej., agentes estimulantes eritroides); prevención de la acidosis (por ej., bicarbonato sódico); y control del ácido úrico (por ej., alopurinol).

EJEMPLOS

La invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Métodos

En los siguientes ejemplos se utilizaron los siguientes materiales y métodos.

Estudios en humanos

El Consejo de Revisión Institucional aprobó los protocolos de reclutamiento y recogida de muestras de orina, que se realizó con el consentimiento informado por escrito de los participantes. Se obtuvieron muestras de orina de pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) en la clínica ambulatoria de nefrología del Brigham and Women's Hospital (BWH). Para este estudio se incluyeron pacientes con ERC en fase 4 o 5 (tasa de filtración glomerular estimada [TFGe] < 30 ml/min/1,73m²). Se excluyó a los pacientes que habían sido hospitalizados recientemente o habían sufrido un episodio de AKI (aumento de la creatinina sérica > 50 % en un periodo de una semana) en los últimos 3 meses, o que habían notificado o sospechado una infección del tracto urinario en las últimas 3 semanas. Se obtuvieron muestras de orina de voluntarios sanos del Proyecto PhenoGenetics, un estudio del impacto de la variación genética en individuos sanos. Se reclutó a participantes de entre 19 y 75 años del área de Boston mediante anuncios en medios de comunicación locales y folletos. El criterio de inclusión era la voluntad de proporcionar 120 ml de sangre cuatro veces al año durante cinco años. Los criterios de exclusión fueron la presencia de enfermedades inflamatorias autodeclaradas (por ej., asma o psoriasis), enfermedades autoinmunes (por ej., lupus o esclerosis múltiple), enfermedades metabólicas crónicas (por ej., enfermedad tiroidea o diabetes) o infecciones crónicas (por ej., hepatitis B o C; VIH). Se recogió la orina, se centrifugó a 3200G durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante, que se almacenó a -80°C en las 4 horas siguientes a su recogida. Las muestras de tejido renal humano desidentificado de pacientes con o sin fibrosis renal grave (n=10) se obtuvieron del Departamento de Patología del Brigham and Women's Hospital.

Estudios en animales

Modelos genéticos de ratón: Los ratones transgénicos con sobreexpresión de SMOC2 (Tg (Smoc2-EGFP)HY194Gsat/Mmucd) (SMOC2 Tg) fueron adquiridos por la Universidad de California, y generados utilizando un BAC modificado, conteniendo un ascendente de EGFP insertado del gen SMOC2 diana, que se inyectó en pronúcleos de ovocitos fertilizados FVB/N. La progenie hemigigética se apareó con ratones lcrTac:ICR en cada generación posterior. *Smoc2^{tm1.1} (KOMP)vlcg* fue generado por el Programa Knockout Mouse Phenotyping (KOMP²) en The Jackson Laboratory utilizando células madre embrionarias proporcionadas por el International Knockout Mouse Consortium. El casete Velocigene ZEN-UB1 se insertó en el gen sustituyendo todos los exones codificantes y las secuencias intervinientes. El constructo se introdujo en células madre embrionarias (ES) VGB6 C57BL/6N-derivadas, y las células ES correctamente seleccionadas se inyectaron en blastocitos B6 (Cg)-Tyrc-2J/J (Stock n.º 58). Los machos quiméricos resultantes se cruzaron con hembras C57BL/6J y luego con B6N.Cg-Tg (Sox2-cre)lAmc/J (Stock n.º 014094) para eliminar el neocasete. La descendencia resultante se cruzó para eliminar el transgén de expresión cre. El genotipado se realizó utilizando los cebadores apropiados (Tabla 1). Los modelos genéticos de ratón se compararon con sus respectivos compañeros de camada de tipo salvaje. Todos los ratones C57BL/6J utilizados en los experimentos se adquirieron en Charles River Laboratories. Todos los protocolos de mantenimiento y tratamiento de los animales se ajustaron a la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio adoptada y promulgada por los Institutos Nacionales de Salud y fueron aprobados por los Comités de Cuidado y Uso de Animales de la Harvard Medical School.

Tabla 1 Lista de cebadores utilizados para el genotipado

Gen	F/R	Secuencia	SEQ ID NO:
Tipo salvaje	F	TCC TTC TCC AGC ACC AAG TC	1
	R	TGA TCC AAA AGT GCC TCC TC	2
KO	F	CGG TCG CTA CCA TTA CCA GT	3
	R	CAT GCT CTG AGA AAT Chol TAC CAA	4
Transgénico	F	TGA CAG Chol CAG CGG CAG TT	5
	R	TAG CGG CTG AAG CAC TGC A	6

Modelos experimentales de fibrosis: Se utilizaron los modelos de ratón de fibrosis renal descritos previamente en detalle por nuestro grupo (29). Se describen brevemente los siguientes modelos:

Modelo de ácido fólico (AF). En las mismas condiciones de alojamiento/dieta, los ratones machos SMOC2 Tg con su cepa de control coincidente (FVB/N e lcrTacTCR) (25-29 g), los ratones machos SMOC2 KO con su cepa de control coincidente (C57BL/6) (21-24 g), y los ratones machos BALB/c (25-29 g) de 8 a 12 semanas de edad recibieron una única inyección intraperitoneal (ip) de 250 mg/kg de AF disuelto en 0,3 M de una solución de bicarbonato sódico (29). Los ratones fueron sometidos a eutanasia a los 7 y 14 días tras la administración. La eutanasia se realizó bajo anestesia de isoflurano.

Modelo de obstrucción unilateral del uréter (UUO). Se anestesiaron ratones hembra SMOC2 Tg con su cepa control coincidente (FVB/N e lcrTacTCR) (25-29 g), y ratones macho BALB/c (25-29 g) de 8 a 12 semanas de edad (50 mg/kg

con pentobarbital sódico, ip), y se expuso su riñón izquierdo mediante incisión en el flanco. El uréter se ligó en 2 puntos proximales al riñón con suturas 6-0. A los ratones simulados se les expuso el riñón pero no se les ligó el uréter. Se aisló tejido del riñón contralateral (CoK) de los ratones SMOC2 Tg y tipo salvaje tras el tratamiento de OUU 14 días después. Los ratones recibieron dosis de reposición de líquidos (1 mL de solución salina normal, calentada a 37°C, por vía subcutánea) inmediatamente después de la cirugía. Los animales fueron sacrificados a los 7 y 14 días tras la cirugía. La eutanasia se realizó bajo anestesia de isoflurano.

Administración de siRNA. Ratones macho C57BL/6 (21-24 g) de 8 semanas recibieron siRNA de SMOC2 (30 µg/200 µL) o siRNA aleatorizado de control (30 µg/200 µL) en medio portador de solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin RNase mediante inyección intravenosa a las -4h, +2d, +4d y +6d del tratamiento con ácido fólico/vehículo.

Patología e inmunotinciones

Patología de cuerpo completo: Se realizó la necropsia completa de ratones machos y hembras (n=6/cada uno) de los 4 grupos (SMOC2-KO, SMOC2-Tg, y sus respectivos controles de camada) para investigar las diferencias patológicas entre los grupos. Los órganos se fijaron con formalina, se deshidrataron en EtOH al 70 %, se incluyeron en parafina y se tiñeron con H&E. El departamento de patología del Dana-Farber/Harvard Cancer Center, dirigido por el Dr. Peter Howley, proporcionó un informe certificado detallado para el análisis histológico de todos los órganos.

Histología y tinciones: Para la evaluación histológica, los tejidos renales se perfundieron con PBS frío antes de la recolección. Las muestras para inmunofluorescencia se fijaron en paraformaldehído al 4 % a 4°C durante 24 horas, después se lavaron en solución de sacarosa al 30 % durante la noche antes de la crioconservación en Tissue-Tek O.C.T. (VWR, Radnor, PA). Las muestras para la tinción histológica se fijaron en formol durante 24 horas y luego se almacenaron en etanol al 70 % antes de embeberlas en parafina. Las muestras de riñón humano se recibieron embebidas en parafina. Los tejidos embebidos en parafina se cortaron en secciones de 4 a 6 µm y se tiñeron con tricrómico de Masson y rojo Picrosirius. Las imágenes se capturaron en un Carl Zeiss AxioImager.M2 utilizando el software AxioVision SE64 con el objetivo Plan Apochromat 20X/0.8. Todas las imágenes se analizaron mediante NIH ImageJ utilizando un algoritmo de umbral de color (ajustes de umbral idénticos para los conjuntos de imágenes comparados) escrito por G. Landini (versión v1.8) disponible en denti.stij.bham.ac.uk/landinig/software/software.html.

Inmunofluorescencia y microscopía cuantitativa: Los riñones de ratón embebidos en OCT y los riñones humanos embebidos en parafina se cortaron en secciones de 4 a 6 µm y se permeabilizaron en IX PBS con Triton X-100 (0,1 %) durante 10 minutos. A continuación, las secciones se marcaron con Cy3-αSMA (1:500; Cell Signaling, C6198), αSMA-FITC (1:500; Sigma-Aldrich, F3777) y anti-SMOC2 (1/250; Santa Cruz Biotechnology, SC-67396). Los portaobjetos con anti-SMOC2 se expusieron posteriormente a anticuerpos secundarios conjugados Cy3 específicos Donkey Anti-Rabbit (burro anticonejo) (1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, 711-165-152). Se utilizó 4,6-diamidino-2-fenilindol (Sigma Aldrich) para la tinción nuclear (azul). Las imágenes confocales se obtuvieron en el Nikon Imaging Center de la Harvard Medical School. Las imágenes se obtuvieron con un confocal de disco giratorio Yokogawa CSU-X1 con modificación Borealis, montado en un microscopio invertido Nikon Ti equipado con lentes objetivo 20X/0,75 Plan Apo, 40x/1,3 Plan Fluor, 60x/1,4 Plan Apo, una platina motorizada Prior Proscan II y el sistema Nikon Perfect Focus para el mantenimiento continuo del enfoque. La fluorescencia FITC se excitó con un láser de estado sólido de 488 nm AOTF controlado y se recogió con un filtro de emisión de 525/50 (Chroma). La fluorescencia Cy3 se excitó con un láser de estado sólido de 561 nm AOTF controlado y se recogió con un filtro de emisión de 620/60 (Chroma). Tanto para FITC como para Cy3 se utilizó un espejo dicróico Quad 405/491/561/642 (Semrock). El DAPI se excitó utilizando un Lumencor SOLA con un filtro de excitación 395/25, y la emisión se recogió a través del cabezal del disco giratorio utilizando un filtro de emisión 460/25. Las imágenes se adquirieron con una cámara CCD refrigerada Hamamatsu ORCAAG controlada con el software MetaMorph 7. El brillo y el contraste se ajustaron en las imágenes mostradas (de forma idéntica para los conjuntos de imágenes comparadas) y se cuantificaron (ajustes de umbral idénticos para los conjuntos de imágenes comparadas) utilizando el software MetaMorph 7.

Análisis Western Blot

Los tejidos renales y los cultivos celulares se homogeneizaron en tampón RIPA (ThermoFisher Scientific, 50 mM Tris-HCl [pH 7,4], 150 mM NaCl, 1 % NP40) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa IX (Roche Applied Science). Las concentraciones de proteínas se determinaron utilizando el kit de estimación de proteínas BCA (Pierce) y se cargó una cantidad igual de proteínas (25 µg) en un gel de poliacrilamida al 10 % o al 12 % (PAGE). La transferencia de proteínas se realizó utilizando una membrana de nitrocelulosa. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios para detectar la proteína específica: anti-SMOC2 (1/250; Santa Cruz Biotechnology, SC-67396), anti-αSMA (1/1000; Sigma-Aldrich, A2547), anti-Colágeno 1α1 (1:250; Novus, NB600-408), anti-fibronectina (1:250; Abcam, ab23750), anti-GAPDH (1/5000; Abcam, ab181602), anti-fosfo-miosina cadena ligera 2 (Thr18/Ser19) (1/1000; Señalización celular n.º 3674), anti-fosfo-paxilina (Tyr118) (1/1000; Señalización celular n.º 2541), anti-fosfo-FAK (Tyr925) (1/1000; Señalización celular n.º 3284). Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano contra ratón (Señalización celular n.º 7076) y conejo (Señalización celular n.º 7074) para detectar el anticuerpo

primario apropiado. Las bandas se detectaron con el método de quimioluminiscencia mejorada (ECL) (Pierce) y se capturaron con el sistema Gel Doc™ XR+ (BioRad).

PCR cuantitativa en tiempo real

El ARN total se aisló de cultivos celulares o muestras de tejido utilizando TRIzol (Invitrogen, Grand Island, NY) según el protocolo del fabricante. La concentración de ARN se midió con un espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE). El ARN aislado (1ug) se transcribió inversamente en ADNc utilizando un kit de transcripción inversa QuantiTect de Qiagen (Valencia, CA). La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando un kit QuantiFast SYBR Green PCR (Qiagen) en un QuantStudio7 (Applied Biosystems by Life Technologies) con el siguiente perfil térmico: activación 15 s a 95°C; 40 ciclos de hibridación/elongación 15 s a 94°C, 30 s a 60°C; extensión 30 s a 72°C. Todas las muestras se midieron con duplicados técnicos y se normalizaron frente a GAPDH. Los cambios en la expresión del ARNm se calcularon mediante el método $\Delta\Delta C_t$ en relación con un control. Las secuencias de los cebadores directos e inversos para genes específicos de ratón se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 2 Lista de cebadores utilizados para la qRT-PCR

Gen	F/R	Secuencia	SEQ ID NO:
α SMA	F	GTC CCA GAC ATC AGG GAG TAA	7
	R	TCG GAT ACT TCA GCG TCA GGA	8
Fibronectina	F	ATG TGG ACC CCT CCT GAT AGT	9
	R	GCC CAG TGA I I I CAG CAA AGG	10
Smoc2	F	CCG TAC AAG AAC TGA TGG GC	11
	R	CTT TCA GCA TGA CCT CTG GG	12
Col1a1	F	TGA CTG GAA GAG CGG AGA GT	13
	R	GTT CGG GCT GAT GTA CCA GT	14
GAPDH	F	ATT GCC CTC AAC GAC CAC I I I G	15
	R	TCT CTC TTC CTC TTG TGC TCT TGC	16

Secuenciación de ARN

Preparación de la biblioteca: Se comprobó la calidad y cantidad de las muestras de ARN (n=3-4 ratones/punto temporal/grupo) utilizando nanodrop y el instrumento Agilent Bioanalyzer. Todas las muestras de ARN tenían números RIN superiores a 7. Las bibliotecas se prepararon utilizando un kit TruSeq Stranded mRNA Library Prep (Illumina) siguiendo el protocolo del fabricante modificado como sigue: Para cada muestra se introdujeron 330 ng de ARN con 6,67 ul de 1:1000 ERCC spike-in Mix 2 (Ambion), se realizó la fragmentación durante 8 minutos y se utilizaron 13 ciclos de PCR para la amplificación de la biblioteca final. Las bibliotecas de dsADN acabadas se cuantificaron mediante fluorómetro Qubit, Agilent TapeStation 2200 y RT- qPCR utilizando el kit de cuantificación de bibliotecas de Kapa Biosystems de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las bibliotecas indexadas de forma única se agruparon en proporciones equimolares y se secuenciaron en un único ciclo Illumina NextSeq500 con lecturas de 75 pb en extremo único en las instalaciones centrales de biología molecular del Instituto del Cáncer Dana-Farber. Se utilizó el alineador STAR para mapear las lecturas secuenciadas con el ensamblaje del genoma de mm9 y cuantificar la expresión a nivel génico. El conjunto de datos completo está disponible en la base de datos NCBI GEO con el número de acceso GSE85209.

Análisis bioinformático: Todas las muestras se procesaron utilizando una línea de secuencias de ARN implementada en el proyecto bcbio-nextgen (<https://bcbio-nextgen.readthedocs.org/en/latest/>). Las lecturas en bruto se examinaron para detectar problemas de calidad mediante FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) a fin de garantizar que la generación de bibliotecas y la secuenciación fueran adecuadas para el análisis posterior. Las secuencias adaptadoras, otras secuencias contaminantes como las colas de poliA y las secuencias de baja calidad con puntuaciones de calidad PHRED inferiores a cinco se recortaron de las lecturas utilizando cutadapt (30). Las lecturas recortadas se alinearon con la compilación UCSC 10 del genoma de Mus musculus (mm 10), aumentada con información de transcripción de la versión GRCm38 de Ensembl utilizando el alineador STAR (31). Las alineaciones se comprobaron en cuanto a uniformidad de cobertura, contenido de ARNr, contexto genómico de las alineaciones (por ejemplo, alineaciones en transcritos e intrones conocidos), complejidad y otras comprobaciones de calidad mediante una combinación de FastQC, Qualimap (32) y scripts personalizados. Los recuentos de las lecturas alineadas con

genes conocidos se generaron mediante featureCounts (33). La expresión diferencial a nivel de genes se determinó con DESeq2 (34). DESeq2 se utilizó para encontrar cómo reaccionaban los dos genotipos de forma diferente al tratamiento utilizando la prueba de significación de Wald y la fórmula diseñada para encontrar la "diferencia en diferencias", o el término de intersección entre genotipo y tratamiento en esta fórmula de diseño DESeq2: genotipo+Tratamiento+genotipo:Tratamiento. Como resultado de este enfoque, los valores de la relación de cambio en la expresión genética describen el efecto diferencial del genotipo sobre los cambios de expresión tras el tratamiento, y no la expresión genética directa que se observaría directamente entre dos clases de muestras. El análisis PCA se realizó sobre lecturas DESeq2 estabilizadas de varianza rlog normalizada. Se realizó un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) sin cortes para los términos de ontología génica (OG) y KEGG sobre los valores de la relación de cambio en la expresión genética derivados de DESeq2 utilizando GAGE (35) y se visualizaron con mapas de árbol REVIGO (36). Los patrones de expresión de los genes dentro de los términos de la ontología génica (OG) enriquecidos se visualizaron mediante un mapa de calor, tras centrar y escalar los valores de expresión de cada genotipo a sus respectivos valores de expresión media de las muestras no tratadas (es decir, el valor de expresión de cada muestra se restó del valor de expresión medio de las muestras no tratadas del genotipo de la muestra y se dividió por la desviación estándar asociada de la media).

Cultivo celular, reactivos y ensayos *in vitro*

Cultivo celular *in vitro*: Las células NIH3T3 se adquirieron a ATCC y se cultivaron como monocapa en placas de cultivo de poliestireno que contenían medio Eagle modificado de Dulbecco: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) (Invitrogen Corporation) suplementado con un 10 % de FBS (Invitrogen Corporation). Las células se cultivaron hasta una confluencia del 80 % antes del paso. Las HPTEC se adquirieron a Biopredic (París, Francia) y se cultivaron en DMEM/F12 suplementado con hidrocortisona, EGF, insulina, transferrina y selenito sódico. Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada con un 5 % de CO₂. Para los experimentos de estudio de la transición de fibroblastos a miofibroblastos (37), los fibroblastos se cultivaron en DMEM/F12 10% de FBS a baja densidad durante 24 horas y, después, cuando alcanzaron una confluencia del 40-50 %, se cambiaron los medios a DMEM/F12 1 % de FBS durante 4 horas antes de los tratamientos con SMOC2 (Preprotech) y/o TGFβ1 (Preprotech). Las líneas celulares no figuraban en la base de datos ICLAC de líneas celulares comúnmente identificadas incorrectamente.

Transfecciones: Para los experimentos de *knockdown* de SMOC2, los fibroblastos NIH3T3 se transfectaron con 100 nM de siRNA de SMOC2 o aleatorizado (Dharmacon, Lafayette, CO) con el reactivo de transfección siPORT NeoFX (Life Technologies, Grand Island, NY) siguiendo el protocolo del fabricante. Tras 24 horas en DMEM/F12 al 10 % de FBS, las células se recolectaron para el análisis Western blot o se trataron con tripsina y se volvieron a sembrar a una confluencia del 40 % en casos de estimulación de TGFβ1. Para la sobreexpresión de SMOC2, las células NIH3T3 se transfectaron con plásmidos pCMV Myc (pCMV) o SMOC2 (Myc-DDK-tagged)-Human SPARC (pCMV-SMOC2) (Origene Technologies, Rockville, MD) con Lipofectamina 2000 (Life Technologies, Grand Island, NY) siguiendo el protocolo del fabricante. Tras 24 horas en DMEM/F12 al 10 % de FBS, las células se recolectaron para el análisis Western blot y RT-PCR o se trataron con tripsina y se volvieron a sembrar en una confluencia del 40 % para diversos ensayos.

Immunofluorescencia: Las células NIH3T3 se fijaron con paraformaldehído al 4 % (Fisher) en PBS, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% (Fisher) en PBS, después se bloquearon en albúmina de suero bovino al 3 % (Sigma). La F-actina citoesquelética se visualizó utilizando Rhodamine Phalloidin (Thermo) conjugada 564 Alexa Fluor a 1:500 en PBS durante 1 h. Para la tinción nuclear (azul) se utilizó 4,6-diamidino-2-fenilindol (Sigma-Aldrich). Las imágenes confocales se obtuvieron en el Nikon Imaging Center de la Harvard Medical School, tal como se ha descrito anteriormente.

Ensayo de regeneración celular: Los fibroblastos se cultivaron hasta formar una monocapa semiconfluyente y, a continuación, en DMEM/F12 1 % de FBS, se sometieron a un ensayo de regeneración celular (provocando una herida) utilizando una punta de pipeta estándar de 200μL. Las células en suspensión se lavaron con DMEM/F12 al 1 % de FBS. A lo largo de la herida, se seleccionaron puntos prefijados para obtener fotografías representativas a las 0 h y 24 h tras la inicialización de la herida utilizando un microscopio de contraste de fases. El cierre de la herida se calculó mediante el porcentaje de la nueva área cubierta por fibroblastos tratados con SMOC2 con respecto a la normalidad durante 24 h (n=5, 3 imágenes por muestra). La distancia migrada de las células no tratadas se tomó como 100 %. Las imágenes representativas se tiñeron con azul de metileno a las 24 horas para aumentar el contraste.

Ensayo MTT: Se sembraron siete mil quinientas células NIH3T3 en una placa de 96 pocillos durante 24 h, tras lo cual se privaron de suero en DMEM/F12 al 0,5 % de FBS. Posteriormente, los fibroblastos se trataron con diferentes concentraciones de SMOC2 durante 24, 48, 72 y 96 h en FBS al 0,2 %. A cada muestra se le añadió 1 mg/ml de MTT 2 h antes de cada punto temporal. Se aspiró el medio y se añadieron 100 ml de isopropanol. La absorbancia se midió a 570 nm tomando como referencia 630 nm utilizando SpectraMax Paradigm (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La absorbancia obtenida de las células no tratadas se tomó como el 100 % (n=5 por concentración por punto temporal).

Ensayo de la cámara de Boyden: Se añadieron medios libres de suero en presencia y ausencia de tratamientos en la cámara inferior de una placa Chemotaxis Cell Migration Assay de 96 pocillos (8 µm) (Millipore). Las células NIH3T3 se cultivaron en FBS al 10 % durante 24 h antes de ser sembradas en FBS al 0,2 % de la cámara de migración superior de una placa de 96 pocillos de 8 µm durante 24 h. El ensayo de migración se realizó siguiendo el protocolo del fabricante.

Ensayo de adhesión celular: Se sembraron 7500 células NIH3T3 en una placa de 96 pocillos durante 24 horas. Las células se recolectaron con tripsina y se volvieron a sembrar en placas de 96 pocillos a 37°C. Tras 1 h de incubación, se eliminaron las células no adheridas mediante 2 lavados de PBS. Los fibroblastos adherentes se fijaron con metanol y se tiñeron con violeta cristal al 1 %. La absorbancia se midió utilizando SpectraMax Paradigm (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La absorbancia obtenida de las células no tratadas se tomó como 100 % (n=3).

Análisis estadístico

Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar. La significación estadística de las comparaciones múltiples se evaluó mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con análisis post-hoc de Tukey ($P < 0,05$), utilizando GraphPad Prism (software GraphPad). La significación estadística de las comparaciones individuales se calculó mediante la prueba t de Student de dos colas ($P < 0,05$), utilizando Microsoft Excel (Microsoft Corporation). El tamaño de la muestra se predeterminó en base al tamaño efector y la variabilidad observada previamente en lecturas similares en nuestro laboratorio.

Ejemplo 1. SMOC2 es altamente inducida en riñones de ratones y humanos tras la fibrosis

SMOC2 se indujo significativamente ($P < 0,05$) en ratones sometidos a obstrucción ureteral unilateral (UUO) o tratados con ácido fólico (AF, 250 mg/kg ip), dos modelos de ratón mecánicamente distintos de lesión renal con fibrosis progresiva resultante (Figs. 1A-D, 7A y B) (UUO Craciun et al., J Am Soc Nephrol. 2016;27(6): 1702-13; Craciun et al., Am J Physiol Renal Physiol. 2014;307(4):F471- 84; Yuan et al., Am J Pathol. 2003;163(6):2289-301; Long et al., J Am Soc Nephrol. 2001; 12(12):2721-31; Surendran et al., Kidney Int. 2004;65(6):2212-22; Kang et al., Nat Med. 2015;21(1):37-46; Kang et al., Cell Rep. 2016; 14(4):861-71; Chevalier et al., Kidney Int. 2009;75(1 1): 1145-52; Yang et al., Nat Med. 2010; 16(5):535-43, Ip siguiendo 143). La tinción conjunta de SMOC2 con α SMA en los riñones de ratones sometidos a UUO o AF a los 7 días confirmó la regulación al alza generalizada de SMOC2 en todo el riñón, predominantemente en las células epiteliales tubulares proximales y distales alrededor de las áreas de fibrosis (Figs. 1A y 1B). En relación con α SMA (Fig. 1 A, panel inferior), SMOC2 no se co-localizó con los miofibroblastos sino que se expresó alrededor de los miofibroblastos que son las células efectoras de la fibrosis, cumpliendo con la expresión extracelular de SMOC2. Tanto en los modelos UUO como de AF, la expresión de SMOC2 se correlacionó con la progresión de la fibrosis caracterizada por la expresión de α SMA-miofibroblastos, colágeno y fibronectina (Figs. 1C e 1D, densitometría Fig. 7C y D). Antes hemos ampliado los efectos histológicos del ácido fólico sobre la función renal (Craciun et al., J Am Soc Nephrol. 2016;27(6): 1702-13), en los que la fibrosis tubulointersticial inducida por AF (análisis histológico y expresión de marcadores fibróticos) se correlacionó con un deterioro de la función renal. La traducibilidad de la expresión de SMOC2 en la enfermedad humana se confirmó al observar una inducción significativa de SMOC2 en las células epiteliales tubulares de secciones de la biopsia de riñón humano de pacientes con fibrosis patológica (Fig. 1E y Fig. 7C). La SMOC2 siendo una proteína secretada, también se elevó significativamente (2,5 veces, $p < 0,05$) en la orina de pacientes con enfermedad renal crónica (ERC, Tabla 3, n=13) en comparación con voluntarios sanos (n=13). Este aumento se correspondía con el aumento del biomarcador de daño tubular Molécula-1 de lesión renal (Fig. 1F). En consonancia con estos hallazgos *in vivo*, la expresión de SMOC2 también aumentó significativamente en fibroblastos embrionarios de ratón (NIH3T3) y en células epiteliales tubulares proximales humanas primarias (HPTEC) tras el tratamiento con la citocina pro-fibrótica TGF β 1 (10 ng/ml) (Fig. 8A-B).

Tabla 3. Características demográficas y clínicas de los pacientes con o sin enfermedad renal crónica (ERC)

Participante	Edad	Sexo	Raza	eGFR (ml/min/ 1,73 m ²)	Fase	Fase de la ERC	SMOC2 U Cr (ng/mg)	KIM-1Z/ U Cr (ng/mg)
ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA								
1	73	M	B	15	4	Diabetes, hipertensión	3,98	1,24
2	62	F	O	19	4	Nefritis intersticial crónica	0,68	10,39
3	35	F	W	20	4	Anomalías congénitas del riñón y tracto urinario	0,08	1,52
4	66	F	W	23	4	Glomerulonefritis fibrilar	1,23	1,69
5	65	F	W	15	4	Toxicidad por litio	5,43	5,17

6	75	F	B	22	4	Diabetes, hipertensión	0,12	0,550
7	64	M	W	25	4	Nefrectomía, tracto urinario recurrente	2,75	0,80
8	56	F	B	20	4	Infecciones Hipertensión	3,74	0,95
9	64	F	W	13	5	Diabetes y Fosfato	2,05	3,55
10	39	M	W	6	5	Nefropatía intersticial crónica Nefritis	5,87	1,39
11	55	M	B	12	5	Diabetes Hipertensión	2,46	3,69
12	51	M	W	14	5	Lupus	1,68	7,42
13	74	F	B	13	5	Nefrectomía, Hipertensión	2,85	2,15

Participante	Edad	Sexo	Raza	eGFR (ml/min/1,73 m ²)	Fase	Fase de la ERC	SMOC2 U (ng/mg)	KIM-1Z/ U Cr (ng/mg)
ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA								
14	21	F	B	-	-	-	0,28	0,43
15	27	M	W	-	-	-	0,92	0,19
16	21	F	W	-	-	-	1,93	0,90
17	21	F	B	-	-	-	0,92	0,57
18	29	M	O	-	-	-	1,38	1,34
19	19	M	B	-	-	-	0,28	0,28
20	20	M	O	-	-	-	0,07	0,24
21	19	M	W	-	-	-	0,66	0,06
22	36	F	W	-	-	-	0,82	0,66
23	19	M	O	-	-	-	0,66	0,49
24	29	F	O	-	-	-	1,75	2,16
25	49	F	B	-	-	-	0,77	0,83
26	19	F	O	-	-	-	0,21	0,93

Ejemplo 2. Los ratones que sobreexpresan SMOC2 presentan una mayor fibrosis renal

Los ratones transgénicos que sobreexpresaban SMOC2 (SMOC2 Tg) presentaban niveles de SMOC2 marcadamente elevados (Fig. 2A) pero una histología normal del corazón, riñón, hígado, pulmón, bazo, ovarios y testículos. Cuando se sometieron a UUO, los SMOC2 Tg mostraron una fibrosis significativamente mayor en comparación con sus compañeros de camada de tipo salvaje, medido por los niveles de ARNm (Fig. 10A) y proteínas (Fig. 2B, densitometría Fig. 10B) de α SMA, colágeno y fibronectina en los riñones en los días 7 y 14 postlesión. Esto se correlacionó con la presencia ~ 2 veces mayor de miofibroblastos positivos α SMA en el intersticio (Fig. 2C). De forma similar, los ratones SMOC2 Tg también demostraron un aumento de la fibrosis cuando fueron tratados con AF (250 mg/kg ip) tanto a nivel de ARNm (Fig. 11A) como de proteínas (Fig. 2D, densitometría Fig. 1 IB). Asimismo, los miofibroblastos α SMA positivos en el intersticio (Fig. 2E) se elevaron significativamente en los ratones SMOC2 Tg en comparación con los ratones de tipo salvaje tras el tratamiento con AF. Los ratones SMOC2 Tg también mostraron consistentemente mayores cantidades de fibrosis tubulointersticial patológica que los ratones de tipo salvaje, tal y como se detectó tanto por tinción con rojo Picrosirius como con tricrómico de Masson de los riñones en los días 7 y 14 tras UUO (Fig. 2F) o AF (Fig. 2G).

Ejemplo 3. SMOC2 promueve la transición de fibroblasto a miofibroblasto

Realizamos la secuenciación de ARN en riñones de ratones SMOC2 Tg y tipo salvaje en el día 7 tras UUU para investigar los mecanismos responsables de la mayor susceptibilidad de los ratones SMOC2 Tg a desarrollar fibrosis. El análisis de enriquecimiento de los conjuntos de genes (GSEA) para términos de ontología genética (OG) y KEGG para componentes celulares reveló que los genes de la categoría ECM representaban una diferencia altamente significativa desde el punto de vista estadístico entre los ratones SMOC2 Tg y los ratones de tipo salvaje (Fig. 3 A). Por tanto, investigamos el potencial de SMOC2 para transformar fibroblastos (fibroblastos renales primarios humanos y fibroblastos NIH 3T3) en miofibroblastos, que son el principal tipo celular responsable de la producción de ECM. En comparación con la inducción de la transición de fibroblasto a miofibroblasto (FMT) por TGF β 1, SMOC2 (10 ng/mL, Fig. 12A) también fue capaz de inducir la transición FMT, caracterizada por la regulación al alza de α SMA, colágeno 1 α 1 y fibronectina (Fig. 3B, C y 12B-D). La especificidad de SMOC2 para inducir la transición FMT se confirmó preincubando SMOC2 con un anticuerpo específico de SMOC2, que resultó en el bloqueo del efecto de señalización de SMOC2 en los fibroblastos (Fig. 3D y Fig. 12E-F).

Se ha demostrado previamente que SMOC2 se une a los queratinocitos a través de la integrina pi (Maier et al., Exp Cell Res. 2008 Ago 1 ;314(13):2477-87). Para verificar si lo mismo se aplica a los fibroblastos y podría ser potencialmente el modo de acción de SMOC2, primero tratamos los fibroblastos con un anticuerpo contra la integrina pi antes del tratamiento con SMOC2. El anticuerpo contra la integrina pi fue efectivo para prevenir la inducción de marcadores de FMT por SMOC2 (Fig. 3E). Para confirmar su interacción, inmunoprecipitamos SMOC2 y luego analizamos el *pull-down* para integrina pi, y viceversa. Los resultados confirmaron en un análisis bidireccional que SMOC2 también se une a la integrina pi en el tipo celular de fibroblasto.

El tratamiento con SMOC2 (10 ng/ml) de fibroblastos quiescentes también desencadenó una cascada temprana de eventos de señalización de integrina para FMT (14), incluyendo la fosforilación de la quinasa de adhesión focal (FAK-P) (15, 16), cadena ligera de miosina (MLC-P) (17), y paxilina (Pax-P) (17), a los 45 min (Fig. 12G-H) doblando casi el efecto a los 60 min (Fig. 3F, densitometría Fig. 12H). Como la expresión de α SMA culmina en el ensamblaje de las fibras contráctiles, validamos entonces esta formación estructural tras el tratamiento de los fibroblastos con SMOC2 (Fig. 3G) Dado que la secuenciación del ARN también reveló la "quimiotaxis" como un proceso biológico altamente significativo (Fig. 3H) entre SMOC2 Tg y los ratones de tipo salvaje a los 7 días después de UUU, investigamos las propiedades quimiotácticas de SMOC2 en los fibroblastos mediante la realización de un ensayo de regeneración celular (mediante raspado) y un ensayo de migración basado en la cámara de Boyden. Los fibroblastos tratados con SMOC2 (10 ng/ml) durante 24 h mostraron un cierre significativamente acelerado de la herida (Fig. 3I) generada por un raspado lineal en una monocapa de NIH3T3 semiconfluente, lo que implicó una repoblación significativa del área herida con el paso del tiempo (Fig. 12I). SMOC2 también aumentó la migración de fibroblastos en ~ 50 % (Fig. 12I). También se produjo un aumento de ~ 3 veces en la adhesión tras el tratamiento con SMOC2 de los fibroblastos (Fig. 3K). Además, SMOC2 aumentó progresivamente la actividad metabólica y la supervivencia de los fibroblastos cada 24 h en el transcurso de 96 h (Fig. 3I, Fig. 12J). SMOC2 también mostró propiedades mitogénicas al estimular la proliferación de fibroblastos ($p < 0,05$), evaluada por el número de células EdU positivas (Fig. 3M). Con el fin de validar estos efectos de SMOC2 recombinante en los fibroblastos, también creamos fibroblastos sobreexpresantes de SMOC2 transfectando células NIH3T3 con pCMV-SMOC2 y observamos cambios fenotípicos similares (Fig. 13A-G). En conjunto, estos resultados sugieren que SMOC2 estimula la señalización de fibroblastos a miofibroblastos (FMT) con la activación de sus rasgos característicos, incluyendo la actividad metabólica, la proliferación, la migración y la adhesión.

Ejemplo 4. Los ratones knockout de SMOC2 están protegidos frente a la fibrosis renal

Para investigar el efecto de la inhibición de SMOC2 en la progresión de la fibrosis, en primer lugar, utilizamos un enfoque de manipulación genética y confirmamos que los ratones knockout (KO) de SMOC2 (Fig. 4A) eran histológicamente normales. Cuando los ratones SMOC2 KO fueron sometidos a AF y UUU se produjo una marcada atenuación de los marcadores fibróticos en el día 7 en comparación con los ratones de tipo salvaje (Fig. 4B, densitometría Fig. 14; Fig. 5 A, densitometría Fig. 18). Esto se confirmó por una disminución significativa de las células α SMA positivas en el intersticio (Fig. 4C y Fig. 5B), junto con una reducción significativa en la deposición y acumulación de ECM visualizado por la tinción tricrómica de Masson (Fig. 4D).

Ejemplo 5. La inhibición de SMOC2 mediante ARN de interferencia protege contra el desarrollo de fibrosis

A continuación, utilizamos un enfoque de inhibición farmacológica para inhibir SMOC2 mediante la síntesis de pequeños ARN de interferencia (siRNAs). Probamos la eficacia de 4 siRNAs y encontramos una (secuencia diana: UCUGAACUCUGAAUUUAA; SEQ ID NO: 17; SMOC2 siRNA usado en estudios con ratones: Sentido (5' a 3'): UUC UGA ACU CUG AAU UUA AUU (SEQ ID NO: 18); Antisentido (5' a 3'): UUA AAU UCA GAGUUC AGA AUU (SEQ ID NO: 19) que resultó en un silenciamiento del ~90 % *in vitro* (siRNA de SMOC2 n.º 16 en la Fig. 16); las mismas secuencias podrían utilizarse para seleccionar SMOC2 humano debido al alto nivel de homología entre las secuencias humanas y murinas. Las células NIH3T3 transfectadas con siRNA de SMOC2 produjeron una atenuación significativa de la transición y señalización de fibroblastos a miofibroblastos mediada por TGF β 1 medida por una disminución significativa de la expresión en la expresión de SMOC2, α SMA, colágeno 1 α 1 y fibronectina (Fig. 6A, densitometría

Fig. 17). Utilizando la misma secuencia de siRNA de SMOC2 sintetizamos un siRNA de SMOC2 modificado químicamente y libre de endotoxinas resistente a la degradación *in vivo* y que se localiza en los riñones (18) (Fig. 18). El siRNA de SMOC2 al ser inyectado en ratones por vía intravenosa también dio lugar a una reducción del ~50 % en la expresión de la proteína SMOC2 en el riñón tras la administración de AF (Fig. 6B, densitometría Fig. 19), estableciendo así la prueba de administración. Y lo más importante, se observó una mejora significativa de la fibrosis renal en los ratones tratados con siRNA de SMOC2 en comparación con siRNA (ssiRNA) aleatorizado el día 7 tras el tratamiento con AF (Fig. 6Bs, densitometría Fig. 19). La transformación de los miofibroblastos y la acumulación de colágeno, evaluadas mediante la tinción de α SMA y la tinción tricrómica de Masson, respectivamente, fueron significativamente menores en los ratones inyectados con AF tratados con siRNA de SMOC2 (Fig. 6c y 6d) en comparación con los ratones tratados con ssiRNA.

Referencias

1. Nanthakumar CB, Hatley RJ, Lemma S, Gaul die J, Marshall RP, and Macdonald SJ. Dissecting fibrosis: therapeutic insights from the small-molecule toolbox. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14 (10):693-720.
2. Ferenbach DA, and Bonventre JV. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nat Rev Nephrol.* 2015; 11 (5):264-76.
3. Breyer MD, and Susztak K. The next generation of therapeutics for chronic kidney disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2016.
4. Grgic I, Duffield JS, and Humphreys BD. The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2012;27 (2): 183-93.
5. Duffield JS. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *J Clin Invest.* 2014; 124 (6):2299-306.
6. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, and Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3 (5):349-63.
7. Hinz B. It has to be the alphav: myofibroblast integrins activate latent TGF-beta1. *Nat Med.* 2013; 19 (12): 1567-8.
8. Meran S, and Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *JExp Pathol.* 2011;92 (3): 158-67.
9. LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, and Kalluri R. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med.* 2013;19 (8):1047-53.
10. Craciun FL, Bijol V, Ajay AK, Rao P, Kumar RK, Hutchinson J, Hofmann O, Joshi N, Luyendyk JP, Kusebauch U, et al. RNA Sequencing Identifies Novel Translational Biomarkers of Kidney Fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27 (6):1702-13. Epub 2015 Oct 8.
11. Wong GS, and Rustgi AK. Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis. *Br J Cancer.* 2013; 108 (4):755-61.
12. Schellings MW, Pinto YM, and Heymans S. Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovasc Res.* 2004;64 (1):24- 31.
13. Jendraschak E, and Sage EH. Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin: implications for tumor cell biology. *Semin Cancer Biol.* 1996;7 (3): 139-46.
14. Mitra SK, Hanson DA, and Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6 (1):56-68.
15. Mimura Y, Ihn H, Jinnin M, Asano Y, Yamane K, and Tamaki K. Constitutive phosphorylation of focal adhesion kinase is involved in the myofibroblast differentiation of scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2005; 124 (5):886-92.
16. Greenberg RS, Bernstein AM, Benezra M, Gelman IH, Taliana L, and Masur SK. FAK-dependent regulation of myofibroblast differentiation. *FASEB J.* 2006;20 (7): 1006-8.
17. Gerarduzzi C, He Q, Antoniou J, and Di Battista JA. Prostaglandin E (2)-dependent blockade of actomyosin and stress fibre formation is mediated through S1379 phosphorylation of ROCK2. *J Cell Biochem.* 2014; 115 (9): 1516-27.
18. Chau BN, Xin C, Hartner J, Ren S, Castano AP, Linn G, Li J, Tran PT, Kaimal V, Huang X, et al. MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. *Sci Transl Med.* 2012;4 (121): 121ra18.
19. Humphrey JD, Dufresne ER, and Schwartz MA. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15 (12):802-12.
20. McCurdy S, Baicu CF, Heymans S, and Bradshaw AD. Cardiac extracellular matrix remodeling: fibrillar collagens and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC). *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48 (3):544-9.

21. Sasaki T, Hohenester E, Gohring W, and Timpl R. Crystal structure and mapping by site-directed mutagenesis of the collagen-binding epitope of an activated form of BM-40/SPARC/osteonectin. *EMBO J.* 1998; 17 (6): 1625-34.
22. Bradshaw AD, Baicu CF, Rentz TJ, Van Laer AO, Boggs J, Lacy JM, and Zile MR. Pressure overload-induced alterations in fibrillar collagen content and myocardial diastolic function: role of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in post-synthetic procollagen processing. *Circulation.* 2009; 119 (2):269-80.
23. Maier S, Paulsson M, and Hartmann U. The widely expressed extracellular matrix protein SMOC-2 promotes keratinocyte attachment and migration. *Exp Cell Res.* 2008;314 (13):2477-87.
24. Pazin DE, and Albrecht KH. Developmental expression of Smoc1 and Smoc2 suggests potential roles in fetal gonad and reproductive tract differentiation. *DevDyn.* 2009;238 (11):2877-90.
25. Rocnik EF, Liu P, Sato K, Walsh K, and Vaziri C. The novel SPARC family member SMOC-2 potentiates angiogenic growth factor activity. *J Biol Chem.* 2006;281 (32):22855-64.
26. Liu P, Lu J, Cardoso WV, and Vaziri C. The SPARC-related factor SMOC-2 promotes growth factor-induced cyclin D1 expression and DNA synthesis via integrin-linked kinase. *Mol Biol Cell.* 2008; 19 (1):248-61.
27. Bornstein P, and Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol.* 2002; 14 (5):608-16.
28. Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol.* 2003; 13 (5):264-9.
29. Craciun FL, Ajay AK, Hoffmann D, Saikumar J, Fabian SL, Bijol V, Humphreys BD, and Vaidya VS. Pharmacological and genetic depletion of fibrinogen protects from kidney fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;307 (4):F471-84.
30. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. 2011. 2011;17 (1).
31. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, and Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29 (1): 15-21.
32. Garcia-Alcalde F, Okonechnikov K, Carbonell J, Cruz LM, Gotz S, Tarazona S, Dopazo J, Meyer TF, and Conesa A. Qualimap: evaluating next-generation sequencing alignment data. *Bioinformatics.* 2012;28 (20):2678-9.
33. Liao Y, Smyth GK, and Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014;30 (7):923-30.
34. Love MI, Huber W, and Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15 (12):550.
35. Luo W, Friedman MS, Shedden K, Hankenson KD, and Woolf PJ. GAGE: generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. *BMC Bioinformatics.* 2009; 10 (161).
36. Supek F, Bosnjak M, Skunca N, and Smuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One.* 2011;6 (7):e21800.
37. Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, and Petridou S. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93 (9):4219-23.

OTRAS REALIZACIONES

Debe entenderse que, si bien la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de la proteína modular secretada fijadora de calcio 2 (SMOC2) para el uso en el tratamiento profiláctico de la fibrosis renal en un sujeto, donde el inhibidor es un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a SMOC2 o un ácido nucleico inhibidor que focaliza un transcrito de SMOC2.
2. El inhibidor para el uso de la reivindicación 1, donde el anticuerpo monoclonal o la porción de unión a antígeno del mismo es quimérico, humanizado o totalmente humano.
3. El inhibidor para el uso de la reivindicación 1, donde el inhibidor es un ácido nucleico inhibitorio que focaliza un transcrito de SMOC2.
4. El inhibidor para el uso de la reivindicación 3, donde el ácido nucleico inhibitorio se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótidos antisentido, ARN de interferencia pequeños (siRNAs), ARN en horquilla pequeño (shRNAs).
5. El inhibidor para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 3-4, donde el ácido nucleico inhibitorio comprende un esqueleto modificado seleccionado entre fosforotioatos, fosfotriesteres, metil fosfonatos, enlaces interazúcar de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces heteroatómicos de cadena corta y/o enlaces interazúcar heterocíclicos.
6. El inhibidor para el uso de la reivindicación 5, donde el ácido nucleico inhibitorio comprende un esqueleto modificado, y el esqueleto es una amida, un ácido nucleico peptídico (PNA) o un esqueleto de morfolino.
7. El inhibidor para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 3-6, donde el ácido nucleico inhibitorio comprende uno o más nucleósidos modificados seleccionados entre fosforotioato, metilfosfonato, ácidos nucleicos peptídicos y/o moléculas de ácido nucleico bloqueado (LNA).
8. El inhibidor para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, donde el ácido nucleico inhibitorio comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, preferentemente un nucleótido modificado con 2'-O-alquilo, 2'-O-alquilo-O-alquilo o 2'-fluoro; o modificaciones de 2'-fluoro, 2'-amino y 2' O-metilo en la ribosa de las pirimidinas, residuos abásicos o una base invertida en el extremo 3' del ARN.
9. El inhibidor para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 3-8, donde el ácido nucleico inhibidor comprende una o más fracciones de azúcar sustituidas seleccionadas entre: la posición 2' OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃ Inter azúcar, OCH₃ O(CH₂)_n CH₃, O(CH₂)_n NH₂ o O(CH₂)_n CH₃ donde n es de 1 a 10; Ci a Cl0 alquilo inferior, alcoxialcoxi, alquilo inferior sustituido, alquilarilo o aralquilo; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo escindidor de ARN; un grupo reporter; o un intercalador; y, opcionalmente, la modificación incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH₂CH₂OCH₃, (2'- O-(2-metoxietil))], 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-propoxi (2'-OCH₂CH₂CH₃), 2'- fluoro (2'-F); y/o modificaciones en la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' y en la posición 5' del nucleótido terminal 5'; y/o miméticos del azúcar en lugar del grupo pentofuranosilo.
10. El inhibidor para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 3-9, donde el ácido nucleico inhibitorio comprende una o más nucleobases modificadas seleccionadas entre: hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me pirimidinas, en particular 5-metilcitosina (5-metil-2' desoxicitosina o 5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC)), glicosil HMC y gentobiosil HMC, 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-deazaguanina, N⁶ (6-aminohehexil)adenina y 2,6- diaminopurina, inosina, 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros

derivados alquílicos de la adenina y guanina, 2-propil, derivados alquílicos de la adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 2-tiocitosina, 5-halouracilo, citosina, 5-propinil uracilo, citosina, 6-azo uracilo, citosina, timina, 5-uracilo (pseudo-uracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo, adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo, 5-bromo, 5-trifluorometil y uracilos y citosinas 5-sustituidas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

11. El inhibidor para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, donde el ácido nucleico inhibidor comprende una o más nucleobases modificadas de pirimidinas 5-sustituidas seleccionadas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Sustituciones de 5-metilcitosina; y/o donde el ácido nucleico inhibidor comprende una o más modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietil.
12. El inhibidor para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, donde el ácido nucleico inhibidor está químicamente enlazado a una o más fracciones o conjugados seleccionados de entre: fracciones lipídicas, una fracción de colesterol, ácido cólico, un tioéter, hexil-S- tritiltiol, un tiocolesterol, una cadena alifática, dodecandiol o residuos de undecil, un fosfolípido, di-hexadecil-rac-glicerol, trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato, una poli amina o una cadena de polietilenglicol, ácido acético adamantano, una fracción de palmitil, una octadecilamina o una fracción de hexilamino-carbonil-oxicolesterol; y/o las fracciones o conjugados pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios, los grupos conjugados seleccionados de intercaladores, moléculas reporter, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros, colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes; y fracciones de conjugados seleccionadas de fracciones lipídicas, una fracción de colesterol, ácido cólico, un tioéter, hexil-5-tritiltiol, un tiocolesterol, una cadena alifática, residuos de dodecandiol o undecil, un fosfolípido, di-hexadecil-rac-glicerol, trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, ácido adamantano acético, una fracción de palmitil, una fracción de octadecilamina o hexilamino- carbonil-oxicolesterol.
13. El inhibidor para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el sujeto sufre una enfermedad renal crónica, síndrome metabólico, reflujo vesicoureteral, fibrosis renal tubulointersticial, diabetes (incluyendo nefropatía diabética) y nefritis glomerular (NG).
14. El inhibidor para el uso de la reivindicación 13, donde la NG es glomeruloesclerosis segmentaria focal y glomerulonefritis membranosa o NG mesangiocapilar.

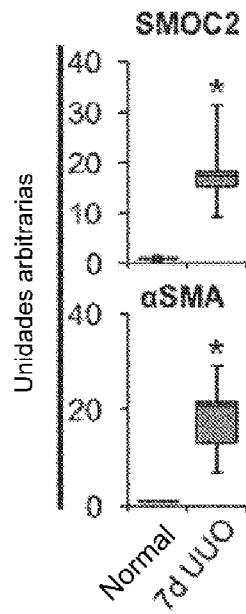


FIG. 1A

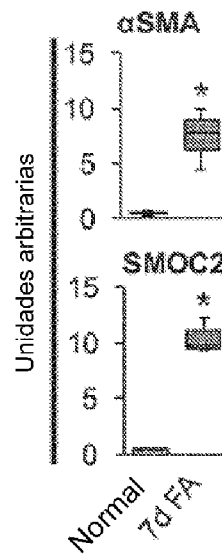


FIG. 1B

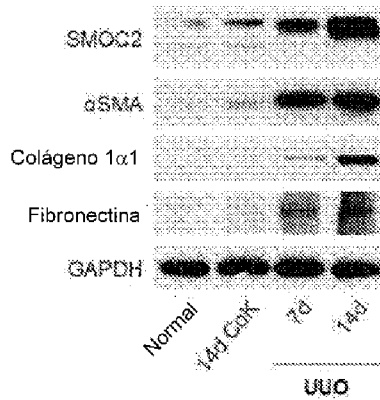


FIG. 1C

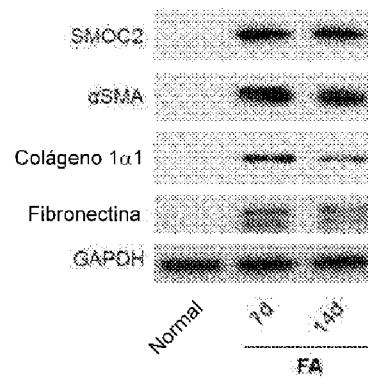


FIG. 1D

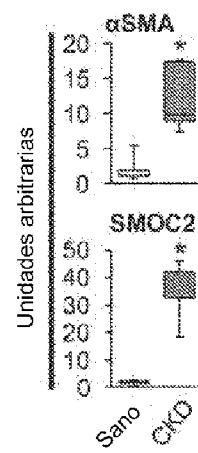


FIG. 1E

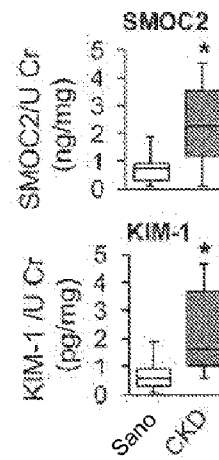


FIG. 1F

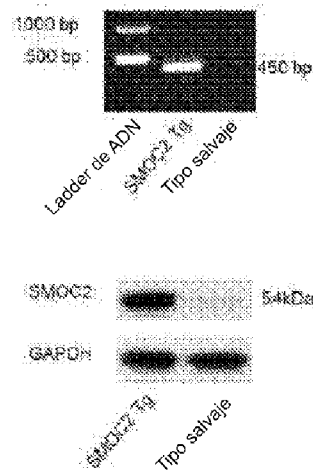


FIG. 2A

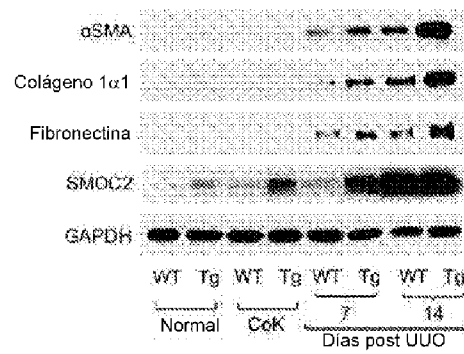


FIG. 2B

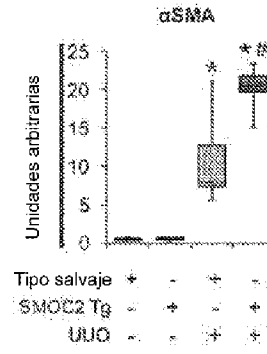


FIG. 2C

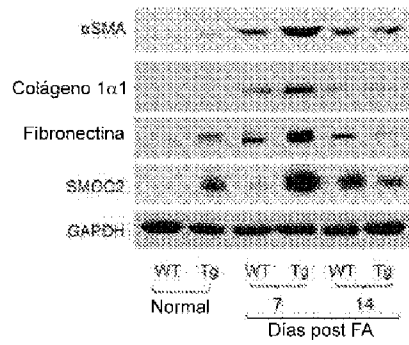


FIG. 2D

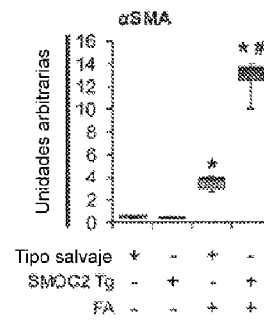


FIG. 2E

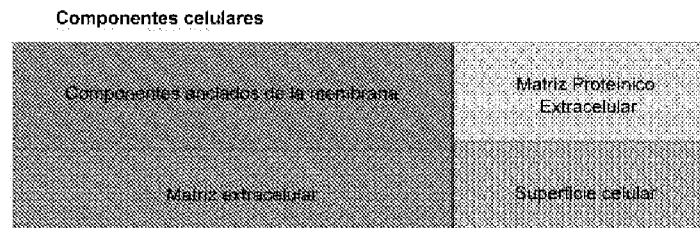
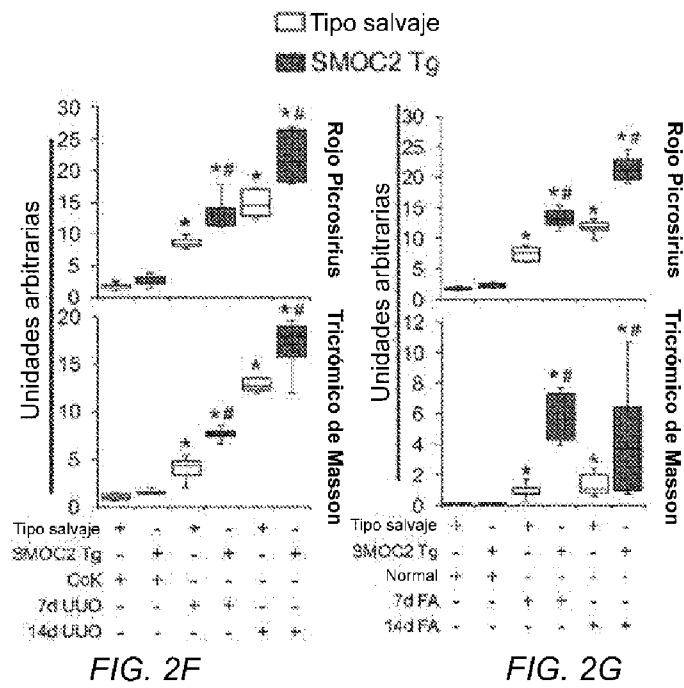


FIG. 3A

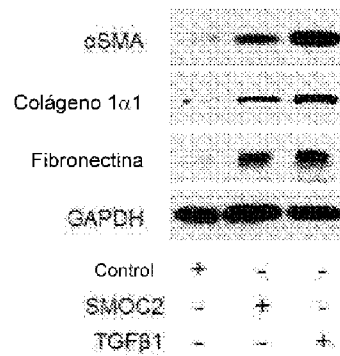


FIG. 3B

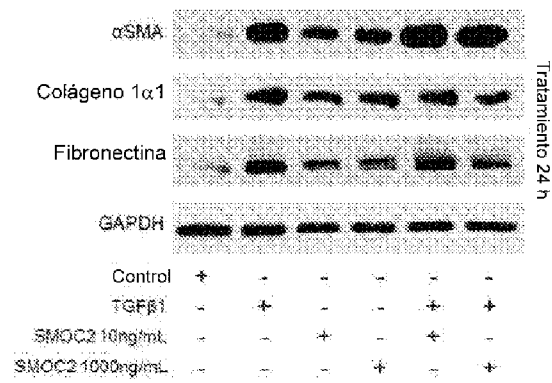


FIG. 3C

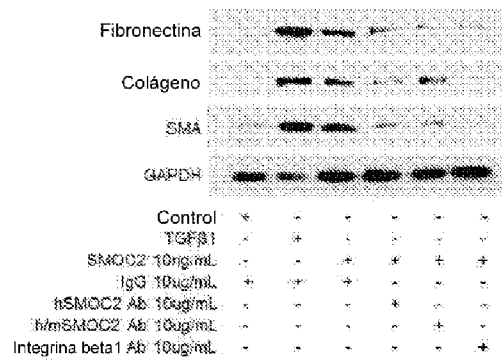


FIG. 3D

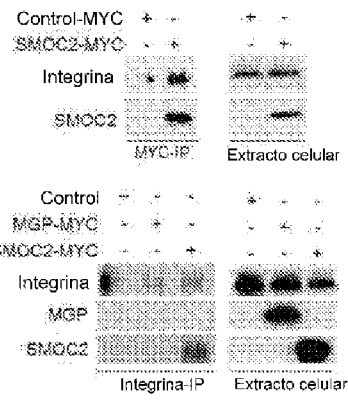


FIG. 3E

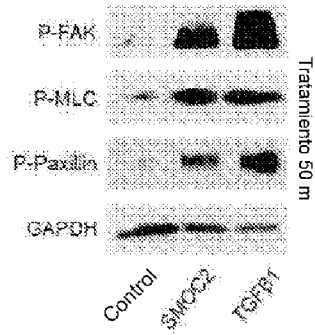


FIG. 3F

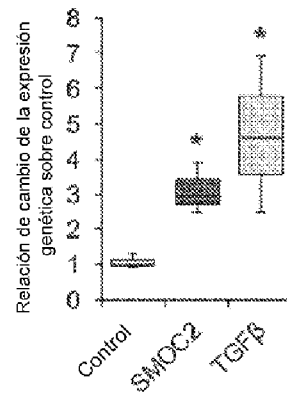


FIG. 3G

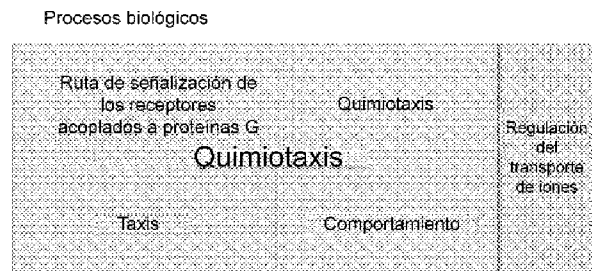


FIG. 3H

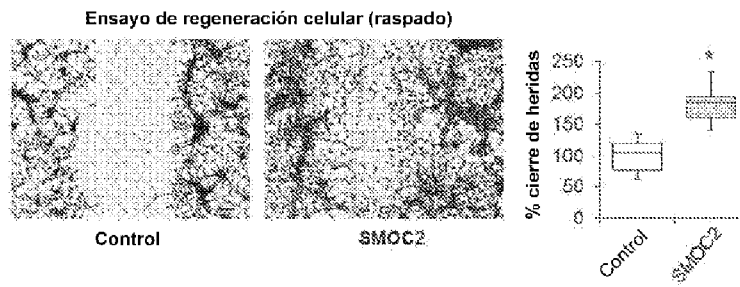


FIG. 3I

FIG. 3J

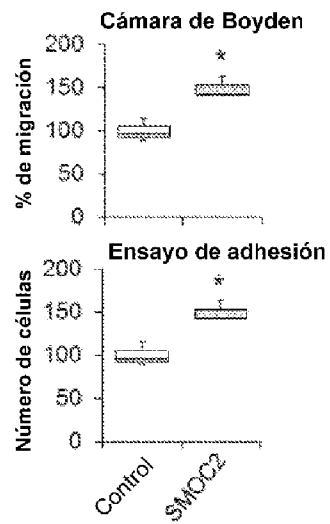


FIG. 3K

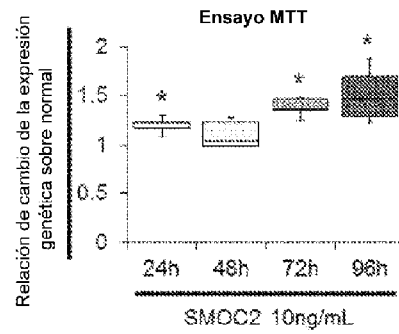


FIG. 3L

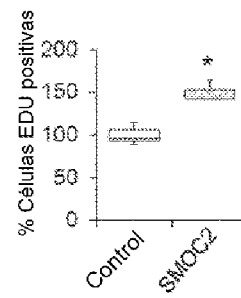


FIG. 3M

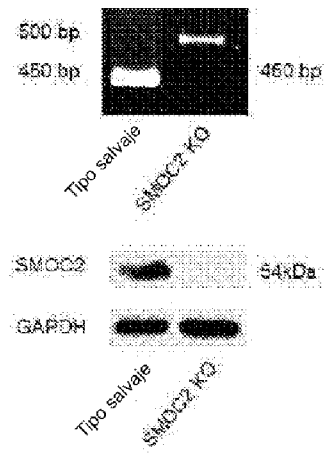


FIG. 4A

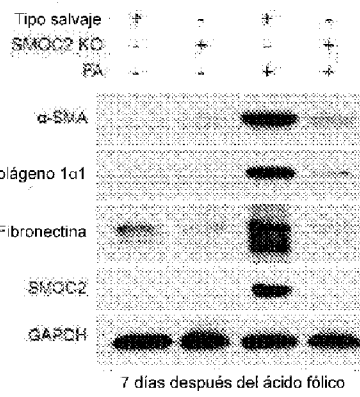


FIG. 4B

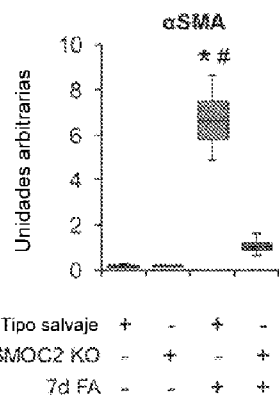


FIG. 4C

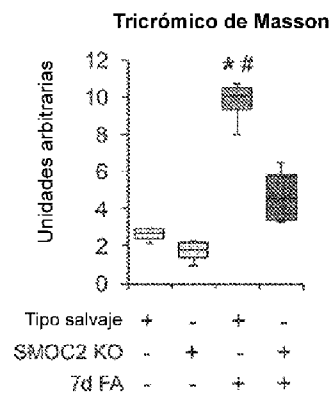


FIG. 4D

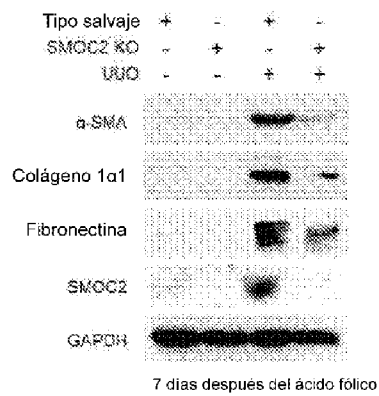


FIG. 5A

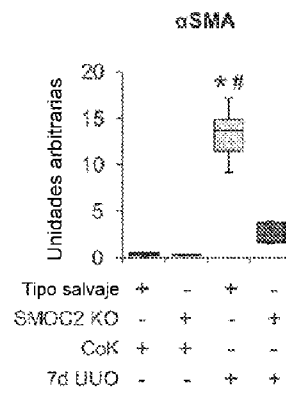


FIG. 5B

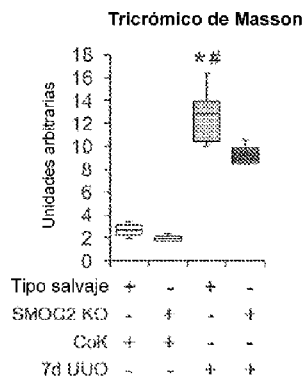


FIG. 5C

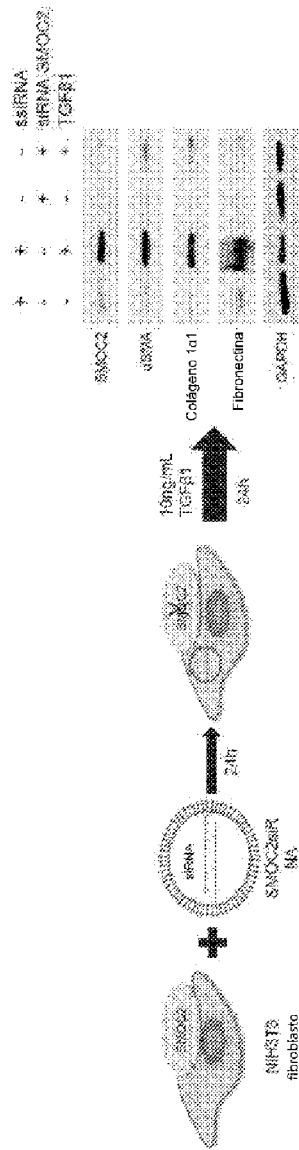


FIG. 6A

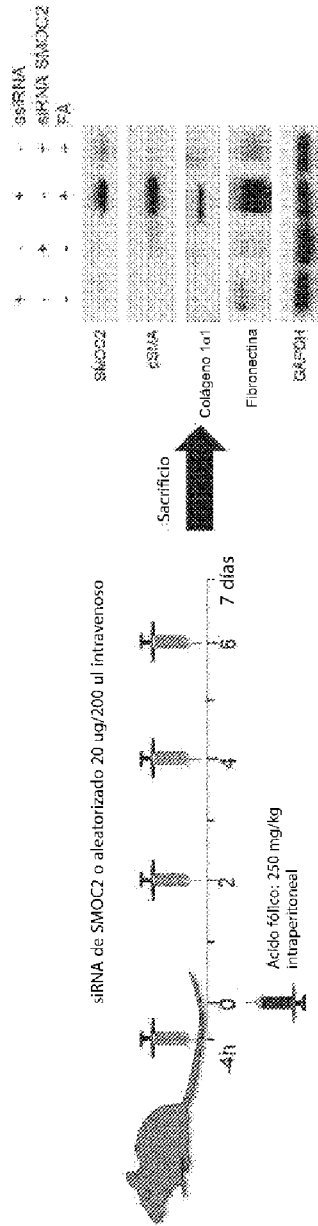


FIG. 6B

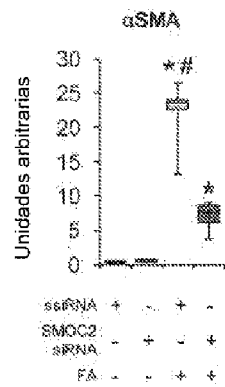


FIG. 6C

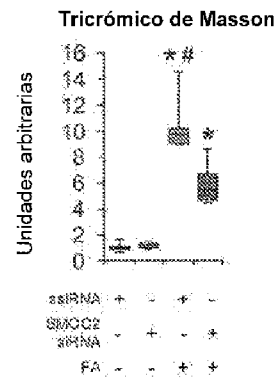
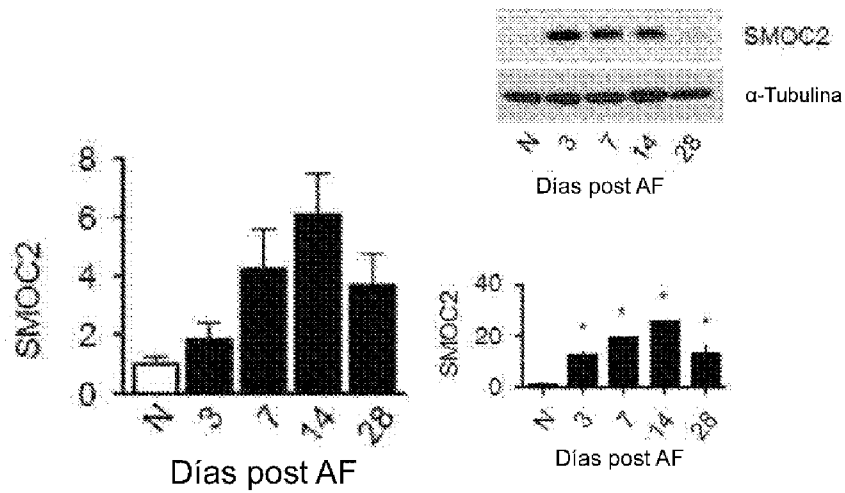
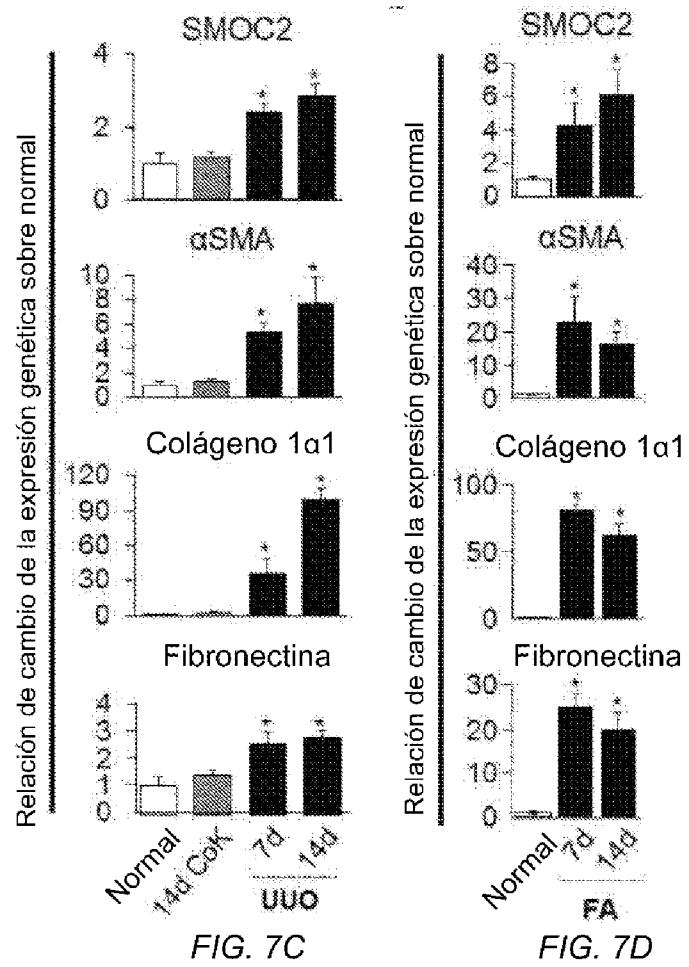


FIG. 6D





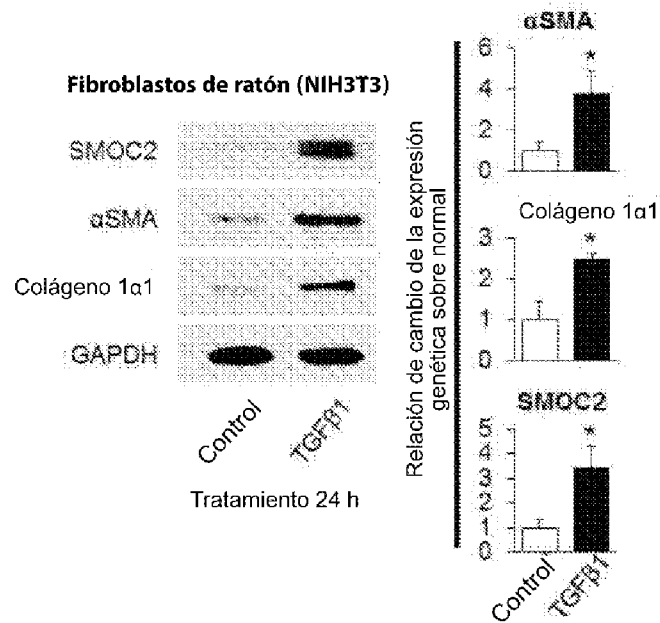


FIG. 8A

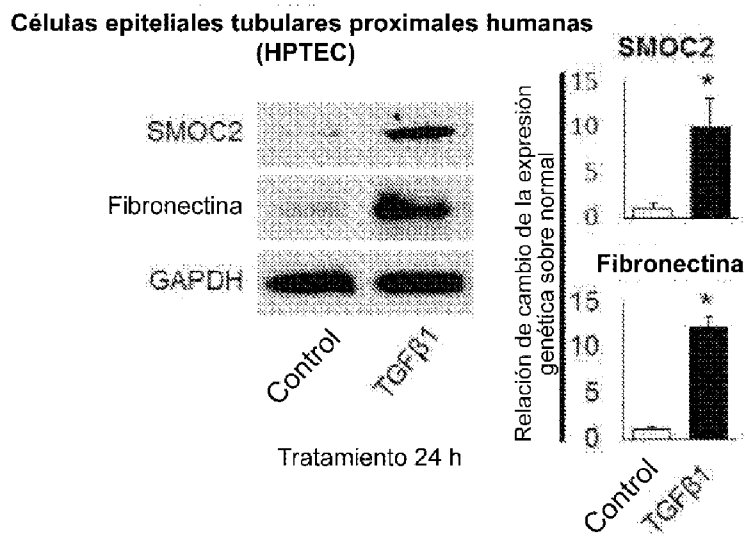


FIG. 8B

Expresión de la proteína SMOC2

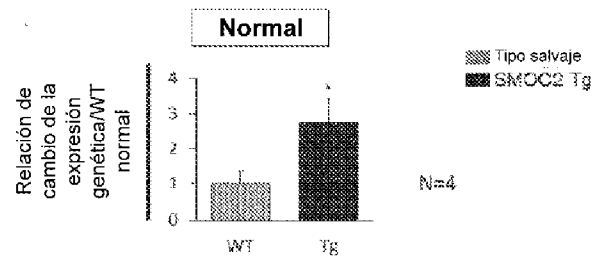


FIG. 9A

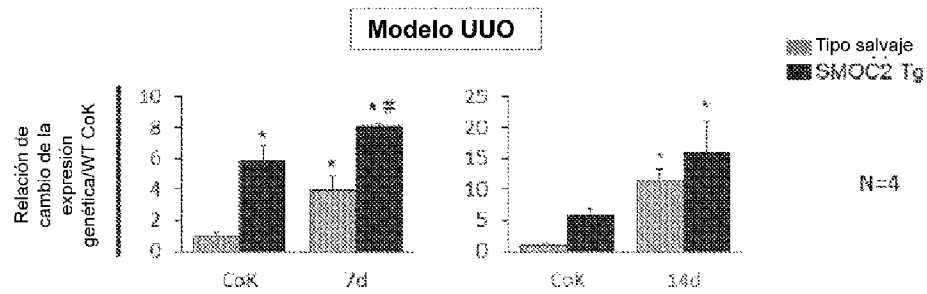


FIG. 9B

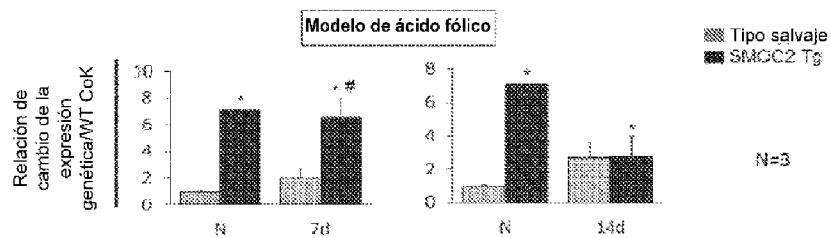


FIG. 9C

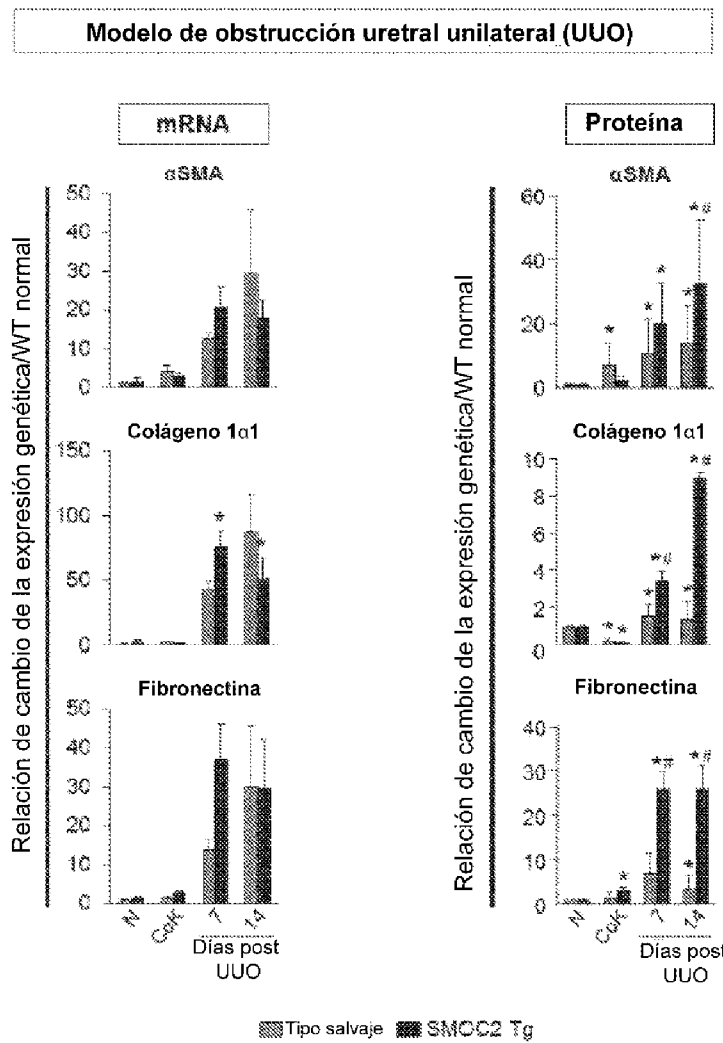


FIG. 10A

FIG. 10B

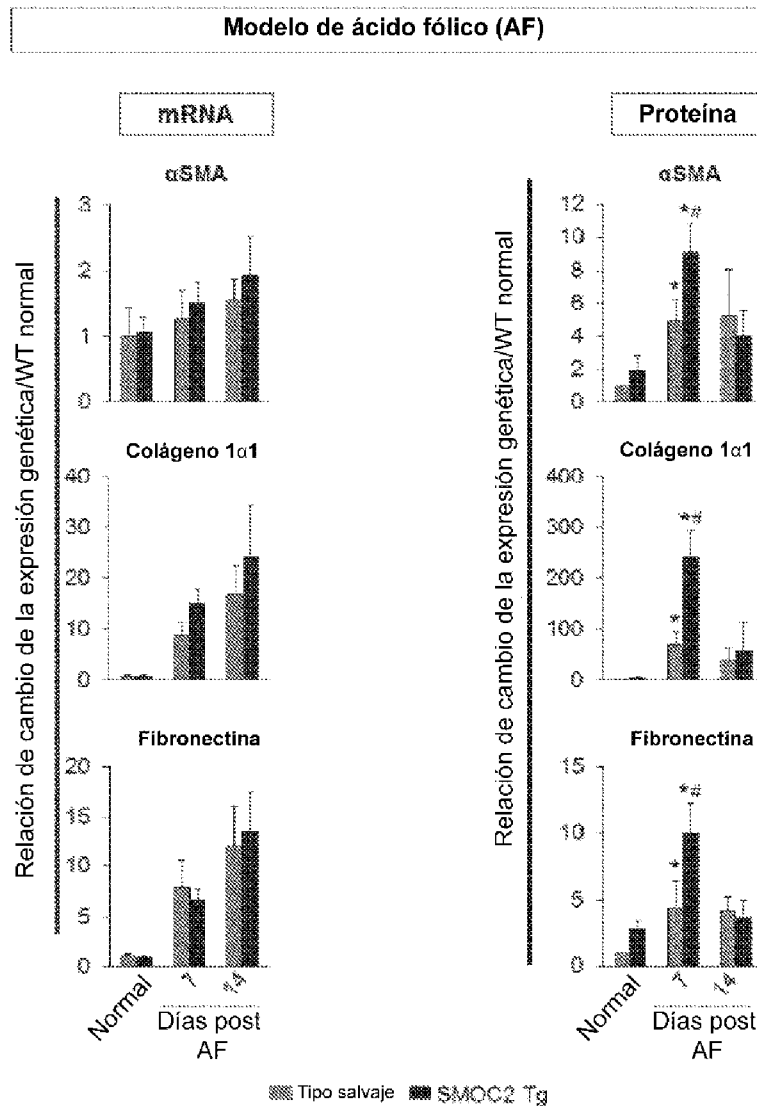


FIG. 11A

FIG. 11B

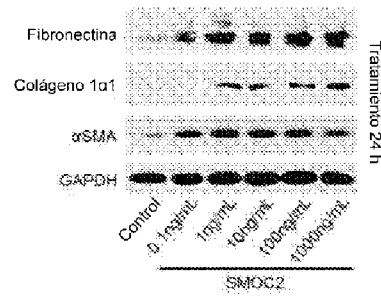


FIG. 12A

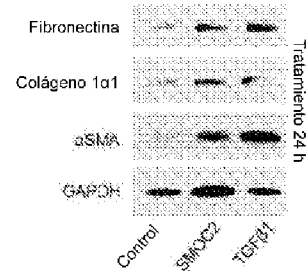


FIG. 12B

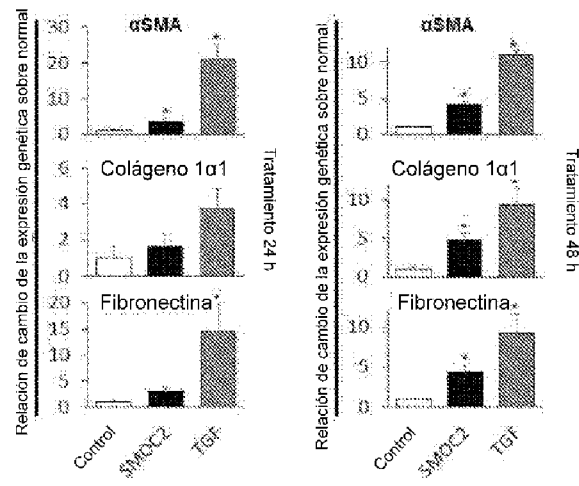


FIG. 12C

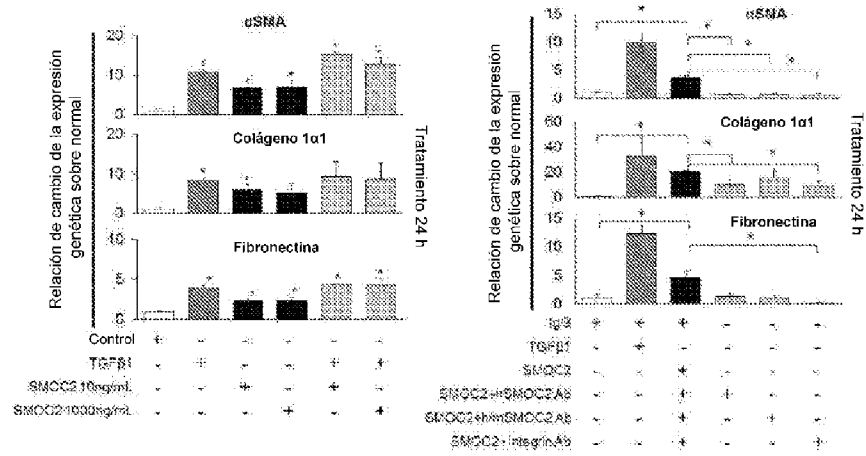


FIG. 12D

FIG. 12E

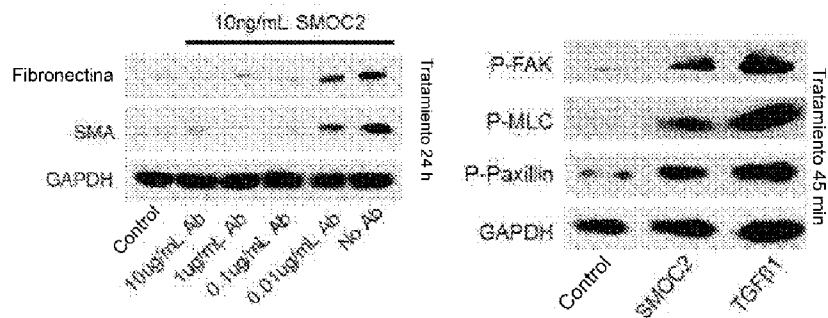


FIG. 12F

FIG. 12G

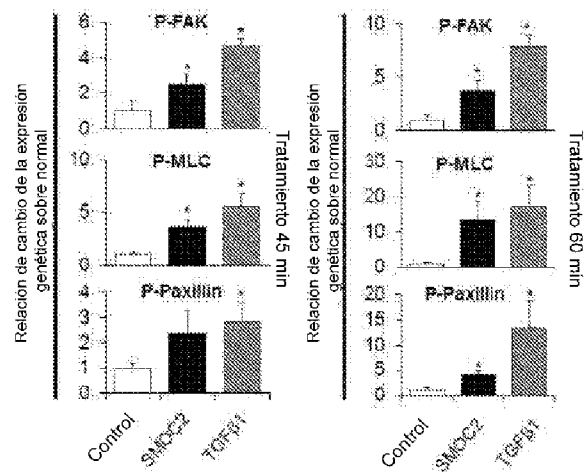


FIG. 12H

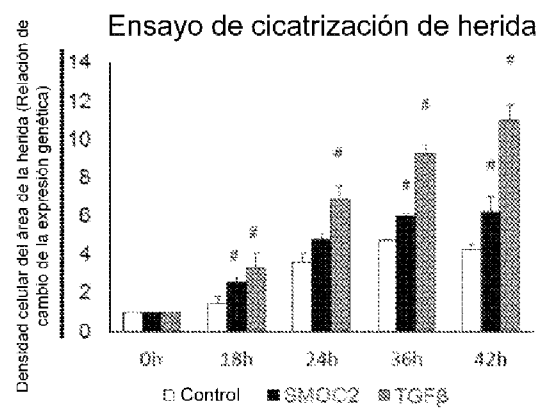


FIG. 12I

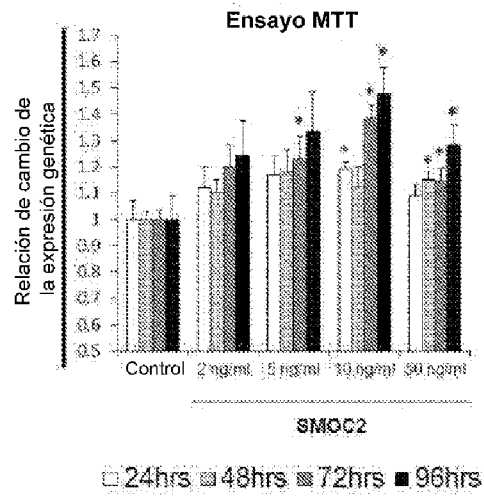


FIG. 12J

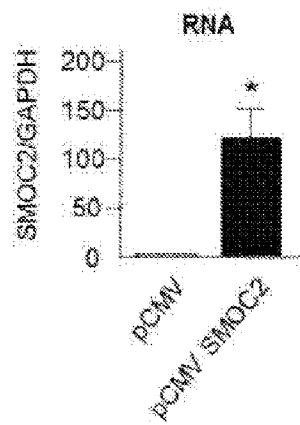


FIG. 13A

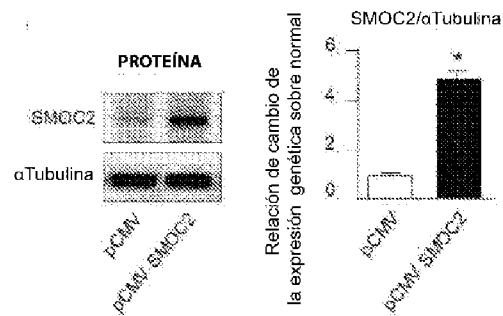


FIG. 13B

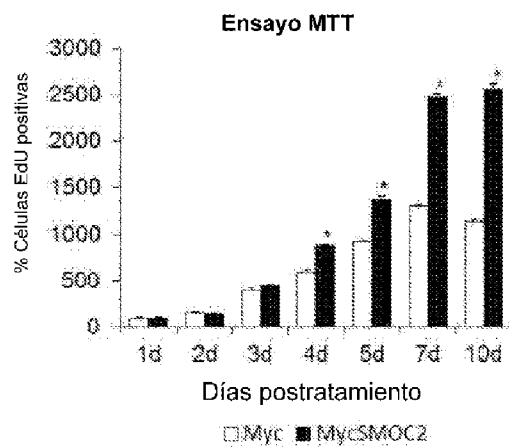
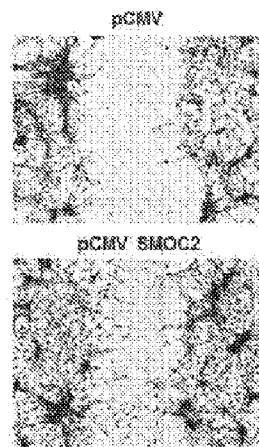


FIG. 13C

Ensayo de regeneración celular (raspado)



Ensayo de regeneración celular (raspado)

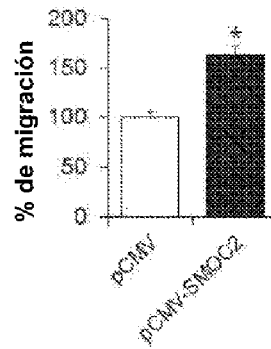
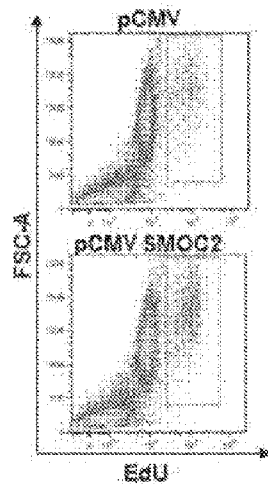


FIG. 13D

Proliferación de células



Proliferación de células

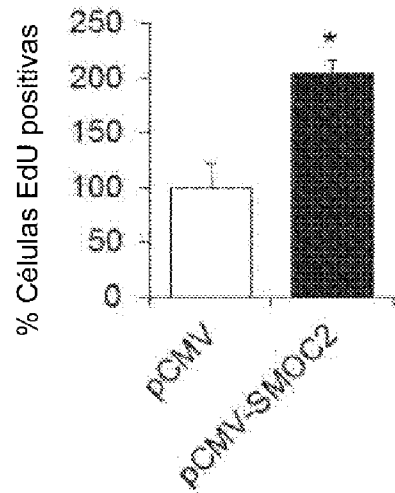


FIG. 13E

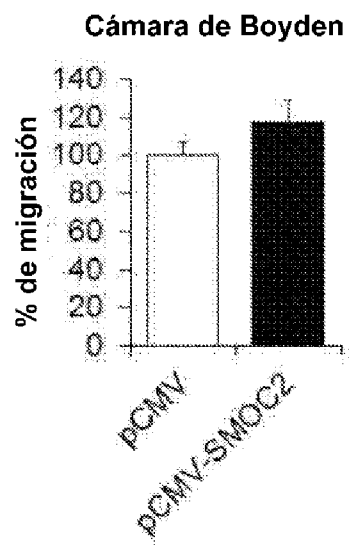


FIG. 13F

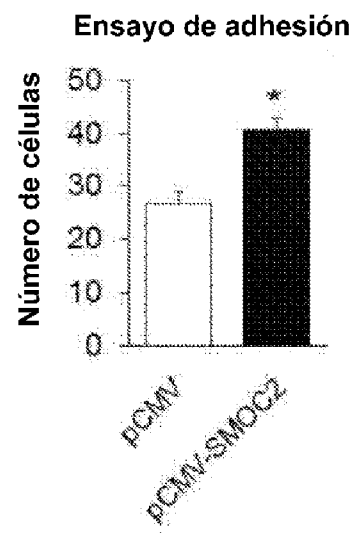


FIG. 13G

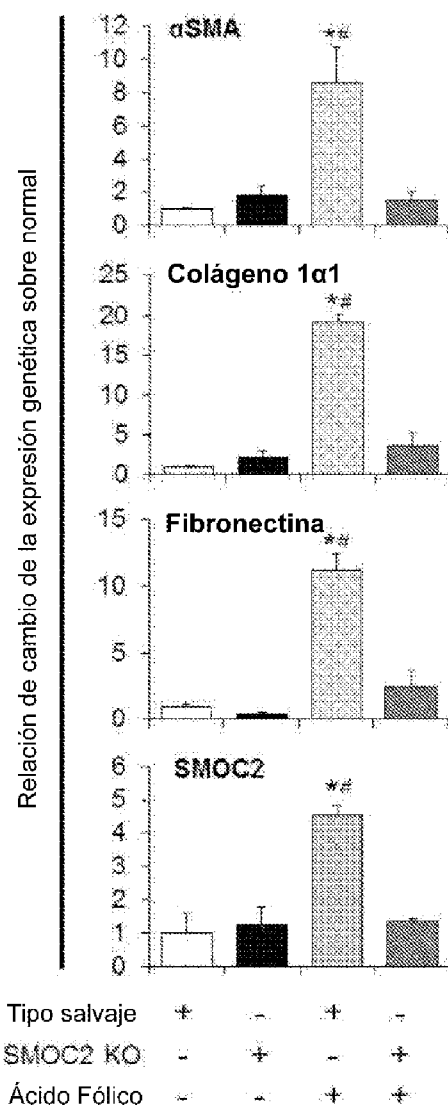


FIG. 14

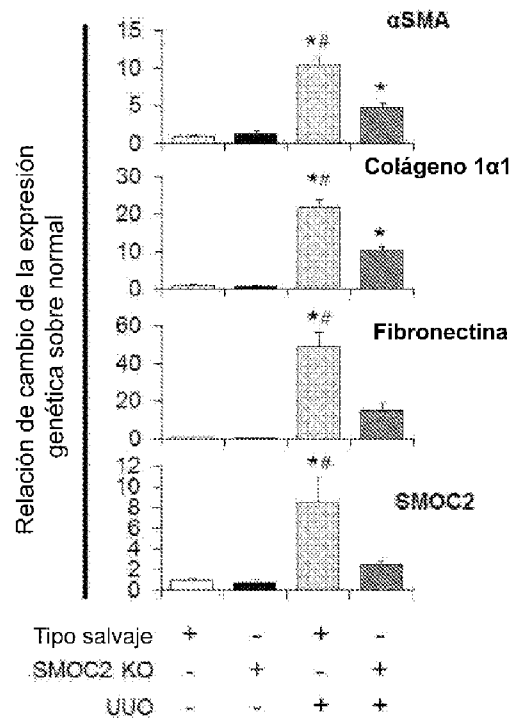


FIG. 15

Control	+	-	-	-	-
SMOC2 siRNA #13	-	+	-	-	-
SMOC2 siRNA #14	-	-	+	-	-
SMOC2 siRNA #15	-	-	-	+	-
SMOC2 siRNA #16	-	-	-	-	+

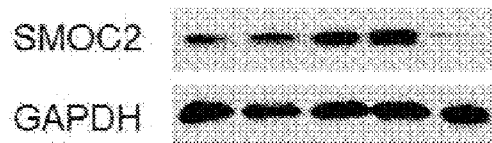


FIG. 16

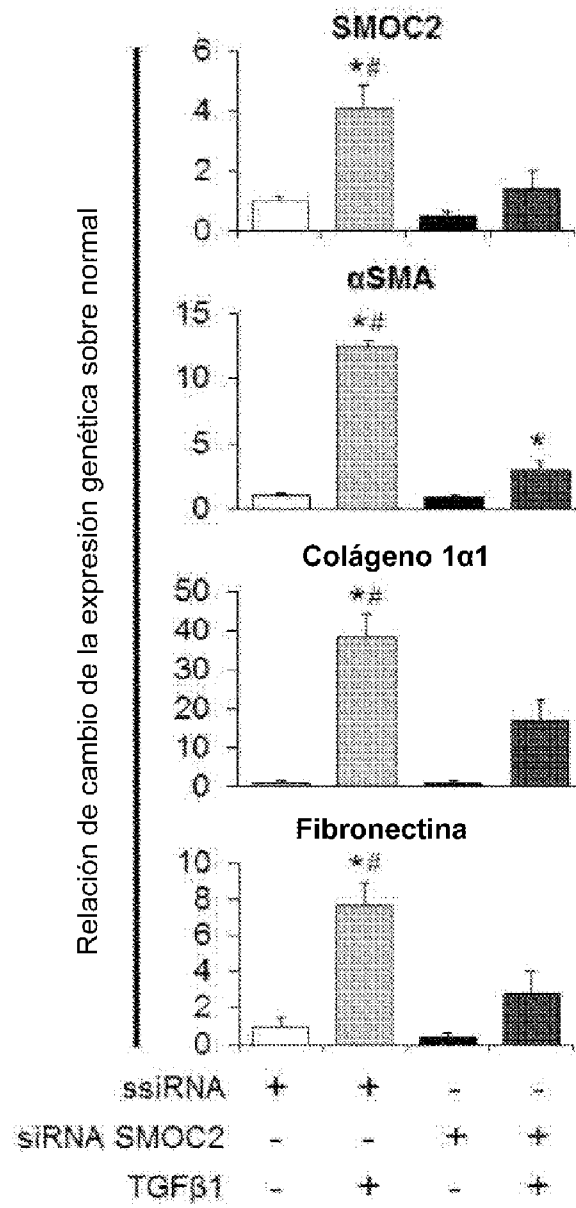


FIG. 17

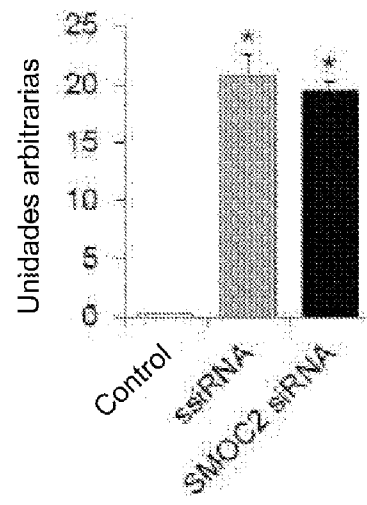


FIG. 18

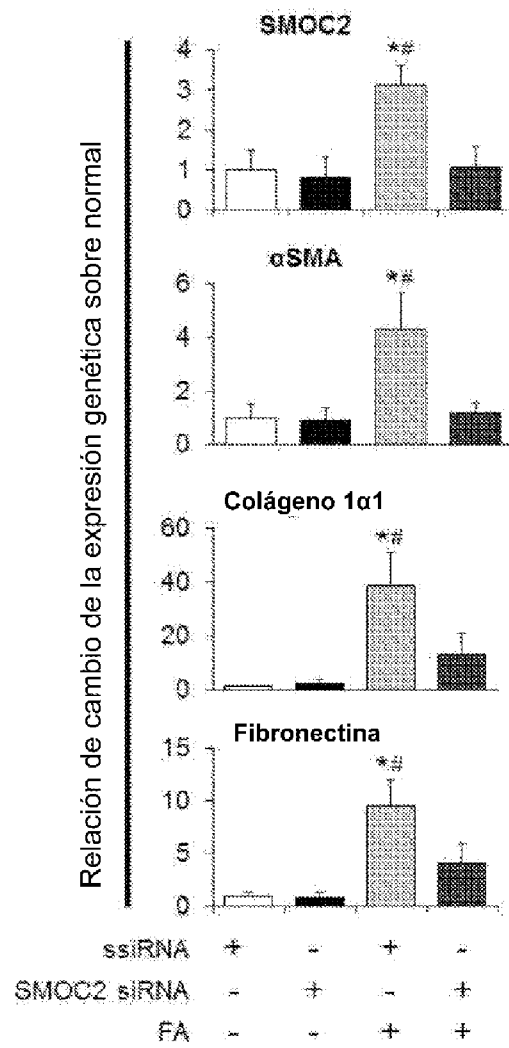


FIG. 19