

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 349 550**

21 Número de solicitud: 200802466

51 Int. Cl.:

**A61K 31/275** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **20.08.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**05.01.2011**

71 Solicitante/s: **Centro Nacional de Investigaciones  
Cardiovasculares (CNIC)** (Titular al 75 %)  
**Melchor Fernández Almagro, 3**  
**28029 Madrid, ES**  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
(CSIC)** (Titular al 25 %)

72 Inventor/es: **Strippoli, Raffaele;**  
**Pozo Barriuso, Miguel Ángel del y**  
**López Cabrera, Manuel**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Inhibidores de la MEK 1/2 para el tratamiento de la fibrosis peritoneal.**

57 Resumen:

Inhibidores de la MEK 1/2 para el tratamiento de la fibrosis peritoneal.

Fármacos útiles en la prevención y tratamiento de la fibrosis de la membrana peritoneal (opacificación peritoneal, síndrome del peritoneo bronceado, fibrosis mural y síndrome de peritonitis esclerosante) que se produce como consecuencia de una diálisis peritoneal a largo plazo, método de selección de estos fármacos, y método para la recolección de datos útiles en el diagnóstico de dicha enfermedad.

ES 2 349 550 A1

## DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la MEK 1/2 para el tratamiento de la fibrosis peritoneal.

5 La presente invención se engloba dentro del campo de la biología molecular, de la biotecnología, y de la medicina, y específicamente se refiere a la prevención y tratamiento de la fibrosis de la membrana peritoneal (opacificación peritoneal, síndrome del peritoneo bronceado, fibrosis mural y síndrome de peritonitis esclerosante) que se produce como consecuencia de una diálisis peritoneal a largo plazo. También se refiere a un método de selección de fármacos útiles en el tratamiento de la fibrosis peritoneal y a un método para la recolección de datos útiles en el diagnóstico de dicha enfermedad.

## Estado de la técnica anterior

15 La diálisis peritoneal (DP) es una alternativa a la hemodiálisis para el tratamiento de enfermedades renales en su último estadio. Durante estos procesos, la membrana peritoneal (MP) actúa como una barrera de permeabilidad a través de la cual tiene lugar la filtración y la difusión. La MP consiste en una capa simple de células mesoteliales (CM) cubriendo una región submesotelial compuesta de tejido conectivo y un pequeño número de fibroblastos, mastocitos, macrófagos y vasos sanguíneos. La exposición crónica a los estímulos exógenos de las soluciones de diálisis hiperosmóticas, hiperglucémicas y ácidas, así como episodios de peritonitis y hemoperitoneo, y otros factores endógenos (liberación de citoquinas proinflamatorias, menstruación retrógrada, migración transmural) puede causar inflamación aguda y crónica y dañar la MP, lo que progresivamente degenera en fibrosis (opacificación peritoneal, síndrome del peritoneo bronceado, fibrosis mural y síndrome de peritonitis esclerosante), angiogénesis y vasculopatía hialinizante, lo que conduce en grado extremo a la desmesotelización de la membrana peritoneal, modificando el intercambio de sustancias y conduciendo al abandono de la diálisis peritoneal.

25 La transición epitelio-mesénquima (TEM) se caracteriza por la adquisición por parte de células epiteliales de características mesenquimáticas que les permiten desprenderse de las células vecinas, reorganizar su citoesqueleto, degradar la lámina basal y la matriz extracelular subyacente, y adquirir la capacidad de migrar a través de esta última. Ejemplos de transiciones epitelio-mesénquimas son la formación del mesodermo a través de la línea primitiva, la diferenciación de la cresta neural, la disgregación del dermomiótomo o la formación del mesénquima valvuloseptal en los cojines endocárdicos, y es un mecanismo involucrado en la fibrosis tisular. Además, la TEM ha sido descrita como proceso fundamental en la progresión tumoral y en patologías inflamatorias crónicas que pueden afectar órganos como riñones, hígado, pulmón y el peritoneo de pacientes sometidos a diálisis peritoneal. En este caso, la TEM puede jugar un papel importante en el desarrollo y progresión de la fibrosis peritoneal, dando lugar a un fallo funcional de la membrana (Yanez-Mo *et al.*, 2003. *N Eng J Med* 2003; 348: 403-13; Margetts *et al.*, 2005. *J Am Soc Nephrol* 16: 425-36; Aroeira *et al.*, 2005. *Am J Kidney Dis* 2005; 46: 938-48).

40 La TEM en el peritoneo está unida a una disfunción de la membrana peritoneal, y su establecimiento limita la efectividad de la diálisis peritoneal. La regulación molecular de la TEM en el peritoneo es de interés, por tanto, desde el punto de vista clínico.

Entre los mecanismos moleculares implicados en la TEM se conoce que la vía Ras está implicada, tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, son necesarias distintas vías aguas abajo de Ras para llegar a una TEM completa. Así, en la fibrosis pulmonar, el desorden fibrótico pulmonar más común, parece que la vía de señales implicada en la TEM alveolar es dependiente de Smad2, puesto que existen estudios donde se describe que inhibidores de la MEK-1 y MEK-2, como PD98059 y U0126, han fracasado en revertir la modulación fenotípica de las células A549 inducida por TGF- $\beta$ 1 (Kasai *et al.*, 2005. *Respiratory Research* 2005, 6:56). En lo que respecta a la fibrosis peritoneal, se conoce que una de las principales causas de la misma, que sucede como consecuencia de la diálisis, es la elevada concentración de glucosa en el líquido de diálisis, En Ogawa *et al.*, 2001. *Kidney International*, 60: 996-1008 también emplean el PD98059 (2'-amino-3'-metoxiflavona) (20  $\mu$ mol/L, Calbiochem), un inhibidor específico de MEK, para determinar si la modificación de la actividad proteínquinasa tiene algún efecto sobre la *gap junctional intercellular communications* (GJIC) y/o Cx43, concluyendo que los inhibidores de MEK no restauran GJIC y no hay un cambio significativo en la fosforilación de Cx43 en presencia de estos inhibidores. Además, también parece que en la remodelación del citoesqueleto y en la formación de fibras de actina se encuentran implicados mayoritariamente genes independientes de la activación de ERK (Zavdil *et al.*, 2001. *PNAS* 98(12): 6686-6691)

Entre las citoquinas y factores de crecimiento producidos durante la inflamación peritoneal, el factor de crecimiento  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) se considera a la molécula clave en la génesis de la fibrosis peritoneal, puesto que elevados niveles de TGF- $\beta$ 1 en el dializado peritoneal se relacionan con peores resultados. Más aún, el tratamiento combinado con interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y TGF- $\beta$ 1 induce cambios bioquímicos y morfológicos en las células mesoteliales omentales que son reminiscentes de aquel que tiene lugar durante la TEM. Sin embargo, los mecanismos que controlan el establecimiento y la progresión de TEM parecen ser múltiples y específicos del tipo de célula. Así, uno de los reguladores es el factor de transcripción Snail1, un potente represor transcripcional de cadherina-E. La expresión de Snail1 integra una red compleja de señales intracelulares, incluyendo la quinasa unida a integrina (ILK), fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3-K) y las proteína quinasa activadas por mitógenos (MAP), GSK-3 $\beta$ , y el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Se ha demostrado recientemente que NF- $\kappa$ B juega un papel principal en la inducción de TEM en el modelo de célula cancerosa transformada por Ras (Huber *et al.* 2004. *J. Clin. Invest.* 114(4): 569-581). En células en estadio basal, NF- $\kappa$ B es complejado por el inhibidor de kappaB (I $\kappa$ B), el cual bajo activación es fosforilado y subsiguiente-

mente degradado, permitiendo la liberación y la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y la subsiguiente expresión de genes específicos.

5 Aunque la regulación molecular de TEM ha sido extensivamente estudiada en otros sistemas celulares, las vías de señales que subyacen en este proceso en CM aún no han sido descrito. Puesto que la TEM producida por CM es principal en el desarrollo de la fibrosis peritoneal y de la angiogénesis, y no existe un tratamiento efectivo para evitar la pérdida progresiva de la capacidad dialítica peritoneal en pacientes sometidos a DP. Dilucidar los elementos implicados en este proceso podría dar lugar a nuevas dianas terapéuticas que permitan establecer dichos tratamientos.

## 10 Descripción de la invención

15 Existe la necesidad de encontrar un tratamiento efectivo para evitar la pérdida progresiva de la capacidad dialítica peritoneal en pacientes sometidos a diálisis peritoneal. En la presente invención se describe como inhibidores de la MEK-1 y MEK-2 son capaces de revertir la TEM en células mesoteliales transdiferenciadas de pacientes peritoneales sometidos a diálisis peritoneal ambulatoria continua (DPAC).

20 Así, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende un agente modulador de la actividad de MEK 1/2 para la prevención y el tratamiento de la fibrosis peritoneal. Se refiere también al uso de una composición que comprende un agente modulador de la actividad de MEK 1 y/o MEK 2, de ahora en adelante composición de la invención, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la fibrosis peritoneal.

25 El término "MEK 1/2" ó "MEK 1" y "MEK 2", también llamadas en la literatura "MAPKK 1/2", "MEK1a", "MAPKK1", "MKK1a", "PRKMK1", "MAP kinase kinase 1" ó "y" ó "MAP2K2", "MAPKK2", "MEK2", "MKK2", "PRKMK2", "ERK activator kinase 2", "MAP kinase kinase 2" ó "FLJ26075", se refiere a una enzima Ser/Thr/Thr-quinasa que fosforila el enzima MAPK en sus residuos Thr y Tyr de la secuencia Thr-XTyr 185/187. A no ser que se indique lo contrario, cuando se utiliza en el presente documento el término "MEK 1/2" ó "MAPKK 1/2", se refiere tanto al gen como a la proteína (enzima) MEK 1 y/o MEK 2 humana.

30 Las dianas aguas abajo de MEK 1 identificadas hasta ahora son ERK1 y ERK2. Posteriormente a la fosforilación, las ERK activan dianas nucleares, de membrana, citosólicas y del citoesqueleto, que median múltiples cascadas de señales.

35 En el contexto de la presente invención, MEK 1 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína MEK 1, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

40 a) moléculas de ácido nucléico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,

b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

45 d) moléculas de ácido nucléico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1.

en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucléicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína MEK 1.

50 MEK 2 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína MEK 2, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

55 a) moléculas de ácido nucléico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,

b) moléculas de ácido nucléico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucléico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

60 d) moléculas de ácido nucléico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2.

65 en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucléicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína MEK 2.

La secuencia de la proteína MEK 2 es substancialmente homologa a la de MEK 1, excepto en su parte terminal amino, y por una región rica en prolina insertada entre los subdominios de quinasa conservados 9 y 10.

## ES 2 349 550 A1

El término “que modula la actividad” como se usa aquí, se refiere principalmente a que inhibe (disminuye) el nivel de actividad de las enzimas MEK 1/2 en una célula. La actividad de MEK 1/2 puede ser modulada por la modificación de los niveles y/o de la actividad de MEK 1/2, o por la modificación de los niveles a los que se transcriben los genes que codifican MEK 1 y MEK 2 tal que los niveles de actividad de las proteínas MEK 1 y MEK 2 en la célula es modulada. Los agentes moduladores pueden ser también agonistas (sustancias que son capaces de unirse a un receptor y provocar una respuesta en la célula, preferiblemente una disminución de la actividad de MEK 1 y/o MEK 2), como antagonistas (sustancias que no solamente no activan el receptor, sino que en realidad bloquea su activación por los agonistas). En el contexto de la presente invención, la *inhibición* es la forma preferida de modulación.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, los agentes moduladores comprendidos en la composición de la invención se seleccionan de una lista que comprende:

- a) una molécula orgánica,
- b) una molécula de ARN,
- c) un oligonucleótido antisentido,
- d) un anticuerpo, o
- e) una ribozima.

En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, el agente modulador de la composición inhibe específicamente la actividad de MEK 1.

Un experto en la materia podría preparar moléculas orgánicas que pueden unirse específicamente a la MEK 1/2 sin unirse a otros polipéptidos o proteínas. Las moléculas orgánicas tendrán preferiblemente un peso de 100 a 20.000 daltons, más preferiblemente 500 a 15.000 daltons, y más preferiblemente 1000 a 10.000 daltons. Librerías de moléculas orgánicas se encuentran disponibles comercialmente. La vía de administración puede ser, sin limitarse a estas, intraperitoneal, intratecal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmica. Entre las moléculas orgánicas moduladoras de la actividad de MEK 1/2 se encuentran, pero sin limitarnos, los inhibidores de la MEK de primera generación, como el U0126, y otros como el PD98059, CI-1040 (PD 184352), PD184161, Ro092210, L783277, LLZ16402, Anthrax LF, ARRY-438162 y otros inhibidores oralmente biodisponibles AZD6244 (ARRY-142886), PD0325901 y RDEA119. Por tanto, otra realización preferida de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la fibrosis peritoneal, donde el agente modulador se selecciona de la lista que comprende: U0126, PD98059, CI-1040 (PD 184352), PD184161, Ro092210, L783277, LLZ16402, Anthrax LF, ARRY-438162, AZD6244 (ARRY-142886), PD0325901, RDEA119 o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente, el agente modulador es U0126 y/o PD98059.

Recientemente, con el desarrollo de la tecnología antisentido, secuencias de nucleótidos específicamente complementarios a una determinada secuencia de ADN o ARN, podrían formar complejos y bloquear la transcripción o traducción. Así, con el progreso del silenciamiento génico post-transcripcional, y en particular del ARN de interferencia (RNA interferente o RNAi), se han desarrollado herramientas que permiten la inhibición específica de la expresión de un gen. La inhibición de la expresión de las proteínas MEK 1/2 constituiría por ende la inhibición de su actividad biológica, y en concreto, de la actividad que está contribuyendo a la fibrosis peritoneal (opacificación peritoneal, síndrome del peritoneo bronceado, fibrosis mural y síndrome de peritonitis esclerosante), angiogénesis y vasculopatía hialinizante que se produce como consecuencia de la diálisis peritoneal.

Por “polinucleótidos antisentido” se entienden cadenas de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos que pueden inhibir MEK 1 y/o MEK 2 por uno de estos tres mecanismos:

1- Interfiriendo la transcripción, al hibridar en el gen estructural o en una región regulatoria del gen que codifica para MEK 1 ó MEK 2. Puesto que la transcripción o expresión es bloqueada de manera efectiva por la hibridación del oligonucleótido antisentido con el ADN, disminuye la producción de MEK 1 ó MEK 2.

2- La unión del oligonucleótido antisentido en el citoplasma con el mRNA, interfiriendo con la formación de la construcción de traducción propiamente dicha, inhibiendo la traducción de mRNA a la proteína.

3- La formación de un mRNA - antisentido dúplex que permite una rápida degradación del mRNA dúplex por ARNasas (como ARNasa H). Esto da lugar a una menor producción de MEK 1 y/o MEK 2.

Oligonucleótidos antisentido capaces de modular la actividad de MEK 1 ó MEK 2 son conocidas en el estado de la técnica. Por ejemplo, y sin limitarnos, podría ser una secuencia de ribonucleótidos o ARN que pertenece al denominado siRNA (*small interfering RNA*), ARN pequeño de interferencia o ARN de silenciamiento, capaz de inhibir la expresión genética de la proteína MEK 1 ó MEK 2. En el contexto de la presente memoria se entiende como “siRNA” (*small interfering RNA* ó ARN pequeño de interferencia) una clase de ARN de doble cadena de 19 a 25 nucleótidos de largo, y más preferentemente entre 21 y 23 nucleótidos, que está involucrado en la ruta de la interferencia de ARN, donde el siRNA interfiere la expresión de un gen específico. En la presente invención, este gen específico es el MEK 1 ó MEK

2. Así, la presente invención incluye a título ilustrativo, pero sin limitarse, los nucleótidos antisentido recogidos en la patente US 6,096,543 (que corresponden a las secuencias SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 42), y los siRNA recogidos en Ussar & Voss, 2004. *J Biol Chem* 279(42): 43861-43869 (SEQ ID NO: 43 a SEQ ID NO: 46); Sahin *et al.*, 2007. *PNAS* 104(16): 6579-6584 (SEQ ID NO: 47 a SEQ ID NO: 50). Por tanto, en otra realización preferida el agente modulador es un oligonucleótido antisentido que se selecciona de la lista que comprende: la secuencia SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; SEQ ID NO: 30; SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46; SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 49; SEQ ID NO: 50 o cualquiera de sus combinaciones. También podría ser cualquier siRNA capaz de hibridar una molécula de ácido nucleico que codifique la proteína MEK 1 y/o MEK 2 humana que se recoge en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. También podrían ser una construcción de ARN que al menos contenga una cualquiera de las secuencias de nucleótidos posibles de siRNA capaces de inhibir la expresión de MEK 1 y/o MEK 2, y sin perjuicio de que adicionalmente formen parte de la presente invención cualquiera de las secuencias y construcciones de RNA de la invención anteriormente descritas que sean objeto de modificaciones, preferentemente químicas, que conduzcan a una mayor estabilidad frente a la acción de ribonucleasas y con ello a una mayor eficiencia. Sin que dichas modificaciones supongan la alteración de su mecanismo de acción, que es la unión específica al complejo RISC (RNA-induced silencing complex), activándolo y manifestando una actividad helicasa que separa las dos hebras dejando solo la hebra antisentido asociada al complejo. El complejo ribonucleoprotéico resultante se une al mRNA diana (ARN mensajero de MEK 1 ó MEK 2, que se recoge en las SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4). Si la complementariedad no es perfecta, RISC queda asociado al mensajero y se atenúa la traducción. Pero si es perfecta, RISC actúa como RNasa, cortando al mensajero y quedando libre para repetir el proceso.

Adicionalmente resulta evidente para un experto en la materia que una gran cantidad de polinucleótidos de mRNA pueden traducirse a MEK 1 ó MEK 2 como consecuencia, por ejemplo, de que el código genético es degenerado. Cualquier siRNA capaz de inhibir la traducción de estos mRNA también forman parte de la invención.

La preparación de las secuencias de siRNA de la invención o de las construcciones de RNA de la invención serían evidentes para un experto en la materia, y se podría llevar a cabo por síntesis química, lo cual permite además la incorporación de modificaciones químicas tanto en los distintos nucleótidos del producto como la incorporación de otros compuestos químicos en cualquiera de los extremos. Por otro lado, la síntesis también podría realizarse enzimáticamente utilizando cualquiera de las RNA polimerasas disponibles. La síntesis enzimática también permite alguna modificación química de los productos o RNAs inhibidores.

El diseño de las secuencias de nucleótidos del siRNA de la invención también sería evidente para un experto en la materia. Así, se podría realizar mediante un diseño aleatorio en el que se seleccionen 19-25 bases del mRNA diana sin tener en cuenta la secuencia o la información posicional que tiene en el transcrito. Otra alternativa no limitativa de la presente invención sería el diseño convencional mediante parámetros simples desarrollados por los pioneros de la técnica (Calipel *et al.*, 2003. *J Biol Chem.* 278(43): 42409-42418) completados con un análisis BLAST de nucleótidos. Otra posibilidad podría ser un diseño racional, en el que se emplee un procedimiento informático dirigido a identificar las dianas óptimas de siRNA en un mRNA. Las secuencias diana se analizan en grupos de 19 nucleótidos a la vez y se identifican las que tienen mejores características en función de un algoritmo que incorpora un gran número de parámetros termodinámicos y de secuencia.

También podría formar parte de la composición de la invención una construcción genética de ADN, la cual dirigiría la transcripción *in vitro* o intracelular de la secuencia siRNA o construcción de ARN de la invención, y que comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias: a) secuencia de nucleótidos de ADN, preferentemente de doble cadena, que comprende, al menos, la secuencia codificante del siRNA de la invención o de la construcción de ARN de la invención para su transcripción, o, b) secuencia de nucleótidos de ADN, preferentemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia codificante de la secuencia de ARN de la invención operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc... para su uso en aquellos contextos patológicos en los que MEK 1 ó MEK 2 está contribuyendo a la fibrosis peritoneal (opacificación peritoneal, síndrome del peritoneo bronceado, fibrosis mural y síndrome de peritonitis esclerosante), angiogénesis y vasculopatía hialinizante que se produce como consecuencia de la diálisis peritoneal. Múltiples de estas construcciones, sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (Sambrook *et al.* 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

Las composiciones de la presente invención permiten la transfección del siRNA de la invención al interior de una célula, *in vivo* o *in vitro*. La transfección se podría llevar a cabo, pero sin limitarnos a, transfección directa o vectores que faciliten el acceso del siRNA al interior de la célula. Así, ejemplos de estos vectores son, sin limitarse a, retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus del *Herpes simplex*, plásmidos de DNA no virales, liposomas catiónicos y conjugados moleculares. Así, por ejemplo, los siRNA de la presente invención, así como ARN

## ES 2 349 550 A1

o ADN precursores de estos siRNA, pueden conjugarse con péptidos de liberación u otros compuestos para favorecer el transporte de estos siRNA al interior de la célula.

5 Los anticuerpos capaces de unirse a las proteínas MEK 1 y/ó MEK 2 pueden ser empleados para inhibir la actividad de dichas proteínas. Tales anticuerpos están disponibles en el estado de la técnica (como por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, los anticuerpos comercializados por Santa Cruz Biotechnology, Inc. MEK-1 (H-8): sc-6250; MEK-1 (C-18): sc-219, MEK-1 (4A5): sc-56925; MEK-1 (263P15): sc-56924; MEK-1 (10B1): sc-81477; p-MEK-1 (Ser 298)-R: sc-30635-R; MEK-1/2 (12-B): sc-436; p-MEK-1/2 (Ser 218/Ser 222): sc-7995; MEK-1/2 (9G3): sc-81504; p-MEK-1/2 (7E10): sc-81503; p-MEK-1/2 (Thr 291): sc-101733; MEK-2 (8E8): sc-81473; MEK-2 (A-1): sc-13159; MEK-2 (C-16): sc-525; MEK-2 (N-20): sc-524; p-MEK-2 (Thr 394): sc-101734; los anticuerpos comercializados por comercializados por Sigma-Aldrich M5795; M7683; M2568; M5193; M4943; M7194 y que reconocen como antígenos péptidos que corresponden a MEK 1 y/ó MEK 2 humana. Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, podrían ser capaces de inhibir la actividad de la proteína MEK 1 y/ó MEK 2 que contribuye a la fibrosis peritoneal (opacificación peritoneal, síndrome del peritoneo bronceado, fibrosis mural y síndrome de peritonitis esclerosante), angiogénesis y vasculopatía hialinizante que se produce como consecuencia de la diálisis peritoneal. Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, el agente modulador se selecciona de entre los anteriores anticuerpos, o fragmentos de los mismos, o cualquiera de sus combinaciones. Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epitopos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de proteínas MEK 1 y/ó MEK 2 y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores.

25 El término “anticuerpo” tal como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con las proteínas MEK 1 y/ó MEK 2. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas, incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')<sub>2</sub> que pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina. Puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal.

30 Un “anticuerpo o polipéptido recombinante” (rAc) es uno que ha sido producido en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del polipéptido, o produce el polipéptido como resultado de la recombinación homologa.

35 Estos rAc se pueden expresar y dirigir hacia subcompartimentos celulares específicos cuando se les incorpora las secuencias apropiadas para el tráfico intracelular. Estos anticuerpos se denominan *intrabodies*, y han demostrado su eficacia no sólo para desviar proteínas de su compartimento habitual o bloquear interacciones entre proteínas implicadas en vías de señalización, sino también para activar proteínas intracelulares.

40 También forman parte de la invención las construcciones genéticas de DNA capaces de transcribirse a un péptido, anticuerpo o fragmento de anticuerpo, para su uso en el tratamiento de la fibrosis peritoneal (opacificación peritoneal, síndrome del peritoneo bronceado, fibrosis mural y síndrome de peritonitis esclerosante), angiogénesis y vasculopatía hialinizante que se produce como consecuencia de la diálisis peritoneal. Dicha construcción genética de DNA dirigiría la transcripción *in vitro* o intracelular de la secuencia del anticuerpo o fragmento del mismo, y comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias: a) secuencia de nucleótidos de DNA, preferentemente de doble cadena, que comprende, al menos, la secuencia codificante del anticuerpo de la invención o del fragmento de anticuerpo de la invención para su transcripción *in vitro*, o intracelular, b) secuencia de nucleótidos de DNA, preferentemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia codificante de la secuencia de anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), etc... para su uso en la prevención o el tratamiento de la fibrosis peritoneal (opacificación peritoneal, síndrome del peritoneo bronceado, fibrosis mural y síndrome de peritonitis esclerosante), angiogénesis y vasculopatía hialinizante que se produce como consecuencia de la diálisis peritoneal.

55 Un “ribozima” tal y como se entiende en la presente invención, se refiere a un polinucleótido catalítico (típicamente RNA), que puede construirse para reconocer específicamente, por hibridación, un mRNA y fragmentarlo o eliminar su expresión. Las ribozimas pueden introducirse en la célula como moléculas de RNA catalíticas o como construcciones genéticas que se expresan a moléculas catalíticas de RNA.

60 En esta memoria se define como “fibrosis peritoneal” a la sustitución del peritoneo por tejido fibroso secundario a peritonitis. Es característico en pacientes en programas de diálisis peritoneal que presentan peritonitis de repetición y pérdida de la eficacia dializante del peritoneo. Tiene un carácter progresivo y se distinguen cuatro síndromes: 1) opacificación y pérdida del brillo; 2) peritoneo bronceado con ausencia de mesotelio y presencia de colágeno hialinizado; 3) fibrosis mural con manifestaciones clínicas; 4) peritonitis esclerosante encapsulante, con intensa fibrosis periintestinal que impide su normal funcionamiento.

## ES 2 349 550 A1

“Tratamiento” se refiere a tanto el tratamiento terapéutico como el profiláctico o medidas preventivas. Aquellas necesarias de tratamiento incluyen las ya asociadas con alteraciones así como en aquellas en las que se previene la alteración. Una “alteración” es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con la composición de la invención, tal y como se describe en el presente documento.

La composición proporcionada por esta invención puede ser facilitada por cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. Los agentes moduladores de la actividad de MEK 1 y/o MEK 2 de dichas composiciones se encuentran en una cantidad terapéuticamente efectiva. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de agentes moduladores (o construcciones genéticas que permitan su expresión intracelular) calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos agentes (y construcciones) y el efecto terapéutico a conseguir. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

La invención proporciona métodos para identificar compuestos que pueden ser usados para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la actividad de MEK 1/2, y en concreto aquellos útiles para el tratamiento de la fibrosis peritoneal. Estos métodos permiten la identificación de candidatos, compuestos a ensayar o agentes (por ejemplo, péptidos, peptidomiméticos, moléculas orgánicas, oligonucleótidos antisentido o otras moléculas) que pueden unirse a MEK 1 y/o MEK 2, y tener un efecto inhibidor de la actividad biológica de MEK 1 y/o MEK 2 o de su expresión, y así determinar si esos compuestos tendrían un efecto sobre las enfermedades en las que MEK 1 y/o MEK 2 está implicado, y en concreto la fibrosis peritoneal (opacificación peritoneal, síndrome del peritoneo bronceado, fibrosis mural y síndrome de peritonitis esclerosante), angiogénesis y vasculopatía hialinizante que se produce como consecuencia de la diálisis peritoneal.

Los ensayos para identificar estas moléculas, compuestos o agentes que modulan la actividad de MEK 1 y/o MEK 2 pueden emplear células que expresan MEK 1 y/o MEK 2, o en ensayos con las enzimas MEK 1 y/o MEK 2 aisladas (o con sus variantes, como fragmentos biológicamente activos o proteínas de fusión que incluyen una porción o parte de MEK 1 y/o MEK 2).

Así, otro aspecto de la invención consiste en un método de selección de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de la fibrosis peritoneal que comprende:

- a) poner en contacto el compuesto a analizar con el polinucleótido y/o polipéptido MEK 1 y/o MEK 2,
- b) detectar la unión de dicho compuesto a analizar con el polinucleótido y/o polipéptido MEK 1 y/o MEK 2.

Los compuestos que se unen al polipéptido MEK 1 y/o MEK 2 se identificarían como agentes terapéuticos potenciales frente a la fibrosis peritoneal (opacificación peritoneal, síndrome del peritoneo bronceado, fibrosis mural y síndrome de peritonitis esclerosante), angiogénesis y vasculopatía hialinizante que se produce como consecuencia de la diálisis peritoneal.

Como se ha dicho, estos ensayos pueden implicar el polipéptido completo MEK 1 y/o MEK 2, un fragmento biológicamente activo del mismo, o una proteína de fusión que implique toda o una porción del polipéptido MEK 1 y/o MEK 2. Determinar la capacidad de un compuesto para modular la actividad de MEK 1 y/o MEK 2 puede realizarse, por ejemplo, determinando la capacidad de MEK 1 y/o MEK 2 de unirse o interactuar con una molécula diana de dicho compuesto, de manera directa o indirecta. Pueden ser también ensayos de actividad, midiendo de manera directa o indirecta la actividad de MEK 1 y/o MEK 2. También puede ser un ensayo de expresión, determinando de manera directa o indirecta la expresión del mRNA de MEK 1 y/o MEK 2 o de la proteína MEK 1 y/o MEK 2. Estos ensayos también pueden combinarse con un ensayo *in vivo* midiendo el efecto de un compuesto test sobre los síntomas de enfermedades relacionadas con MEK 1 y/o MEK 2, y en concreto la fibrosis peritoneal (por ejemplo, pero sin limitarse, sobre modelos animales u otros sistemas modelo conocidos en la técnica).

Los compuestos a testar empleados en el método de selección de agentes terapéuticos no se limitan a moléculas orgánicas de bajo peso molecular, sino también proteínas (incluyendo anticuerpos), péptidos, oligonucleótidos, etc. y pueden ser naturales y/o sintéticos.

Por ejemplo, anticuerpos capaces de unirse a un epitopo de MEK 1 y/o MEK 2, que pueden ser empleados terapéuticamente, como se ha expuesto anteriormente, pueden emplearse también en ensayos inmunohistoquímicos, como Western blots, ELISAs, radioinmunoensayos, ensayos de inmunoprecipitación, o otros ensayos inmunohistoquímicos conocidos en el estado de la técnica. Los polipéptidos MEK 1 y/o MEK 2 pueden emplearse para inmunizar a un animal, para obtener anticuerpos policlonales. También se pueden preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas que permiten la producción de anticuerpos por líneas celulares en cultivo, entre las que se incluyen, pero sin limitarse, hibridomas, hibridomas de células B humanas. Técnicas para producir anticuerpos quiméricos, humanizados o sintéticos son conocidas en el estado de la técnica.

Los agentes terapéuticos identificados por el método de selección aquí descrito pueden ser usados en un modelo animal o de otro tipo para determinar el mecanismo de acción de dicho agente. Más aún, los agentes terapéuticos seleccionados por el método aquí descrito se emplearían en el tratamiento de la fibrosis peritoneal (opacificación peritoneal, síndrome del peritoneo bronceado, fibrosis mural y síndrome de peritonitis esclerosante), angiogénesis y vasculopatía hialinizante que se produce como consecuencia de la diálisis peritoneal.

En otro aspecto de la invención se describe un método de selección de agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de fibrosis peritoneal que comprende:

- a) determinar la actividad de MEK 1 y/o MEK 2 a una concentración establecida del compuesto a analizar o en ausencia de dicho compuesto,
- b) determinar la actividad de MEK 1 y/o MEK 2 a una concentración del compuesto a analizar diferente de la de a).

Más preferiblemente, la determinación de la actividad de MEK 1 y/o MEK 2 se realiza a una concentración establecida del compuesto a analizar. Compuestos que den lugar a una actividad diferente de MEK 1 y/o MEK 2 se identificarían como agentes terapéuticos potenciales frente a la fibrosis peritoneal (opacificación peritoneal, síndrome del peritoneo bronceado, fibrosis mural y síndrome de peritonitis esclerosante), angiogénesis y vasculopatía hialinizante que se produce como consecuencia de la diálisis peritoneal.

Las enfermedades en las que la alteración de la actividad de MEK 1 y/o MEK 2 puede ser diagnóstica, y en concreto la fibrosis peritoneal, puede ser detectadas midiendo la cantidad de ácidos nucleicos (ADN y/o ARN y/o mRNA) que codifican para MEK 1 y/o MEK 2, o la cantidad de proteína MEK 1 y/o MEK 2 que se expresa, en comparación con células normales. La detección de los oligonucleótidos puede hacerse por métodos bien conocidos en el estado de la técnica (como por ejemplo, pero sin limitarse, sondas con nucleótidos marcados, hibridación ADN-ADN ó ADN-ARN, amplificación por PCR empleando nucleótidos marcados, la RT-PCR). Procedimientos para detectar la expresión de la proteína MEK 1 y/o MEK 2 también son bien conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo anticuerpos poli o monoclonales, ELISA, radioinmunoensayo (RIA), y FACS (*fluorescence activated cell sorting*).

Por tanto, en otro aspecto de la invención se describe un método para la recolección de datos útiles en el diagnóstico y/o pronóstico de la fibrosis peritoneal que comprende:

- a) determinar la expresión de MEK 1 y/o MEK 2 en una muestra extraída de un mamífero,
- b) comparar los valores de la expresión de MEK 1 y/o MEK 2 obtenidos en a) con los valores estándar en mamíferos sanos o enfermos.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxiribonucleótidos.

Los términos “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### Breve descripción de las figuras

Fig. 1. *Células mesoteliales derivadas del omento experimentan TEM bajo la exposición del efluente de la peritonitis*, A. Fotomicrografías de las monocapas confluentes de las células mesoteliales humanas omentales primarias no tratadas (NT) o tratadas durante 72 horas con el efluente peritoneal (diluido 1:1 con el medio de cultivo) de un paciente sometido a diálisis peritoneal que a sufrido peritonitis. B, Inmunofluorescencia confocal (rojo) de células mesoteliales tratadas y no tratadas teñidas con anticuerpos monoclonales contra pan-citoqueratina (72 horas de estimulación). El núcleo fue teñido con Hoechst 33342 (azul). C, Western blots mostrando la expresión de cadherina E y fibronectina en los lisados celulares totales de las células mesoteliales tratadas como se indica a las 1, 24 o 48 horas. La detección de la expresión de  $\alpha$ -tubulina se utilizó como control. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

Fig. 2. *Células mesoteliales derivadas del omento experimentan TEM bajo la estimulación de TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$* . A, Fotomicrografías de las monocapas confluentes de las células mesoteliales humanas omentales primarias no tratadas (NT) o tratadas con TGF- $\beta$ 1 (0.5 ng/ml) en combinación con IL-1 $\beta$  (2 ng/ml) durante 24 horas (T/I). B, Inmunofluorescencia confocal (rojo) de células mesoteliales tratadas y no tratadas teñidas con anticuerpos monoclonales contra cadherina E (24 horas de estimulación) y con pan-citoqueratina (56 horas de estimulación). El núcleo fue teñido con Hoechst 33342 (azul). C, Western blots mostrando la expresión de cadherina E, cadherina N y fibronectina en los

lisados celulares totales de las células mesoteliales tratadas con TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$  durante 24 horas y 48 horas. La detección de la expresión de  $\alpha$ -tubulina se utilizó como control. Los datos son representativos de más de 10 experimentos independientes.

5 Fig. 3. *La translocación nuclear de NF- $\kappa$ B es inhibida por la expresión del super represor I $\kappa$ B.* A, Inmunofluorescencia confocal de la expresión y localización de NF- $\kappa$ B. CM peritoneales humanas primarias fueron co-estimuladas con TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$  durante los tiempos indicados; NT, controles no tratados. Células fijadas y permeabilizadas se tiñeron con un anticuerpo policlonal contra p65 NF- $\kappa$ B. El histograma muestra las intensidades medias de fluorescencia de la tinción nuclear de NF- $\kappa$ B, cuantificadas usando el software LAS-AS de Leica. Las barras representan SEM. Se analizaron un total de 50 células por condición; AU: unidades arbitrarias. B, CM peritoneales humanas primarias estimuladas con el efluente de la peritonitis o el medio de control fueron analizadas como en A. C, Células mesoteliales omentales primarias fueron infectadas con el retrovirus etiquetado con Cop Green codificando el super represor I $\kappa$ B (I $\kappa$ B, paneles inferiores) o con el virus - vacío etiquetado con Cop Green (vector vacío, paneles superiores). Las células fueron posteriormente co-estimuladas con TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$  durante 30 minutos. Las células fijadas y permeabilizadas fueron teñidas para p65 NF- $\kappa$ B (amarillo en la imagen superpuesta). La fluorescencia verde indica células infectadas. La tecnología espectral confocal permite la discriminación entre la fluorescencia amarilla y verde emitida. Las imágenes superpuestas muestran las tinciones Hoechst 33342, anti-NF- $\kappa$ B y Cop green. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

20 Fig. 4. *La regulación a la baja de los marcadores epiteliales en las células mesoteliales estimuladas por citoquinas requiere la señal activadora de NF- $\kappa$ B.* A, Western blots mostrando la expresión de cadherina E y I $\kappa$ B en el lisado celular total de las células mesoteliales. Las células mesoteliales omentales primarias fueron infectadas con el retrovirus Cop Green-tagged codificando el super represor I $\kappa$ B (I $\kappa$ B) o con el virus vacío etiquetado con Cop Green, y estimuladas durante 24 horas con TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$ , como se ha indicado (T/I); NT, células no tratadas. La expresión de  $\alpha$ -tubulina se utilizó como control. El histograma muestra los ratios de intensidad de banda cadherina E/ $\alpha$ -tubulina de un experimento representativo. B, Efecto de la inhibición de NF- $\kappa$ B en la expresión del mRNA de cadherina E en células mesoteliales. Células mesoteliales MeT-5A se infectaron como se ha descrito anteriormente, con el retrovirus codificando el super represor I $\kappa$ B (I $\kappa$ B), o con el plásmido control vacío (CopG). Los cultivos de MeT-5A fueron seleccionados tras la infección mediante fluorescencia verde para obtener cultivos casi puros de células infectadas. Los cultivos fueron dejados sin tratar (NT, barras grises) o co-estimuladas durante 24 horas con TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$  (barras negras), y se llevó a cabo una RT-PCR cuantitativa del ARN total. Los niveles de mRNA de la histona H3 fueron usados para la normalización. Las barras representan las medias  $\pm$  SEM de las determinaciones de 5 experimentos independientes. C, Análisis por inmunofluorescencia confocal de la expresión de citoqueratinas. Las células infectadas y estimuladas como en A fueron fijadas, permeabilizadas, y teñidas con un anticuerpo monoclonal contra pancitoqueratina. Verde, fluorescencia Cop Green.

Fig. 5. *ERK controla la regulación a la baja de cadherina E y citoqueratina durante la TEM de las células mesoteliales estimuladas por citoquinas.* A, Western blot mostrando la expresión de ERK fosforilada (activa) (parte superior) en el lisado celular total de las células mesoteliales. CM omentales primarias fueron dejadas sin tratar (NT) o co-estimuladas con TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$  por el tiempo indicado (T/I). Como control, las muestras fueron probadas para la expresión total de ERK (parte inferior). B, CM omentales primarias incubadas durante 24 horas en fluido de diálisis (D), efluente no procedente de peritonitis (E) o efluente procedente de peritonitis (P) fueron analizadas como en A. C, Western blot mostrando la expresión de cadherina E y ERK fosforilada (activa) en el lisado de células mesoteliales total. Células mesoteliales omentales fueron pretratadas con DMSO o U0126 (20  $\mu$ m) y tratadas durante 24 horas con TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$  como se ha indicado. La detección de la expresión total de ERK fue empleada como control. D, análisis por inmunofluorescencia confocal de la expresión de citoqueratina. E, efecto de la inhibición de ERK en la expresión del mRNA de cadherina E en células mesoteliales. Las células fueron pretratadas con DMSO (barras grises) o U0126 (barras negras) y co-estimuladas durante los tiempos indicados con TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$  (T/I); NT, controles no-estimulados. Se llevó a cabo una RT-PCR cuantitativa del ARN total. Los niveles de mRNA de la histona H3 se usaron para la normalización. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de las determinaciones por duplicado en tres experimentos independientes.

Fig. 6. *ERK controla la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y la actividad transcripcional inducida por la estimulación de TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$  en las células mesoteliales.* A, Análisis por inmunofluorescencia confocal de la expresión y localización de NF- $\kappa$ B. Células mesoteliales omentales fueron pretratadas con DMSO o U0126 (20  $\mu$ m) y co-estimuladas durante los tiempos indicados con TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$ ; NT, no tratadas. Células fijadas y permeabilizadas fueron teñidas con un anticuerpo policlonal contra p65 NF- $\kappa$ B. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes representativos. B, efecto de la inhibición de ERK en la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B. Las células MeT-5A fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido reportero KBF-luc junto con la luciferasa Renilla. Las células fueron pretratadas como se ha indicado con U0126 (20  $\mu$ m) y no tratadas (NT, barras grises) o co-estimuladas por los tiempos indicados con TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$  (T/I, barras negras). Las barras representan la media  $\pm$  SEM de las determinaciones de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. P<0.05 comparado con las células tratadas con DMSO. C, Células mesoteliales omentales fueron pretratadas con DMSO o U0126 (20  $\mu$ m) y tratadas como se ha indicado. Se llevó a cabo una RT-PCR cualitativa con primers específicos para COX-2 e Histona 3.

Fig. 7. *ERK y NF- $\kappa$ B controla la expresión de Snail1 inducida por la coestimulación de TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$  en células mesoteliales.* A, Efecto de la inhibición de la expresión del mRNA de Snail1 en células mesoteliales. Células mesoteliales omentales fueron pretratadas con DMSO (barras grises) o 20  $\mu$ m de U0126 (barras negras) y co-estimuladas

con TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$  (T/I); NT, no tratadas. Se llevó a cabo la RT-PCR cuantitativa del mRNA total. La expresión del mRNA de la Histona 3 fue usada para la normalización. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de las determinaciones de tres experimentos independientes. B, efecto de la inhibición de ERK en la inmunofluorescencia de la proteína Snail1. Células mesoteliales omentales fueron pretratadas con DMSO o U0126 (20  $\mu$ m) y tratadas como se ha indicado durante 24 horas. LiCl (40 mM) y MG132 (10  $\mu$ m) fueron añadidas a las células 4 horas antes del final de la estimulación. Las células fueron fijadas, permeabilizadas, teñidas con un anticuerpo policlonal contra Snail1 y sometidas a análisis de microscopía confocal. Los paneles muestran la tinción del núcleo celular con Hoechst 33342 (nuclei) y la expresión de Snail1 teñida por inmunofluorescencia. Los resultados mostrados son de tres experimentos representativos independientes. C, efecto de la inhibición de NF- $\kappa$ B en la expresión de mRNA de Snail1 en células mesoteliales. Cultivos del *omentum* o de la línea de células mesoteliales MeT-5A fueron infectadas con el retrovirus codificando el super represor I $\kappa$ B (I $\kappa$ B S) o con el plásmido de control vacío (CopG). Cultivos de MeT-5A fueron clasificados posteriormente a la infección por fluorescencia verde para obtener cultivos casi puros de células infectadas. Se dejaron los cultivos sin tratar (NT, gris) o se coestimularon durante 24 horas con TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$  (negro), y se llevó a cabo una RT-PCR cuantitativa del ARN total. La expresión del mRNA de la Histona H3 fue usada para la normalización.

Fig. 8. *La inhibición de ERK y NF- $\kappa$ B puede revertir la TEM en células mesoteliales transdiferenciadas de pacientes peritoneales sometidos a diálisis peritoneal ambulatoria continua (DPAC).*

A, Western blot mostrando la expresión de pERK en cultivos monocapa de células mesoteliales derivadas del efuente peritoneal de pacientes sometidos a diálisis peritoneal ambulatoria continua (DPAC) o del omento normal. Monocapas confluentes de células mesoteliales omentales de donadores control o de pacientes DPAC fueron lisadas, y los lisados se enfrentaron con anticuerpos monoclonales contra pERK. Se detectó la expresión total de ERK como control. El histograma muestra los ratios pERK/intensidad total de banda ERK. \*, P<0.05 donadores control comparados con pacientes DPAC. B, Fotomicrográficas de monocapas confluentes de CM no epitelioides derivadas del efuente tratadas durante 48 horas con DMSO (NT) o U0126 (20  $\mu$ m). C, *Izquierda*. Western blot mostrando la expresión de cadherina E en cultivos monocapa de CM derivadas de efuente o CM control de omento normal (O). Monocapas confluentes de células mesoteliales, tratadas con DMSO o con U0126 (20  $\mu$ m). Alternativamente, las células fueron infectadas con el retrovirus codificando para super represor I $\kappa$ B (I $\kappa$ B) o con el virus vacío (CopGreen). Después de 48 horas, las células fueron lisadas y los lisados sometidos a Western blotting con el anticuerpo monoclonal anti-cadherina E. Se detectó la expresión de  $\alpha$ -tubulina como control. *Derecha*. Densitometría de los Western blots mostrando la expresión de cadherina E bajo el tratamiento de DMSO o U0126 (pacientes 1-6) o la infección con super represor I $\kappa$ B (I $\kappa$ B) o con el virus vacío (CopG) (pacientes 1-2 y 5-6). \*, P<0.05 comparada con células tratadas con DMSO ó infectadas con el vector vacío. D. *Top*. Análisis por inmunofluorescencia confocal del efecto de la inhibición de ERK sobre NF- $\kappa$ B y la expresión de citoqueratina en el mesotelio peritoneal transicional. Monocapas confluentes de células mesoteliales derivadas del efuente (paciente 10), mostrando morfología no epitelioides, fueron tratadas con DMSO o U0126 por 56 h. Las células fueron teñidas con los anticuerpos policlonales anti-p65NF- $\kappa$ B y monoclonales anticitoqueratina. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33342 (azul). *Inferior izquierda*. Los histogramas muestran las intensidades de fluorescencia del NF- $\kappa$ B nuclear teñidas de células tratadas como en la parte superior del panel (pacientes analizados 1-3, 9, 10) cuantificadas con el software LAS-AS de Leica. Las barras representan SEM. Fueron analizadas un total de 250 células por condición; AU: unidades arbitrarias. *Inferior-centro*. Western blots mostrando la expresión de citoqueratina y cadherina E en CM no epitelioides derivadas de efuente tratadas con DMSO (D) o U0126 (pacientes 11-13). *Inferior-derecha*. Cuantificación del western blot mostrado en el medio del panel. E. Expresión del mRNA de Snail1 y cadherina E en CM derivadas de efuente (pacientes 7-10) tratados con DMSO (gris) o U0126 (negro) durante 24 horas. Se llevó a cabo una RT-PCR cuantitativa del ARN total. Se usó la expresión del mRNA de la Histona H3 como normalización. Las barras representan las medias  $\pm$  SEM de las determinaciones por duplicado en cuatro experimentos independientes usando células de tres pacientes diferentes. \*, P<0.05 comparada con células tratadas con DMSO.

## 50 **Exposición detallada de modos de realización**

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de inhibidores de MEK 1 y/o MEK 2 para el tratamiento de la fibrosis peritoneal.

55 *El tratamiento de células mesoteliales primarias con el efuente de la peritonitis o con TGF- $\beta$ 1 más IL-1 $\beta$  induce alteraciones morfológicas y bioquímicas consistentes con EMT.*

El efuente derivado de las células mesoteliales de pacientes sometidos a diálisis muestra cambios reminiscentes de la TEM, y estos cambios se correlacionan con la diálisis peritoneal y episodios de peritonitis o hemoperitoneo. Para testar si estos cambios pueden ser producidos *ex vivo*, se expusieron células mesoteliales procedentes del omento de donantes sanos (Fig. 1), al efuente peritoneal de pacientes que sufren peritonitis aguda durante la diálisis peritoneal. El tratamiento con el efuente de la peritonitis durante 72 horas induce la pérdida de las uniones intercelulares, la dispersión celular, y la adopción de un fenotipo fibroblástico en huso (Fig. 1A), todas las cuales son características de TEM. El análisis mediante inmunofluorescencia confocal mostró que el tratamiento regulaba a la baja la expresión de citoqueratinas, un marcador epitelial altamente expresado en células mesoteliales (Fig. 1B). La expresión de cadherina E, otro marcador epitelial, fue marcadamente reducida después de 24 horas (Fig. 1C). El efuente de la peritonitis indujo un aumento en la expresión de proteínas como fibronectina, cadherina E, cuya expresión está asociada con EMT (Fig. 1C y 5B). Se han confirmado estos resultados en un sistema experimental no diálítico mediante coestimulación

de las células mesenquimales con TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$ . El tratamiento combinado se usó a lo largo de este estudio puesto que aunque la estimulación individual con cada citoquina induce cambios asociados con las células mesenquimales que sufren TEM, como el descenso de cadherina E y el incremento de la expresión de las integrinas  $\beta$ 1 y  $\alpha$ 2 (Fig. 2 A-B), se obtuvo un efecto aditivo con la combinación de ambas citoquinas. De manera similar al tratamiento con el efuente de la peritonitis, TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$  indujeron un fenotipo en huso (Fig.2A), y la pérdida de los marcadores epiteliales y la adquisición de los mesenquimales (Fig. 2B-C). Estos experimentos indicaron que ambos, el efuente de las peritonitis y TGF- $\beta$ 1 más IL-1 $\beta$  inducían una TEM genuina en células mesenquimales primarias.

*La regulación a la baja de cadherina E y citoqueratina en CM, inducida por TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$ , es mediada por NF- $\kappa$ B.*

Existe una evidencia creciente de que la activación de NF- $\kappa$ B tiene un papel en los estadios iniciales de la TEM en la progresión tumoral. Encontramos que TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$ , tanto en combinación como por separado, potencialmente inducen la traslocación nuclear de NF- $\kappa$ B (Fig. 3A, Suppl. Fig. 3); el efuente de la peritonitis dio el mismo resultado (Fig.3B). Para testar si esta vía de activación da lugar a la TEM observada, infectamos CM primarias con un vector retroviral bicistrónico pRV-IRES-CopGreen codificando el super represor I $\kappa$ B $\alpha$ , una forma mutante no degradable (S32A y S36A) del represor I $\kappa$ B $\alpha$ . El super represor I $\kappa$ B $\alpha$  bloquea la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B inducida por TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$ , mientras que la infección con el vector retroviral pRV-IRES-CopGreen no tuvo ningún efecto (Fig. 3C). La infección con el vector con el super represor I $\kappa$ B $\alpha$  también interfirió con los cambios bioquímicos asociados con TEM. En células estimuladas con TGF- $\beta$ 1 más IL-1 $\beta$  por 24 horas, la expresión del super represor I $\kappa$ B $\alpha$ , limita la regulación a la baja de la expresión de la proteína cadherina E, mientras esto no fue afectado en células infectadas con el vector control pRV-IRES-CopGreen (Fig. 4A). Este efecto fue también evidente a nivel del mRNA, aunque la magnitud de este efecto del super represor I $\kappa$ B $\alpha$  fue limitada por la baja eficiencia de la infección viral en estas células (10-40%). Este experimento fue repetido en la línea de células mesoteliales humanas MeT-5A, que sufre TEM bajo el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 más IL-1 $\beta$  de forma similar a las MC. Células MeT-5A retroviralmente infectadas y purificadas por FACS fueron estimuladas, y se demostró mediante RT-PCR cuantitativa que la expresión del super represor I $\kappa$ B $\alpha$  bloquea completamente la regulación a la baja de la cadherina E (Fig. 4B). La expresión del super represor I $\kappa$ B $\alpha$  en CM primarias también limita la inhibición de la citoqueratina inducida por citoquinas, como se demostró mediante el análisis por inmunofluorescencia confocal después de 56 horas de tratamiento (Fig. 4C). La vía de activación de NF- $\kappa$ B por tanto, controla tanto la regulación a la baja de la cadherina E como de la citoqueratina durante la TEM en CM primarias.

*La regulación a la baja de cadherina E y citoqueratina durante la TEM en CM es controlada por la vía ERK.*

Se han analizado los eventos aguas arriba que tienen lugar para la activación de NF- $\kappa$ B en este sistema experimental. Recientemente se ha reportado en varios modelos celulares han documentado un papel para las MAP quinasas, particularmente las ERKs, en el establecimiento del TEM. El tratamiento de las CM con TGF- $\beta$ 1 más IL-1 $\beta$  indujo una fuerte fosforilación de ERK (Fig. 5A), y el efuente de la peritonitis tiene un efecto similar (Fig. 5B).

Para examinar el papel de la activación de ERK en la TEM, se pretrataron las CM con U0126, un inhibidor farmacológico de MEK-1, el activador aguas arriba de ERK. U0126 suprimió de manera marcada la regulación a la baja de cadherina E y de citoqueratina mediado por citoquinas Fig. 5C y D). U0126 también inhibe la regulación a la baja de la expresión de mRNA de cadherina E mediado por citoquinas en todos los tiempos analizados (Fig. 5E). Resultados similares se obtuvieron con el inhibidor de MEK-1 PD98059 (20  $\mu$ M). Estos resultados sugieren robustamente que la activación de la vía ERK media la regulación a la baja de cadherina E y citoqueratina inducida por TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$ .

*ERK regula la localización nuclear de NF- $\kappa$ B y la actividad transcripcional durante la TEM inducida por citoquinas.*

Se investigó si el papel de la señalización ERK en la TEM podría ser mediada a través de la inducción de la actividad de NF- $\kappa$ B. El pretratamiento de las CM con U0126 redujo la intensidad y la persistencia de la tinción nuclear de NF- $\kappa$ B bajo el tratamiento combinado de citoquinas (Fig. 6A). Para testar el efecto de ERK sobre la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B se transfectaron CM con una construcción *reporter* de luciferasa con múltiples sitios de unión a NF- $\kappa$ B (KBF-luc). El pretratamiento de estas células con U0126 redujo marcadamente la actividad luciferasa inducida por citoquina (Fig. 6B). Para examinar directamente el papel de ERK en la expresión génica mediada por NF- $\kappa$ B, se analizó el efecto de U0126 en la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2), un gen cuya expresión es regulada por NF- $\kappa$ B y es inducida durante la TEM. El pretratamiento con U0126 potencialmente inhibió la expresión del mRNA de COX-2 inducido por TGF- $\beta$ 1 más IL-1 $\beta$  (Fig. 6C), demostrando un papel para ERK en la regulación de la expresión génica de NF- $\kappa$ B durante la TEM.

*La vía de activación ERK/NF- $\kappa$ B regula la expresión de Snail1.*

Se analizaron los eventos de señalización aguas debajo de NF- $\kappa$ B que acontecen por la inducción de la TEM. Snail1 es el miembro mejor conocido de la familia de los reguladores transcripcionales de dedos de zinc involucrados en la inducción de la TEM. Snail1 directamente bloquea la transcripción del promotor de cadherina E y parece estar involucrado en la represión génica de citoqueratina. La RT-PCR cuantitativa mostró que la estimulación de CM primarias con TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$  induce un incremento en la expresión de mRNA de Snail1, incrementando la expresión y loca-

lización nuclear (Fig. 7B, top). De manera similar a su efecto en la expresión del mRNA de Snail1, el pretratamiento con U0126 disminuyó marcadamente la expresión de la proteína Snail1 en las células estimuladas por citoquinas (Fig. 7B, abajo).

5 Para analizar el papel de la actividad de NF- $\kappa$ B en la expresión de Snail1, se infectaron CM primarias con el retrovirus codificante del super represor I $\kappa$ B $\alpha$  o el vector vacío pRV-IRES-CopGreen, y se estimularon con TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$ . La expresión exógena del super represor I $\kappa$ B $\alpha$  redujo parcialmente la expresión del mRNA de Snail1 inducida por citoquinas (Fig 7C, izquierda). Para controlar la eficiencia limitada de la infección de estas células, este experimento fue repetido en cultivos de células MeT5A retroviralmente infectadas y purificadas por FACS. En estas células, la expresión del del super represor I $\kappa$ B $\alpha$  inhibió efectivamente la expresión de la expresión del mRNA de Snail1 inducido por citoquinas (Fig. 7, derecha). Estos resultados sugieren robustamente un papel casual de la activación de la vía ERK/NF- $\kappa$ B en la expresión de Snail1 en CM.

15 *La inhibición de ERK ó NF- $\kappa$ B restaura el fenotipo epitelial en las CM transdiferenciadas por el efluente peritoneal.*

La TEM de CM peritoneales en pacientes sometidos a DP está unida a la disfunción de la membrana peritoneal (MP), esto es, a un fallo en la ultrafiltración. Dado el papel de las vías de señalización de ERK y NF- $\kappa$ B en la génesis de la TEM en CM estimuladas por citoquinas, en cultivo, se analizó si esta vía puede controlar el mantenimiento del fenotipo mesenquimal en el efluente de la DP derivado de CM que han realizado ya la TEM *in vivo*. Con este fin, se obtuvieron CM de los efluentes de 13 pacientes sometidos a DP (Tabla 1). Los parámetros empleados para evaluar los distintos estadios de transdiferenciación de estas células fueron tanto morfológicos (de tipo epitelioide y no epitelioide) y bioquímico (niveles reducidos de cadherina E y citoqueratinas, expresión elevada de VEGF y vimentin), como ya se ha descrito en otros estudios. El análisis por Western Blot mostró que, comparado con las muestras de control del omento, CM no tratadas con el efluente derivado de la DP presentaron un incremento significativo en los niveles de ERK activo (Fig. 8A). Las CM tratadas con el efluente derivado de la DP fueron tratadas con U0126 o infectadas con el retrovirus codificando el super represor I $\kappa$ B $\alpha$ . El análisis por microscopía de las CM no epitelioides derivadas de efluentes mostró que el tratamiento con U0126 revertía las células a la morfología epitelial (Fig. 8B). El análisis por Western Blot mostró que la expresión de cadherina E, tanto en las CM derivadas de efluente tanto epitelioides como no epitelioides, fue restaurada tanto en las células tratadas con U0126 como en las que expresaban el super represor I $\kappa$ B $\alpha$  (Fig. 8C). Más aún, la inmunofluorescencia confocal mostró que el tratamiento con U0126 incrementó los niveles de citoqueratina en las CM no epiteliales de los efluentes (Fig. 8D). U0126 también limitó la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B (Fig. 8D). Finalmente, el tratamiento de CM no epitelioides derivadas del efluente con U0126 también reguló a la baja la expresión del mRNA de Snail1 y sobrerreguló la expresión de mRNA de cadherina E (Fig. 8E). La reversión de la TEM por el bloqueo de ERK o de NF- $\kappa$ B en estos experimentos soporta de manera robusta el papel de la activación de la vía ERK/ NF- $\kappa$ B en el mantenimiento del fenotipo mesenquimal en el peritoneo de pacientes sometidos a DP.

#### 40 *Aislamiento y cultivo de células mesoteliales*

Células mesoteliales humanas (CM) se obtuvieron por la digestión de muestras del omento de pacientes que fueron sometidos a cirugía abdominal no relacionada. Las muestras fueron digeridas con una solución al 0.125% de tripsina conteniendo un 0.01% EDTA. Las células fueron cultivadas en medio Earle's M199 suplementado con un 20% de suero fetal de ternero, 50 U/ml de penicilina, 50  $\mu$ g/ml de estreptomycin, y un 2% de Biogro-2 (conteniendo insulina, transferrina, etanolamina, y putrescina) (Biological Industries, Beit Haemek, Israel). Para inducir la TEM, las CM fueron tratadas con una combinación del factor de crecimiento transformante recombinante TGF- $\beta$ 1 (0.5 ng/mL) e interleucina (IL)-1 $\beta$  (2 ng/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN). Aunque tanto TGF- $\beta$ 1 como IL-1 $\beta$  por separado son capaces de inducir cambios fenotípicos TEM, la estimulación combinada induce una genuina TEM. Las dosis de citoquinas usadas se encuentran en el rango de aquellas detectadas en los fluidos de la diálisis peritoneal en presencia de peritonitis.

Las CM derivadas del efluente fueron aisladas de 13 pacientes sometidos a DP clínicamente estables usando un método descrito previamente (López-Cabrera *et al.*, 2006. *Perit Dial Int.* 26: 26-34). Las células fueron cultivadas como anteriormente se ha descrito, y tras 10 o 15 días los cultivos alcanzaron confluencia y fueron separados en un radio de 1:2. Las características morfológicas de células en cultivos confluentes fueron comparadas y permanecieron estables durante dos o tres pases. Los cultivos de CM confluentes de los efluentes de PD mostraron uno de los principales fenotipos, de tipo epitelial (E) o no epitelial (NE), que permanecieron estables durante dos o tres pases celulares. De los 13 cultivos de CM derivadas de efluentes evaluados, seis tuvieron el fenotipo de tipo epitelial, y siete tuvieron el fenotipo no epitelial. Para evitar la contaminación de fibroblastos, la pureza del omento y de los cultivos de CM derivadas del efluente se determinó mediante la evaluación de los marcadores estándar molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1 y citoqueratinas. Las CM expresaron altos niveles de ICAM-1 y bajos niveles del marcador específico de fibroblastos. Cultivos de CM fueron también negativos para el marcador endotelial CD31 y el marcador de macrófagos CD45 (Fig. 1). Cuando aislamos tanto el omento como las CM derivadas del efluente peritoneal, nosotros generalmente obtenemos poblaciones de células altamente purificadas, con células contaminantes <5% como se determinó por análisis FACS. Se descartaron de forma rutinaria las muestras purificadas con contaminantes superiores al 5%.

## ES 2 349 550 A1

El estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario de la Princesa (Madrid, España). Se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes sometidos a DP incluidos en este estudio para el uso de muestras de efluente y donadores de omento antes de la cirugía optativa.

5 La línea de células mesoteliales humanas MeT-5A (ATCC, Rockville, MD) fue cultivada en medio Earle's M199 y estimuladas con las mismas dosis de TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$ . Met-5A es una línea de células mesoteliales no transformadas corrientemente usadas en la investigación de células mesoteliales peritoneales; los datos obtenidos con esta línea celular muestran concordancia con los datos obtenidos con células primarias.

10

### *Análisis por Western Blot*

Se lisaron monocapas de CM en un buffer RIPA modificado que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1% NP-40; 0.1% SDS; 0.25% Na-deoxycholate; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM PMSF; 1  $\mu$ g/ml de aprotinina, 15 leupeptina y pepstatina; y 25 mM NaF. Cantidades iguales de proteínas fue resuelta por SDS-PAGE. Las proteínas fueran transferidas a membranas PVDF (Millipore, Bedford, VA) y probado con anticuerpos usando procedimientos estándar. La unión de anticuerpos PVDF se detectó por quimioluminiscencia con ELC (Amersham Life Sciences, Little Chalfont, UK).

20

### *Microscopía confocal e inmunofluorescencia*

Las células fueron fijadas durante 20 minutos en 3% de formaldehído en PBS, permeabilizadas en 0.2% Tritón X-100/PBS por 5 min, y bloqueadas con 2% BSA por 20 min. Para la tinción de cadherina E, las células fueron 25 fijadas y permeabilizadas en metanol frío por 10 minutos. Para la tinción de Snail, las células fueron pretratadas con LiCl y MG132 para bloquear la fosforilación de Snail, ubiquitinación u degradación subsiguiente. Los anticuerpos secundarios (conjugados a Alexa-647, -488 and -541) y Hoechst 33342 fueron de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL). Las imágenes confocales se obtuvieron usando un microscopio espectral confocal Leica SP5. La tecnología espectral permite la discriminación entre fluorescencia verde y amarilla. La cuantificación de la intensidad nuclear NF- $\kappa$ B se 30 llevó a cabo usando el software Leica LAS-AF. Brevemente, el núcleo fue delimitado empleando el marcador Hoechst, y la medida de la intensidad de fluorescencia del NF- $\kappa$ B marcado fue cuantificada. Un mínimo de 3 campos diferentes por condición fueron adquiridos, con un número de células entre 30 y 50 por condición cuantificada.

### *Infección de células MeT5A y CM derivadas del omento con vectores retrovirales*

Células MeT5A y CM derivadas del omento fueron infectadas con el vector retroviral pRV-IRES-CopGreen (Genetrix, Madrid, Spain) codificando el super represor I $\kappa$ B $\alpha$  mutante, con las mutaciones S32A y S36A, o con el vector pRV-IRES-CopGreen vacío como control. Un paso crítico en la activación de NF- $\kappa$ B es la fosforilación de I $\kappa$ B por 40 el complejo quinasa I $\kappa$ B de alto peso molecular (IKK). Las mutaciones S32A y S36A vuelven I $\kappa$ B $\alpha$  insensible a la fosforilación por IKK. 24 horas antes de la infección, la CM fueron sembradas en 6 placas (2 x 10<sup>5</sup> células por placa) y el retrovirus produciendo células 293T fueron sembradas en 3 x 10<sup>6</sup> por 10 cm de placa. Para la infección, los sobrenadantes de las células 293T fueron filtrados a través de un filtro de 0.45- $\mu$ m (Whatman, Dassel, Germany), y 5  $\mu$ g/ml polibreno (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) se añadió al filtrado. Así pues, el medio fue removido 45 de las CM y repuesto con células 293T que contienen el retrovirus. Este proceso fue repetido dos veces en un intervalo de 24 horas. 24 horas después de la exposición del retrovirus, la influencia de la infección fue monitorizada por microscopía de fluorescencia (Cari Zeiss, Standort Göttingen, Germany) o análisis FACS (BD FACS Canto, Becton-Dickinson Laboratories, Mountain View, CA). El análisis FACS mostró que el porcentaje de CM primarias infectadas era del 10 al 40%, indicando que la eficiencia de la infección podría dar lugar a una estimación a la baja del efecto del 50 super represor I $\kappa$ B $\alpha$ . Como control de esto, cultivos puros de células MeT5A fueron obtenidas por separación con el separador celular Dako MoFlo cell sorter (Glostrup, DK).

### *Transfección celular y ensayo de luciferasa*

55

La actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B fue medida por infección transitoria de las células MeT5A con el plásmido reportero KBF-luc y el subsiguiente ensayo de actividad de luciferasa. 2 x 10<sup>5</sup> células fueron transfectadas con 2  $\mu$ g del plásmido reportero KBF-luc junto con 500 ng del plásmido reportero pRL-null, con un gen Renilla Luciferase sin promotor (Promega, Madison, WI). La transfección se llevó a cabo incubando las células durante 4 horas con 60 una mezcla de ADN y lipofectamina y un ración de 1:2.5 (Lipofectamine 2000; Invitrogen, Carlsbad, California, USA) en un medio libre de suero. Después de la transfección, las células fueron pretratadas toda una noche con un vehículo (DMSO) o U0126 (20  $\mu$ M). Las células fueron estimuladas con TGF- $\beta$ 1 y IL-1 $\beta$  por los tiempos indicados. La actividad luciferasa se midió con Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y determinadas en un Sirius Single Tube luminometer (Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim, 65 Germany). Todos los experimentos fueron llevados a cabo por duplicado.

## ES 2 349 550 A1

### *RT-PCR*

Se extrajo el ARN total se extrajo con el RNeasy kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), y se obtuvo el ADN complementario de 500 ng del ARN total usando el Omniscript RT kit (Qiagen). La PCR cuantitativa se llevó a cabo en un LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) usando el SYBR Green kit (Roche Diagnostics GmbH) y el siguiente set de primers específicos SEO ID NO: 51 y SEO ID NO: 52 para cadherina; SEO ID NO: 53 y SEQ ID NO: 54 para Snail1; SEO ID NO: 55 y SEO ID NO: 56 para la histona H3 (usada para la normalización). La temperatura de hibridación para la amplificación de cadherina E y H3 fue 62°C, y se midió la fluorescencia al final de cada ciclo de elongación. Para la amplificación de Snail, la temperatura de hibridación fue de 55°C y la fluorescencia se midió a 88°C después de cada ciclo de elongación. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado. Tras la amplificación, los productos de PCR se confirmaron por el análisis de la curva de fusión, y electroforesis en gel. Los niveles de mRNA de COX-2 se estimaron por 35 ciclos de PCR cualitativa con una temperatura de alineamiento de 63°C y los siguientes primers SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58.

### *Análisis estadístico*

El significado estadístico se determinó con un test t con OriginPro7 software (OriginLab Co.). Los valores  $P < 0.05$  fueron considerados significativos.

# ES 2 349 550 A1

## REIVINDICACIONES

5 1. Uso de una composición que comprende el agente U0126 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la fibrosis peritoneal.

2. Uso según la reivindicación 1, donde dicha composición además comprende adyuvantes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

10 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la composición se presenta en una forma adaptada a la administración intraperitoneal, intratecal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmica.

15 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la fibrosis peritoneal se identifica mediante la determinación de una cantidad menor de cualquier ácido nucleico transcrito que codifica para MEK 1 y/o MEK 2, o de una cantidad menor de proteína MEK 1 y/o MEK 2, en comparación con células normales.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

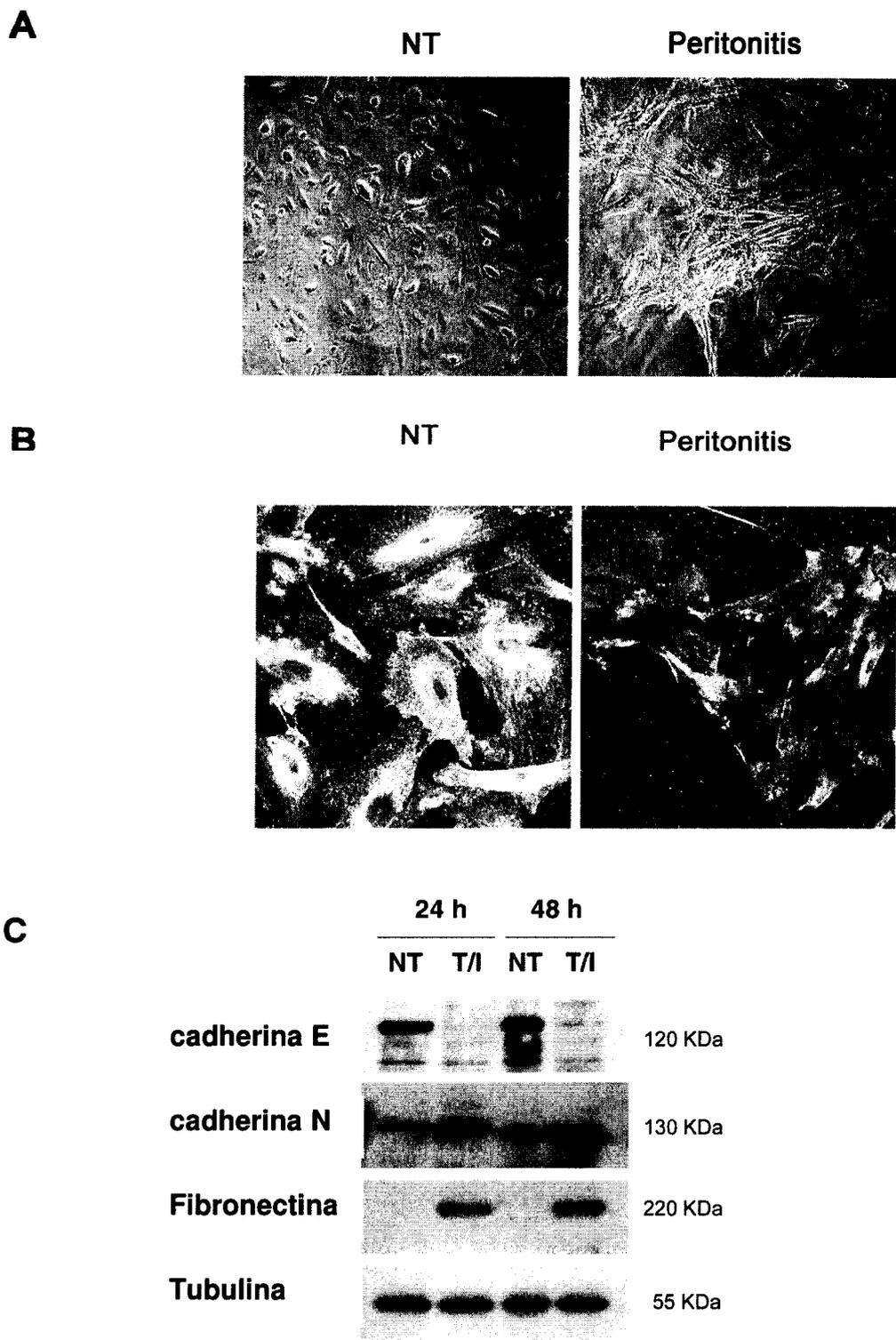


FIG. 1A, 1B y 1C.

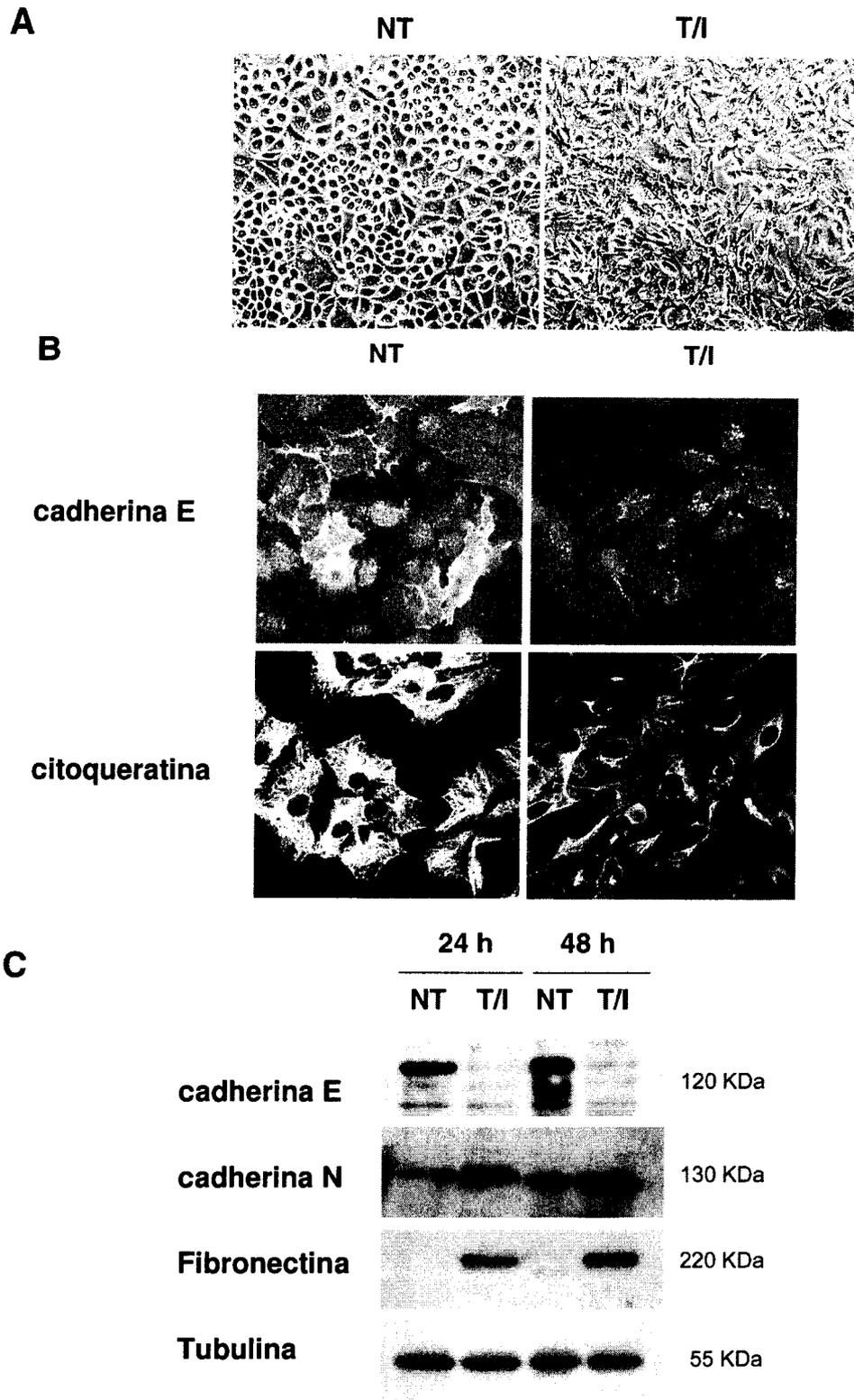


FIG. 2A, 2B y 2C.

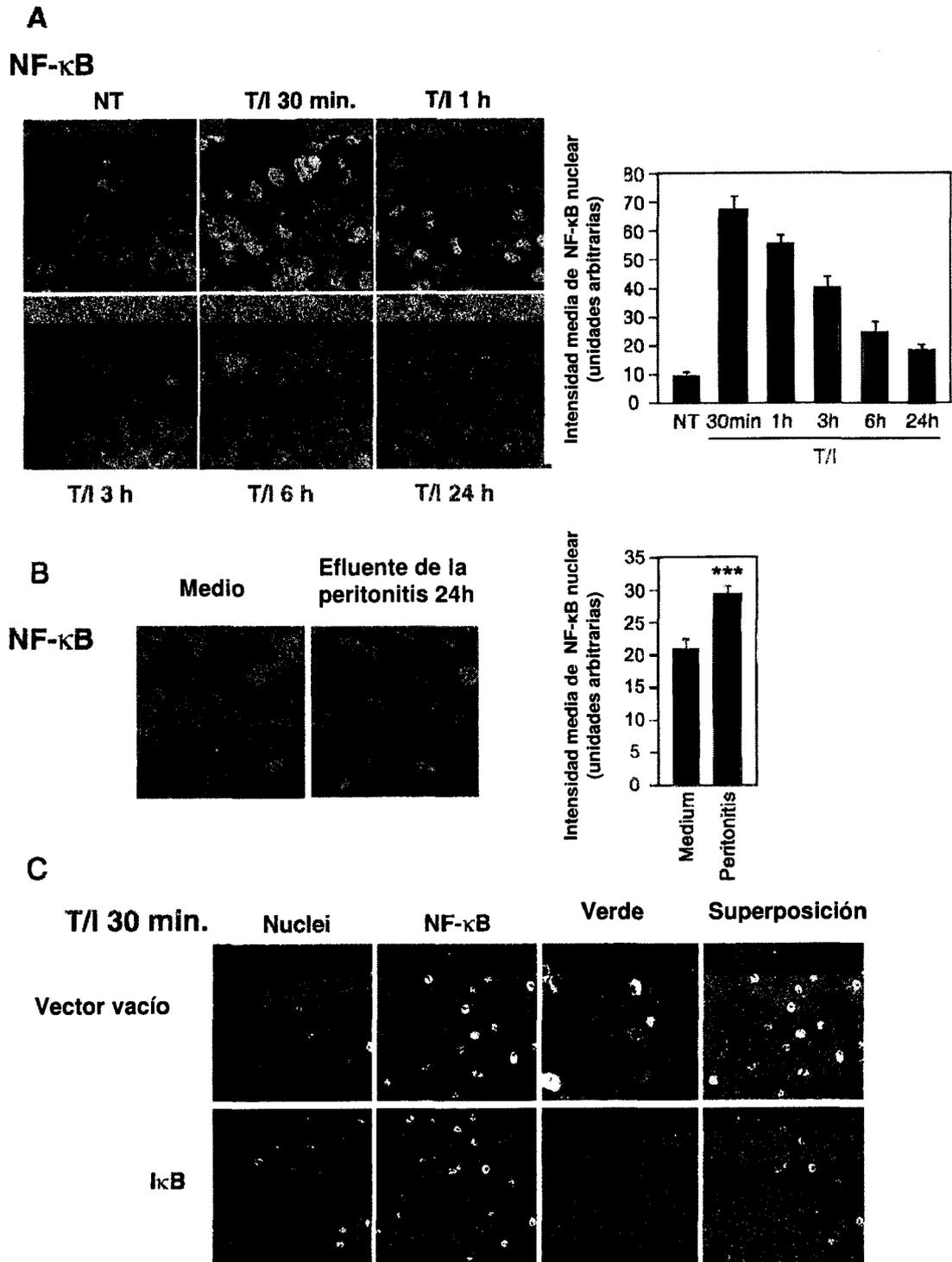


FIG. 3A, 3B y 3C.

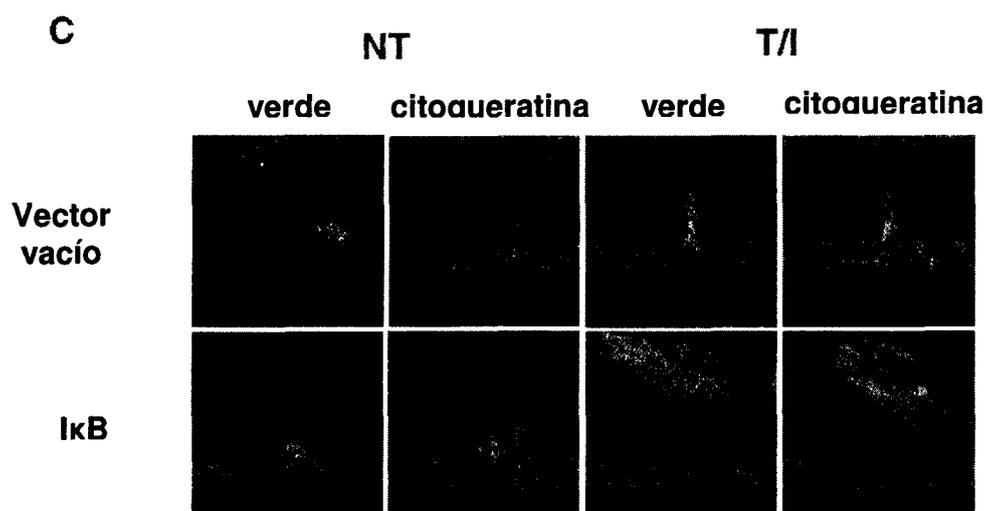
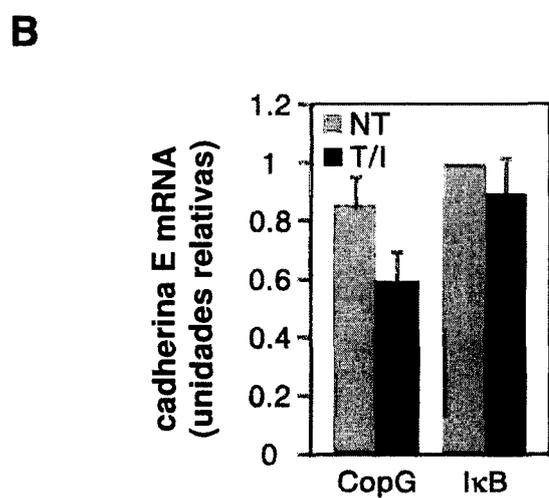
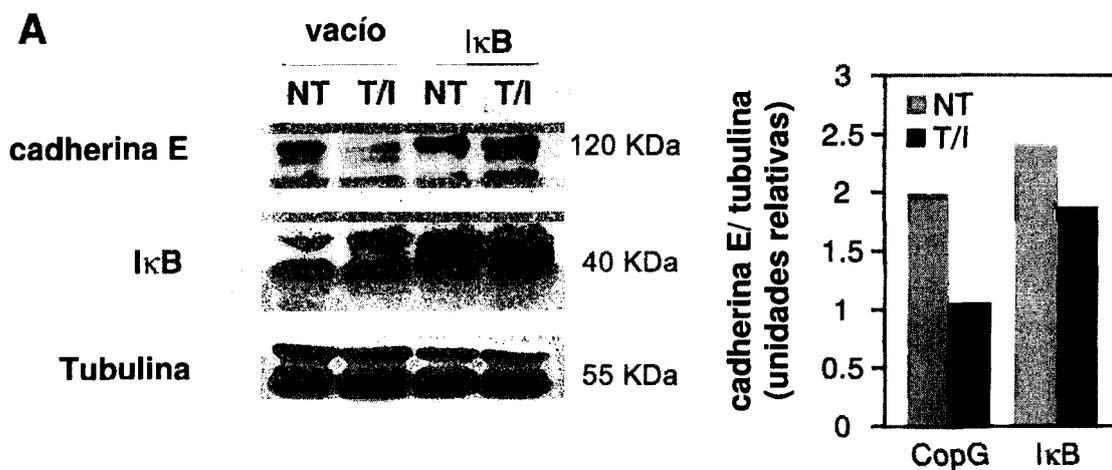


FIG. 4A, 4B y 4C.

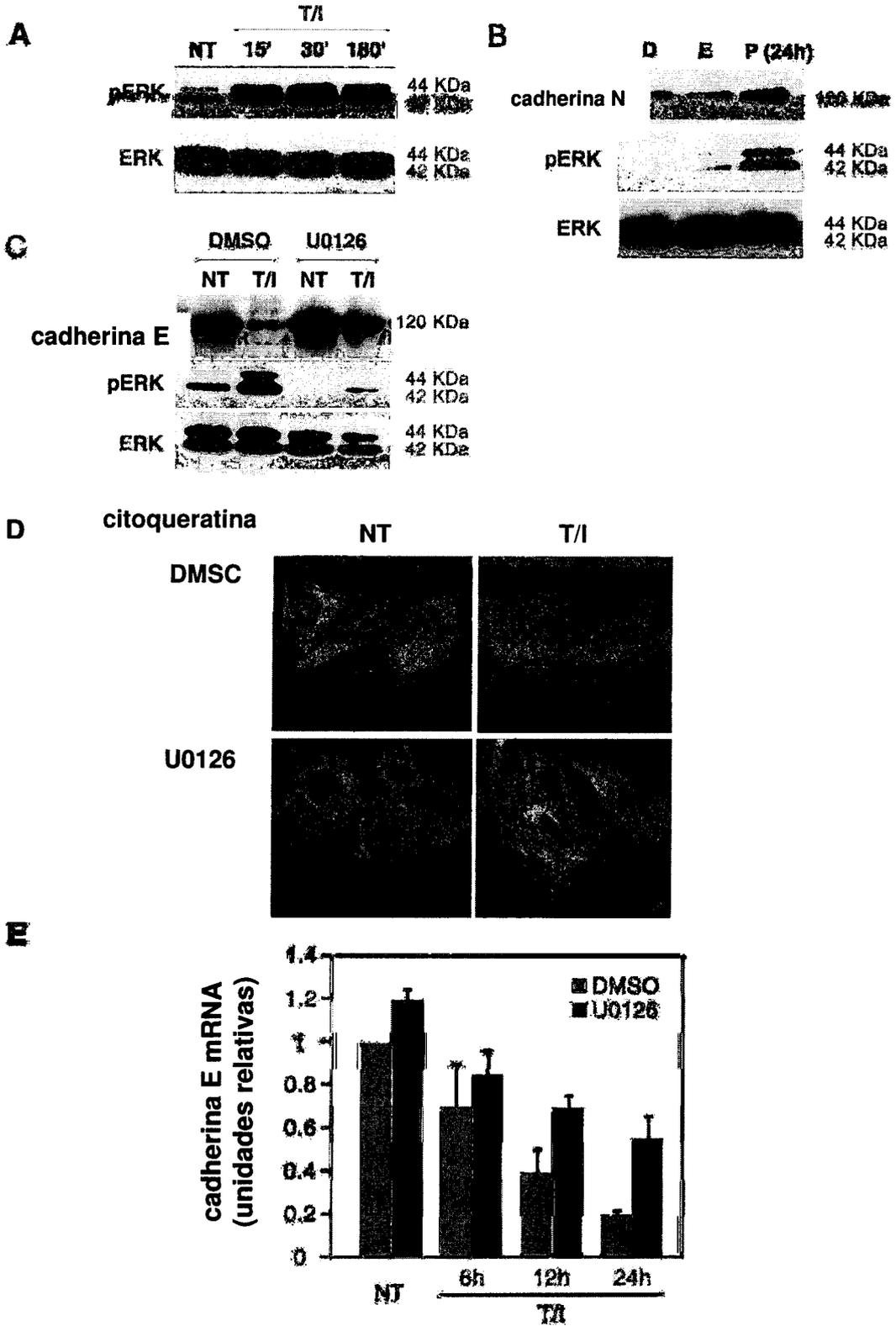
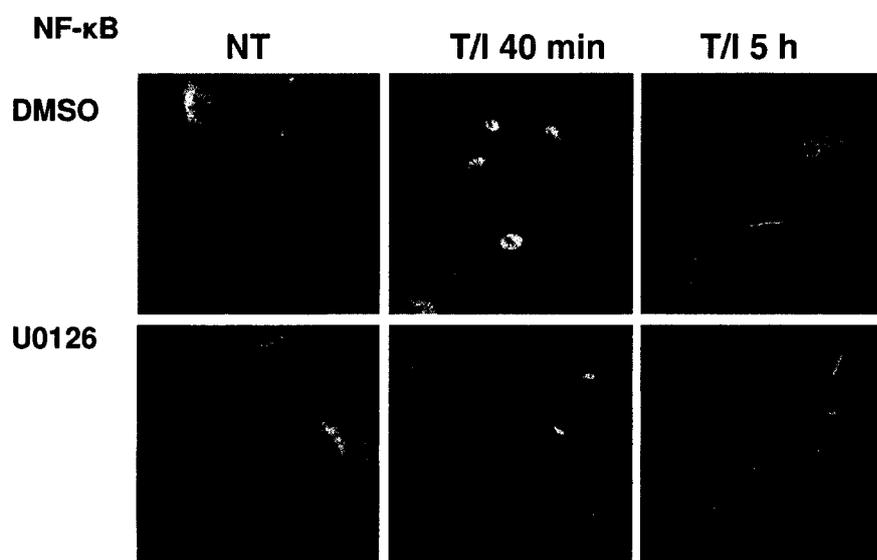
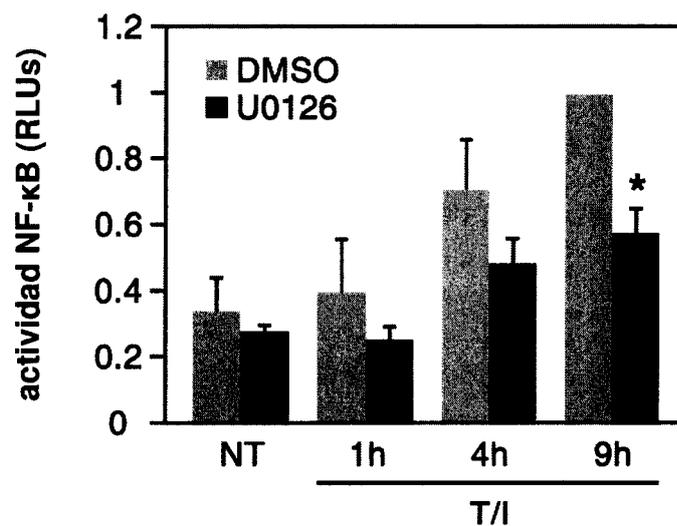


FIG. 5A, 5B, 5C, 5D y 5E.

**A**



**B**



**C**

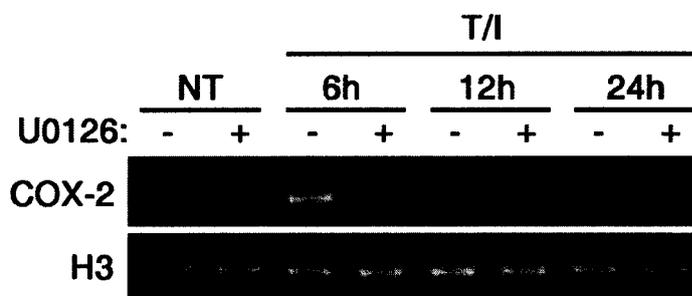


FIG. 6A, 6B y 6C.

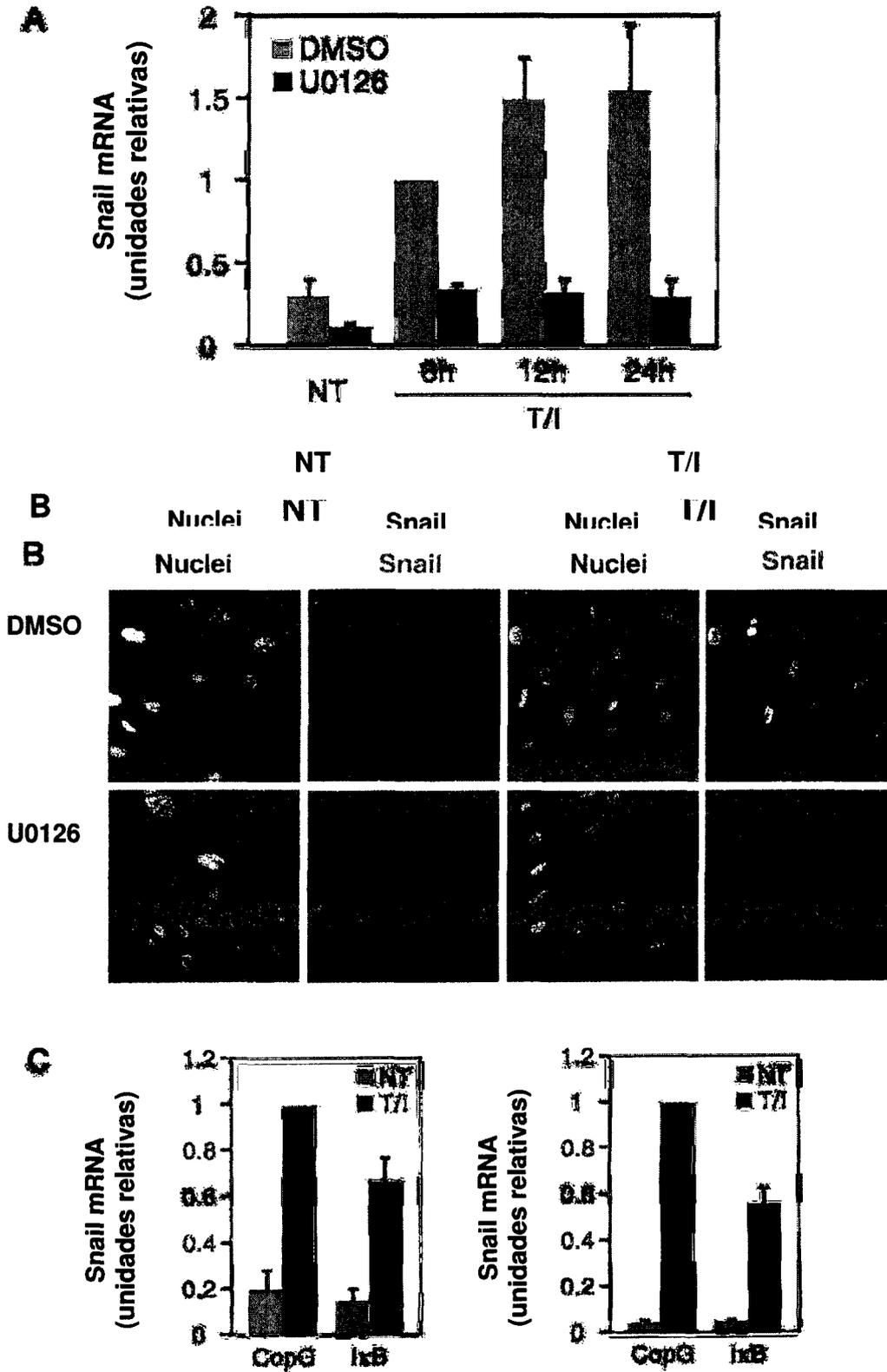


FIG. 7A, 7B y 7C.

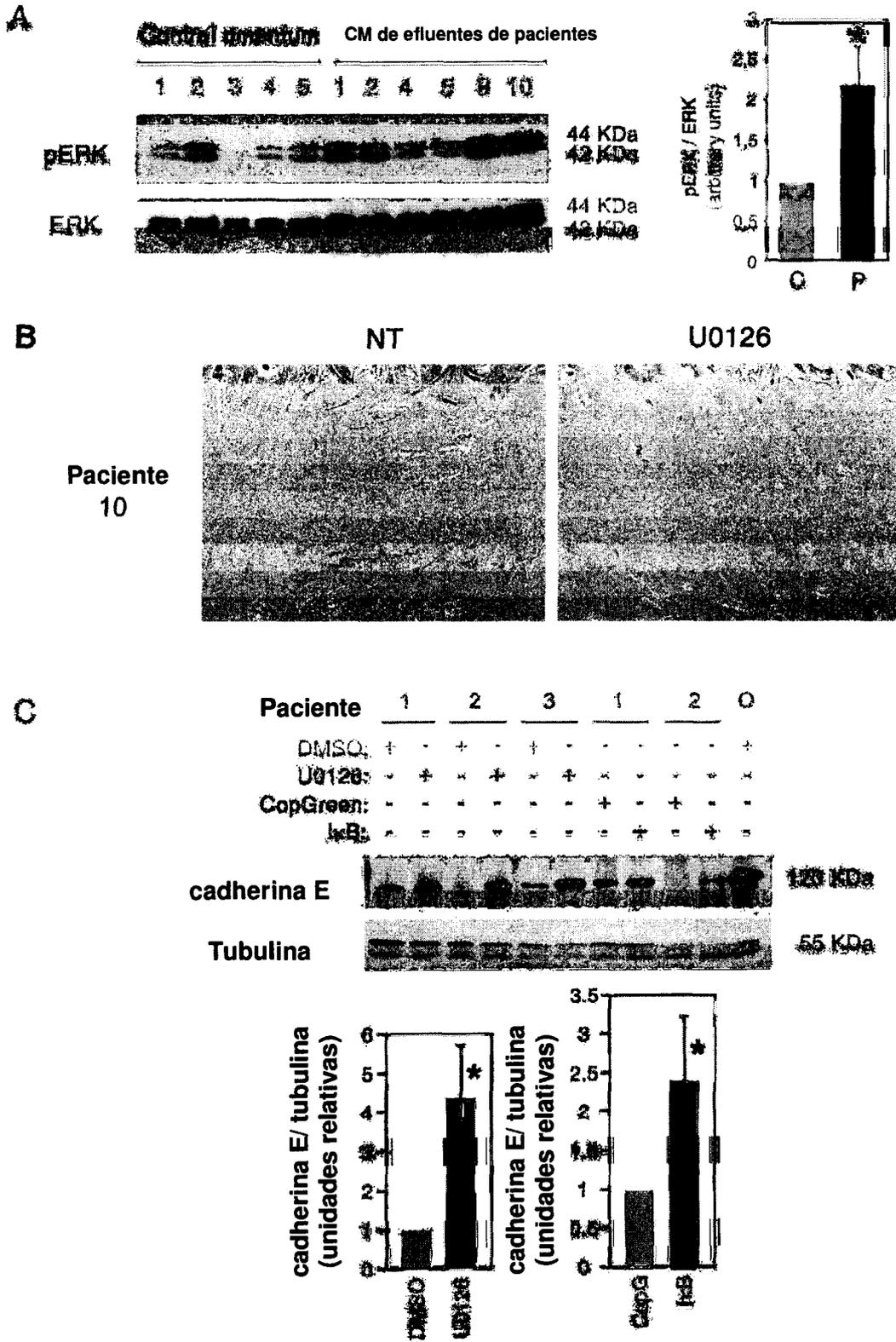
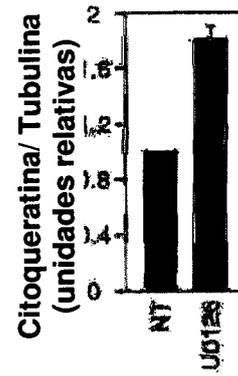
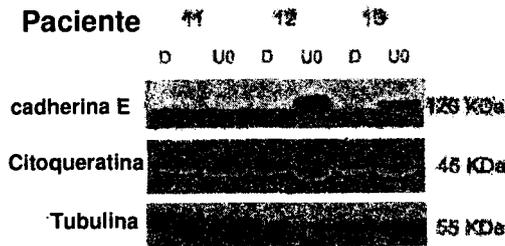
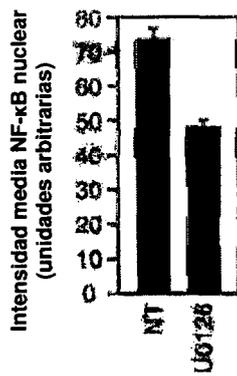
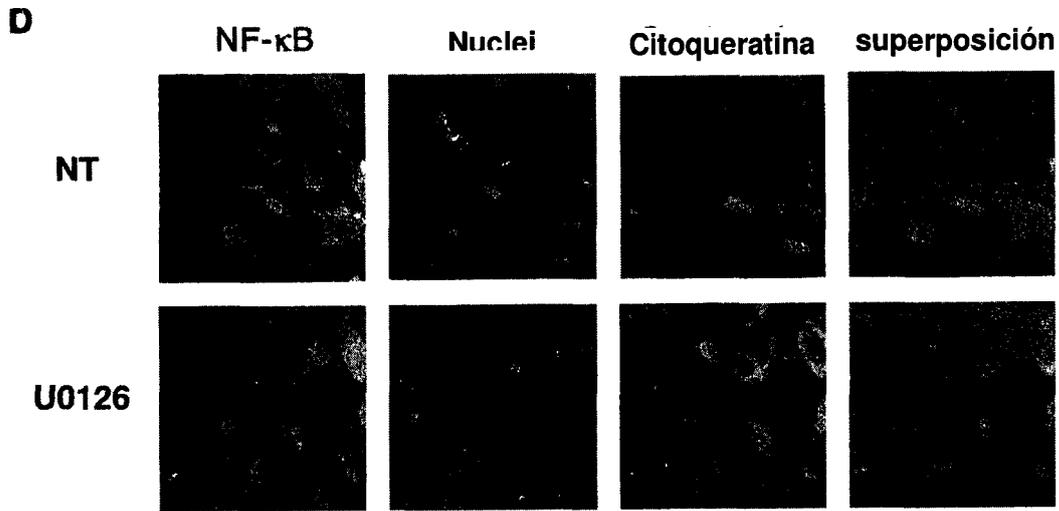


FIG. 8A, 8B y 8C.



**E**

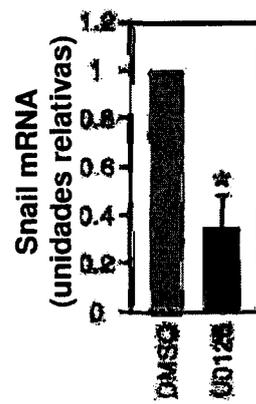
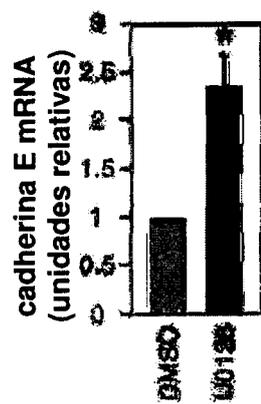


FIG. 8D y 8E.

# ES 2 349 550 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

5

<120> INHIBIDORES DE LA MEK 1/2 PARA EL TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS PERITONEAL

<130> ES1997.1

10

<160> 58

<170> PatentIn versión 3.4

15

<210> 1

<211> 393

<212> PRT

20

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

25

Met Pro Lys Lys Lys Pro Thr Pro Ile Gln Leu Asn Pro Ala Pro Asp  
1 5 10 15

30

Gly Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Ser Ala Glu Thr Asn Leu Glu Ala  
20 25 30

35

Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Asp Glu Gln Gln Arg Lys  
35 40 45

40

Arg Leu Glu Ala Phe Leu Thr Gln Lys Gln Lys Val Gly Glu Leu Lys  
50 55 60

45

Asp Asp Asp Phe Glu Lys Ile Ser Glu Leu Gly Ala Gly Asn Gly Gly  
65 70 75 80

50

Val Val Phe Lys Val Ser His Lys Pro Ser Gly Leu Val Met Ala Arg  
85 90 95

Lys Leu Ile His Leu Glu Ile Lys Pro Ala Ile Arg Asn Gln Ile Ile  
100 105 110

55

Arg Glu Leu Gln Val Leu His Glu Cys Asn Ser Pro Tyr Ile Val Gly  
115 120 125

Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Gly Glu Ile Ser Ile Cys Met Glu  
130 135 140

60

His Met Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gln Val Leu Lys Lys Ala Gly Arg  
145 150 155 160

65

Ile Pro Glu Gln Ile Leu Gly Lys Val Ser Ile Ala Val Ile Lys Gly  
165 170 175

ES 2 349 550 A1

Leu Thr Tyr Leu Arg Glu Lys His Lys Ile Met His Arg Asp Val Lys  
 180 185 190  
 5 Pro Ser Asn Ile Leu Val Asn Ser Arg Gly Glu Ile Lys Leu Cys Asp  
 195 200 205  
 10 Phe Gly Val Ser Gly Gln Leu Ile Asp Ser Met Ala Asn Ser Phe Val  
 210 215 220  
 15 Gly Thr Arg Ser Tyr Met Ser Pro Glu Arg Leu Gln Gly Thr His Tyr  
 225 230 235 240  
 20 Ser Val Gln Ser Asp Ile Trp Ser Met Gly Leu Ser Leu Val Glu Met  
 245 250 255  
 25 Ala Val Gly Arg Tyr Pro Ile Pro Pro Pro Asp Ala Lys Glu Leu Glu  
 260 265 270  
 30 Leu Met Phe Gly Cys Gln Val Glu Gly Asp Ala Ala Glu Thr Pro Pro  
 275 280 285  
 35 Arg Pro Arg Thr Pro Gly Arg Pro Leu Ser Ser Tyr Gly Met Asp Ser  
 290 295 300  
 40 Arg Pro Pro Met Ala Ile Phe Glu Leu Leu Asp Tyr Ile Val Asn Glu  
 305 310 315 320  
 45 Pro Pro Pro Lys Leu Pro Ser Gly Val Phe Ser Leu Glu Phe Gln Asp  
 325 330 335  
 50 Phe Val Asn Lys Cys Leu Ile Lys Asn Pro Ala Glu Arg Ala Asp Leu  
 340 345 350  
 55 Lys Gln Leu Met Val His Ala Phe Ile Lys Arg Ser Asp Ala Glu Glu  
 355 360 365  
 60 Val Asp Phe Ala Gly Trp Leu Cys Ser Thr Ile Gly Leu Asn Gln Pro  
 370 375 380  
 65 Ser Thr Pro Thr His Ala Ala Gly Val  
 385 390  
 <210> 2  
 <211> 400  
 <212> PRT  
 60 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 2  
 65 Met Leu Ala Arg Arg Lys Pro Val Leu Pro Ala Leu Thr Ile Asn Pro  
 1 5 10 15

ES 2 349 550 A1

Thr Ile Ala Glu Gly Pro Ser Pro Thr Ser Glu Gly Ala Ser Glu Ala  
 20 25 30  
 5 Asn Leu Val Asp Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Asp Glu  
 35 40 45  
 10 Gln Gln Lys Lys Arg Leu Glu Ala Phe Leu Thr Gln Lys Ala Lys Val  
 50 55 60  
 15 Gly Glu Leu Lys Asp Asp Asp Phe Glu Arg Ile Ser Glu Leu Gly Ala  
 65 70 75 80  
 20 Gly Asn Gly Gly Val Val Thr Lys Val Gln His Arg Pro Ser Gly Leu  
 85 90 95  
 25 Ile Met Ala Arg Lys Leu Ile His Leu Glu Ile Lys Pro Ala Ile Arg  
 100 105 110  
 30 Asn Gln Ile Ile Arg Glu Leu Gln Val Leu His Glu Cys Asn Ser Pro  
 115 120 125  
 35 Tyr Ile Val Gly Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Gly Glu Ile Ser  
 130 135 140  
 40 Ile Cys Met Glu His Met Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gln Val Leu Lys  
 145 150 155 160  
 45 Glu Ala Lys Arg Ile Pro Glu Glu Ile Leu Gly Lys Val Ser Ile Ala  
 165 170 175  
 50 Val Leu Arg Gly Leu Ala Tyr Leu Arg Glu Lys His Gln Ile Met His  
 180 185 190  
 55 Arg Asp Val Lys Pro Ser Asn Ile Leu Val Asn Ser Arg Gly Glu Ile  
 195 200 205  
 60 Lys Leu Cys Asp Phe Gly Val Ser Gly Gln Leu Ile Asp Ser Met Ala  
 210 215 220  
 65 Asn Ser Phe Val Gly Thr Arg Ser Tyr Met Ala Pro Glu Arg Leu Gln  
 225 230 235 240  
 Gly Thr His Tyr Ser Val Gln Ser Asp Ile Trp Ser Met Gly Leu Ser  
 245 250 255  
 60 Leu Val Glu Leu Ala Val Gly Arg Tyr Pro Ile Pro Pro Pro Asp Ala  
 260 265 270  
 65 Lys Glu Leu Glu Ala Ile Phe Gly Arg Pro Val Val Asp Gly Glu Glu

ES 2 349 550 A1

		275						280								285
5	Gly	Glu	Pro	His	Ser	Ile	Ser	Pro	Arg	Pro	Arg	Pro	Pro	Gly	Arg	Pro
		290					295					300				
10	Val	Ser	Gly	His	Gly	Met	Asp	Ser	Arg	Pro	Ala	Met	Ala	Ile	Phe	Glu
	305					310					315					320
15	Leu	Leu	Asp	Tyr	Ile	Val	Asn	Glu	Pro	Pro	Pro	Lys	Leu	Pro	Asn	Gly
					325					330					335	
20	Val	Phe	Thr	Pro	Asp	Phe	Gln	Glu	Phe	Val	Asn	Lys	Cys	Leu	Ile	Lys
				340					345					350		
25	Asn	Pro	Ala	Glu	Arg	Ala	Asp	Leu	Lys	Met	Leu	Thr	Asn	His	Thr	Phe
			355					360					365			
30	Ile	Lys	Arg	Ser	Glu	Val	Glu	Glu	Val	Asp	Phe	Ala	Gly	Trp	Leu	Cys
		370					375					380				
35	Lys	Thr	Leu	Arg	Leu	Asn	Gln	Pro	Gly	Thr	Pro	Thr	Arg	Thr	Ala	Val
	385					390					395					400

30 <210> 3  
 <211> 2222  
 <212> DNA  
 <213> *Homo sapiens*  
 35 <400> 3

40 attcggcaccg agggaggaag cgagaggtgc tgcctcccc ccggagttgg aagcgcgtta  
 60  
 cccgggtcca aaatgcccaa gaagaagccg acgcccattc agctgaacc ggccccgcac  
 120  
 45 ggctctgcag ttaacgggac cagctctgcg gagaccaact tggaggcctt gcagaagaag  
 180  
 ctggaggagc tagagcttga tgagcagcag cgaaagcgc ttgaggcctt tcttaccag  
 240  
 50 aagcagaagg tgggagaact gaaggatgac gactttgaga agatcagtga gctgggggct  
 300  
 ggcaatggcg gtgtggtggt caaggtctcc cacaagcctt ctggcctggt catggccaga  
 360  
 55 aagctaattc atctggagat caaacccgca atccggaacc agatcataag ggagctgcag  
 420  
 60 gttctgcatg agtgcaactc tccgtacatc gtgggcttct atggtgcggt ctacagcgat  
 480  
 ggcgagatca gtatctgcat ggagcacatg gatggagggt ctctggatca agtcctgaag  
 540  
 65 aaagctggaa gaattcctga acaaatttta ggaaaagtta gcattgctgt aataaaaggc  
 600

ES 2 349 550 A1

ctgacatatc tgagggagaa gcacaagatc atgcacagag atgtcaagcc ctccaacatc  
 660  
 5 ctagtcaact cccgtgggga gatcaagctc tgtgactttg gggtcagcgg gcagctcatc  
 720  
 gactccatgg ccaactcctt cgtgggcaca aggtcctaca tgtcgccaga aagactccag  
 780  
 10 gggactcatt actctgtgca gtcagacatc tggagcatgg gactgtctct ggtagagatg  
 840  
 gcggttgga ggtatcccat ccctcctcca gatgccaagg agctggagct gatgtttggg  
 900  
 15 tgccaggtgg aaggagatgc ggctgagacc ccaccaggc caaggacccc cgggaggccc  
 960  
 20 cttagctcat acggaatgga cagccgacct cccatggcaa tttttgagtt gttggattac  
 1020  
 atagtcaacg agcctcctcc aaaactgccc agtggagtgt tcagtctgga atttcaagat  
 1080  
 25 tttgtgaata aatgcttaat aaaaaacccc gcagagagag cagatttgaa gcaactcatg  
 1140  
 gttcatgctt ttatcaagag atctgatgct gaggaagtgg attttgcagg ttggctctgc  
 1200  
 30 tccaccatcg gccttaacca gccagcaca ccaacccatg ctgctggcgt ctaagtgttt  
 1260  
 35 gggaagcaac aaagagcgag tcccctgccc ggtggtttgc catgtcgctt ttgggcctcc  
 1320  
 ttcccatgcc tgtctctggt cagatgtgca tttcacctgt gacaaaggat gaagaacaca  
 1380  
 40 gcatgtgcca agattctact cttgtcattt ttaatattac tgtctttatt cttattacta  
 1440  
 ttattgttcc cctaagtgga ttggctttgt gcttggggct atttgtgtgt atgctgatga  
 1500  
 45 tcaaaacctg tgccaggctg aattacagtg aaatTTTTGG tgaatgtggg tagtcattct  
 1560  
 tacaattgca ctgctgttcc tgctccatga ctggctgtct gcctgtattt tcggactttg  
 1620  
 50 acatttgaca tttggtggac tttatcttgc tgggcatact ttctctctag gagggagcct  
 1680  
 55 tgtgagatcc ttcacaggca gtgcatgtga agcatgcttt gctgctatga aatgagcat  
 1740  
 cagagagtgt acatcatggt attttattat tattatttgc ttttcatgta gaactcagca  
 1800  
 60 gttgacatcc aaatctagcc agagcccttc actgccatga tagctggggc ttcaccagtc  
 1860  
 65 tgtctactgt ggtgatctgt agacttctgg ttgtatttct atatttattt tcagtatact  
 1920

ES 2 349 550 A1

gtgtgggata cttagtgga tgtctcttta agttttgatt aatgtttctt aaatggaatt  
1980

5 atttgaatgt cacaaattga tcaagatatt aaaatgctcg atttatcttt ccccatatcc  
2040

aagtaccaat gctgttgtaa acaacgtgta tagtgcctaa aattgtatga aaatcctttt  
2100

10 aaccatttta acctagatgt ttaacaaatc taatctctta ttctaataaa tatactatga  
2160

aataaaaaaa aaaggagaaa gctaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa  
2220

15 aa  
2222

20 <210> 4  
<211> 1759  
<212> DNA  
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 4

cccctgcctc tcggactcgg gctgcggcgt cagccttctt cgggcctcgg cagcggtagc  
60

30 ggctcgcctc cctcagcccc agcgcctcctc ggctaccctc ggcccaggcc cgcagcgcgg  
120

cccgcctcgg gccgccccga cgccggcctg ggccgcggcc gcagccccgg gctcgcgtag  
35 180

gcgccgaccg ctcccggccc gccccctatg ggccccggct agaggcgccg ccgcccggcg  
240

40 cccgcggagc cccgatgctg gcccgaggga agccggtgct gccggcgctc accatcaacc  
300

ctaccatcgc cgagggccca tcccctacca gcgagggcgc ctccgaggca aacctggtgg  
360

45 acctgcagaa gaagctggag gagctggaac ttgacgagca gcagaagaag cggctggaag  
420

cctttctcac ccagaaagcc aaggctcggc aactcaaaga cgatgacttc gaaaggatct  
50 480

cagagctggg cgcgggcaac ggcgggggtg tcaccaaagt ccagcacaga ccctcgggcc  
540

55 tcatcatggc caggaagctg atccacctg agatcaagcc ggccatccgg aaccagatca  
600

tccgcgagct gcaggtcctg cacgaatgca actcgccgta catcgtgggc ttctacgggg  
660

60 ccttctacag tgacggggag atcagcattt gcatggaaca catggacggc ggctccctgg  
720

accaggtgct gaaagaggcc aagaggattc ccgaggagat cctggggaaa gtcagcatcg  
780

65 cggttctccg gggcttggcg tacctccgag agaagcacca gatcatgcac cgagatgtga

ES 2 349 550 A1

840

agccctccaa catcctcgtg aactctagag gggagatcaa gctgtgtgac ttcgggggtga  
900

5

gcgggccagct catcgactcc atggccaact ccttcgtggg cacgcgctcc tacatggctc  
960

10

cgagcgggtt gcagggcaca cttactcgg tgcagtcgga catctggagc atgggcctgt  
1020

ccctgggtgga gctggccgctc ggaaggtacc ccatcccccc gcccgacgcc aaagagctgg  
1080

15

agggcatctt tggccggccc gtggtcgcgc gggagaagg agagcctcac agcatctcgc  
1140

ctcggccgag gccccccggg cgccccgtca gcggtcacgg gatggatagc cggcctgcca  
1200

20

tggccatctt tgaactcctg gactatattg tgaacgagcc acctcctaag ctgccaacg  
1260

gtgtgttcac ccccgacttc caggagttag tcaataaatg cctcatcaag aaccagcgg  
1320

25

agcgggcgga cctgaagatg ctcaaaacc acaccttcat caagcggctc gaggtggaag  
1380

aagtggattt tgccggctgg ttgtgtaaaa ccctgcggct gaaccagccc ggcacacca  
1440

30

cgcgaccgc cgtgtgacag tggccgggct ccctgcgtcc cgctggtgac ctgcccaccg  
1500

35

tccctgtcca tgccccgccc ttccagctga ggacaggctg gcgcctccac ccaccctcct  
1560

gcctcaccctc tgccggagagc accgtggcgg ggcgacagcg catgcaggaa cgggggtctc  
1620

40

ctctcctgcc cgtcctggcc ggggtgcctc tggggacggg cgacgctgct gtgtgtggtc  
1680

tcagaggctc tgcttcctta ggttacaaaa caaacaggg agagaaaaag caaaaaaaaa  
1740

45

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa  
1759

50

<210> 5

<211> 18

55 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

60 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 5

65 tctcgttcc tccctcgt  
18

## ES 2 349 550 A1

<210> 6  
<211> 18  
<212> DNA  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido antisentido  
10  
<400> 6

**taacgcgctt ccaactcc**  
15 **18**

<210> 7  
20 <211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 7  
30

**ggcgtcggct tcttcttg**  
**18**

35 <210> 8  
<211> 18  
<212> DNA  
40 <213> Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido antisentido

45 <400> 8

**gttggtctcc gcagagct**  
50 **18**

<210> 9  
<211> 18  
55 <212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
60 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 9  
65

**tctgcttctg ggtaagaa**  
**18**

## ES 2 349 550 A1

<210> 10  
<211> 18  
<212> DNA  
5 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> oligonucleótido antisentido  
10  
<400> 10  
  
          **cccagctcac tgatcttc**  
15          **18**

<210> 11  
20 <211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial  
  
<220>  
25 <223> oligonucleótido antisentido  
  
<400> 11  
30  
          **gcttgtggga gaccttga**  
          **18**

35 <210> 12  
<211> 18  
<212> DNA  
40 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> oligonucleótido antisentido  
  
45 <400> 12  
  
          **gtacggagag ttgcactc**  
50          **18**

<210> 13  
<211> 18  
55 <212> DNA  
<213> Artificial  
  
<220>  
60 <223> oligonucleótido antisentido  
  
<400> 13  
  
65          **tgacagatact gatctcgc**  
          **18**

## ES 2 349 550 A1

<210> 14  
<211> 18  
<212> DNA  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido antisentido  
10  
<400> 14

**ttccagcttt cttcagga**  
15 **18**

<210> 15  
20 <211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
25 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 15  
30

**ggccttttat tacagcaa**  
**18**

<210> 16  
35 <211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> oligonucleótido antisentido

45 <400> 16

**ctctgtgcat gatcttgt**  
**18**

50

<210> 17  
<211> 18  
<212> DNA  
55 <213> Artificial

<220>  
60 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 17

65 **ctaggatggt ggagggct**  
**18**

## ES 2 349 550 A1

<210> 18  
<211> 18  
<212> DNA  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido antisentido  
10  
<400> 18

15           **agtcacagag cttgatct**  
              **18**

<210> 19  
20 <211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 19  
30

**agtcgatgag ctgcccgc**  
              **18**

35 <210> 20  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial  
40

<220>  
<223> oligonucleótido antisentido

45 <400> 20

**tggagtcttt ctggcgac**  
              **18**

50

<210> 21  
<211> 18  
55 <212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
60 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 21

65           **ctgactgcac agagtaat**  
              **18**

## ES 2 349 550 A1

<210> 22  
<211> 18  
<212> DNA  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido antisentido  
10  
<400> 22

15 **taccagagac agtcccat**  
**18**

<210> 23  
20 <211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 23  
30

30 **catctggagg agggatgg**  
**18**

35 <210> 24  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial  
40

<220>  
<223> oligonucleótido antisentido

45 <400> 24

50 **cacccaaaca tcagctcc**  
**18**

50 <210> 25  
<211> 18  
<212> DNA  
55 <213> Artificial

<220>  
60 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 25

65 **tctcagccgc atctcctt**  
**18**

## ES 2 349 550 A1

<210> 26  
<211> 18  
<212> DNA  
5 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> oligonucleótido antisentido  
10  
<400> 26

15           **gcagttttgg aggaggct**  
              **18**

<210> 27  
20 <211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial  
  
<220>  
25 <223> oligonucleótido antisentido  
  
<400> 27

30           **attaagcatt tattcaca**  
              **18**

35 <210> 28  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial  
40  
<220>  
<223> oligonucleótido antisentido  
45 <400> 28

**catgaacct gagttgct**  
              **18**

50  
  
<210> 29  
<211> 18  
55 <212> DNA  
<213> Artificial  
  
<220>  
60 <223> oligonucleótido antisentido  
  
<400> 29

65           **caaaatccac ttcctcag**  
              **18**

## ES 2 349 550 A1

<210> 30  
<211> 18  
<212> DNA  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido antisentido  
10  
<400> 30

15           **aggccgatgg tggagcag**  
              **18**

<210> 31  
<211> 18  
20 <212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
25 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 31

30           **agcagcatgg gttggtgt**  
              **18**

<210> 32  
35 <211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> oligonucleótido antisentido

45 <400> 32

**ctctttgttg cttcccaa**  
              **18**

50

<210> 33  
<211> 18  
55 <212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
60 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 33

65           **aggaggccca aaagcgac**  
              **18**

## ES 2 349 550 A1

<210> 34  
<211> 18  
<212> DNA  
5 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> oligonucleótido antisentido  
10  
<400> 34  
  
15 **aagagtagaa tcttggca**  
**18**

<210> 35  
20 <211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial  
  
<220>  
25 <223> oligonucleótido antisentido  
  
<400> 35  
30 **ctaccacat tcaccaa**  
**18**

35 <210> 36  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial  
40  
<220>  
<223> oligonucleótido antisentido  
45 <400> 36  
  
50 **gaaggatctc acaaggct**  
**18**

<210> 37  
<211> 18  
55 <212> DNA  
<213> Artificial  
  
<220>  
60 <223> oligonucleótido antisentido  
  
<400> 37  
65 **gagttctaca tgaaaagc**  
**18**

## ES 2 349 550 A1

<210> 38  
<211> 18  
<212> DNA  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido antisentido  
10  
<400> 38

**tgaagcccca gctatcat**  
15 **18**

<210> 39  
20 <211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
25 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 39  
30

**aaccagaagt ctacagat**  
**18**

35 <210> 40  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial  
40

<220>  
<223> oligonucleótido antisentido  
45

<400> 40

**actaagtatc ccacacag**  
50 **18**

<210> 41  
<211> 18  
55 <212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
60 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 41

65 **tacaacagca ttggtact**  
**18**

## ES 2 349 550 A1

<210> 42  
<211> 18  
<212> DNA  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> oligonucleótido antisentido  
10  
<400> 42

**aaggattttc atacaatt**  
15 **18**

<210> 43  
20 <211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
25 <223> siRNA (MEK-1)

<400> 43  
30

**aagcaactca tggttcatgc ttt**  
**23**

35 <210> 44  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial  
40

<220>  
<223> siRNA (MEK-1)

45 <400> 44

**aagtcctgaa gaaagctgga a**  
50 **21**

<210> 45  
<211> 21  
55 <212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
60 <223> siRNA (MEK-2)

<400> 45

65 **aagaaggaga gcctcacagc a**  
**21**

## ES 2 349 550 A1

<210> 46  
<211> 21  
<212> DNA  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> siRNA (MEK-2)  
10  
<400> 46

**aaggtcggcg aactcaaaga c**  
15 **21**

<210> 47  
<211> 21  
20 <212> RNA  
<213> Artificial

<220>  
25 <223> siRNA (MEK-1)

<400> 47

30 **agaaccucca uccaugugcu u**  
**21**

<210> 48  
35 <211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> siRNA (MEK-1)

45 <400> 48

**ucaaaucugc ucucucugcu u**  
50 **21**

<210> 49  
<211> 21  
<212> DNA  
55 <213> Artificial

<220>  
60 <223> siRNA (MEK-1)

<400> 49

65 **aguugcuuca aaucugcucu u**  
**21**

## ES 2 349 550 A1

<210> 50  
<211> 21  
<212> DNA  
5 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> siRNA (MEK-1)  
10  
<400> 50

15       **agaugaauua gcuuucuggu u**  
          **21**

<210> 51  
<211> 20  
20 <212> DNA  
<213> Artificial  
  
<220>  
25 <223> cebador  
  
<400> 51

30       **tgaaggtgac agagcctctg**  
          **20**

35 <210> 52  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial  
40  
<220>  
<223> cebador  
45 <400> 52

**tgggtgaatt cgggcttggt**  
          **20**

50  
  
<210> 53  
<211> 18  
55 <212> DNA  
<213> Artificial  
  
<220>  
60 <223> cebador  
  
<400> 53

65       **gcaaatactg caacaagg**  
          **18**

## ES 2 349 550 A1

<210> 54  
<211> 19  
<212> DNA  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> cebador  
10

<400> 54  
15 **gcactggtac ttcttgaca**  
**19**

<210> 55  
<211> 21  
20 <212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
25 <223> cebador

<400> 55  
30 **aaagccgctc gcaagagtgc g**  
**21**

<210> 56  
35 <211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial  
40

<220>  
<223> cebador  
45 <400> 56

**acttgcctcc tgcaaagcac**  
**20**  
50

<210> 57  
<211> 27  
55 <212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
60 <223> cebador

<400> 57  
65 **ttcaaatgag attgtggaaa aattgct**  
**27**

ES 2 349 550 A1

<210> 58

<211> 24

<212> DNA

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

10

<400> 58

15        agatcatctc tgcctgagta tctt  
          24

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200802466

②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.08.2008

②③ Fecha de prioridad: **00-00-0000**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K31/275** (2006.01)  
**A61P43/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	XIAO-CONG LIU, BI-CHENG LIU, XIAO-LIANG ZHANG, MIN-XIA LI, JIAN-DONG ZHANG. Role of ERK1/2 and PI3-K in the regulation of CTGF-induced ILK expression in HK-2 cells. Clinica Chimica Acta 382 (2007) 89-94. Páginas 93-94.	1-4
Y	ENGLISH J., COBB M. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. Trends in Pharmacological Sciences (2002) Vol.23, No.1, 40-45. Páginas 42-43.	1-4
A	SELGAS, R. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of the mesothelial cell-its role in the response of the peritoneum to dialysis. Nephrology Dialysis Transplantation (2006) 21 [Suppl 2]: ii2-ii7. doi:10.1093/ndt/gf1183. Página ii2-ii3.	1-4
A	SELGAS, R. et al. Transición epitelio-mesenquimal en procesos fibrosantes. Células mesoteliales obtenidas ex vivo de pacientes tratados con diálisis peritoneal como modelo de transdiferenciación. Nefrología (2004). Vol. XXIV. Número 1. 34-39. Páginas 34.	1-4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº: TODAS

Fecha de realización del informe  
25.11.2010

Examinador  
M. García Bueno

Página  
1/5

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita:

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-4	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-4	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	XIAO-CONG LIU, BI-CHENG LIU, XIAO-LIANG ZHANG, MIN-XIA LI, JIAN-DONG ZHANG. Role of ERK1/2 and PI3-K in the regulation of CTGF-induced ILK expression in HK-2 cells. <i>Clinica Chimica Acta</i> 382 (2007) 89-94.	2007
D02	ENGLISH J., COBB M. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. <i>Trends in Pharmacological Sciences</i> (2002) Vol.23, No.1, 40-45.	2002
D03	SELGAS, R. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition of the mesothelial cell-its role in the response of the peritoneum to dialysis. <i>Nephrology Dialysis Transplantation</i> (2006) 21 [Suppl 2]: ii2-ii7. doi:10.1093/ndt/gf1183.	2006
D04	SELGAS, R. et al. Transición epitelio-mesenquimal en procesos fibrosantes. Células mesoteliales obtenidas ex vivo de pacientes tratados con diálisis peritoneal como modelo de transdiferenciación. <i>Nefrología</i> (2004). Vol. XXIV. Número 1. 34-39.	2004

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende un agente U0126 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la fibrosis peritoneal. (reivindicaciones 1-4).

El documento D01 divulga que la inhibición de kinasa unida a integrina (ILK), una proteína Ser/Thr-kinasa, inducida por CTGF (factor de crecimiento del tejido conectivo), mediante las vías de señalización PI3-K y/o MEK/ERK1/2 podrían tener valor terapéutico en la fibrosis renal. Para estudiar esta implicación, se han utilizado inhibidores de MEK1 y MEK2.

El documento D02 divulga inhibidores de MEK1 y MEK2, entre los que se encuentran U0126.

El documento D03 divulga que la fibrosis de la membrana peritoneal es una de las complicaciones de la diálisis peritoneal.

Debido a la diálisis peritoneal las células mesoteliales del peritoneo procedentes de efluentes de la diálisis muestran una progresiva pérdida del fenotipo epitelial y adquieren características fibroblásticas denominándose a éste proceso transición epitelio-mesenquimal (TEM) o transdiferenciación (ver página ii2).

También se divulga que la expresión del factor Snail regula TEM mediante la inhibición de la expresión de cadherina-E. La expresión de Snail integra una cascada de señales intracelulares activadas por TGF-B que incluyen la quinasa unida a integrina ILK y el factor de transcripción nuclear kappa B (NF-kB), entre otras (ver página ii3).

Otra señal de transducción estimulada por TGF-B es la vía H-Ras/Raf/ERK, la cual también es necesaria para la inducción de la expresión de Snail y TEM (ver página ii3).

El documento D04 divulga que el tratamiento de las células mesoteliales in vitro con medios con alta concentración de glucosa o citoquinas proinflamatorias inducen la expresión de E-cadherina, que desempeña un papel central en el control de la transición epitelio-mesenquimal. El factor de transcripción Snail es un potente represor de la transcripción de E-cadherina e inductor de la transdiferenciación (ver página 35).

**1.-NOVEDAD (Art. 6 Ley 11/1986).**

Las reivindicaciones 1-4 parecen ser nuevas en el sentido del artículo 6 de la Ley 11/1986.

**2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8 Ley 11/1986).**

El documento D01 divulga inhibidores de MEK1 y MEK2 para elaborar un medicamento para el tratamiento de la fibrosis peritoneal (ver páginas 93-94).

En el documento D01 no aparece la molécula U0126 como inhibidor de MEK1 y MEK2. Sin embargo, esta molécula si es divulgada en el documento D02 junto a la molécula PD98059, que si es divulgada en el documento D01. Ambas moléculas compiten por la unión a MEK1 para inhibirla (ver página 41-43).

Además, el documento D02 también divulga el uso de estos inhibidores de MEK1 y MEK2 junto con otros principios activos (ver conclusiones).

Se considera que un experto en la materia intentaría combinar las partes principales del documento D01 con el documento D02 para obtener las características de las reivindicaciones 1-3 y tener una expectativa razonable de éxito.

Por lo tanto, el objeto de las reivindicaciones 1-3 no implica actividad inventiva (Artículo 8 Ley 11/1986).