



No. 16-026431-00000-0000

Fecha: 2016-02-04 16:08:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 9



No. 14-165787-00011-0000

Fecha: 2016-02-04 16:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 9

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

K

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO SEÑALIZACIÓN DE SLIT-ROBO PARA
DIAGNOSIS Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD DEL
RIÑÓN

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATIONDOMICILIO BOSTON, MA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA74. APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. BOGOTÁ, D.C. _____



No. 14-165787-00011-0000

Fecha: 2016-02-04 16:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 10 9



No. 16-026431-00000-0000

Fecha: 2016-02-04 16:08:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 10 9

AS. 135.923

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión

☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐ Persona Jurídica ☒

BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATION
Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre representante legal _____

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☒

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/Pais de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
US	One Boston Medical Center Place, MA 02118	Boston
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☒ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

CADENA SARMIENTO JUAN PABLO 80.410.337 57492
Apellidos y Nombre Documento de identificación Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Ciudad	
Calle 70 A #4-41	Bogotá, D.C.	
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
<u>notificaciones@bc.com.co</u>	742-2200	744-2200

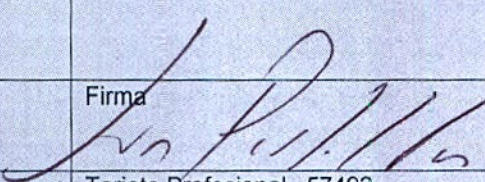
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

2

4. Datos del trámite		
CONVERSIÓN	DIVISIÓN	FUSIÓN
Expediente:	Expediente: 14 165.787	Expediente:
De:	De:	De:
A:	A:	A:

5. Anexos	
Comprobante de pago No. 16-000737	Fecha: 05-01-2018
16-000676	05-01-2016

6. Anexos
☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación.
☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación.
☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división.
☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud.
☒ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

7. Firma	
Nombre y apellidos	Firma
JUAN PABLO CADENA SARMIENTO	
C.C 80.410.337	Tarjeta Profesional 57492

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

435923
3



RECIBO DE CAJA

No. 16 - 000737

Bogotá D.C., Enero 05 de 2016 - 17:07:55

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	344	05/01/2016	79.138.500.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	80.000.00	80.000.00
			\$80.000.00

SON: **OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-026431 - -00000-0000

Fecha: 2016-02-04 16:08:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 10

9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-165787 - -00011-0000

Fecha: 2016-02-04 16:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 10

9

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 5 de 2016 - 17:08:16

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 16 - 000676

Bogotá D.C., Enero 05 de 2016 - 17:07:55

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.

NI 860.047.372

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	344	05/01/2016	79.138.500.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
7 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	40.000.00	280.000.00
			\$280.000.00

SON: **DOSIENTOS OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-026431- -00000-0000

Fecha: 2016-02-04 16:08:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 10

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-165787- -00011-0000

Fecha: 2016-02-04 16:08:39 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 10

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 5 de 2016 - 17:08:14

REIVINDICACIONES DIVISIONAL

1. Un método, caracterizado porque comprende:
 - a. ensayar una muestra de prueba biológica de un sujeto para determinar un nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o un RNA que codifica un polipéptido ROBO2;
 - b. determinar si el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 en la muestra de prueba biológica está arriba de un nivel de umbral de referencia; y
 - c. diagnosticar al sujeto como en necesidad de tratamiento o terapia para la enfermedad de riñón crónica.
2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el ensayo del nivel de expresión del polipéptido ROBO2 se realiza utilizando un anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del mismo específico para el polipéptido ROBO2.
3. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el ensayo del nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 se realiza utilizando PCR o un ensayo de hibridación.
4. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque la muestra de prueba biológica es una biopsia de riñón, orina, sangre, muestra de suero o células formadas en pelotillas de una muestra de orina.
5. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 está por lo menos 20% arriba del nivel de umbral de referencia.

6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 es por lo menos dos desviaciones estándares arriba del nivel de umbral de referencia.

7. Un ensayo, caracterizado porque comprende:

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

b. medir el nivel del polipéptido ROBO2 o un RNA que codifica un polipéptido ROBO2,

en donde un nivel incrementado del polipéptido ROBO2 o el RNA que codifica un polipéptido ROBO2, con relación a una muestra biológica normal, identifica a un sujeto que tiene enfermedad de riñón crónica y/o progresión de enfermedad de riñón crónica o proteinuria.

8. El ensayo de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque la detección del nivel de expresión del polipéptido ROBO2 se realiza utilizando un anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del mismo específico para el polipéptido ROBO2.

9. El ensayo de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque la detección del nivel de expresión del RNA que codifica un ROBO2 se realiza utilizando PCR o un ensayo de hibridación.

10. El ensayo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7-9, caracterizado porque la muestra de prueba biológica es una biopsia de riñón, orina, sangre, muestra de suero, o células formadas en pellet de una muestra de orina.

11. El ensayo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7-10, caracterizado porque el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 está por lo menos 20% arriba del nivel de umbral de referencia.

7
7

12. El ensayo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7-10, caracterizado porque el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 es por lo menos dos desviaciones estándares arriba del nivel de umbral de referencia.

13. El ensayo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7-12, caracterizado porque el sujeto se ha diagnosticado con diabetes o presión arterial alta.

14. Un sistema para determinar si un sujeto está en riesgo por enfermedad de riñón crónica o proteinuria, o tiene enfermedad de riñón crónica, caracterizado porque comprende:

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

b. un módulo de comparación configurado para recibir el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 determinado por el módulo de medición y realizar por lo menos un análisis para determinar si el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 es mayor que un nivel de referencia o relación pre-determinado, y proporcionar un contenido recuperado; y

c. un módulo de exhibición para exhibir un contenido en base a la salida de datos del módulo de comparación, en donde el contenido comprende una señal indicativa de que el nivel o relación de expresión del polipéptido ROBO2 o RNA es mayor que el nivel o relación de referencia pre-determinado, o una señal indicativa de que el nivel o relación de expresión de ROBO2 no es mayor que el nivel de referencia o relación pre-determinada.

15. El sistema de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el contenido exhibido sobre el módulo de exhibición además comprende una señal indicativa del sujeto que es recomendado para recibir un régimen de tratamiento particular.

16. Un sistema para determinar si un sujeto está en riesgo por enfermedad de riñón crónica o proteinuria, o tiene enfermedad de riñón crónica, caracterizado porque comprende:

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

i. una relación de expresión de ROBO2 mayor que una relación pre-determinada, o

ii. un nivel de expresión de ROBO2 mayor que un nivel pre-determinado,

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

c. un módulo de exhibición para exhibir un contenido en base a la salida de datos del módulo de determinación, en donde el contenido comprende una señal indicativa de que la relación de expresión de ROBO2 es mayor que la relación o nivel pre-determinado de ROBO2 mayor que un nivel pre-determinado, o una señal indicativa de que la relación de expresión de ROBO2 no es mayor que la relación pre-determinada o no mayor que un nivel pre-determinado.

17. El sistema de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque el contenido exhibido sobre el módulo de exhibición además comprende una señal indicativa del sujeto que es recomendado para recibir un régimen de tratamiento particular.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	TESTIGO DOCUMENTAL	Folio: <u>9</u>
---	---------------------------	-----------------

Dependencia Jerárquica: DEL PROPIEDAD INDUSTRIAL		Código	2000
Dependencia Productora: GRUPO DE NUEVAS CREACIONES		Código	2020
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:			
DESCRIPCIÓN DE LA PRUEBA			
Nombre de la Serie / Subserie:		Código:	
Expediente: <u>14-165787-11</u> <u>16-026431-0</u>		Solicitante / <i>Quejoso / Demandante / otros.</i>	
Prueba excluida: <u>CD</u>			
N°. de Pruebas excluidas: <u>1</u>			
Fecha de emisión de la Prueba:			
UBICACIÓN DE LA PRUEBA EN LA SECCIÓN DE MATERIAL GRÁFICO			
N°. de bloque:		Otras especificaciones:	
N°. de rodante:			
N°. de estante:			
N°. de archivador:			
N°. de entrepaño:			
N°. de gaveta:			
N°. de caja:			
IMPORTANTE: - El material gráfico o especial que se encuentra dentro o anexo a las unidades documentales o expedientes, debe extraerse y llevarse a aquella sección del archivo que se haya dispuesto para conservar documentos en distintos formatos. - Entiéndase por material gráfico todos aquellos dibujos, croquis, mapas, planos, fotografías, ilustraciones, pictografías, códigos, prensa, objetos tridimensionales, entre otros.			
Observaciones:		Unidad de Conservación ☐ Bolsa ☐ Caja ☐ Libro ☐ Sobre ☐ Tomo ☐ Otro	
<u>El cd contiene: 5 archivos en</u> <u>Formato Pdf procesados y</u> <u>cargados al sistema.</u>		Soporte Documental ☒ CD ☐ Disquete ☐ DVD ☐ Folleto ☐ Periódico ☐ Plano ☐ Publicación Periódica ☐ USB ☐ Otro	

**SEÑALIZACIÓN DE SLIT-ROBO PARA DIAGNOSIS Y TRATAMIENTO DE
ENFERMEDAD DEL RIÑÓN**

CAMPO DE LA INVENCION

El campo de la invención se relaciona a métodos
5 para el tratamiento de enfermedad de riñón crónica y
proteinuria y para la diagnosis de enfermedad de riñón
crónica y monitoreo de los efectos del tratamiento en la
progresión de la enfermedad de riñón crónica y proteinuria.

APOYO GUBERNAMENTAL

10 Esta invención se hizo con el Apoyo Gubernamental
bajo el Contrato No. DK078226 otorgado por Los Institutos
Nacionales de la Salud. El Gobierno tiene ciertos derechos en
la invención.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

15 Se proporcionan en la presente métodos novedosos
para el tratamiento de enfermedad de riñón crónica y
proteinuria y para la diagnosis de enfermedad de riñón
crónica, y monitoreo de los efectos del tratamiento en la
progresión de enfermedad de riñón crónica y proteinuria
20 basado, en parte, en el descubrimiento de los inventores de
una función novedosa e inesperada para la ruta de
señalización de SLIT-ROBO en la regulación del citoesqueleto
de F-actina de podocito y la estructura del proceso basal en
el riñón.

25 Por consiguiente, en algunos aspectos, se

proporcionan en la presente métodos para el tratamiento de enfermedad de riñón crónica en un sujeto en necesidad del mismo, los métodos que comprenden administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de un enfermedad de riñón crónica una
5 cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende un inhibidor de ROBO2.

También se proporciona en la presente, en algunos aspectos, un método para la reducción de proteinuria en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar a un
10 sujeto que tiene o está en riesgo de proteinuria una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende un inhibidor de ROBO2.

En algunas modalidades de estos métodos y todos de tales métodos descritos en la presente, el inhibidor de ROBO2
15 es un anticuerpo de bloqueo o fragmento de enlace a antígeno del mismo específico para ROBO2, una molécula anti-sentido específica para ROBO2, un RNA de interferencia corto (siRNA) específico para ROBO2, un inhibidor de molécula pequeña de ROBO2, un polipéptido inhibidor de ROBO2, o un análogo
20 estructural de ROBO2.

En algunas modalidades de estos métodos y todos de tales métodos descritos en la presente, el inhibidor de ROBO2 bloquea o reduce el enlace de ROBO2 a SLIT, a Nck, o a ambos.

En algunas modalidades de estos métodos y todos de
25 tales métodos descritos en la presente, el inhibidor de ROBO2

es específico para el dominio de enlace Ig1 SLIT, los dominios de enlace Ig1 e Ig2 SLIT, el dominio de enlace intracelular Nck, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas modalidades de estos métodos y todos de
5 tales métodos descritos en la presente, el polipéptido o inhibidor de ROBO2 es una proteína de fusión ROBO2 negativa dominante, un polipéptido que comprende un dominio extracelular ROBO2 sin el dominio intracelular, o un polipéptido que comprende un dominio intracelular ROBO2 sin
10 el dominio extracelular.

En algunas modalidades de estos métodos y todos de tales métodos descritos en la presente, el sujeto que tiene o está en riesgo de una enfermedad de riñón crónica tiene nefropatía diabética o presión arterial alta.

15 En algunas modalidades de estos métodos y todos de tales métodos descritos en la presente, el método comprende adicionalmente administrar al sujeto un agente terapéutico adicional.

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

También se proporcionan en la presente, en algunos
25 aspectos, métodos que comprenden:

- a. someter a ensayo una muestra de prueba biológica de un sujeto para determinar un nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o un RNA que codifica un polipéptido ROBO2;
- 5 b. determinar si el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 en la muestra de prueba biológica está por arriba de un nivel de umbral de referencia; y
- 10 c. diagnosticar al sujeto como en necesidad de tratamiento o terapia para enfermedad de riñón crónica.

En algunas modalidades de estos métodos y todos de tales métodos descritos en la presente, el ensayo del nivel de expresión del polipéptido ROBO2 se lleva a cabo utilizando un anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno del mismo específico para el polipéptido ROBO2.

En algunas modalidades de estos métodos y todos de tales métodos descritos en la presente, el ensayo de nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 se lleva a cabo utilizando PCR o un ensayo de hibridación.

En algunas modalidades de estos métodos y todos de tales métodos descritos en la presente, la muestra de prueba biológica es una biopsia de riñón, muestra de orina, sangre, muestra de suero, o células en pellet de una muestra de

orina.

En algunas modalidades de estos métodos y todos de tales métodos descritos en la presente, el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del RNA que
5 codifica un polipéptido ROBO2 es por lo menos 20% por arriba del nivel de umbral de referencia.

En algunas modalidades de estos métodos y todos de tales métodos descritos en la presente, el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del RNA que
10 codifica un polipéptido ROBO2 es por lo menos dos desviaciones estándares por arriba del nivel de umbral de referencia.

También se proporcionan en la presente, en algunos aspectos, ensayos que comprenden:

- 15 a. poner en contacto una muestra de prueba biológica aislada de un sujeto con un reactivo que detecta el polipéptido ROBO2 o un RNA que codifica un polipéptido ROBO2; y
- b. medir el nivel del polipéptido ROBO2 o un RNA que
20 codifica un polipéptido ROBO2,
en donde un nivel incrementado del polipéptido ROBO2 o el RNA que codifica un polipéptido ROBO2, relativo con una muestra biológica normal, identifica un sujeto que tiene enfermedad de riñón crónica y/o progresión de
25 enfermedad crónica o proteinuria.

En algunas modalidades de estos ensayos y todos de tales ensayos descritos en la presente, la detección de nivel de expresión del polipéptido ROBO2 se lleva a cabo utilizando un fragmento de enlace a anticuerpo o antígeno del mismo
5 específico para el polipéptido ROBO2.

En algunas modalidades de estos ensayos y todos de tales ensayos descritos en la presente, la detección del nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 se lleva a cabo utilizando un PCR o un ensayo de hibridación.

10 En algunas modalidades de estos ensayos y todos de tales ensayos descritos en la presente, la muestra de prueba biológica es una biopsia de riñón, muestra de orina, sangre, suero, o células formadas en pellet de una muestra de orina.

15 En algunas modalidades de estos ensayos y todos de tales ensayos escritos en la presente, el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 es por lo menos 20% por arriba del nivel de umbral de referencia.

20 En algunas modalidades de estos ensayos y todos de tales ensayos descritos en la presente, el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 es por lo menos dos desviaciones estándares por arriba del nivel de umbral de
25 referencia.

En algunas modalidades de estos ensayos y todos de tales ensayos descritos en la presente, el sujeto se ha diagnosticado con diabetes o presión arterial alta.

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

- a. un módulo de medición configurado para determinar el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel
10 de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 en una muestra biológica obtenida de un sujeto;
- b. un módulo de comparación configurado para recibir el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel
15 de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 determinado por el módulo de medición y llevar a cabo por lo menos un análisis para determinar si el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del RNA que codifica un
20 polipéptido ROBO2 es mayor que un nivel o relación de referencia predeterminados, y proporcionar un contenido recuperado; y
- c. un módulo de visualización para mostrar un contenido basado en la salida de datos del módulo de
25 comparación, en donde el contenido comprende una

señal indicativa de que el nivel o relación de expresión del polipéptido ROBO2 o RNA es mayor que el nivel o relación de referencia predeterminado, o una señal indicativa que el nivel o relación de expresión del ROBO2 no es mayor que el nivel de referencia o relación predeterminada.

En algunas modalidades de estos sistemas y todos de tales sistemas descritos en la presente, el contenido mostrado en el módulo de visualización comprende además una señal indicativa del sujeto que es recomendado para recibir un régimen de tratamiento particular.

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

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

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

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

- b. un dispositivo de almacenamiento configurado para almacenar salidas de datos del módulo de determinación; y
- c. un módulo de visualización para mostrar un contenido
5 basado en la salida de datos del módulo de determinación, en donde el contenido comprende una señal indicativa de que la relación de expresión de ROBO2 es mayor que la relación o nivel predeterminado de ROBO2 mayor que un nivel
10 predeterminado, o una señal indicativa que la relación de expresión de ROBO2 no es mayor que la relación predeterminada o no mayor que un nivel predeterminado.

En algunas modalidades de estos sistemas y todos de
15 tales sistemas descritos en la presente, el contenido mostrado en el módulo de visualización comprende además una señal indicativa del sujeto que es recomendado para recibir un régimen de tratamiento particular.

También se proporcionan en la presente, en algunos
20 aspectos, métodos para tratar a un sujeto humano con un riesgo de enfermedad de riñón crónica o proteinuria, que comprende administrar un tratamiento o terapia para prevenir la ocurrencia de enfermedad de riñón crónica o proteinuria a un sujeto humano quien es determinado que tiene un nivel de
25 proteína ROBO2 por arriba de un nivel de umbral de

referencia.

En algunas modalidades de estos métodos y todos de tales métodos descritos en la presente, el nivel de proteína ROBO2 es por lo menos 20% por arriba del nivel de referencia.

5 En algunas modalidades de estos métodos y todos de tales métodos descritos en la presente, el nivel de proteína ROBO2 es por lo menos dos desviaciones estándares por arriba del nivel de referencia.

En algunas modalidades de estos métodos y todos de
10 tales métodos descritos en la presente, el tratamiento o terapia para prevenir la ocurrencia de enfermedad de riñón crónica o proteinuria comprende un inhibidor de ROBO2.

En algunas modalidades de estos métodos y todos de tales métodos descritos en la presente, el inhibidor de ROBO2
15 es un anticuerpo de bloqueo o fragmento de enlace a antígeno del mismo específico para ROBO2, una molécula anti-sentido específica para ROBO2, un RNA de interferencia corto (siRNA) específico para ROBO2, un inhibidor de molécula pequeña de ROBO2, un polipéptido inhibidor de ROBO2, o un análogo
20 estructural ROBO2.

En algunas modalidades de estos métodos y todos de tales métodos descritos en la presente, el inhibidor de ROBO2 bloquea o reduce el enlace de ROBO2 a SLIT, a Nck, o a ambos.

En algunas modalidades de estos métodos y todos de
25 tales métodos descritos en la presente, el inhibidor de ROBO2

es específico para el dominio de enlace a Ig1 SLIT, los dominios de enlace a Ig1 e Ig2 SLIT, el dominio de enlace intracelular Nck, o cualquier combinación de los mismos.

En algunas modalidades de estos métodos y todos de
5 tales métodos descritos en la presente, el inhibidor de ROBO2 es una proteína de fusión ROBO2 negativa dominante, un polipéptido que comprende un dominio extracelular ROBO2 sin el dominio extracelular, o un polipéptido que comprende un dominio extracelular ROBO2 sin el dominio extracelular.

10 También se proporcionan en la presente, en algunos aspectos, inhibidores de ROBO2 para el uso en el tratamiento de una enfermedad de riñón crónica, y un inhibidor de ROBO2 para el uso en el tratamiento de proteinuria.

En algunas modalidades de estos usos y todos de
15 tales usos descritos en la presente, el inhibidor de ROBO2 es un anticuerpo de bloqueo o un fragmento de enlace a antígeno del mismo específico para ROBO2, una molécula anti-sentido específica para ROBO2, un RNA de interferencia corto (siRNA) específico para ROBO2, un inhibidor de molécula pequeña de
20 ROBO2, un polipéptido inhibidor de ROBO2, o un análogo estructural ROBO2.

En algunas modalidades de estos usos y todos de tales usos descritos en la presente, el inhibidor de ROBO2 bloquea o reduce el enlace de ROBO2 a SLIT, a Nck, o a ambos.

25 En algunas modalidades de estos usos y todos de

tales usos descritos en la presente, el inhibidor de ROBO2 es específico para el dominio de enlace a Ig1 SLIT, los dominios de enlace a Ig1 e Ig2 SLIT, el dominio de enlace intracelular Nck, o cualquier combinación de los mismos.

5 En algunas modalidades de estos usos y todos de tales usos descritos en la presente, el polipéptido inhibidor de ROBO2 es una proteína de fusión ROBO2 negativa dominante, un polipéptido que comprende un dominio extracelular ROBO2 y el dominio intracelular, o un polipéptido que comprende un
10 dominio intracelular ROBO2 sin el dominio extracelular.

En algunas modalidades de estos usos y todos de tales usos descritos en la presente, la enfermedad de riñón crónica o proteinuria es provocada por nefropatía diabética o presión arterial alta.

15 En algunas modalidades de cualquiera de estos aspectos y todos de tales aspectos descritos en la presente, ROBO2 se refiere a ROBO2 humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 codificada por la secuencia de mRNA de SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades de cualquiera de
20 estos aspectos y todos de tales aspectos descritos en la presente, ROBO2 se refiere a ROBO2 humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 codificada por la secuencia mRNA de SEQ ID NO: 4.

Definiciones

25 Por conveniencia, ciertos términos empleados en la

presente, en la especificación, ejemplos y reivindicaciones adjuntas se recolectan aquí. A menos que se establezca de otra manera, o sea implícito del contexto, los siguientes términos y frases incluyen los significados proporcionados enseguida. A menos que se establezca explícitamente de otra manera, o sea evidente del contexto, los términos y frases enseguida no excluyen el significado que el término o frase ha adquirido en la técnica a la cual pertenece. Las definiciones se proporcionan para ayudar en la descripción de las modalidades particulares, y no se proponen para limitar la invención reclamada, debido a que el alcance de la invención se limita solo por las reivindicaciones. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado como es entendido comúnmente por una persona de experiencia ordinaria en la técnica a la cual está invención pertenece.

Como se utiliza en la presente el término "que comprende" o "comprende" se utiliza en referencia a composiciones, métodos, y componente(s) respectivo de los mismos, que son esenciales a la invención, pero abiertos a la inclusión de elementos no específicos, ya sea esenciales o no.

Como se utiliza en la presente el término "que consiste esencialmente de" se refiere a aquellos elementos

requeridos para una modalidad dada. El término permite la presencia de elementos adicionales que no afectan materialmente la característica(s) básica y novedosa o funcional de esa modalidad de la invención.

5 El término "que consiste de" se refiere a composiciones, métodos, y componentes respectivos de los mismos como son descritos en la presente, que son exclusivos de cualquier elemento no citado en esa descripción de la modalidad.

10 Como se utiliza en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera. De esta manera por ejemplo, las referencias al "método" incluye uno o más
15 métodos, y/o etapas del tipo descrito en la presente y/o que llegarán a ser evidentes para aquellas personas expertas en la técnica en la lectura de esta descripción y así sucesivamente.

Diferente en los ejemplos de operación, o donde se
20 indique de otra manera, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción utilizados en la presente se deben entender como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" cuando se utiliza en relación con
25 porcentajes puede significar $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, o $\pm 1\%$.

A menos que se defina de otra manera en la presente, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente solicitud tendrán los significados que son comúnmente entendidos por aquellas personas de experiencia ordinaria en la técnica a la cual esta descripción pertenece. Se debe entender que esta invención no se limita a la metodología particular, protocolos, y reactivos, etc., descritos en la presente y como tal pueden variar. La terminología utilizada en la presente es para el propósito de describir modalidades particulares solamente, y no se propone para limitar el alcance de la presente invención, que se define solamente por las reivindicaciones. Las definiciones de los términos comunes en inmunología, y biología molecular se pueden encontrar en The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 18th Edition, publicada por Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-18-2); Robert S. Porter y *colaboradores* (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicadas por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); Immunology by Werner Luttmann, publicada por Elsevier, 2006. Las definiciones de los términos comunes en biología molecular se encuentran en Benjamin Lewin, Genes IX, publicada por Jones & Bartlett Publishing, 2007 (ISBN-13: 9780763740634); Kendrew y

colaboradores (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); and Robert A. Meyers (ed.), *Maniatis y colaboradores*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., EUA (1982); Sambrook y *colaboradores*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (1989); Davis y *colaboradores*, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., Nueva York, EUA (1986); or Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol.152, S. L. Berger and A. R. Kimmerl Eds., Academic Press Inc., San Diego, EUA (1987); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB) (Fred M. Ausubel, y *colaboradores* ed., John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, y *colaboradores*, ed., John Wiley and Sons, Inc.) and Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, y *colaboradores*, ed. John Wiley and Sons, Inc.), que se incorporan a manera de referencia en la presente en sus totalidades.

Se entiende que la siguiente descripción detallada y los siguientes ejemplos son ilustrativos solamente y no se van a tomar como limitaciones en el alcance de la invención. Varios cambios y modificaciones a las modalidades descritas, que serán evidentes para aquellas personas de experiencia en

la técnica, se pueden hacer sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención. Además, todas las patentes, solicitudes de patente, y publicaciones identificadas se incorporan expresamente en la presente a manera de referencia para el propósito de describir y divulgar, por ejemplo, las metodologías descritas en tales publicaciones que se podrían utilizar en relación con la presente invención. Estas publicaciones se proporcionan solamente para su descripción antes de fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este sentido se debe considerar como una admisión que los inventores no tienen derecho a anteceder tales en virtud de la técnica previa o por cualquier otra razón. Todas las declaraciones en cuanto a la fecha o representación como los contenidos de estos documentos se basan en la información disponible a los solicitantes y no constituyen ninguna admisión como para la corrección de las fechas o contenidos de estos documentos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las **FIGS. 1A-1R** muestran que Robo2 se expresa y se sitúa en la superficie de células basales de podocitos. Todas las inmunotinciones en (FIGS. 1A-1Q) se llevan a cabo en los días E16.5 de ratón a 600X de aumento (ver FIGS. 5A-5M para inmunotinciones en los glomérulos de ratón adulto). (FIGS. 1A-1C) el Robo2 se co-localiza con la proteína de diafragma slit de podocitos nefrina. (FIGS. 1D-2F) Robo2 se co-localiza

con la proteína de diafragma slit de podocitos podocina. (FIGS. 1G-1I) Robo2 se co-localiza con la proteína adaptadora Nck en los glomérulos. (FIGS. 1J-1L) Robo2 se expresa en la superficie de podocitos basales adyacentes a la proteína de membrana basal glomerular nidógeno. (FIGS. 1M-1O) Robo2 no se co-localiza con el marcador de proteína de células endoteliales glomerular Pecam1. (FIG. 1P) la región agrandada en recuadro en (FIG. 1L) muestra que el Robo2 se expresa predominantemente sobre la superficie de células basales (flecha) de los podocitos (p) adyacentes al marcador de membrana basal glomerular nidógeno. El Robo2 se expresa débilmente en las superficies celulares ápicas y laterales (cabezas de flechas) de los podocitos. (FIG. 1Q) el Robo2 se expresa predominantemente sobre la superficie de células basales (flechas) de los podocitos (p) y se expresa débilmente en las superficies celulares ápicas o laterales (cabezas de flecha). (FIG. 1R) la microscopía electrónica de inmuno-oro muestra la localización de parciales de oro (flechas) conjugados al anticuerpo Robo2 en el proceso basal (fp) de un podocito de un ratón de 3 semanas de edad. GBM, membrana basal glomerular. Aumento: 50,000X. Ver también FIGS. 5A-5M.

Las **FIGS. 2A-2J** muestran que el Robo2 interactúa con la proteína adaptadora Nck y forma un complejo con nefrina. (FIG. 2A) los ensayos de dos híbridos de levadura

muestran una interacción positiva entre el dominio intracelular Robo2 (Robo2-ICD) y Nck1. El reportador LacZ (X-gal): +++, la levadura se volvió oscura; ++, luz; -, blanco en 24 horas. Reportador de leucina (-Leu): +, la levadura se desarrolló; -, la levadura no se desarrolló. CC, región conservada citoplásmica. Los números indican las posiciones de residuos en la proteína de longitud completa. (FIG. 2B) los ensayos de dos híbridos de levadura muestran que los primeros dos dominios SH3 de Nck1 son requeridos para su interacción con Robo2-ICD. (FIG. 2C) Los ensayos de dos híbridos de levadura muestran los dominios de enlace potenciales que median la interacción de Robo2 y Nck1. La secuencia es la región de enlace potencial en Robo2 para Nck1. Se destacan las regiones ricas en prolina. (FIG. 2D) La Co-precipitación de Robo2 y Nck. Los lisados celulares en la línea 5 se recolectan de células transfectadas con His-myc-Robo2 (utilizadas en las líneas 1 y 2); los lisados celulares en la línea 6 se recolectan de células transfectadas con His-myc-Robo2- Δ NBD (utilizadas en las líneas 3 y 4). (FIG. 2E) La co-precipitación de Robo2, Nck, y nefrina. (FIG. 2F) Una co-precipitación similar como (FIG. 2E) excepto que la His-myc-nefrina se extrae en lugar de His-myc-Robo2. (FIG. 2G) La co-inmunoprecipitación de Robo2 endógeno de riñón, Nck, y nefrina. (FIG. 2H) Un ensayo similar como (FIG. 2G) excepto que los precipitados se preparan utilizando anticuerpo anti-

nefrina de ratón. (I) Slit2 mejora la formación en complejo de Robo2-Nck-nefrina. His-myc-Robo2, nefrina, y Fyn se expresan en las células HEK que se estimulan con medio acondicionado con Slit2 (líneas 1, 3) o medio acondicionado de control (línea 2, 4). (FIG. 2J) Cuantificación de intensidad de (FIG. 2I). Los datos se representan como media $\pm$ SEM; n=7, *p < 0.05, **p < 0.01 comparado con la prueba t de student pareada, de control. Ver también las FIGS. 6A-6F'.

Las **FIGS. 3A-3G** muestran que la señalización Slit2-Robo2 inhibe la polimerización de actina mediada por nefrina. (FIG. 3A) CD16/7-NCD se co-expresa con Robo2 en células HEK, que se tratan con anti-CD16 y anticuerpo anti-IgG conjugado con rodamina en presencia de medio acondicionado con Slit2 (Slit) o medio acondicionado de control (CTL). Las células luego se fijan y se tiñen con faloidina conjugada con FITC para revelar la F-actina. Barra de escala, 5 μ m. NCD: dominio citoplásmico de nefrina. (FIG. 3B) Un ensayo similar como (FIG. 3A) excepto que CD16/7-NCD se reemplaza por CD16/7-HA y se utiliza como un ensayo de control. (FIG. 3C) El porcentaje de las células con las colas de F-actina sobre las células totales con las agrupaciones CD16/7 en cada grupo se cuantifica. Los datos se representan como media $\pm$ SEM, *p < 0.01, n=5. (FIG. 3D) CD16/7-NCD en (FIG. 3A) se inmunoprecipita por el anticuerpo anti-CD 16 después de la estimulación del medio acondicionado con Slit2 (líneas 1 y 3)

o el medio acondicionado de control (líneas 2 y 4). Notar la F-actina reducida en la línea 1. El CD 16/7-HA se utiliza como un control negativo. (FIG. 3E) Cuantificación de intensidad de (FIG. 3D). Los datos se representan como media
 5 $\pm$ SEM; n=4, *p < 0.05 comparados con la prueba t de student pareada, de control. (FIG. 3F) Inmunoprecipitación de nefrina de riñones de ratón homocigotos inactivados con Robo2 (Robo2-/-), heterocigotos (Robo2+/-), y de tipo silvestre (Robo2+/+) que utilizan el anticuerpo anti-nefrina. Notar la F-actina
 10 incrementadas en la línea 3. (FIG. 3G) Cuantificación de intensidad de (FIG. 3F). Los datos se representan como media $\pm$ SEM; n=4, *p < 0.05 comparados con el análisis ANOVA, de tipo silvestre y heterocigoto. Ver también las FIGS. 7A-7C.

Las **FIGS. 4A-4W** muestran los fenotipos
 15 estructurales de podocitos en ratones nulos homocigotos de Robo2, inactivados específicos de podocitos de Robo2, y genéticamente desactivados dobles Robo2 y Nphs1. (FIGS. 4A y 4B) Imágenes representativas de recién nacido muestran los cuerpos de podocitos (cabezas de flecha) y la cápsula de
 20 Bowman (flechas) en ratones nulos homocigotos de tipo silvestre (FIG. 4 A) y Robo2 (FIG. 4B). (FIGS. 4C y 4D) Imágenes con alto aumento de (FIGS. 4A y 4B) muestran procesos basal de podocitos (flechas) en riñones de recién nacido. Barra de escala, 1 μ m. (FIGS. 4E y 4F) Imágenes
 25 representativas de riñones de 3 semanas en aumento bajo

muestran el cuerpo de células de podocitos (cabezas de flecha) en un ratón nulo homocigoto Robo2 (FIG. 4F) comparado con un control de edad coincidente (FIG. 4E). (FIGS. 4G y 4H) Imágenes de aumento más alto de (FIGS. 4E y 4F) procesos

5 basales divagantes más cortos desorganizados (flecha) en un ratón nulo homocigoto Robo2 de 3 semanas (FIG. 4H) comparado con los proceso basal similar a cremallera bien organizados en el control de edad coincidente (FIG. 4G). Barras de escala: 2 μ m. (FIGS. 4I y 4J) Las imágenes de microscopía

10 electrónica de transmisión representativas (aumento a 5000x) representan el borramiento de proceso basal de podocitos segmentario focal (flecha en la FIG. 4J) en un ratón inactivado específico de podocitos de Robo2 de un mes de edad. Y el fenotipo normal en el control. (FIG. 4I).

15 Abreviaciones: gc: capilar glomerular; us: espacio urinario. (FIGS. 4K y 4L) Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión de aumento más alto (40000x) muestran procesos basales de podocitos más amplios (flecha en la FIG. 4L) en un ratón mutante específico de podocitos de Robo2 de dos meses

20 de edad comparado con el control (FIG. 4K). Las abreviaciones: fp, proceso basal de podocitos; GBM, membrana basal glomerular. (FIG. 4M) La cuantificación del ancho del proceso basal de podocitos en ratones inactivados específicos de podocitos de Robo2^{del5/fox};Tg^{Nphs2-Cre+} de un mes de edad (Robo2

25 KO) y los controles de crías de la camada de tipo silvestre

(WT). Los datos se representan como media $\pm$ SEM, $n=333$, $*p < 0.01$. (FIG. 4N) Ensayo ELISA de la muestra de orina muestra una relación de albúmina/creatinina elevada en ratones adultos (KO) $Robo2^{del5/flox}$; $Nphs2-Cre+$ comparados con los de tipo silvestre de control (WT). Los datos se representan como media $\pm$ SEM, $n=20$, $*p < 0.01$. (FIG. 4O) tinción de Western muestra la presencia de la albúmina en la orina; 1 μ l de orina se carga en cada cavidad, 0.2g de albúmina se utiliza como un control positivo. WT, tres crías de camada de tipo silvestre; $Robo2$ KO, tres ratones $Robo2^{del5/flox}; Nphs2-Cre+$ individuales. (FIGS. 4P y 4Q) Imágenes de microscopía electrónica de exploración representativas muestran los procesos basales de podocitos de interdigitalización alterados que se asemejan a protuberancias celulares desorganizadas (flechas) en el riñón de ratón recién nacido homocigoto individual $Nphs1^{-/-}$. Barras de escala: 1 μ m. (FIGS. 4R y 4S) Glomérulos de ratones recién nacidos homocigotos dobles $Nphs1^{-/-}Robo2^{-/-}$ muestran los procesos basales de interdigitalización restaurados (flechas), indicando el alivio del fenotipo nulo de nefrina al inactivar genéticamente el $Robo2$. (FIGS. 4T y 4U), Glomérulos de ratones recién nacidos homocigotos individuales $Robo2^{-/-}$ muestran procesos basales irregulares y más amplios pero formación de patrón de interdigitalización extensiva (flechas). (FIGS. 4V y 4W), Glomérulos de ratones de tipo

silvestre recién nacidos con patrón de interdigitalización regular normal del proceso basal (flechas). Ver también FIGS. 8A-8Z y Tablas 1-4.

Las **FIGS. 5A-5M** muestran que el Robo2 se expresa en los glomérulos de desarrollo y adultos. (FIGS. 5A y 5B) El análisis de hibridación in situ muestra que los transcriptos Robo2 se expresan en los glomérulos en desarrollo (flechas) en E16.5. Aumento: 60X (FIG. 5A) y 200X (FIG. 5B). (FIGS. 5C-5F) Los estudios de inmunohistoquímica (IHC) revelan que el Robo2 se expresa durante los glomérulos en desarrollo de E14.5 a E17.5. Aumento: 600X. (FIG. 5G) La IHC muestra que Robo2 se expresa específicamente en los glomérulos de ratones adultos a las 5 semanas de edad (FIG. 5G). El DAPI marca los núcleos celulares en el riñón. Aumento: 400X. (FIG. 5H) Tinciones de co-localización de IHC de riñón de 5s muestra que el Robo2 se co-expresa en el glomérulo con el marcador de podocitos Wt1. Aumento: 600X. (FIGS. 5I-5K) Robo2 y WT1 se co-expresan en el glomérulo de ratón en E16.5. Aumento: 600X. (FIGS. 5L y 5M) Tinciones de co-localización de IHC de riñón de 5s muestran que el Robo2 se co-expresa en el glomérulo con el marcador de células mesangiales Pdgfrb (FIG. 5L), y el marcador de células endoteliales Pecaml (FIG. 5M). Aumento: 600X.

Las **FIGS. 6A-6F'** muestran que el Robo2 interactúa con Nck y forma un complejo con nefrina, que es aumentado por

la estimulación de Slit2. (FIG. 6A) Co-IP de Robo2 y nefrina con Nck endógeno. Robo2, nefrina, y Fyn se expresan en células HEK y se estimulan por Slit2. El Nck endógeno se inmunoprecipita por un anticuerpo anti-Nck. La IgG de ratón se utiliza como un control. La formación compleja con nefrina se aumenta por la expresión de Slit2 y Fyn. (FIGS. 6B y 6C) Slit2 se expresa en los glomérulos de ratón recién nacido por la tinción de Inmunoperoxidasa (FIG. 6B) y se co-expresa en el glomérulo con el marcador de podocitos Sinaptopodina (FIG. 6C). Aumento: 600X. (FIGS. 6D y 6D') CD16/7-NCD se co-expresa con Robo2 en células HEK en presencia de Slit2, tratadas con anticuerpo anti-CD16 y anticuerpo anti-IgG conjugado con rodamina, luego se fija y se tiñe con anticuerpo anti-Robo2. Las agrupaciones CD16/7-NCD se co-localizan con Robo2 (FIG. 6D) pero no se observa la co-localización en las agrupaciones CD16/7-HA de control (FIG. 6D'). Barra de escala: 5 μ m. NCD: dominio citoplásmico de nefrina. (FIGS. 6E y 6E') Supresión del dominio de enlace a Nck (NBD) en Robo2 deteriora su co-localización con CD16/7-NCD en presencia de Slit2. Las agrupaciones CD16/7-NCD se co-localizan con Robo2 (FIG. 6E) pero no se observa co-localización en las agrupaciones Robo2- Δ NBD (FIG. 6E'). Barra de escala: 5 μ m. (FIGS. 6F y 6F') La estimulación de Slit2 mejora la co-localización de CD16/7-NCD y Robo2 en células HEK. Las agrupaciones CD16/7-NCD se co-localizan con Robo2 en presencia de Slit2 (FIG. 6F) pero no

con el medio acondicionado de control (FIG. 6F'). Barra de escala: 5 μ m.

Las **FIGS. 7A-7C** muestran que la supresión del dominio de enlace a Nck de Robo2 compromete la inhibición de Slit2-Robo2 en la polimerización de actina inducida por nefrina. (FIG. 7A) CD16/7-NCD y Robo2 se co-expresaron a células HEK, se agruparon con anticuerpo anti-CD16 y el anticuerpo anti-IgG conjugado con rodamina en presencia del medio acondicionado con Slit2 (Slit2) o el medio acondicionado de control (CTL). Las células luego se fijaron y se tiñeron con faloidina conjugada con FITC para revelar fibras de F-actina. Las agrupaciones de CD16/7-NCD y las fibras de F-actina se examinaron utilizando microscopía confocal. Barra de escala, 5 μ m. NCD, dominio de citoplásmico de nefrina. (FIG. 7B) CD16/7-NCD y Robo2- Δ NBD se co-expresaron en células HEK. Barra de escala, 5 μ m. NBD, dominio de enlace a Nck. (FIG. 7C) Se cuantificó el porcentaje de células con colas de F-actina sobre células totales con agrupaciones CD16/7-NCD en cada grupo. Los datos se representan como media $\pm$ SEM, *p = 1.436×10^{-5} , **p = 6.32×10^{-5} , n=5, ANOVA.

Las **FIGS. 8A-8Z** muestran el fenotipo glomerular en ratones nulos homocigotos *Robo2*, inactivados específicos de podocitos de *Robo2*, inactivados dobles *Robo2* y *Nphs1*, y un modelo propuesto de señalización de Robo2-Nefrina. (FIGS. 8A-

8F) Análisis de microscopía electrónica de transmisión de la ultraestructura glomerular de riñón de ratones mutantes *Robo2*^{del15/del15} recién nacidos (NB). (FIGS. 8A, 8C, 8E) Ultraestructura glomerular de un ratón de control *Robo2* heterocigoto recién nacido en aumentos bajos (FIG. 8 A, 2200X), medios (FIG. 8C, 15500X) y altos (FIG. 8E, 52000X). (FIGS. 8B, 8D, 8F) Ultraestructura glomerular de un ratón mutante *Robo2* (-/-) (es decir, *Robo2*^{del15/del15}) homocigoto recién nacido en aumentos bajos (FIG. 8B), medios (FIG. 8D) y altos (FIG. 8F). Las flechas indican el borramiento del proceso basal focal. Abreviaciones: gc: capilar glomerular; us: espacio urinario; GBM: membrana basal glomerular. (FIGS. 8G-8N) patrones de proceso basal de podocitos a anormal de ratones inactivados específicos de podocitos de *Robo2*. (FIGS. 8G-8J) Representan imágenes de microscopía electrónica de exploración representativas de glomérulos de ratones inactivados específicos de podocitos de *Robo2*^{del155/flox}; *Nphs2-Cre*⁺ de un mes de edad y ratones de control *Robo2*^{flox/+} de edad coincidente. Las irregularidades leves de los procesos basales de podocitos de interdigitalización se encontraron en un ratón inactivado específico de podocitos de *Robo2* de un mes de edad (FIGS. 8K y 8N). A los siete meses de edad, los ratones inactivados específicos de podocitos de *Robo2* desarrollaron notablemente procesos basales irregulares (FIGS. 8L y 8N). Barras de escala: 10 µm (FIGS. 8G, 8H, 8K,

8L a 2000x de aumento) y 2 μ m (FIGS. 8I, 8J, 8M, 8N a 13000x de aumento). (FIGS. 8O-8T) Morfología glomerular en ratones inactivados específicos de podocitos de Robo2. (FIGS. 8O-8R) Tinción de ácido periódico de Schiff (PAS) mostró expansión

5 de matriz mesangial de los glomérulos de ratones inactivados específicos de podocitos de Robo2 de 2 y 6 meses de edad (FIGS. 8P, 8R) comparados con los controles de edad coincidente (FIGS. 8Q, 8Q). (FIG. 8S) El análisis cuantitativo de glomérulos muestra la expresión de matriz

10 mesangial en ratones inactivados específicos de podocitos de Robo2 de 12 meses de edad (MU) comparados con los controles de tipo silvestre de edad coincidente (WT). Los datos se representan como media $\pm$ SEM, $n=5$, $*p < 0.01$. La inactivación genética específica de podocitos de Robo2 (T) no afecta los

15 números de podocitos. Las células de podocitos se identificaron utilizando la tinción WT-1. El número de podocitos por sección transversal glomerular se contó en cuatro ratones inactivados específicos de podocitos de Robo2^{del5/flox};Tg^{Nphs2-Cre+} de un año de edad (MU) comparados con

20 cuatro ratones de tipo silvestre de edad coincidente (WT). Los datos se representan como media $\pm$ SEM, $p = 0.645$, prueba t ; mutante: $n=165$ glomérulo; control: $n=166$ glomérulo. (FIGS. 8U-8Y) Fenotipo glomerular en ratones inactivados dobles Robo2 y Nphs1. (FIG. 8U) Tinción H&E muestra los glomérulos

25 con dilataciones características del espacio de Bowman

(asteriscos) en un ratón recién nacido homocigoto individual *Nphs1*^{-/-}, 400x. (FIG. 8V) Glomérulos de un ratón recién nacido homocigoto individual *Robo2*^{-/-} muestra la ausencia de las dilataciones del espacio de Bowman; 400x. (FIG. 8W) Los

5 glomérulos de búsqueda normales sin dilataciones espaciales de Bowman significativas (flechas) se muestran en un ratón recién nacido homocigoto doble *Robo2*^{-/-}, *Nphs1*^{-/-} que indica el alivio del fenotipo glomerular *Nphs1*^{-/-}; 400x. (FIG. 8X)

Tinción de H&E de riñón de glomérulos normales de un control

10 de ratón recién nacido de tipo silvestre de edad coincidente; 400x. (FIG. 8Y) Cuantificación de los glomérulos con el espacio de Bowman dilatado en ratones recién nacidos muestra la reducción significativa de los glomérulos con el fenotipo de dilatación característico del espacio de Bowman en

15 homocigotos dobles *Robo2*^{-/-}, *Nphs1*^{-/-} comparados con el homocigoto individual *Nphs1*^{-/-} (*Robo2*^{-/-}; *Nphs1*^{-/-}). Los datos se representan como media ± SEM, *p < 0.01. (FIG. 8Z) Un modelo de efectos inhibidores de señalización Slit2-Robo2 en nefrina para influir en la estructura del proceso basal de

20 podocitos. Bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo, durante el desarrollo de proceso basal), los dominios de tirosina fosforilada intracelular de nefrina (YDxV-p) reclutan Nck a través de su interacción con el dominio SH2. Nck a su vez recluta los reguladores de citoesqueleto a

25 través de sus dominios SH3 para promover la polimerización de

actina. El Slit2 se enlaza a Robo2 para incrementar la interacción del dominio intracelular Robo2 con los dominios SH3 de Nck, que evitaría el enlace de Nck a los reguladores de citoesqueleto y daría por resultado una inhibición de la polimerización de actina inducida por nefrina. La polimerización de actina balanceada se mantiene durante el desarrollo de podocitos para una estructura de proceso basal normal. En ausencia de la señalización de Slit2-Robo2 (por ejemplo, cuando Robo2 se inactiva), los efectos inhibidores de Robo2 en la polimerización inducida por nefrina se pierden. Los dominios SH3 de Nck son capaces de interactuar con los reguladores de citoesqueleto corriente abajo para incrementar la polimerización de actina, que puede explicar la estructura del proceso basal de podocitos alterada en ratones mutantes Robo2. Abreviaciones: Ig: Dominio de Inmunoglobulina; FN3: Dominio tipo 3 de Fibronectina; SH2: dominio homólogo 2 Src; SH3: dominio homólogo 3 Src; CCO, CC1, CC2, CC3: Región conservada citoplásmica 0, 1, 2, 3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se ha mostrado previamente que Robo2 es el receptor de superficie celular para la señal guía repulsiva Slit y que es implicada en la migración guía de axón y neuronal en el sistema nervioso. La nefrina es una proteína slit-diafragma de podocitos que funciona en la barrera de filtración glomerular de riñón. Los inventores muestran en la presente

que el Robo2 se expresa en la superficie basal de los podocitos, tales como podocitos de ratón, y se co-localiza con nefrina. Los estudios bioquímicos indican que Robo2 forma un complejo con nefrina en el riñón a través de la proteína adaptadora en Nck. En contraste a la función de la nefrina que promueve la polimerización de actina, los inventores muestran en la presente que la señalización Slit2-Robo2 inhibe la polimerización de actina inducida por nefrina. Por ejemplo, la cantidad de F-actina asociada con nefrina se incrementa en los ratones inactivados Robo2 que desarrollan una estructura de proceso basal de podocitos alterada y microalbuminuria. Los estudios de interacción genética revelan además que la pérdida de Robo2 mejora el fenotipo de podocitos anormal en el ratón nulo de nefrina. Los resultados proporcionados en la presente muestran que la señalización Robo2 actúa como un regulador negativo en la nefrina para influir en la arquitectura del proceso basal de podocitos.

Además, se ha mostrado que un paciente que tiene reflujo vesicouretral (VUR) tiene una translocación de cromosomas que altera el gen ROBO2 y produce proteínas de fusión ROBO2 negativas dominantes que anulan la ruta de señalización SLIT2-ROBO2. Normalmente, el VUR es una enfermedad caracterizada por el flujo retrogrado de orina de la vejiga en los uréteres y riñón y los pacientes con VUR pueden presentarse con nefropatía de reflujo, una condición

que se manifiesta con proteinuria grave. Se ha mostrado que las proteínas de fusión ROBO2 negativas dominantes producidas por un paciente con VUR bloquea la ruta de señalización SLIT2-ROBO2 y protege al paciente de la nefropatía de reflujo y proteinuria, confirmando de esta manera y apoyando además los resultados de los inventores en los modelos animales del valor terapéutico del objetivo de la ruta de señalización SLIT2-ROBO2 para el tratamiento de la enfermedad de riñón crónica.

En el riñón normal, la pared capilar glomerular trilaminar, compuesta de células endoteliales fenestradas, membrana basal y podocitos, restringen la permeabilidad a las proteínas plasmáticas. Los podocitos son células epiteliales especializadas que extienden los procesos primarios y secundarios para cubrir la superficie exterior de la membrana basal glomerular. Los procesos secundarios de interdigitalización ricos en actina, o procesos basales, de los podocitos vecinos crean slit de filtración conectadas por un slit-diafragma semi-poroso que forma la barrera final a la permeación de la proteína. Mientras que las mutaciones genéticas de las proteínas slit-diafragma de podocitos tal como nefrina y otras se asocian con la formas hereditarias de la enfermedad renal proteinúrica (Tryggvason y colaboradores, 2006), ha sido evidente que las proteínas que constituyen y se asocian con el slit-diafragma son más que una barrera

estructural simple. Estas proteínas forman una red de señalización balanceada que puede influir en la estructura del proceso basal de podocitos y funciona a través de la interacción del citoesqueleto de F-actina (Faul y colaboradores, 2007; Jones y colaboradores, 2006; Verma y colaboradores, 2006).

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

polimerización de actina (Guan y Rao, 2003) o induce la despolimerización de F-actina (Piper y colaboradores, 2006).

La señalización de SLIT-ROBO también desempeña funciones cruciales durante la inducción renal temprana y la proliferación de yemas uretrales. Los mutantes de ratón que carecen de *Slit2* o *Robo2* desarrollan yemas uretrales supernumerarias, que conducen a un amplio espectro de fenotipo del tracto urinario que incluyen riñones dúplex, uniones ureterovesicales anormales e hidronefrosis (Grieshammer y colaboradores, 2004; Lu y colaboradores 2007). La alteración de *ROBO2* en los humanos provoca anomalías congénitas de los riñones y tracto urinarios (CAKUT), y mutaciones puntuales de *ROBO2* se han identificado en paciente con reflujo vesicouretral (VUR) (Lu y colaboradores, 2007). Los estudios recientes de los inventores muestran que *Robo2* es crucial para la formación de un orificio uretral normal y para el mantenimiento de un mecanismo anti-reflujo efectivo (Wang y colaboradores, 2011).

En este punto los inventores muestran que el *Robo2* es una proteína de podocitos novedosa expresada en la superficie basal de los podocitos glomerulares en el riñón y se co-localiza con la nefrina y podocina. El *Robo2* interactúa directamente con los dominios de proteína adaptadora Nck SH3 y forma un complejo con nefrina. Mientras que los ratones inactivados de *Robo2* desarrollan procesos basales de

podocitos alterados, la pérdida de Robo2 mejora las anormalidades estructurales de proceso basal que se observa en los ratones nulos de nefrina. Estos resultados descritos en la presente indican que la señalización Robo2 actúa como un regulador negativo en la señalización de nefrina para incluir en la arquitectura del proceso basal de podocitos. Además, como se muestra en la presente, se ha descubierto que las proteínas de fusión ROBO2 negativas dominantes producidas por un paciente bloquea la ruta de señalización SLIT2-ROBO2 y protege al paciente de la nefropatía de reflujo y la proteinuria, confirmando de esta manera y apoyando además los resultados descritos en la presente en los modelos animales del volumen terapéutico para fijar como objetivo la ruta de señalización SLIT2-ROBO2 para el tratamiento de enfermedad de riñón crónica.

Por consiguiente, en algunos aspectos, se proporcionan en la presente métodos para el tratamiento de enfermedad de riñón crónica en un sujeto en necesidad del mismo, tal método que comprende además administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de una enfermedad de riñón crónica una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende un inhibidor de ruta de señalización SLIT2-ROBO2.

También se proporcionan en la presente, en algunos aspectos, métodos para la reducción de la proteinuria en un

sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de proteinuria una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende un inhibidor de la ruta de señalización SLIT2-ROBO2.

5 En otros aspectos, se proporcionan en la presente métodos para prevenir enfermedades renales o para promover la profilaxis de enfermedades renales en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende un
10 inhibidor de ruta de señalización SLIT2-ROBO2 para prevenir o promover la profilaxis de la enfermedad renal en el sujeto.

También se proporcionan en la presente, en algunos aspectos, métodos para mitigar los efectos de la enfermedad renal, reducir la gravedad de la enfermedad renal, reducir la
15 probabilidad de desarrollar una enfermedad renal y/o desacelerar la progresión de la enfermedad renal en un sujeto en necesidad del mismo.

Como se utiliza en la presente, "ROBO2" se refiere al polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de:

20 MARRHERVTRRMWTWAPGLLMMTVVFWGHQNGQGQGSRLRQEDFPFPRIVEHPSDVIVSK
GEPTTLNCKAEGRPPTPTIEWYKDGERTVETDKDDPRSHRMLLPSSLSLFFLRIVHGRRSKPDE
GSYVCVARNYLGEAVSRNASLEVALLRDDFRQNPTDVVVAAGEPAILECQPPRGHPEPTIY
WKKDKVRIDDKEERISIRGGKLMISNTRKSDAGMYTCVGTNMVGERDSDPAELTVFERPTF
LRRPINQVVLEEEAVEFRQVQGDQPQPTVRWKKDDADLPRGRYDIKDDYTLRIKKTMTSTDE
25 GTYMCIAENRVGKMEASATLTVRAPPQFVVRPRDQIVAQGRTVTFPCETKGNPQPAVFWQK

EGSQNLLFPNQPPQPNRCSVSPTGDLTITNIQRSDAGYYICQALTVAGSILAKAQLVTD
 VLTDRPPPIILQGPANQTLAVDGTALLKCKATGDPLPVISWLKEGFTFPGRDPRATIQEQG
 TLQIKNLRISDTGTYTCVATSSSGETSWSAVLDVTESGATISKNYDLSDLPGPPSKPQVTD
 VTKNSVTLQPGTLPASAYIIIEAFSQSVSNSWQTVANHVKTTLTYTVRGLRPNTIYLF
 5 MVRAINPQGLSDPSPMSDPVRTQDISPPAQGVDRQVQKELGDVLVRLHNPVVLTPTTVQV
 TWTVDQRQPFIQGYRVMYRQTSGLQATSSWQNLDAKVPTERSAVLVNLKKGVTYEIKVRPY
 FNEFQGMDESSEKTVRTTEEAPSAPPQSVTVLTVGSYNSTSSISVSWDPPPPDHQNGIIQYK
 IWCLGNETRFHINKTVDAAIRSVIIGGLFPGIQYRVEVAASTSAGVGKSEPPQPIIIIGRN
 EVVITENNNSITEQITDVVKQPAFIAGIGGACWVILMGFSIWLYWRRKKRKGLSNYAVTFQ
 10 RGDGGLMSNGSRPGLLNAGDPSYPWLADSWPATSLPVNNSNSGPNEIGNFGRGDVLPVPVG
 QGDKTATMLSDGAIYSSIDFTTKTSYNSSSQITQATPYATTQILHSNSIHELAVDLPDPQW
 KSSIQQKTDLMGFGYSLPDQNKGNNGGKGGKKKKKNKNSSKPQKNNGSTWANVPLPPPPVQP
 LPGTELEHYAVEQQENGYDSDSWCPPLPVQTYLHQGLEDELEEDDDRVPTPPVRGVASSPA
 ISFGQQSTATLTSPREEMQPMQLAHLDELTRAYQFDIAKQTWHIQSNNQPPQPPVPPLGY
 15 VSGALISDLETDVADDDADDEEEALEIPRPLRALDQTPGSSMDNLDSSVTGKAFTSSQRPR
 PTSPFSTDSNTSAALSQSQRPRPTKKHKGGRMDQQPALPHRREGMTDEEALVPYSKPSFPS
 PGGHSSSGTASSKGSTGPRKTEVLRAGHQRNASDLLDIGYMGSNSQGQFTGEL
 (isoforma del homólogo 2 Roundabout de *Homo sapiens* ROBO2a;
SEQ ID NO: 1), como se describe por, por ejemplo, NP
 20 001122401.1 y codificada por NM_001128929.2 (SEQ ID NO: 2); o
 MSLLMFTQLLLCGFLYVRVDGSRLRQEDFPPIVEHPSDVIVSKGEPTTLNCKAEGRPPTPT
 IEWYKDGERVETDKDDPRSHRMLLPSGSLFFLRIVHGRRSKPDEGSYVCVARNYLGEAVSR
 NASLEVALLRDDFRQNPTDVVVAAGEPAILECQPPRGHPEPTIYWKDKVRIDDKEERISI
 RGGKLMISNTRKSDAGMYTCVGTNMVGERDSDPAELTVFERPTFLRRPINQVVLEEEAVEF
 25 RCQVQGDQPPTVRWKKDDADLPRGRYDIKDDYTLRIKKTMTSTDEGTYMCIAENRVGKMEAS

ATLLTVRAPPQFVVRPRDQIVAQGRVTFTPCETKGNPQPAVFWQKEGSQNLLFPNQPPQPN
 RCSVSPTGDLTITNIQRSDAGYYICQALTVAGSILAKAQLEVTDVLTDRPPPIILQGPANQ
 TLAVDGTALLKCKATGDPLPVISWLKEGFTFPGRDPRATIQEQGTLQIKNLRISDTGTYTC
 VATSSSGETSWSAVLDVTESGATISKNYDLSDLPGPSKPQVTDVTKNVTLVSWQPGTPGT
 5 LPASAYIIIEAFSQSVSNSWQTVANHVKTTLTYTVRGLRPNTIYLFMVRAINPQGLSDPSPMS
 DPVRTQDISPPAQGVDRQVQKELGDVLVRLHNPVVLTPPTVQVTWTVDRQPQFIQGYRVM
 YRQTSGLQATSSWQNLDAKVPTERSAVLVNLKKGVTYEIKVRPYFNEFQGMDSSESKTVRTT
 EEAPSAPPQSVTVLTVGSYNSTSSISVSWDPPPPDHQNGIIQEYKIWCLGNETRFHINKTVD
 AAIRSVIIIGGLFPGIQYRVEVAASTSAGVGKSEPQPIIIGRRNEVVITENNNSITEQITD
 10 VVKQPAFIAGIGGACWVILMGFSIWLYWRRKKRKGLSNYAVTFQRGDGGLMSNGSRPGLLN
 AGDPSYPWLADSWPATSLPVNNSNSGPNEIGNFGRGDVLPVPVPGQDKTATMLSDGAIYSS
 IDFTTKTSYNSSSQITQATPYATTQILHSNSIHELAVDLDPDQWKSSIQQKTDLMGFGYSL
 PDQNKGNNGGKGGKKKKKNKSSKPQKNNGSTWANVPLPPPPVQPLPGTELEHYAVEQQENG
 YDSDSWCPLPVQTYLHQGLEDELEEDDDRVPPTPPVRGVASSPAISFGQQSTATLTSPRE
 15 EMQPMLQAHLDLDELTRAYQFDIAKQTWHIQSNNQPPQPPVPLGYVSGALISDLETDVADDD
 ADDEEEALEIPRPLRALDQTPGSSMDNLDSSVTGKAFTSSQRPRPTSPFSTDSNTSAALSQ
 SQRPRPTKKHKGGRMDQQPALPHRREGMTDEEALVPYSKPSFPSPGGHSSSGTASSKGSTG
 PRKTEVLRAGHQRNASDLLDIGYMGSNSQGQFTGEL (isoforma del homólogo 2
 de Roundabout de *Homo sapiens* ROBO2b; **SEQ ID NO: 3**), como se
 20 describe por, por ejemplo, NP_002933.1 y codificada por
 NM_002942.4 (**SEQ ID NO: 4**), junto con cualquiera de las
 variantes alélicas, de empalme de origen natural, y formas
 procesadas de las mismas. Típicamente, ROBO2 se refiere a
 ROBO2 humano. El gen de ROBO2 se conserva en chimpancé, mono
 25 Rhesus, perro, vaca, ratón, rata, pollo, pez cebra, mosca de

la fruta, mosquito, y *C.elegans*. Los residuos específicos de ROBO2 se pueden referir como, por ejemplo, "ROBO2(30)".

Los dominios específicos de ROBO2 se pueden preferir por tal nomenclatura también. La N-terminal o "dominio extracelular de ROBO2", que compren los cinco
 5 motivos de inmunoglobulina y tres repeticiones de tipo III de fibronectina (FNIII) se pueden referir como ROBO2(46-848) de SEQ ID NO: 1 o ROBO2(30-832) of SEQ ID NO: 3, por ejemplo. Los motivos de inmunoglobulina (Ig) 1 y 2 que interactúan con
 10 Slit2, o el "dominio de enlace a Ig SLIT" se pueden referir como ROBO2(46-145) y ROBO2(151-237) respectivamente de SEQ ID NO: 1, y ROBO2(30-129) y ROBO2(135-221) respectivamente de SEQ ID NO: 3. Similarmente, el "dominio intracelular" que comprende el "dominio de enlace intracelular Nck", que
 15 comprende los cuatro motivos ricos en prolina intracelulares, descritos en la presente, se pueden referir como ROBO2(881-1378) de SEQ ID NO: 3.

Como se utiliza en la presente, los términos "inhibidor de ROBO2", "antagonista de ROBO2" "agente de
 20 inhibidor de ROBO2" y "agente de antagonista de ROBO2" se refieren a una molécula o agente que bloquea, y reduce o interfiere significativamente con la actividad biológica de ROBO2 (de mamífero, tal como humano, ROBO2) in vitro, in situ, y/o in vivo, incluyendo la actividad de las rutas
 25 corriente abajo por la señalización ROBO2, tal como, por

ejemplo, interacción ROBO2 con la proteína adaptadora Nck y/o formación compleja con nefrina, inhibición mediada por SLIT2-ROBO-2 de polimerización de actina mediada por nefrina, y/o inducción de una respuesta celular a ROBO2. El término

5 "agente" como se utiliza en la presente en referencia a un inhibidor de ROBO2 significa cualquier compuesto o sustancia tal como pero no limitado a, molécula pequeña, ácido nucleico, polipéptido, péptido, fármaco, ión, etc. Un "agente" puede ser cualquier químico, entidad, o porción,

10 incluyendo, sin limitación, entidades proteínicas y no proteínicas sintéticas y de origen natural. En algunas modalidades de los aspectos descritos en la presente, un agente es un ácido nucleico, un análogo de ácido nucleico, una proteína, un anticuerpo, un péptido, un aptámero, un

15 oligómero de ácidos nucleicos, un aminoácido, o un carbohidrato, e incluye, sin limitación, proteínas, oligonucleótidos, ribozimas, DNazimas, glicoproteínas, RNAs anti-sentido, siRNAs, lipoproteínas, aptámeros, y modificaciones y combinaciones de los mismos etc. Los

20 compuestos para el uso en las composiciones terapéuticas y métodos descritos en la presente se pueden conocer por tener una actividad y/o propiedad deseada, o se pueden seleccionar de una biblioteca de diversos compuestos, utilizando métodos de clasificación conocidos por una persona de experiencia

25 ordinaria en la técnica.

Los inhibidores de ROBO2 ejemplares contemplados para el uso en los diversos aspectos y modalidades descritas en la presente incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-ROBO2 o fragmentos de enlace a antígeno de los mismos
5 que se enlazan específicamente a ROBO2; moléculas anti-sentido dirigidas a un ácido nucleico que codifica ROBO2 (*por ejemplo*, ROBO2a o ROBO2b o ambos); moléculas de RNA de interferencia corto ("siRNA") dirigidas a un ácido nucleico que codifica ROBO2 (*por ejemplo*, ROBO2a o ROBO2b o ambos);
10 aptámeros de RNA o de DNA que se enlazan a ROBO2, e inhiben/reduce/bloquean la señalización mediada por ROBO2; análogos estructurales ROBO2; y proteínas ROBO2 solubles, polipéptidos inhibidores, *por ejemplo*, polipéptidos negativos dominantes, o polipéptidos de fusión de los mismos. En
15 algunas modalidades de estos aspectos y todos de tales aspectos descritos en la presente, un inhibidor de ROBO2 (*por ejemplo*, un anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno del mismo) se enlaza a (interactuar físicamente con) ROBO2, fija como objetivo la señalización ROBO2 corriente abajo, y/o
20 inhibe (reduce) la síntesis, producción o liberación de ROBO2. En algunas modalidades estos aspectos y todos de tales aspectos descritos en la presente, un inhibidor de ROBO2 se enlaza y previene su enlace de un ligando de proteína SLIT, tal como SLIT2. En algunas modalidades de esos aspectos y
25 todos de tales aspectos descritos en la presente, un

inhibidor de ROBO2 reduce o elimina específicamente la expresión (es decir, transcripción o traducción) de una o más isoformas de ROBO2.

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

15 Por consiguiente, en algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente el inhibidor de ROBO2 inhibe la traducción de señal mediada por ROBO2. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, el inhibidor de ROBO2 fija como objetivo la
20 interacción de ROBO2 con la proteína adaptadora Nck y/o la formación compleja con nefrina, inhibición mediada por SLIT2-ROBO-2 de la polimerización de actina mediada por nefrina, y/o inducción de una respuesta celular a ROBO2.

En algunas modalidades de las composiciones y
25 métodos descritos en la presente, sitios de enlace de los

inhibidores de ROBO2, tal como un anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno del mismo, se dirigen contra un sitio de interacción de ligando ROBO2, tal como un sitio de interacción de ligando SLIT2. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, los sitios de enlace del inhibidor de ROBO2, tal como un anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno del mismo, se dirigen contra un sitio de interacción de adaptador ROBO2 tal como un sitio de interacción Nck o el dominio de enlace intracelular NCK que comprende los cuatro motivos ricos en prolina intracelulares de ROBO2. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, los sitios de enlace de los inhibidores de ROBO2 se dirigen contra un sitio en un objetivo en proximidad del sitio de interacción de ligando, a fin de proporcionar el impedimento estérico para la interacción del receptor (por ejemplo, ROBO2) con su ligando (por ejemplo, SLIT2). Mediante el enlace a un sitio de interacción de ligando ROBO2, un inhibidor de ROBO2 descrito en la presente puede reducir o inhibir la actividad o expresión de ROBO2, y la secuencia de señalización ROBO2 corriente abajo (por ejemplo, interacción ROBO2 con la proteína adaptadora Nck y/o la formación compleja con nefrina, la inhibición mediada por SLIT2-ROBO-2 de la polimerización de actina mediada por nefrina y/o la inducción de una respuesta celular a ROBO2). Por ejemplo, en algunas

modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, los sitios de enlace de los inhibidores de ROBO2 bloquean o fijan como objetivo por lo menos la Ig1, y preferiblemente ambos de los sitios Ig1 e Ig2, en ROBO2, es
5 decir, ROBO2(46-145) y ROBO2(151-237) respectivamente de SEQ ID NO: 1, y ROBO2(30-129) y ROBO2(135-221) respectivamente de SEQ ID NO: 3, por ejemplo. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, los sitios de enlace de los inhibidores de ROBO2 bloquean o fijan como
10 objetivo el domino intracelular ROBO2 que comprende el dominio de enlace intracelular Nck, es decir, ROBO2(881-1378) de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, los sitios de enlace de los inhibidores de ROBO2 bloquean o fijan como objetivo el
15 dominio de enlace intracelular ROBO2 Nck que comprende los cuatro motivos ricos en prolina intracelulares de ROBO2. Estos e puede lograr por una variedad de medios bien conocidos en la técnica, tales como anticuerpos y fragmentos de enlace a antígeno de los mismos, y RNAs inhibidores, etc.,
20 como se describe en la presente.

Por consiguiente, en algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, el inhibidor de ROBO2 es un anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno del mismo que se enlaza selectivamente o interactúa
25 físicamente con ROBO2. En algunas modalidades de las

composiciones y métodos descritos en la presente, el inhibidor de ROBO2 es un anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno del mismo que se enlaza a ROBO2 e inhibe y/o bloqueo y/o previene la interacción con Nck y/o la formación compleja con nefrina. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, el anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno del mismo se enlaza al dominio de enlace Ig SLIT de ROBO2. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, el anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno del mismo se enlaza al domino de enlace Ig1 SLIT de ROBO2 o ambos dominios de enlace a Ig1 e Ig2 SLIT de ROBO2, es decir, ROBO2(46-145) y ROBO2(151-237) respectivamente de SEQ ID NO: 1, y ROBO2(30-129) y ROBO2(135-221) respectivamente of SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, el anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno del mismo se enlaza a o bloquea el dominio extracelular ROBO2 es decir, ROBO2(881-1378) de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, el anticuerpo o fragmento de enlace antígeno del mismo se enlaza o bloquea el dominio de enlace intracelular en Nck que comprende los cuatro motivos ricos en prolina intracelulares de ROBO2.

Los anticuerpos específicos para o que se enlazan selectivamente a ROBO2, adecuados para el uso en las

composiciones y para practicar los métodos descritos en la presente son preferiblemente monoclonales, y pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, que comprenden anticuerpos de cadena individual, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab y/o fragmentos de enlace de cualquiera de lo anterior. Los anticuerpos también se refieren a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen antígeno o sitios de enlace objetivos, o "fragmentos de enlace a antígeno". Las moléculas de inmunoglobulina descritas en la presente pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina, como es entendido de una persona de experiencia en la técnica.

Por consiguiente, en algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, un inhibidor de ROBO2 como se describe en la presente es un anticuerpo anti-ROBO2 monoclonal o fragmento de enlace a antígeno.

En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, un inhibidor de ROBO2 como se describe en la presente es un fragmento de anticuerpo de ROBO2 o fragmento de enlace a antígeno. Los términos

"fragmento de anticuerpo", "fragmento de enlace a antígeno" y "derivado de anticuerpo" como se utiliza en la presente, se refieren a un fragmento de proteína que comprenden solo una porción de un anticuerpo, que incluye generalmente un sitio de enlace a antígeno del anticuerpo intacto y retiene de esta manera la capacidad de enlazarse al antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo abarcados por los términos de fragmento de anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno, incluyen: (i) el fragmento Fab, que tiene los dominios V_L , C_L , V_H y C_{H1} ; (ii) el fragmento Fab', que es un fragmento Fab que tiene uno o más residuos de cisteína en la C-terminal del dominio C_{H1} ; (iii) el fragmento Fd que tiene los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) el fragmento Fd' que tiene los dominios V_H y C_{H1} y uno o más residuos de cisteína en la C-terminal del dominio C_{H1} ; (v) el fragmento Fv que tiene los dominios V_L y V_H de un brazo individual de un anticuerpo; (vi) un fragmento de (Ward y colaboradores, Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste de un dominio V_H o un dominio V_L ; (vii) regiones CDR aisladas; (viii) fragmentos $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab' enlazados por un puente de disulfuro en la región bisagra; (ix) moléculas de anticuerpo de cadena individual (por ejemplo Fv de cadena individual; scFv) (Bird y colaboradores, Science 242:423-426 (1988); y Huston y colaboradores, PNAS (USA) 85:5879-5883 (1988)); (x) "diacuerpos" con dos sitios de enlace a antígeno, que

comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en una misma cadena de polipéptido (ver, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)); (xi) "anticuerpos lineales" que comprenden un par de segmentos Fd en tándem ($V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$) que, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de enlace a antígeno (Zapata y colaboradores Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995); y patente de los Estados Unidos No. 5,641,870); y versiones modificadas de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, modificados por la unión covalente de poli-alquilenglicol (por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol) u otro polímero adecuado).

En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, un inhibidor de o antagonista de ROBO2 es un derivado de anticuerpo quimérico de un anticuerpo antagonista de ROBO2 o fragmento de enlace a antígeno del mismo.

Los anticuerpos inhibidores o antagonistas de ROBO2 y los fragmentos de enlace a antígeno de los mismos descritos en la presente también pueden ser, en algunas modalidades, un derivado de anticuerpo humanizado.

En algunas modalidades, los anticuerpos de

inhibidor de o antagonistas de ROBO2 y los fragmentos de enlace a antígeno de los mismos descritos en la presente incluyen derivados que se modifican, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula del anticuerpo, con
5 la condición de que la unión covalente no evite que el anticuerpo se enlace antígeno objetivo, por ejemplo, ROBO2.

En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, se utilizan anticuerpos completamente humanos, que son particularmente deseables para
10 el tratamiento terapéutico de pacientes humanos.

En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, el inhibidor de ROBO2 comprende por lo menos una molécula anti-sentido capaz de bloquear o disminuir la expresión de un ROBO2 funcional
15 particular al fijar como objetivo ácidos nucleicos que codifican ROBO2, por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 o ambas, o dominios relevantes de los mismos. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, la por lo menos una molécula anti-sentido fija como
20 objetivo ácidos nucleicos que codifican el dominio de enlace a Ig SLIT de ROBO2. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, la por lo menos una molécula anti-sentido fija como objetivo ácidos nucleicos que codifican el dominio de enlace SLIT del ROBO2 o
25 ambos de los dominios de enlace Ig1 e Ig2 SLIT de ROBO2. En

algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, la por lo menos una molécula anti-sentido fija como objetivo ácidos nucleicos que codifican el dominio intracelular ROBO2 en algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, la por lo menos una molécula anti-sentido fija como objetivo ácidos nucleicos que codifican el dominio de enlace intracelular Nck que comprende los cuatro motivos ricos en prolina intracelulares de ROBO2. Los métodos son conocidos por aquellas personas de experiencia ordinaria en la técnica para la preparación de moléculas de oligonucleótido anti-sentido que se enlazarán específicamente a ROBO2 mRNA sin reacción cruzada con otros polinucleótidos. Sitios ejemplares de orientación incluyen, pero no se limitan a, el codón de inicio, las regiones reguladoras 5', que incluyen promotores o potenciadores, la secuencia de codificación, que incluyen cualquiera de las regiones consenso conservadas, y la región no traducida 3'. En alguna modalidad de estos aspectos y todos de tales aspectos descritos en la presente, los oligonucleótidos anti-sentido son de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos en longitud, aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos en longitud, aproximadamente 18 a aproximadamente 25 nucleótidos en longitud, o más. En ciertas modalidades, los oligonucleótidos anti-sentido comprenden además modificaciones químicas para

incrementar la resistencia a la nucleasa y similar, tal como, por ejemplo, los enlaces de fosforotioato y modificaciones de 2'-O-azúcar conocidas por aquellas personas de experiencia ordinaria en la técnica.

5 En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, el inhibidor de ROBO2 comprende por lo menos una molécula de RNA de interferencia corto (siRNA) capaz de bloquear o disminuir la expresión del ROBO2 funcional al fijar como objetivo ácidos nucleicos que
10 codifican ambas isoformas de ROBO2, por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, o dominios relevantes de las mismas. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, la por lo menos una molécula de siRNA fija como objetivo ácidos nucleicos que codifican el dominio de
15 enlace Ig SLIT de ROBO2. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, la por lo menos una molécula de siRNA fija como objetivo ácidos nucleicos que codifican el dominio de enlace SLIT de ROBO2 o ambos de los dominios de enlace Ig1 e Ig2 SLIT de ROBO2. En
20 algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, la por lo menos una molécula de siRNA fija como objetivo ácidos nucleicos que codifican el dominio intracelular ROBO2. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, la por lo
25 menos una molécula de siRNA fija como objetivo ácidos

nucleicos que codifican el dominio de enlace intracelular Nck que comprende los cuatro motivos ricos en prolina intracelulares de ROBO2. Es de rutina preparar moléculas de siRNA que fijarán como objetivo específicamente ROBO2 mRNA sin reacción cruzada con otros polinucleótidos. Las moléculas de siRNA para el uso en las composiciones y métodos descritos en la presente se pueden generar por métodos conocidos en la técnica, tal como por síntesis de oligonucleótido de fase sólida típicos, e incorporarán frecuentemente modificaciones químicas para incrementar la vida media y/o eficacia del agente de siRNA, y/o para permitir una formulación de suministro más consistente. Alternativamente, las moléculas de siRNA se administran utilizando un vector que codifica un casete de expresión para la transcripción intracelular del siRNA.

En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, el inhibidor de ROBO2 es un aptámero de RNA o DNA que se enlaza a una o más isoformas de ROBO2. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, un inhibidor de o antagonista de ROBO2 es un aptámero de RNA o DNA que se enlaza o interactúa físicamente con ROBO2, y bloquea las interacciones entre ROBO2 y un ligando o molécula adaptadora, por ejemplo, SLIT2 o Nek, respectivamente. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, un

inhibidor de o antagonista de ROBO-2 es un aptámero de RNA o DNA que se enlaza o interactúa físicamente con ROBO2, y reduce, e impide, o bloquea la señalización ROBO2 corriente abajo, tal como la inhibición mediada por SLIT2-ROBO-2 de la polimerización de actina mediada por nefrina y/o la inducción de una respuesta celular a ROBO2. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, el aptámero de RNA o DNA se enlaza a interactúa físicamente con el dominio de enlace Ig SLIT de ROBO2. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, el aptámero de RNA o DNA se enlaza a o interactúa físicamente con el dominio de enlace Ig1 SLIT de ROBO2 o ambos dominios de enlace Ig1 e Ig2 SLIT de ROBO2, es decir, ROBO2(46-145) y ROBO2(151-237) respectivamente de SEQ ID NO: 1, y ROBO2(30-129) y ROBO2(135-221) respectivamente de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, el aptámero de RNA o DNA se enlaza a o interactúa físicamente con el dominio intracelular ROBO2, es decir, ROBO2(881-1378) de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, el aptámero de RNA o DNA se enlaza o interactúa físicamente con o bloquea el dominio de enlace intracelular Nck que comprende los cuatro motivos ricos en prolina intracelulares de ROBO2.

En algunas modalidades de las composiciones y

métodos descritos en la presente, el inhibidor de ROBO2 es un compuesto o agente de molécula pequeña que fija como objetivo o se enlaza a ROBO2, incluyendo, pero no limitado a, péptidos pequeños o moléculas similares a péptido, péptido solubles, y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos. Como se utiliza en la presente, el término "molécula pequeña" se refiere a un agente químico que puede incluir, pero no se limita a, un péptido, un peptidomimético, un aminoácido, un análogo de aminoácido, un polinucleótido, un análogo de polinucleótido, un aptámero, un nucleótido, un nucleótido, un análogo de nucleótido, un compuesto orgánico e inorgánico (por ejemplo, incluyendo compuestos heterorgánicos y organometálicos) que tienen un peso molecular menor que aproximadamente 10,000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor que aproximadamente 5,000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor que aproximadamente 1,000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor que aproximadamente 500 gramos por mol, y sales, ésteres, y otras formas farmacéuticamente aceptables de tales compuestos. Los sitios ejemplares de enlace de molécula pequeña incluyen, pero no se limitan a, la porción de ROBO2 que se enlaza a SLIT2 o al adaptador Nck, es decir, el dominio de enlace Ig1 SLIT de ROBO2 o ambos dominios de enlace Ig1 e Ig2 SLIT de

ROBO2, el dominio intracelular ROBO2 o el dominio de enlace intracelular Nck que comprende los cuatro motivos ricos en prolina intracelulares de ROBO2.

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

En algunas modalidades de las composiciones y métodos descritos en la presente, el inhibidor de o antagonista de ROBO2 comprende por lo menos un análogo estructural de ROBO2, tal como un polipéptido ROBO2 negativo dominante. El término análogos estructurales de ROBO2, como se utiliza en la presente, se refiere a compuestos que tienen una estructura tridimensional similar como parte de aquella de ROBO2 y que se enlaza a SLIT2 y/o a Nck bajo condiciones fisiológicas in vitro o in vivo, en donde el enlace inhibe por lo menos parcialmente una actividad biológica de ROBO2, tal como inhibición mediada por SLIT2-ROBO2 de polimerización de actina mediada por nefrina, y/o inducción de una respuesta celular a ROBO2. Los análogos estructurales de ROBO2 adecuados se pueden diseñar y sintetizar a través de la modelación molecular del enlace ROBO2-SLIT2, por ejemplo. Los análogos estructurales de ROBO2 pueden ser monómeros, dímeros, o multímeros de orden superior en cualquier combinación deseada de las mismas o diferentes estructuras

para obtener afinidades mejoradas y efectos biológicos.

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

Los inhibidores o antagonistas de ROBO2 para el uso en las composiciones y métodos descritos en la presente se pueden identificar o caracterizar utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como ensayos de enlace de proteína-proteína, ensayos de clasificación bioquímica, inmunoensayos, y ensayos basados en células, que son bien conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, aquellos descritos en la presente en los ejemplos.

Por ejemplo, para identificar una molécula que inhibe la interacción entre ROBO2 y su ligando, por ejemplo, SLIT2, se pueden utilizar ensayos de enlace. Por ejemplo, ROBO2 o SLIT se inmoviliza sobre una placa de microtítulo por

la unión covalente o no covalente. El ensayo se lleva a cabo al agregar el componente no inmovilizado (ligando o receptor), que se puede etiquetar por una etiqueta detectable, al componente inmovilizado, en presencia o
5 ausencia de un agente de prueba. Cuando la reacción se completa, los componentes no reaccionados se remueven y se detectan complejos de enlace. Si la formación de los complejos de enlace se inhibe por la presencia del agente de prueba, el agente de prueba se puede considerar en un
10 antagonista candidato que inhibe el enlace entre ROBO2 y SLIT2, por ejemplo. Los ensayos basados en células o basados en membrana también se pueden utilizar para identificar los inhibidores de ROBO2. En otras modalidades, al detectar y/o al medir los niveles de la expresión del gen ROBO2, las
15 moléculas inhibidoras de ROBO2 que inhiben la expresión del gen ROBO2 se pueden someter a prueba. La expresión del gen ROBO2 se puede detectar y/o medir por una variedad de métodos, tal como RT-PCR de tiempo real, ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzimas. ("ELISA"), análisis de
20 Northern blotting, o citometría de flujo, y como es conocido por una persona de experiencia ordinaria en la técnica.

Tales inhibidores de ROBO2 identificados se pueden someter a prueba adicionalmente utilizando modelos animales in vivo de enfermedad de riñón crónica, tal como modelos de
25 lesión glomerular e intersticial (por ejemplo, modelos

animales de nefritis lúpica, incluyendo ratones del híbrido NZB, (NZB x NZW) F1 (llamado NZB/W), y derivados oncogénicos de los mismos, cepas MRL/lpr y BXSB), modelos animales de envejecimiento (por ejemplo, ratas Sprague Dawley envejecidas y ratones C57BL/6 envejecidos); ratas espontáneamente hipertensivas (SHR); ratas Búfalo/mna, que son un modelo de síndrome nefrótico idiopático humano; ratas Munich Wistar Fromter (MWF), que son un modelo genético relacionado con un déficit congénito en el número de nefrones que se predisponen al desarrollo de hipertensión y sensibilidad a la sal en la edad adulta; modelos FSGS genéticos específicos de podocitos primarios; modelos de ratón transgénico de nefropatía asociada al VIH (HIV AN); modelos animales de síndrome de Alport, que comprende mutaciones de las cadenas $\alpha 3$, $\alpha 4$, o $\alpha 5$ del colágeno tipo IV (COL4A3, COL4A4, y COL4A5); modelos inmunoinducidos, tal como el modelo de nefritis Thy-1, que es un modelo de rata experimental de glomerulonefritis mesangioproliferativa (MsPGN), modelos de membrana basal anti-glomerular (GBM); y modelos no inmune inducidos.

Como se utiliza en la presente, con respecto a un inhibidor de ROBO2, "se enlaza selectivamente" o "se enlaza específicamente" o "específico para" se refiere a la capacidad de un inhibidor de ROBO2 como se describe en la presente, tal como, por ejemplo, un anticuerpo antagonista de ROBO2 o fragmento de enlace a antígeno ROBO2 del mismo, para

enlazarse a un objetivo, es decir, ROBO2, con una K_D 10^{-5} M (10000 nM) o menor, por ejemplo, 10^{-6} M o menor, 10^{-7} M o menor, 10^{-8} M o menor, 10^{-9} M o menor, 10^{-10} M o menor, 10^{-11} M o menor, o 10^{-12} M o menor. Por ejemplo, si un
5 inhibidor/antagonista de ROBO2 descrito en la presente se enlaza a ROBO2 con una K_D de 10^{-5} M o menor, pero no a una molécula relacionada, tal como, por ejemplo, otros miembros de la familia ROBO, entonces el agente se dice que se enlaza específicamente a ROBO2. El enlace específico se puede
10 incluir por, por ejemplo, la afinidad y avidéz de, por ejemplo, el anticuerpo inhibidor/ antagonista de ROBO2 o fragmento de enlace a antígeno del mismo y la concentración de agente de polipéptido. La persona de experiencia ordinaria en la técnica puede determinar las condiciones apropiadas
15 bajo las cuales los agentes de polipéptido descritos en la presente se enlazan selectivamente a los objetivos utilizando cualquiera de los métodos adecuados, tal como titulación de un agente de polipéptido en un ensayo de enlace a células adecuado.

20 Con respecto a los métodos para tratar la enfermedad de riñón crónica al inhibir la actividad de ROBO2, el término "enfermedad de riñón crónica" o CKD se refiere a enfermedades renales que empeoran lenta y progresivamente a través del tiempo debido a la pérdida progresiva de nefrones
25 y pérdida consecuente de la función renal. En las etapas

tempranas, puede no haber síntomas. La pérdida de función toma usualmente meses o años para que se presente. Puede ser tan lenta que los síntomas no se presentan hasta que la función renal es menor que un décimo de lo normal. La etapa

5 final de la enfermedad de riñón crónica es llamada enfermedad renal de etapa final (ESRD). En esta etapa, los riñones ya no son capaces de remover suficientes residuos y fluidos de exceso del cuerpo. El paciente necesita diálisis o un trasplante de riñón. La diabetes, que conduce a nefropatía

10 diabética, y presión arterial alta son las dos causas más comunes de enfermedad de riñón crónica y representa la mayoría de casos. Otras enfermedades y condiciones que pueden dañar los riñones y conducir a la enfermedad de riñón crónica incluyen: desórdenes autoinmunes (tal como lupus eritematoso

15 sistémico y escleroderma); defectos de nacimiento de los riñones (tal como enfermedad renal policística); ciertos químicos tóxicos; glomerulonefritis; lesión o trauma; piedras renales e infección; problemas con las arterias que inducen a o dentro de los riñones; algunos medicamentos para el dolor y

20 otros fármacos (tal como fármacos para el cáncer); nefropatía de reflujo (en la cual los riñones se dañan por el flujo posterior de orina en los riñones); etc. Como se utiliza en la presente, "proteinuria" se refiere a la presencia de un exceso de proteínas de suero en la orina. La proteinuria

25 puede, en algunas modalidades, ser indicativa de enfermedad

renal, pero, por sí misma, no es conclusiva.

Por consiguiente, en algunas modalidades de estos aspectos y todos de tales aspectos descritos en la presente, el sujeto que tiene o está en riesgo de una enfermedad de
5 riñón crónica tiene nefropatía diabética.

Por "reducir" o "inhibir" en términos de los métodos de tratamiento de enfermedad crónica y proteinuria descritos en la presente se proponen la capacidad de provocar una disminución total preferiblemente de 20% o mayor, 30% o
10 mayor, 40% o mayor, 45% o mayor, más preferible de 50% o mayor, de 55% o mayor, de 60% o mayor, de 65% o mayor, de 70% o mayor, y mucho más preferible de 75% o mayor, 80% o mayor, 85% o mayor, 90% o mayor, o 95% o mayor, para un parámetro o síntoma dado de una enfermedad de riñón crónica. Reducir o
15 inhibir puede referirse a, por ejemplo, síntomas del desorden que se trata, por ejemplo, presión arterial alta, proteína en la orina, etc.

La presión arterial alta casi siempre está presente en todas las etapas de la enfermedad de riñón crónica. Un
20 examen del sistema nervioso puede mostrar signos de daño nervioso. El proveedor del cuidado de la salud puede oír sonidos anormales del corazón o pulmón cuando se escucha con un estetoscopio. Los síntomas tempranos de la enfermedad de riñón crónica también son síntomas de otras enfermedades.
25 Estos síntomas pueden ser los únicos síntomas de la

enfermedad renal hasta que la condición sea más avanzada. Los síntomas de enfermedad crónica pueden incluir: pérdida de aptito; sensación de malestar y fatiga general; dolores de cabeza; comezón (prurito) y piel seca; náusea; pérdida de peso sin tratar de perder peso; etc. Otros síntomas que se pueden desarrollar, especialmente cuando la función renal se ha empeorado, incluyen: piel anormalmente oscura o clara; dolor óseo; síntomas del cerebro y sistema nervioso; somnolencia y confusión; problemas de concentración o para pensar; adormecimiento en las manos, pies, u otras áreas; espasmos musculares o calambres; halitosis; fácil aparición de moretones, sangrado, o sangre en las heces; sed excesiva; hipo frecuente; bajo nivel de interés sexual e impotencia; interrupción de períodos menstruales (amenorrea); dificultad para respirar; problemas de sueño, tal como insomnio, síndrome de piernas inquietas, y apnea de sueño obstructivo; hinchamiento de los pies y manos (edema); vómito, típicamente en la mañana.

Por consiguiente, en algunas modalidades de los métodos descritos en la presente, una cantidad efectiva de una composición que comprende un inhibidor de ROBO2 descrito en la presente se administra a un sujeto a fin de aliviar un síntoma de enfermedad de riñón crónica. Como se utiliza en la presente, "aliviar un síntoma de enfermedad de riñón crónica" es mejorar cualquier condición o síntoma asociado con la

enfermedad de riñón crónica. Alternativamente, aliviar un síntoma de una enfermedad de riñón crónica puede implicar reducir uno o más síntomas de la enfermedad de riñón crónica en el sujeto relativo con un control no tratado que sufre de

5 enfermedad de riñón crónica o relativo al sujeto antes del tratamiento. Como se compara con un control no tratado equivalente, o el sujeto antes del tratamiento con el inhibidor de ROBO2, tal reducción o grado de prevención es por menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo

10 menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, o más, como es

15 medido por una técnica estándar. Deseablemente, la enfermedad de riñón crónica se reduce significativamente o es indetectable, como se detecta por cualquier método estándar conocido en la técnica, en cuyo caso la enfermedad de riñón crónica se considera que ha sido tratada. Un paciente quien

20 está siendo tratado para una enfermedad de riñón crónica es uno quien un profesional médico le ha diagnosticado tener tal afección. La diagnosis puede ser cualquier medio adecuado conocido por una persona de experiencia ordinaria en la técnica. La diagnosis y monitoreo pueden implicar, por

25 ejemplo, detectar el nivel proteínas o moléculas específicas

en una muestra de orina, sangre o suero, tal como, por ejemplo, albúmina, calcio, colesterol, conteo de sangre completa (CBC), electrolitos, magnesio, fósforo, potasio, sodio, o cualquier combinación de los mismos; ensayos para
5 detectar, por ejemplo, eliminación de creatinina; niveles de creatinina; BUN (nitrógeno de urea); a través del uso de técnicas o procedimientos específicos, tal como un escaneo CT, MRI abdominal, ultrasonido abdominal, biopsia de riñón, escaneo de riñón, ultrasonido de riñón; a través de la
10 detección de cambios en los resultados de los ensayos o pruebas para la eritropoyetina, PTH; prueba de densidad ósea, o Vitamina D; o cualquier combinación de tales métodos y ensayos de detección.

Los términos "sujeto" e "individuo" como se utiliza
15 con respecto a cualquiera de los métodos descritos en la presente se utilizan intercambiabilmente en la presente, y se refieren a un animal, por ejemplo un humano, recipiente de los inhibidores de ROBO2 descritos en la presente. Para el tratamiento de los estados de enfermedad que son específicos
20 para un animal específico tal como un sujeto humano, el término "sujeto" se refiere aquel animal específico. Los términos "animales no humanos" y "mamíferos no humanos" se utilizan intercambiabilmente en la presente, e incluyen mamíferos tales como ratas, ratones, conejos, oveja, gatos,
25 perros, vacas, cerdos, y primates no humanos. El término

"sujeto" también abarca cualquier vertebrado que incluye pero no se limita a mamíferos, réptiles, anfibios y peces. Sin embargo, ventajosamente, el sujeto es un mamífero tal como un humano, u otros mamíferos tal como un mamífero domesticado
5 por ejemplo perro, gato, caballo y similares.

En algunas modalidades de estos métodos y todos de tales métodos descritos en la presente, el método comprende además administrar al sujeto un agente terapéutico adicional, además del inhibidor de ROBO2. Tal agente terapéutico
10 adicional se puede co-administrar con el inhibidor de ROBO2. Como se utiliza en la presente, la frase "co-administra" o a "co-administrar" significa la administración de un inhibidor de ROBO2 descrito en la presente y otro compuesto, por ejemplo, un agente terapéutico, separadamente,
15 simultáneamente y/o secuencialmente durante un período de tiempo como se determina por un proveedor de cuidado calificado.

En algunas tales modalidades, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de enzima convertidora de
20 angiotensina (ACE), un bloqueador de receptor de angiotensina II (ARB), o un antagonista de receptor mineralocorticoide (MR).

Los inhibidores de ACE para el uso con los inhibidores de ROBO2 descritos en la presente incluyen, pero
25 no se limitan a, benazepril (comercializado en los Estados

Unidos como LOTENSIN^{MR}), captopril (comercializado en los Estados Unidos como CAPOTEN^{MR}), enalapril/enalaprilat (comercializado en los Estados Unidos como VASOTEC^{MR} oral e inyectable), fosinopril (comercializado en los Estados Unidos como MONOPRIL^{MR}), lisinopril (comercializado en los Estados Unidos como ZESTRIL^{MR} y PRINIVIL^{MR}), moexipril (comercializado en los Estados Unidos como UNIVASC^{MR}), perindopril (comercializado en los Estados Unidos como ACEON^{MR}), quinapril (comercializado en los Estados Unidos como ACCUPRIL^{MR}),
10 ramipril (comercializado en los Estados Unidos como ALTACE^{MR}), y trandolapril (comercializado en los Estados Unidos como MAVIK^{MR}). Los ARBs para el uso con los inhibidores de ROBO2 descritos en la presente incluyen candesartan (comercializado en los Estados Unidos como ATACAND^{MR}), irbesartan
15 (comercializado en los Estados Unidos como AVAPRO^{MR}), olmesartan (comercializado en los Estados Unidos como BENICAR^{MR}), losartan (comercializado en los Estados Unidos como COZAAR^{MR}), valsartan (comercializado en los Estados Unidos como DIOVAN^{MR}), telmisartan (comercializado en los Estados Unidos como MICARDIS^{MR}), y eprosartan (comercializado en los Estados Unidos como TEVETEN^{MR}).

En algunas modalidades de estos métodos y todos de tales métodos descritos en la presente, el método comprende además administrar al sujeto una cantidad efectiva de un
25 diurético, además del inhibidor de ROBO2. Los diuréticos

incluyen, pero no se limitan a, torsemida (comercializado en los Estados Unidos como DEMAD^{MR}EX), furosemida (comercializado en los Estados Unidos como LASIX^{MR}), bumetanida (comercializado en los Estados Unidos como BUMEX^{MR}), ácido
5 etacrínico (comercializado en los Estados Unidos como EDECRIN^{MR}), torsemida (comercializado en los Estados Unidos como DEMAD^{MR}EX), amilorida, (comercializado en los Estados Unidos como MID AMOR^{MR}), acetazolamida (comercializado en los Estados Unidos como DIAMOX^{MR}), pamabrom (comercializado en los
10 Estados Unidos como AQUA-BAN^{MR}), manitol (comercializado en los Estados Unidos como ARIDOL^{MR} o OSMITROL^{MR}), traimitreno (comercializado en los Estados Unidos como DYRENIUM^{MR}), spironolactona (comercializado en los Estados Unidos como ALDACTONE^{MR}), amilorida (comercializado en los Estados Unidos
15 como MID AMOR^{MR}), indapamida (comercializado en los Estados Unidos como LOZOL^{MR}), hidroclorotiazida (comercializado en los Estados Unidos como HYDRODIURIL^{MR}), metolazona (comercializado en los Estados Unidos como ZAROXOLYN^{MR} o MYKROX^{MR}), metilclotiazida (comercializado en los Estados Unidos como
20 AQUATENSEN^{MR} o ENDURON^{MR}), hidroclorotiazida (comercializado en los Estados Unidos como AQUAZIDE H^{MR} o ESIDRIX^{MR} o MICROZIDE^{MR}), clorotiazida (comercializado en los Estados Unidos como DIURIL^{MR}), bendroflumetiazida (comercializado en los Estados Unidos como NATURETIN^{MR}), politiazida
25 (comercializado en los Estados Unidos como RENESE^{MR}),

hidroflumetiazida (comercializado en los Estados Unidos como SALURON^{MR}), y clortalidona (comercializado en los Estados Unidos como THALITONE^{MR}). Para un listado completo ver también, por ejemplo, Physician's Desk Reference, 2012 Edition, PDR Network (2011).

Como se utiliza en la presente, con respecto a cualquiera de las composiciones y métodos que comprenden los inhibidores de ROBO-2 o tratamientos de combinación de los mismos descritos en la presente, los términos "tratan" "tratamiento", "que trata" o "mejora" se refiere a tratamientos terapéuticos, en donde el objetivo es revertir, aliviar, mejorar, inhibir, desacelerar o detener la progresión o gravedad de una afección asociada con, una enfermedad o desorden. El término "que trata" incluye reducir o aliviar por lo menos un efecto o síntoma adverso de una afección, enfermedad o desorden asociado con una enfermedad de riñón crónica, tal como, pero no limitado a, nefropatía diabética. Es generalmente "efectivo" si uno o más síntomas o marcadores clínicos se reduce. Alternativamente, el tratamiento es "efectivo" si la progresión de una enfermedad se reduce o se detiene. Es decir, "tratamiento" incluye no solo la mejora de los síntomas o marcadores, sino también un cese de por lo menos la desaceleración del progreso o empeoramiento de síntomas que se esperarían en ausencia del tratamiento. Los resultados clínicos benéficos o deseados

incluyen, pero no se limitan a, alivio de uno o más
síntoma(s), disminución del grado de enfermedad, estado de
enfermedad estabilizado (es decir, sin empeoramiento),
retardo o desaceleración de la progresión de la enfermedad,
5 mejora o paliación del estado de la enfermedad, y remisión
(ya sea parcial o total), si es detectable o no detectable.
El término "tratamiento" de una enfermedad también incluye
proporcionar alivio de los síntomas o efectos secundarios de
la enfermedad (incluyendo el tratamiento paliativo).

10 El término "cantidad efectiva" como se utiliza en
la presente se refiere a la cantidad de un inhibidor de ROBO-
2 descrito en la presente, necesario para aliviar por lo
menos uno o más síntomas de la enfermedad o desorden que se
trata, y se relaciona en una cantidad suficiente de
15 composición farmacológica para proporcionar el efecto
deseado. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se
refiere por lo tanto a una cantidad del inhibidor de ROBO-2
descrito en la presente, utilizando los métodos como se
describe en la presente, que es suficiente para proporcionar
20 un efecto particular cuando se administra a un sujeto típico.
Una cantidad efectiva como se utiliza en la presente también
incluiría una cantidad suficiente para retardar el desarrollo
de un síntoma de la enfermedad, alterar el curso de un
síntoma de la enfermedad (por ejemplo pero no limitado a,
25 desacelerar la progresión de un síntoma de la enfermedad), o

revertir un síntoma de la enfermedad. De esta manera, no es posible especificar la "cantidad efectiva" exacta. Sin embargo, para cualquier caso dado, una "cantidad efectiva" apropiada se puede determinar por una persona de experiencia ordinaria en la técnica utilizando solo experimentación de rutina.

Las cantidades efectivas, toxicidad, y eficacia terapéutica se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándares en los cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal a 50% de la población) y la ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

La relación de dosis entre los efectos tóxicos terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD50/ED50. Se prefieren composiciones y métodos que muestran índices terapéuticos grandes. Una dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente de ensayos de cultivo celular. También, una dosis se puede formular en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye la IC50 (es decir, la concentración del inhibidor de ROBO-2 descrito en la presente, que logra una inhibición semi-máxima de función o actividad medida) como se determinar en el cultivo celular, o en un modelo

animal apropiado. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto desempeño. Los efectos de cualquier dosificación particular se pueden monitorear por un bioensayo adecuado. La dosis se puede
5 determinar por un médico y ajustar, como sea necesario, para adaptar los efectos observados del tratamiento. Dependiendo del tipo y gravedad y la enfermedad de riñón crónica, aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (por ejemplo, 0.1-20 mg/kg) de un inhibidor de ROBO2 descrito en la presente es un
10 intervalo de dosificación candidato inicial para la administración al sujeto, ya sea, por ejemplo, por una más administraciones separadas, o por difusión continua.

Modos de Administración

Los inhibidores de ROBO2 o tratamientos de
15 combinación de los mismos descritos en la presente se pueden administrar a un sujeto en necesidad del mismo por cualquier vía apropiada lo cual da por resultado un tratamiento efectivo en el sujeto. Como se utiliza en la presente, los términos "administrar" y "introducir" se utilizan
20 intercambiabilmente y se refieren a la colocación de un inhibidor de ROBO-2 de un sujeto mediante un método o vía que da por resultado la colocación por lo menos parcial en tres agentes en un sitio deseado, tal que se produce un efecto(s) deseado.

25 En algunas modalidades, el inhibidor de ROBO2 se

administra a un sujeto que tiene una enfermedad de riñón crónica mediante cualquier modo de administración que administra el agente sistémicamente a una superficie deseada u objetivo, y puede incluir, pero no se limita a, inyección, 5 infusión, instilación, y administración por inhalación. Al grado en que los agentes de polipéptidos se pueden proteger de la activación en los intestinos, también se contemplan formas de administración oral. "Inyección" incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, 10 intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, sub-capsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebro-espinal, e inyección intraesternal e infusión. En algunas modalidades, 15 los inhibidores de ROBO-2 para el uso en los métodos descritos en la presente se administran por infusión o inyección intravenosa.

Las frases "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" como se utiliza en la 20 presente, se refiere a los modos de administración diferente a la administración enteral y tópica, usualmente por inyección. Las frases "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente" como se utilizan en la 25 presente se refieren a la administración del inhibidor de

ROBO-2, diferente a directamente en un sitio objetivo, tejido, u órgano, tal como un sitio tumoral, tal que entra al sistema circulatorio del sujeto y, de esta manera, se somete al metabolismo y otros procesos similares.

5 Para el uso clínico de los métodos descritos en la presente, la administración de los inhibidores de ROBO-2 descritos en la presente, pueden incluir formulación en composiciones farmacéuticas o formulaciones farmacéuticas para administración parenteral, por ejemplo, intravenosa; por
10 la mucosa, por ejemplo, intranasal; ocular, u otro modo de administración. En algunas modalidades, los inhibidores de ROBO-2 descritos en la presente se pueden administrar junto con cualquier compuesto portador farmacéuticamente aceptable, material, o composición que da por resultado un tratamiento
15 efectivo en el sujeto. De esta manera, una formulación farmacéutica para el uso en los métodos descritos en la presente puede contener un inhibidor de ROBO-2, como se describe en la presente, en combinación con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables.

20 La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuadas para el uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales y toxicidad excesiva, irritación,
25 respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde

con una relación de beneficio/riesgo razonable. La frase "portador farmacéuticamente aceptable" como se utiliza en la presente significa un material farmacéuticamente aceptable, composición o vehículo, tal como un rellenedor líquido o sólido, diluyente, excipiente, solvente, medio, material de encapsulamiento, auxiliar de fabricación (por ejemplo, lubricante, tal como magnesio, calcio o estearato de zinc, o ácido esteárico, o material de encapsulación con solvente, implicado en el mantenimiento de la estabilidad, solubilidad, o actividad de un inhibidor de ROBO-2. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial al paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tal como almidón de maíz y almidón de papa; (3) celulosa, y sus derivados, tal como carboximetil celulosa de sodio, metilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) excipientes, tales como mantequilla de cacao y ceras de supositorio; (8) aceites, tal como aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de cártamo, aceite de ajonjolí, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (9) glicoles, tales como propilenglicol; (10) polioles, tal como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol (PEG);

(11) ésteres, tal como oleato de etilo y laurato de etilo; (12) agar; (13) agentes amortiguadores, tal como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (14) ácido algínico; (15) agua sin pirógeno; (16) solución salina isotónica; (17) solución de Ringer; (19) soluciones amortiguadas con pH; (20) poliésteres, policarbonatos y/o poli-anhídridos; (21) agentes de volumen, tales como polipéptidos y aminoácidos (22) componentes de suero, tales como albúmina de suero, HDL y LDL; (23) alcoholes 2-C12, tal como etanol; y (24) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en las formulaciones farmacéuticas. Los agentes de liberación, agentes de recubrimiento, conservadores, y antioxidantes también pueden estar presentes en la formulación. Los términos tal como "excipiente", "portador", "portador farmacéuticamente aceptable" o similares se utilizan intercambiabilmente en la presente.

Los inhibidores de ROBO-2 descritos en la presente se pueden formular especialmente para la administración de compuesto a un sujeto en forma sólida, líquida o en gel, incluyendo aquellos adaptados para los siguiente: (1) administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril o formulación de liberación sostenida; (2) aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, ungüento, o un parche de liberación

controlada o rocío aplicado a la piel; (3) intravaginalmente o intrarectalmente, por ejemplo, como un pesario, crema o espuma; (4) ocularmente; (5) transdérmicamente; (6) transmucosa; o (79) nasalmente. Adicionalmente, un inhibidor
5 de ROBO-2 se puede implementar en un paciente o ser inyectado utilizando un sistema de administración de fármacos. Ver, por ejemplo, Urquhart, y colaboradores, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24: 199-236 (1984); Lewis, ed. "Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals" (Plenum Press, Nueva York,
10 1981); patente de los Estados Unidos No. 3,773,919; y patente de los Estados Unidos No. 35 3,270,960.

Las modalidades adicionales de las formulaciones y modos de administración de las composiciones que comprenden los inhibidores de ROBO-2 descritos en la presente, se pueden
15 utilizar en los métodos descritos en la presente como se describe a continuación.

Formas de Dosificación Parenterales. Las formas de dosificación parenterales de los inhibidores de ROBO-2 también se pueden administrar a un sujeto con una afección
20 renal crónica por varias vías, incluyendo, pero no limitado a, subcutánea, intravenosa (incluyendo inyección de bolo), intramuscular, e intra-arterial. Puesto que la administración de las formas de dosificación parenterales se desvía típicamente de las defensas naturales del paciente contra los
25 contaminantes, las formas de dosificación parenterales son

preferiblemente estériles o capaces de ser esterilizadas antes de la administración a un paciente. Ejemplos de formas de dosificación parenterales incluyen, pero no se limitan a, soluciones listas para inyección, productos seco listos para
5 ser disueltos o suspendidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable para inyección, suspensiones listas par inyección, formas de dosificación parenterales de liberación controlada, y emulsiones.

Los vehículos adecuados que se pueden utilizar para
10 proporcionar formas de dosificación parenterales de la descripción son bien conocidas por aquellas personas expertas en la técnica. ejemplos incluyen, sin limitación: agua estéril; agua para inyección USP; solución salina; solución de glucosa; vehículos acuosos tales pero como, pero no
15 limitados a, inyección de cloruro de sodio de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, e inyección de Ringer lactada; vehículos miscibles en agua tales como, pero no limitado a, alcohol etílico, polietilenglicol, y propilenglicol; y
20 vehículos no acuosos tales como, pero no limitados a, aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de cacahuate, aceite de ajonjolí, oleato de etilo, miristato de isopropilo y benzoato de bencilo.

En algunas modalidades, las composiciones que
25 comprenden una cantidad efectiva de un inhibidor de ROBO2 se

formulan para ser adecuadas para la administración oral, por ejemplo como formas de dosificación discretas, tales como, pero no limitadas a, comprimidos (incluyendo sin limitación comprimidos ranurados o recubiertos), pastillas, cápsulas, comprimidos masticables, paquetes de polvo, cápsulas, trociscos, obleas, rocíos de aerosol, o líquidos, tales como pero no limitados a, jarabes, elixires, soluciones o suspensiones en un líquidos acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión de aceite en agua, o una emulsión de agua en aceite. Tales composiciones contienen una cantidad predeterminada de la sal farmacéuticamente aceptable de los compuestos descritos, y se pueden preparar por métodos de farmacia bien conocidos por aquellas personas expertas en la técnica. Ver generalmente, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing, Easton, Pa. (1990).

Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y cápsulas representan las formas unitarias de dosificación oral sólidas más ventajosas, en cuyo caso se utilizan excipientes farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos se pueden recubrir por técnicas acuosas o no acuosas estándares. Estas formas de dosificación se pueden preparar por cualquiera de los métodos de farmacia. En general, las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación se preparan al mezclar uniforme e íntimamente el ingrediente(s) activo con portadores líquidos, portadores

sólidos finamente divididos, o ambos, y luego formar el producto en la presentación deseada si es necesario. En algunas modalidades, las formas de dosificación oral no se utilizan para el agente antibiótico.

5 Las formas de dosificación oral típicas de las composiciones que comprenden una cantidad efectiva de un inhibidor de ROBO2 se preparan al combinar la sal farmacéuticamente aceptable del inhibidor de ROBO2 en una mezcla íntima con por lo menos un excipiente de acuerdo con
10 las técnicas de formación de compuestos farmacéuticos convencionales. Los excipientes pueden tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de la composición deseada para administración. Por ejemplo, los excipientes adecuados para el uso en las formas de dosificación líquidas
15 o en aerosol orales incluyen, pero no se limitan a, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservadores, y agentes colorantes. Ejemplos de muestras adecuadas para el uso en las formas de dosificación oral sólidas (por ejemplo, polvos, comprimidos, cápsulas y
20 tabletas) incluyen, pero no se limitan a, almidones, azúcares, celulosa microcristalina, caolín, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes y agentes de desintegración.

 Los aglutinantes adecuados para el uso en las
25 formulaciones farmacéuticas descritas en la presente

incluyen, pero no se limitan a, almidón de maíz, almidón de
papa, u otros almidones, gelatina, gomas naturales y
sintéticas tales como acacia, alginato de sodio, ácido
algínico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma guar,
5 celulosa y sus derivados (por ejemplo , etil celulosa,
acetato de celulosa, carboximetil celulosa de calcio,
carboximetil celulosa de sodio), polivinilpirrolidona, metil
celulosa, almidón pre-gelatinizado, hidroxipropil-metil
celulosa, (por ejemplo, Nos. 2208, 2906, 2910), celulosa
10 microcristalina, y mezclas de los mismos.

Ejemplos de rellenos adecuados para el uso en
las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente
incluyen, pero no se limitan a, talco, carbonato de calcio
(por ejemplo, gránulos o polvos), celulosa microcristalina,
15 celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido
silícico, sorbitol, almidón, almidón pre-gelatinizado, y
mezclas de los mismos. El aglutinante o relleno en las
composiciones farmacéuticas descritas en la presente está
típicamente presente de aproximadamente 50 a aproximadamente
20 99 por ciento en peso de la composición farmacéutica.

Se utilizan desintegrantes en las co-formulaciones
farmacéuticas orales descritas en la presente para
proporcionar comprimidos que se desintegran cuando se exponen
a un entorno acuoso. Una cantidad suficiente de desintegrante
25 que es ya sea ni muy poco ni demasiado para alterar

perjudicialmente la liberación del ingrediente(s) activo se debe utilizar para conformar las formas de dosificación oral sólidas de los inhibidores de ROBO2 descritos en la presente. La cantidad de desintegrante utilizado varía basado en el tipo de formulación, y es fácilmente discernible para aquellas personas de experiencia ordinaria en la técnica. Los desintegrantes que se pueden utilizar para formar formulaciones farmacéuticas orales incluyen, pero no se limitan a, agar, ácido algínico, carbonato de calcio, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, potasio de polacrilina, glicolato de almidón de sodio, almidón de papa o tapioca, otros almidones, almidón pre-gelatinizado, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas, y mezclas de los mismos.

Los lubricantes que se pueden utilizar para formar las formulaciones farmacéuticas orales de los inhibidores de ROBO2 descritos en la presente incluyen, pero no se limitan a, estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, lauril sulfato de sodio, talco, aceite vegetal hidrogenado, (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de girasol, aceite de ajonjolí, aceite de oliva, aceite de maíz, y aceite de soja), estearato de zinc, oleato de etilo, laureato de etilo, agar, y mezclas de los mismos. Los

lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice siloide (AEROSIL^{MR} 200, fabricado por W. R. Grace Co. of Baltimore, Md.), un aerosol coagulado de sílice sintética (comercializado por Degussa Co. of Piano, Tex.), CAB-O-SIL^{MR} (un producto de dióxido de silicio pirogénico vendido por Cabot Co. of Boston, Mass.), y mezclas de los mismos. Si se utiliza en lo absoluto, los lubricantes se utilizan típicamente en una cantidad de menor que aproximadamente 1 por ciento en peso de las composiciones farmacéuticas o formas de dosificación en las cuales se incorporan.

En otras modalidades, se proporcionan formulaciones farmacéuticas sin lactosa y formas de dosificación, en donde tales composiciones contienen preferiblemente poco, si los hay, lactosa u otros mono- o di-sacáridos. Como se utiliza en la presente, el término "sin lactosa" significa que la cantidad de lactosa presente, si la hay, es insuficiente para incrementar sustancialmente la velocidad de degradación de un ingrediente activo. Las composiciones sin lactosa de la descripción pueden comprender excipientes que son bien conocidos en la técnica y se listan en la USP (XXI)/NF (XVI), que se incorporan en la presente a manera de referencia.

Las formulaciones orales de los inhibidores de ROBO2 abarcan además, en algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas anhidras y las formas de dosificación que comprenden los inhibidores de inhibidor de

ROBO2 descritos en la presente como ingredientes activos, puesto que el agua puede facilitar la degradación de algunos compuestos. Por ejemplo, la adición de agua (por ejemplo, 5%) se acepta ampliamente en las técnicas farmacéuticas como un medio para simular el almacenamiento a largo plazo a fin de determinar las características tales como vida de anaquel o la estabilidad de las formulaciones a través del tiempo. Ve, por ejemplo, Jens T. Carstensen, Drug Stability: Principles & Practice, 379-80 (2da edición, Marcel Dekker, NY, N.Y.: 1995). Las composiciones farmacéuticas anhidras y las formas de dosificación descritas en la presente se pueden preparar utilizando ingredientes anhidros o que contienen baja humedad y condiciones de baja humedad. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden lactosa y por lo menos un ingrediente activo que comprende una amina primaria o secundaria son preferiblemente anhidras si se espera el contacto sustancial con la humedad durante la fabricación, empaquetado y almacenamiento. Las composiciones anhidras se empacan preferiblemente usando materiales conocidos para prevenir la exposición al agua tal que se pueden incluir en los equipos formularios adecuados. Ejemplos de empaquetado adecuado incluyen, pero no se limitan a, láminas delgadas herméticamente selladas, plásticos, recipientes de dosis unitaria (por ejemplo, frasquitos de vidrio) con o sin desecantes, empaques de láminas al vacío, y

empaques de tiras.

Formulaciones de aerosol. Un inhibidor de ROBO-2 se pueden empaquetar en un recipiente de aerosol presurizado junto con propelentes adecuados, por ejemplo, propelentes de 5 hidrocarburo similar a propano, butano, o isobutano con adyuvantes convencionales. Un inhibidor de ROBO-2 también se puede administrar en una forma no presurizada tal como un nebulizador o atomizador. Un inhibidor de e ROBO-2 también se puede administrar directamente a las vías aéreas en la forma 10 de un polvo seco, por ejemplo por el uso de un inhalador.

Las composiciones de polvo adecuadas incluyen, por medio de ilustración, preparaciones en polvo de un inhibidor de ROBO-2, intermezclado completamente con lactosa, u otros polvos inertes aceptables para la administración 15 intrabronquial. Las composiciones en polvo se pueden administrar a través de un dispensador de aerosol o encerradas en una cápsula rompible que se puede instar por el sujeto en un dispositivo que perfora la cápsula y sopla el polvo en una corriente permanente adecuada para inhalación. 20 Las composiciones pueden incluir propelentes, surfactantes, y co-solventes y se puede rellenar en recipientes de aerosol convencionales que se cierran por una válvula dosificadora adecuada.

Los aerosoles para la administración al tracto 25 respiratorio son conocidos en la técnica. Ver por ejemplo,

Adjei, A. y Garren, J. *Pharm. Res.*, 1: 565-569 (1990); Zanen,
 P. y Lamm, J.-W. *J. Int. J. Pharm.*, 114: 111-115 (1995);
 Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and
 diagnostic agents to the respiratory tract", in *Critical*
 5 *Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 6:273-313
 (1990); Anderson y colaboradores, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 140:
 1317-1324 (1989)) and have potential for the systemic
 delivery of peptides and proteins as well (Patton y Platz,
Advanced Drug Delivery Reviews, 8: 179-196 (1992)); Timsina
 10 et. al., *Int. J. Pharm.*, 101: 1-13 (1995); y Tansey, I. P.,
Spray Technol. Market, 4:26-29 (1994); French, D. L.,
 Edwards, D. A. and Niven, R. W., *Aerosol Sci.*, 27: 769-783
 (1996); Visser, J., *Powder Technology* 58: 1-10 (1989)); Rudt,
 S. y R. H. Muller, *J. Controlled Release*, 22: 263-272 (1992);
 15 Tabata, Y, e Y. Ikada, *Biomed. Mater. Res.*, 22: 837-858
 (1988); Wall, D. A., *Drug Delivery*, 2: 10 1-20 1995); Patton,
 J. y Platz, R., *Adv. Drug Del. Rev.*, 8: 179-196 (1992);
 Bryon, P., *Adv. Drug. Del. Rev.*, 5: 107-132 (1990); Patton,
 J. S., y colaboradores, *Controlled Release*, 28: 15 79-85
 20 (1994); Damms, B. y Bains, W., *Nature Biotechnology* (1996);
 Niven, R. W., y colaboradores, *Pharm. Res.*, 12(9): 1343-1349
 (1995); y Kobayashi, S., y colaboradores, *Pharm. Res.*, 13(1):
 80-83 (1996), los contenidos de los cuales se incorpora en la
 presente a manera de referencia en su totalidad.

25 Las formulaciones de los inhibidores de ROBO-2

descritos en la presente abarcan adicionalmente composiciones farmacéuticas anhidras y formas de dosificación que comprenden los compuestos descritos como ingredientes activos, puesto que el agua puede facilitar la degradación de algunos compuestos. Por ejemplo, la adición de agua (por ejemplo, 5%) se acepta ampliamente en las técnicas farmacéuticas como un medio para simular el almacenamiento a largo plazo a fin de determinar las características tales como vida de anaquel o la estabilidad de las formulaciones a través del tiempo. Ver, por ejemplo, Jens T. Carstensen, Drug Stability: Principles & Practice, 379-80 (2da ed., Marcel Dekker, NY, N.Y.: 1995). Las composiciones farmacéuticas anhidras y las formas de dosificación de la descripción se puede preparar utilizando ingredientes anhidros lo que contienen baja humedad y condiciones de baja humedad. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden lactosa y por lo menos un ingrediente activo que comprende una amina primaria o secundaria son preferiblemente anhidras si se espera el contacto sustancial con la humedad durante la fabricación, empaquetado, y/o almacenamiento. Las composiciones anhidras se empacan preferiblemente usando materiales conocidos para prevenir la exposición al agua tal que se pueden incluir en equipos formularios adecuados. Ejemplos de empaquetado adecuado incluyen, pero no se limitan a, láminas delgadas herméticamente selladas, plásticos,

recipientes de dosificación unitaria (por ejemplo, frasquitos de vidrio) con o sin desecantes, paquetes de lámina al vacío, y paquetes de tiras.

Formas de Dosificación de Liberación Controlada y

5 Retardada. En algunas modalidades de los aspectos descritos en la presente, un inhibidor de ROBO-2 se puede administrar a un sujeto por medios de liberación controlada o retardada. Idealmente, el uso de una preparación de liberación controlada óptimamente diseñada en el tratamiento médico se
10 caracteriza por un mínimo de sustancia de fármaco que se emplea para curar o controlar la afección en una cantidad de tiempo mínima. Las ventajas de las formulaciones de liberación controlada incluyen: 1) actividad extendida del fármaco; 2) frecuencia de dosificación reducida; 3)
15 aceptación incrementada del paciente; 4) uso de menos fármaco total; 5) reducción en los efectos secundarios locales o sistémicos; 6) minimización de la acumulación de fármaco; 7) reducción en las fluctuaciones del nivel sanguíneo; 8) mejora en la eficacia del tratamiento; 9) reducción de la
20 potenciación o pérdida de la actividad del fármaco; y 10) mejora en la velocidad del control de enfermedades o afecciones. (Kim, Cherng-ju, Controlled Release Dosage Form Design, 2 (Technomic Publishing, Lancaster, Pa.: 2000)). Se pueden utilizar formulaciones de liberación controlada para
25 controlar un compuesto de la fórmula (I)'s en el inicio de

acción, duración de la acción, niveles de plasma, dentro de la ventaja terapéutica, y niveles de sangre pico. En particular, las formas de dosificación de liberación controlada o extendida o formulaciones se pueden utilizar
5 para asegurar que la efectividad máxima de un compuesto de la fórmula (I) se logre mientras que minimice los efectos adversos potenciales y las preocupaciones de seguridad, que pueden presentarse tanto de dosificación insuficiente de un fármaco (es decir, yendo por debajo de los niveles
10 terapéuticos mínimos) así como excediendo el nivel de toxicidad para el fármaco.

Una variedad de formas de dosificación de liberación controlada o extendida, formulaciones, y dispositivos se pueden adaptar para el uso con los
15 inhibidores de ROBO-2 descritos en la presente. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en las patentes de Estados Unidos Nos.: 3,845,770; 3,916,899; 3,536,809; 3,598,123; 4,008,719; 5,674,533; 5,059,595; 5,591,767; 5,120,548; 5,073,543; 5,639,476; 5,354,556; 5,733,566;
20 y 6,365,185 B1, cada una de las cuales se incorpora en la presente a manera de referencia en sus totalidades. Estas formas de dosificación se pueden utilizar para proporcionar liberación lenta o controlada de uno o más ingredientes activos utilizando, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, otras
25 matrices de polímero, geles, membranas permeables, sistemas

osmóticos (tal como OROS^{MR} (Alza Corporation, Mountain View, Calif. EUA)), recubrimientos de múltiples capas, micropartículas, liposomas, o microesferas o una combinación de los mismos para proporcionar el perfil de liberación deseado en las proporciones variantes. Adicionalmente, los materiales de intercambio iónico se pueden utilizar para preparar formas de sal adsorbidas, inmovilizadas de los compuestos descritos y afectar de esta manera la administración controlada de fármaco. Ejemplos de intercambiadores aniónicos específicos incluyen, pero no se limitan a, DUOLITE^{MR} A568 y DUOLITE^{MR} AP143 (Rohm&Haas, Spring House, Pa. EUA).

En algunas modalidades de los métodos descritos en la presente, un inhibidor de ROBO-2 para el uso en los métodos descritos en la presente, se administra a un sujeto por liberación sostenida o en pulsos. La terapia de pulsos no es una forma de administración discontinua de la misma cantidad de una composición a través del tiempo, sino comprende la administración de la misma dosis de la composición en una frecuencia reducida o administración de dosis reducidas. Las administraciones de liberación sostenida o de pulsos se prefieren particularmente cuando el desorden se presenta continuamente en el sujeto, por ejemplo donde el sujeto tiene enfermedad de riñón crónica. Cada dosis de pulso se puede reducir y la cantidad total de un inhibidor de ROBO-

2 descrito en la presente administrado durante el curso del tratamiento al sujeto o paciente se minimiza.

El intervalo entre pulsos, cuando es necesario, se puede determinar por una persona de experiencia ordinaria en la técnica. Frecuentemente, el intervalo entre pulsos, se puede calcular al administrar otra dosis de la composición cuando la composición al componente activo de la composición ya no es detectable en el sujeto antes del suministro del siguiente pulso. Los intervalos también se pueden calcular de la vida media in vivo de la composición. Los intervalos se pueden calcular como mayor que la vida media in vivo, o 2, 3, 4, 5 y aún 10 veces mayor que la vida media de composición. Varios métodos y aparatos para pulsar las composiciones para infusión u otras formas de administración al paciente se describen en las patentes de los Estados Unidos Nos. 4,747,825; 4,723,958; 4,948,592; 4,965,251 y 5,403,590.

En algunas modalidades, las preparaciones de liberación sostenida que comprenden el inhibidor de ROBO-2 se pueden preparar. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el inhibidor, en cuyas matrices están en la forma de artículos formados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles, (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol

vinílico)), polilacturos (patente de los Estados Unidos No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etilen-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tal
5 como el LUPRON DEPOT (microesferas inyectadas compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

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

También se proporcionan, en algunos aspectos,
15 ensayos, métodos, y sistemas para determinar si un individuo tiene una enfermedad de riñón crónica o una predisposición para una enfermedad de riñón crónica o proteinuria basados en los perfiles de expresión o la información de secuencia de ROBO2 como un biomarcador indicativo de enfermedad de riñón
20 crónica o una predisposición para una enfermedad de riñón crónica o proteinuria. Como se muestra en la presente, ROBO2 es útil como un biomarcador para identificar un sujeto que tiene enfermedades renal crónica o en alto riesgo de enfermedad de riñón crónica o proteinuria o para monitorear
25 los efectos de tratamiento en la progresión de la enfermedad

de riñón crónica o proteinuria.

Como se utiliza en la presente, un "biomarcador" se refiere a un refiere a una biomolécula orgánica que está diferencialmente presente en una muestra tomada de un sujeto
5 de un estado fenotípico (por ejemplo, que tiene una enfermedad) como es comparado con otro estado fenotípico (por ejemplo, que no tiene la enfermedad). Un biomarcador está diferencialmente presente entre los estados fenotípicos diferentes si el nivel de expresión media o media del
10 biomarcador en los diferentes grupos se calcula por ser estadísticamente significativo. Las pruebas comunes para la significancia estadística incluyen, entre otros, prueba t, ANOVA, Kruskal-Wallis, Wilcoxon, Mann-Whitney e índice de probabilidades. Los biomarcadores, solos o en combinación,
15 proporcionan mediciones de riesgo reducido que el sujeto a pertenece a un estado fenotípico u otro. Como tales, son útiles como marcadores para enfermedad (diagnóstico), efectividad terapéutica de un fármaco (teranósticos) y de la toxicidad de fármacos.

20 La expresión ROBO2 para uso en los ensayos descritos en la presente se puede detectar por cualquier método adecuado, incluyendo detección con niveles de proteína o detección de los niveles de expresión de mRNA. El polipéptido ROBO2 se puede detectar en cualquier forma que se
25 pueda encontrar en una muestra biológica obtenida de un

sujeto, o en cualquier forma que pueda resultar de la manipulación de la muestra biológica (por ejemplo, como el resultado de procesamiento de muestras). Las formas modificadas de ROBO2 pueden incluir proteínas modificadas que
5 son un producto de variantes alélicas, variantes de empalme, modificación pos-traducciona (por ejemplo, glicosilación, escisión proteolítica (por ejemplo, fragmentos de una proteína precursora) glicosilación, fosforilación, lipidación, oxidación, metilación, cisteinilación,
10 sulfonación, acetilación, y similares), oligomerización, des-oligomerización (para separar monómeros de una forma multimérica de la proteína), desnaturalización, y similares.

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

Por consiguiente, se proporcionan en la presente, en algunos aspectos, ensayos para la diagnosis de un sujeto que tiene enfermedad de riñón crónica o está en riesgo de
25 enfermedad de riñón crónica o proteinuria, el ensayo que

comprende: medir el nivel de proteína ROBO2 o ácido nucleico en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde si el nivel de ROBO2 en la muestra biológica del sujeto es en el mismo nivel o mayor que (por ejemplo, mayor que por una
5 cantidad estadísticamente significativa) un nivel de referencia de umbral para ROBO2, el sujeto probablemente esté en riesgo de enfermedad de riñón crónica o proteinuria o tiene enfermedad de riñón crónica. Por ejemplo, un incremento en el nivel de ROBO2 por más de aproximadamente 10%, o más de
10 aproximadamente 20%, o más de aproximadamente 30%, o más de aproximadamente 40%, o más de aproximadamente 50%, o más de aproximadamente 60%, o más, como es comparado con un nivel de umbral de referencia de ROBO2. En algunas modalidades, el incremento en el nivel de ROBO2 es por lo menos una
15 desviación estándar mayor que, o por lo menos dos desviaciones estándares, o más, mayor que un nivel de umbral de referencia ROBO2 mediano o medio. Tales niveles de referencia de ROBO2 medianos o medios se pueden calcular, por ejemplo, de cinco o más muestras obtenidas de sujetos que no
20 tienen enfermedad de riñón crónica o proteinuria, o de cinco o más muestras obtenidas del mismo sujeto en diferentes puntos de tiempo.

En algunas modalidades de estos ensayos, la cantidad de ROBO2 medida en una muestra biológica se compara
25 con un nivel de umbral de referencia, o una muestra biológica

de referencia, tal como muestra biológica obtenida de un control normal de edad de concordancia (por ejemplo, un sujeto de edad de concordancia que no tiene un riesgo de enfermedad de riñón crónica o proteinuria), o un sujeto sano, por ejemplo, un individuo sano.

En algunas modalidades, los ensayos, sistemas y equipos como se describen en la presente también son útiles para monitorear un curso de tratamiento que se administra a un sujeto. Por ejemplo, se puede medir el nivel de ROBO2 en una muestra biológica del sujeto en el primer punto de tiempo (por ejemplo, t_1) y comparar con el nivel de umbral de referencia de biomarcador ROBO2 y si el nivel medido para ROBO2 es el mismo o más alto que el nivel de umbral de referencia, al sujeto se le puede administrar un tratamiento o régimen terapéutico apropiado para retardar o reducir la ocurrencia de la enfermedad de riñón crónica o proteinuria, por ejemplo, incrementar el ejercicio, reducir la presión cardíaca, ajustar la dieta, etc. como se describe en los métodos en la presente, y luego el nivel del panel de proteína biomarcador ROBO2 se puede medir en un segundo punto de tiempo (por ejemplo, t_2) y puntos de tiempos subsecuentes (por ejemplo, t_3 , t_4 , t_5 , $t_5...$ etc.), y comparar los niveles de ROBO2 en uno o más puntos de tiempo (por ejemplo, en t_1 o cualquier punto de tiempo subsecuente) o los niveles de umbral de referencia de ROBO2 para determinar si el

tratamiento terapéutico o el tratamiento régimen médico para el tratamiento para reducir el riesgo de, retardar, o reducir la ocurrencia de la enfermedad de riñón crónica o proteinuria es efectivo. En tales modalidades, los ensayos, sistemas o equipos como se describen en la presente se pueden utilizar para monitorear un tratamiento terapéutico en un sujeto sintomático (por ejemplo, un sujeto que sabe que tiene enfermedad de riñón crónica o proteinuria), donde un tratamiento efectivo puede ser una disminución en ROBO2 en un sujeto, o alternativamente los ensayos, sistemas y equipos como se describen en la presente se pueden utilizar para monitorear el efecto del tratamiento profiláctico en un sujeto sintomático (por ejemplo, para prevenir la enfermedad de riñón crónica o proteinuria que se presenta en un sujeto), por ejemplo, donde el sujeto se ha identificado que está en riesgo de enfermedad de riñón crónica o proteinuria de acuerdo con los métodos tal como se describen en la presente, u otros conocidos en la técnica, o debido a razones hereditarias, por ejemplo.

El término "muestra" como se utiliza en la presente se refiere generalmente a cualquier material que contiene ácido nucleico, ya sea DNA o RNA, o aminoácidos. Generalmente, tal material estará en la forma de una muestra de sangre, muestra heces, muestra de tejido, células, bacterias, sección de histología, o hisopo bucal. Las

muestras se pueden preparar, por ejemplo las muestras pueden ser recientes, fijas, congeladas, o incrustadas en parafina. El término "muestra biológica" como se utiliza en la presente se refiere a una célula o población de células o una cantidad
5 de tejido o fluido de un sujeto. Más frecuentemente, la muestra se ha removido de un sujeto, pero el término "muestra biológica" también se puede referir a células o tejido analizados in vivo, es decir sin la remoción del sujeto. Frecuentemente, una "muestra biológica" contendrá células del
10 animal, pero el término también puede referirse a material biológico no celular, tal como fracciones no celulares de sangre, saliva u orina, que se pueden utilizar para medir los niveles de expresión génica. Las muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, biopsias de tejido, raspados,
15 sangre entera, plasma, suero, orina, saliva, cultivo celular, o líquido cefalorraquídeo. Las muestras biológicas también incluyen biopsias de tejido, cultivo celular. Una muestra biológica o muestra de tejido puede referirse a una muestra de tejido o fluido aislada de un individuo, incluyendo pero
20 no limitado a, por ejemplo, orina, sangre, plasma, suero, biopsia de riñón, heces, esputo, fluido espinal, fluido pleural, aspirados del pezón, fluido linfático, secciones externas de la piel, tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lagrimas, saliva, leche, células (incluyendo
25 pero no limitado a, células de sangre), tumores, órganos, y

también muestras de un constituyente de de cultivo celular in vitro. En algunas modalidades, donde se obtiene una muestra de orina, la muestra de orina se centrifuga para formar en pelotillas cualquiera de las células de riñón, o sobre las
5 cuales los ensayos y métodos descritos en la presente se pueden llevar a cabo. En algunas modalidades, la muestra es de una biopsia de riñón, tal como una biopsia con aguja gruesa de un riñón o porción del mismo, tal como una muestra de podocitos. Además, se utilizan muestras de aspirados con
10 aguja fina. En algunas modalidades, las muestras biológicas se pueden preparar, por ejemplo las muestras biológicas pueden ser reciente, fijas, congeladas, o incrustadas en parafina. La muestra se puede obtener al remover una muestra de células de un sujeto, pero también se puede lograr al utilizar
15 células previamente aisladas (por ejemplo aisladas por otra persona), o al llevar a cabo los métodos descritos en la presente *in vivo*.

El término "expresión" como se utiliza en la presente se refiere a intercambiablemente a la expresión de
20 un polipéptido o proteína o expresión de un polinucleótido o expresión de un gen. La expresión también se refiere a la expresión de proteínas traduccionalmente modificadas y pos-traduccionalmente modificado, así como la expresión de moléculas de pre-mRNA, empalmadas alternativamente y
25 moléculas mRNA maduras. La expresión de un polinucleótido se

puede determinar, por ejemplo, al medir la producción de las moléculas transcritas de RNA por ejemplo niveles de transcripto de RNA mensajero (mRNA). La expresión de una proteína o polipéptido se puede determinar, por ejemplo, mediante inmunoensayo utilizando un anticuerpo(s) que se enlaza con el polipéptido. El término "codificar" como se aplica a los polinucleótidos se refiere a un polinucleótido que se dice "codifica" un polipéptido o proteína si, en su estado nativo cuando se manipula por métodos bien conocidos por aquellas personas expertas en la técnica, se puede transcribir para producir el RNA que se puede traducir en una secuencia de aminoácidos para generar el polipéptido y/o un fragmento del mismo. La hebra anti-sentido es el complemento de tal ácido nucleico, y la secuencia de codificación se puede deducir de la misma. El término "endógenamente expresado" o "expresión endógena" se refiere a la expresión de un producto de gen en niveles normales y bajo regulación normal para ese tipo de célula.

Los métodos de detección se pueden utilizar con los ensayos, métodos, y sistemas descritos en la presente para medir los niveles de la proteína ROBO2 o ácido nucleico en una muestra o muestra biológica que incluyen métodos ópticos, métodos electromecánicos (técnicas de voltametría y amperometría), microscopia de fuerza atómica, y métodos de radiofrecuencia, por ejemplo, espectroscopia de resonancia

multipolar. Los métodos ópticos incluyen microscopia, tanto confocal como no confocal, detección de fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, absorbancia, reflectancia, transmitancia, y birrefringencia o índice de refracción (por ejemplo, resonancia de plasmón en superficiales, elipsometría, método de espejo resonante, un método de guía de onda acoplador de injerto o interferometría).

En esas modalidades de los ensayos, métodos, y sistemas descritos en la presente en los cuales el nivel de proteína ROBO2 determina, tal como por ejemplo, el nivel de una proteína de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, se puede utilizar cualquier procedimiento proteómico comúnmente conocido por las personas de experiencia ordinaria en la técnica para medir el nivel de proteínas biomarcadoras en una muestra biológica. La medición puede ser ya sea cuantitativa o cualitativa, siempre y cuando la medición sea capaz de determinar o indicar si el nivel de la proteína ROBO2 en la muestra biológica es el mismo como, o por arriba o por debajo de un valor de umbral de referencia para la proteína ROBO2.

El nivel medido de la proteína ROBO2 puede, en algunas modalidades, ser una medición primaria del nivel de la proteína ROBO2 (que mide la cantidad de proteína ROBO2 misma tal como al detectar el número de moléculas de proteína ROBO2 en la muestra) o puede ser, en algunas modalidades, una

medición secundaria de la proteína ROBO2 (una medición por lo cual una cantidad de proteína ROBO2 se puede pero no necesariamente deducir, tal como una medición de la actividad funcional o medición del ácido nucleico, tal como mRNA, que
5 codifica la proteína ROBO2). Los datos cualitativos también se pueden derivar u obtener de las mediciones primarias.

En algunas modalidades de los ensayos y métodos descritos en la presente, los niveles de proteína ROBO2 se pueden medir utilizando una tecnología de medición basada en
10 afinidad. "Afinidad" como se refiere a un anticuerpo es un término bien entendido en la técnica y mide el grado, o resistencia, del enlace del anticuerpo al socio de enlace, tal como un biomarcador como se describe en la presente (o epítipo del mismo). La afinidad se puede medir y/o expresar
15 en una variedad de formas conocidas en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, constante disociación de equilibrio (K_D o K_d), constante disociación de equilibrio evidente (K_D , o K_d), e IC_{50} (cantidad necesaria para llevar a cabo 50% de inhibición en un ensayo de competición;
20 utilizable intercambiabilmente en la presente con "150"). Se entiende que, para los propósitos de esta invención, una afinidad es una afinidad promedio para una población dada de anticuerpos que se enlazan a un epítipo.

La tecnología de medición basada en afinidad
25 utiliza una molécula que se enlaza específicamente a la

proteína biomarcadora que se mide (un "reactivo de afinidad", como un anticuerpo o aptámero), aunque otras tecnologías, tales como tecnologías basadas en espectroscopia (por ejemplo, ionización de desorción laser asistida por matriz-
5 tiempo de vuelo, espectroscopia MALDI-TOF) o ensayos que miden la bioactividad (por ejemplo, ensayos que miden la mitogenicidad de los factores de crecimiento) también se pueden utilizar. Las tecnologías basadas en afinidad para el uso con los ensayos y métodos descritos en la presente pueden
10 incluir ensayos en anticuerpos (inmunoensayos) y ensayos que utilizan aptámeros (moléculas de ácidos nucleicos que se enlazan específicamente a otras moléculas), tal como ELONA. Adicionalmente, los ensayos que utilizan tanto anticuerpos como aptámeros también se pueden contemplar (por ejemplo un
15 ensayo formato de intercalación que utiliza un anticuerpo para la captura y un aptámero para la detección). Una amplia variedad de ensayos basados en afinidad también son conocidos en la técnica.

Los ensayos basados en afinidad utilizan
20 típicamente por lo menos un epítopo derivado de la proteína biomarcadora, es decir, ROBO2, y muchos formatos de ensayo basados en afinidad utilizan más de un epítopo (por ejemplo dos o más epítopos se implican en los ensayos de formato de "intercalación"; por lo menos un epítopo se utiliza para
25 capturar la proteína biomarcadora, y por lo menos un epítopo

diferente se utiliza para detectar el marcador).

Los ensayos basados en afinidad pueden estar en competición o formatos de reacción directos, utilizan formato de tipo de intercalación, y pueden ser heterogéneos (por ejemplo, utilizan soportes sólidos) u homogéneos (por ejemplo se llevan a cabo en una fase individual) y/o utilizan inmunoprecipitación. Muchos ensayos implican el uso del reactivo de afinidad etiquetado (por ejemplo anticuerpo, polipéptido o aptámeros); las etiquetas pueden ser, por ejemplo, enzimáticas, fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas o moléculas de tinte. Los ensayos que amplifican las señales de la sonda también son conocidos; ejemplos de los cuales son ensayos que utilizan biotina y avidina, e inmunoensayos etiquetados y mediados con enzimas, tales como ensayos ELISA y ELONA. Por ejemplo, las concentraciones de biomarcadores de las muestras de fluido biológicas se pueden medir por el ensayo LUMINEX^{MR} o ELISA. Cualquiera de biomarcador o reactivo específico para el biomarcador se puede unir a una superficie y los niveles se pueden medir directa o indirectamente.

En algunas modalidades de los ensayos, métodos, y sistemas descritos en la presente, los niveles de proteína ROBO2 se pueden medir utilizando una tecnología de medición basada en la afinidad de inmunoensayo.

Las tecnologías de inmunoensayo pueden incluir

cualquier tecnología de inmunoensayo que pueda medir cuantitativa o cualitativamente el nivel de la proteína ROBO2 en una muestra biológica. Las tecnologías de inmunoensayo adecuadas incluyen, pero no se limitan a radioinmunoensayo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzimas), 5 inmunoensayos "de intercalación", ensayos inmunoradiométricos, ensayos inmunodifusión, inmunoensayos in situ (utilizando oro coloidal, etiquetas de enzima o radioisótopos, por ejemplo), tinción de Western, 10 inmunoprecipitaciones, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de inmunoelectroforesis, fluoroinmunoensayo (FiA), ensayo inmunoradiométrico (IRMA), ensayo inmunoenzimométrico (IEMA), ensayo de inmunoluminiscencia, y ensayo de inmunofluorescencia (Madersbacher S, Berger P. Antibodies and 15 immunoassays. Methods 2000; 21:41-50), ensayo quimioluminiscente, inmuno-PCR, y ensayo de tinción de Western. Del mismo modo, los ensayos basados en aptámeros que pueden medir cuantitativa o cualitativamente el nivel de un biomarcador en la muestra biológica se pueden utilizar en los 20 ensayos, métodos, y sistemas descritos en la presente. Generalmente, los aptámeros se pueden sustituir por anticuerpos en casi todos los formatos del inmunoensayo, aunque los aptámeros permiten formatos de ensayos adicionales (tal como amplificación de aptámeros enlazados que utilizan 25 la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos tal como

PCR (U.S. Pat No. 4,683,202) o amplificación isotérmica con cebadores compuestos (Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,251,639 6,692,918).

En algunas modalidades de los ensayos, métodos, y sistemas descritos en la presente, donde los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando una tecnología de medición basada en la afinidad de inmunoensayo, el inmunoensayo se lleva a cabo a medir el grado de la interacción de proteína/anticuerpo de la interacción del biomarcador/anticuerpo. Cualquier método conocido de inmunoensayo se puede utilizar.

En algunas modalidades, un asociado de enlace, por ejemplo, un anticuerpo o ligando que se enlaza a la proteína ROBO2 en el ensayo de enlace, es preferiblemente un asociado de enlace específico etiquetado, pero no necesariamente un anticuerpo. El asociado de enlace se etiqueta usualmente, pero alternativamente se puede detectar por una reacción secundaria en la cual se genera una señal, por ejemplo de otra sustancia etiquetada.

De esta manera, el anticuerpo que se enlaza específicamente a la proteína ROBO2 se puede utilizar en los ensayos, métodos, y sistemas descritos en la presente para determinar la presencia y/o cantidad de proteína ROBO2 en una muestra biológica, que se puede utilizar para detectar la concentración incrementada o disminuida de la proteína ROBO2

presente en una muestra de diagnóstico. Tales anticuerpos se pueden desarrollar por cualquiera de los métodos bien conocidos en el campo de inmunodiagnóstico. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos anti-proteína ROBO2 a cualquier estado biológicamente relevante de la proteína. De esta manera, por ejemplo, se podrían producir contra la forma no glicosilada de la proteína ROBO2, que existe en el cuerpo en una forma glicosilada, o contra un péptido que lleva un epítipo relevante de la proteína ROBO2.

En algunas modalidades de estos ensayos, métodos, y sistemas, una forma de ensayo amplificado se puede utilizar, mediante lo cual una "señal" mejorada se produce de un nivel relativamente bajo de proteína que se detecta. Una forma particular de un inmunoensayo amplificado es el ensayo quimioluminiscente mejorado. Por ejemplo en anticuerpo se etiqueta con peroxidasa de rábano picante, que participa en una reacción quimioluminiscente con luminol, un sustrato de peróxido y un compuesto que mejora la intensidad y duración de la luz emitida, típicamente 4-yodofenol o ácido 4-hidroxicinámico.

En algunas modalidades de estos ensayos, método, y sistemas, se puede utilizar un inmunoensayo amplificado que comprende inmuno-PCR. En esta técnica, el anticuerpo se enlaza covalentemente a una molécula de DNA arbitrario que comprende cebadores de PCR, mediante los cuales el DNA con el

anticuerpo unido a él se amplifica por la reacción en reacción en cadena de la polimerasa. Ver E. R. Hendrickson y colaboradores, Nucleic Acids Research 23: 522-529 (1995).

Por consiguiente, en todas las modalidades de los
5 ensayos, métodos, y sistemas descritos en la presente, el nivel de proteína ROBO2 se puede determinar utilizando un agente de enlace a proteína, también referido en la presente como "entidad de enlace a proteína" o un "reactivo de afinidad" se puede utilizar, en particular, anticuerpos. Por
10 ejemplo, los reactivos de afinidad, en particular, anticuerpos tales como anticuerpos anti-biomarcadores se pueden utilizar en un inmunoensayo, particularmente en un ELISA (ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzimas). En las modalidades donde el nivel de una proteína biomarcadora se
15 puede medir en una muestra biológica utilizando métodos comúnmente conocidos en la técnica, e incluyendo, por ejemplo pero no limitado a escisión química o enzimática específica de isoforma de proteínas de isoforma, inmunotinción, análisis inmunohistoquímica, ELISA, y espectrometrías de masas.

20 En algunas modalidades de los ensayos, métodos, y los sistemas descritos en la presente, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando el "Ensayo Inmunoabsorbente Enlazado a Enzimas (ELISA)." El ELISA es una técnica para detectar y medir la concentración de un antígeno
25 utilizando una forma etiquetada (por ejemplo enlazada a

enzimas) del anticuerpo. Existen diferentes formas de ELISA que son bien conocidos por aquellas personas expertas en la técnica. Las técnicas estándares conocidas en el campo para el ELISA se describen en "Methods in Immunodiagnosis", 2nd
5 Edition, Rose y Bigazzi, eds. John Wiley & Sons, 1980; Campbell y colaboradores, "Methods and Immunology", W. A. Benjamin, Inc., 1964; y Oellerich, M. 1984, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 22:895-904.

En algunas modalidades de los ensayos, métodos, y
10 sistemas descritos en la presente, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando un ensayo de intercalación ELISA. En un "ELISA de intercalación", un anticuerpo, (por ejemplo anti-enzimas) se enlaza a una fase sólida, (es decir placa de microtítulo) y se expone a una muestra biológica que contiene
15 antígeno (por ejemplo enzimas). La fase sólida luego se lava para remover el antígeno no enlazado. Un anticuerpo etiquetado (por ejemplo enlazado a enzimas) luego se enlaza al antígeno enlazado (si está presente) formando una intercalación de anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Por
20 consiguiente, utilizando este método, un primer anticuerpo a la proteína ROBO2 se enlaza a la fase sólida tal como una cavidad de una placa de microtítulo de plástico, y se incuba con la muestra y con un segundo anticuerpo etiquetado específico a la proteína ROBO2 para ser sometida a ensayo.
25 Ejemplos de enzimas que se pueden enlazar al anticuerpo son

fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, ureasa, y β -galactosidasa. El anticuerpo enlazado a enzimas reacciona con un sustrato para generar un producto de reacción coloreado que se puede medir.

5 En algunas modalidades de los ensayos, métodos, y sistemas descritos en la presente, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando un ensayo de captura de anticuerpos o ELISA competitivo. En un "ELISA competitivo", el anticuerpo se incuba con una muestra que contiene antígeno (es decir
10 enzimas). La mezcla de antígenos-anticuerpos luego se pone en contacto con una fase sólida (por ejemplo una placa de microtítulo) que se recubre con antígeno (es decir, enzima). Mientras más antígenos estén presentes en la muestra, menos anticuerpos libres serán disponibles para enlazarse a la fase
15 sólida. Un anticuerpo secundario etiquetado (por ejemplo, enlazado a enzimas) luego se agrega a la fase sólida para determinar la cantidad de anticuerpo primario enlazado a la fase sólida. Por consiguiente, en algunas tales modalidades, una muestra de prueba biológicas se deja enlazar a una fase
20 sólida, y el anticuerpo anti-proteína ROBO2 (por ejemplo anticuerpos que se enlazan específicamente a la proteína ROBO2) se pueden adicionar y dejar enlazar. Después de lavar el material no enlazado, la cantidad de anticuerpo enlazado a la fase sólida se determina utilizando un segundo anticuerpo
25 etiquetado, anti- al primero.

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

5 En algunas modalidades de estos ensayos, métodos, y sistemas descritos en la presente, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando inmunohistoquímica. En un "ensayo de inmunohistoquímica" una sección de tejido se somete a prueba para proteínas específicas al exponer el tejido a
10 anticuerpos que son específicos para la proteína que se somete a ensayo. Los anticuerpos luego se visualizan por cualquiera de una variedad de métodos para determinar la presencia y cantidad de la proteína presente. Ejemplos de métodos utilizados para visualizar anticuerpos son, por
15 ejemplo, a través de enzimas enlazadas a anticuerpos (por ejemplo, luciferasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, o β -galactosidasa), o métodos químicos (por ejemplo DAB/Substrate chromagen). La muestra luego se analiza microscópicamente, mucho más preferentemente por microscopia
20 de luz de una muestra teñida con una tinción que se detecta en el espectro visible, utilizando cualquiera de una variedad de tales métodos de tinción y reactivos conocidos por aquellas personas expertas en el campo.

 En algunas modalidades de estos ensayos, métodos, y
25 sistemas descritos en la presente, los niveles de proteína

ROBO2 se miden utilizando radioinmunoensayos. Un radioinmunoensayo es una técnica para detectar y medir la concentración de un antígeno, es decir, ROBO2, utilizando una forma etiquetada (por ejemplo radioactiva o fluorescentemente etiquetada) del antígeno. Ejemplos de etiquetas radioactivas para antígenos incluyen 3H, 14C, y 125I. La concentración de ROBO2 en una muestra biológica se mide al tener el ROBO2 en la muestra biológica compitiendo con el ROBO2 etiquetado (por ejemplo radioactivamente) para enlazarse a un anticuerpo a ROBO2. Para medir el enlace competitivo entre el ROBO2 etiquetado y el ROBO2 no etiquetado, el ROBO2 etiquetado está presente en una concentración suficiente para saturar los sitios de enlace del anticuerpo. Mientras es más alta la concentración de ROBO2 en la muestra, es más baja la concentración del ROBO2 etiquetado que se enlazará al anticuerpo.

En algunas modalidades de estos ensayos, métodos, y sistemas descritos en la presente, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando un ensayo inmunoradiométrico (IRMA). El IRMA es un inmunoensayo en el cual el reactivo de anticuerpo se etiqueta radiactivamente. Un IRMA requiere la producción de un conjugado de antígeno multivalente, por técnicas tales como por conjugación a una proteína por ejemplo, albumina de suero de conejo (RSA). El conjugado de antígeno multivalente debe tener por lo menos 2 residuos de

antígeno por molécula y los residuos de antígeno deben estar separados a una distancia suficiente para permitir el enlace por al menos de dos anticuerpos al antígeno. Por ejemplo, en un IRMA el pre-conjugado de antígeno multivalente se puede
5 unir a una superficie sólida, tal como una cera de plástico. El antígeno "de muestra" no etiquetado y el anticuerpo al antígeno que se etiqueta radiactivamente se adicionan al tubo de prueba que contiene la esfera recubierta con conjugado de antígeno multivalente. El antígeno en la muestra compete con
10 el conjugado de antígeno multivalente para los sitios de enlace a anticuerpo de antígeno. Después de un período de incubación apropiado, los reactivos no enlazados se remueven por lavado y se determina la cantidad de radioactividad en la fase sólida. La cantidad de anticuerpo radioactivo enlazado
15 es inversamente proporcional a la concentración de antígeno en la muestra.

Se pueden utilizar otras técnicas para detectar el nivel de proteína ROB02 en una muestra biológica que se lleva a cabo de acuerdo con la preferencia del practicante, y se
20 basa en la presente descripción y el tipo de muestra biológica (es decir muestra de plasma, orina, tejido, etc.). Una tal técnica es tinción de Western (Towbin y colaboradores, Proc. Nat. Acad. Sci. 76:4350 (1979)), en donde una muestra adecuadamente tratada se ejecuta sobre un
25 gel SDS-PAGE antes de ser transferido a un soporte sólido,

tal como un filtro de nitrocelulosa. Los anticuerpos anti-ROBO2 detectablemente etiquetados o las moléculas de enlace a proteínas luego se pueden utilizar para evaluar el nivel de la proteína ROBO2 donde la intensidad de la señal de la etiqueta detectable corresponde a la cantidad de proteína ROBO2. Los niveles de la cantidad de proteína ROBO2 presentes también se pueden cuantificar, por ejemplo por densitometría.

En algunas modalidades de los ensayos, métodos, y sistemas descritos en la presente, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando la espectrometría de masas tal como MALDI/TOF (tiempo de vuelo), SELDI/TOF, cromatografía líquida-espectrometrías de masas (LC-MS), cromatografía de gas-espectrometrías de masas (GC-MS), cromatografía líquida de alto desempeño-espectrometrías de masas (HPLC-MS), electroforesis capilar-espectrometrías de masas, espectrometrías de resonancia magnética nuclear, o espectrometrías de masas tándem (por ejemplo, MS/MS, MS/MS/MS, ESI-MS/MS, etc.). Ver por ejemplo, la Solicitud de U.S. Pat Nos: 20030199001, 20030134304, 20030077616, que se incorporan en la presente en su totalidad a manera de referencia.

En algunas de tales modalidades, estas metodologías se pueden combinar con las maquinas, sistema de computadora y medios para producir un sistema automatizado para determinar el nivel de la proteína ROBO2 en una muestra biológica y

análisis para producir un reporte imprimible que identifica, por ejemplo, el nivel de la proteína ROBO2 en una muestra biológica. En algunos casos, la medición del nivel de ROBO2 se hace remotamente de los módulos de determinación y
5 comparación.

Los métodos de espectrometría de masas son bien conocidos en la técnica y se han utilizado para cuantificar y/o identificar biomoléculas, tales como proteínas (ver, por ejemplo, Li y colaboradores (2000) *Tibtech* 18: 151-160;
10 Rowley y colaboradores (2000) *Methods* 20: 383-397; y Kuster y Mann (1998) *Curr. Opin. Structural Biol.* 8: 393-400). Además, se han desarrollado técnicas de espectrometría de masas que permiten por lo menos la secuenciación de novo parcial de las proteínas aisladas. Chait y colaboradores, *Science* 262:89-92
15 (1993); Keough y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA.* 96:7131-6 (1999); reviewed in Bergman, *EXS* 88: 133-44 (2000).

En ciertas modalidades, se utiliza un espectrofotómetro de iones de fase gaseosa. En otras modalidades, la espectrometría de masas de
20 desorción/ionización de laser se utiliza para analizar la muestra. La espectrometría de masas desorción/ionización de laser moderna ("LDI-MS") se puede practicar en dos variaciones principales: espectrometría de masas de desorción/ionización de laser asistida por matriz ("MALDI") y
25 la desorción/ionización por láser de superficie mayor

("SELDI"). En el MALDI, el analito se mezcla con una solución que contiene una matriz, y una gota de líquido se coloca sobre la superficie de un sustrato. La solución de matriz luego se co-cristaliza con las moléculas biológicas. El sustrato se inserta en el espectrómetro de masas. La energía láser se dirige a la superficie del sustrato donde desorbe e ioniza las moléculas biológicas sin fragmentarlas significativamente. Ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 5,118,937 (Hillenkamp y colaboradores), y la patente de Estados Unidos No. 5,045,694 (Beavis & Chait) que se incorporan en la presente a manera de referencia.

En el SELDI, la superficie de sustratos se modifica de modo que es un participante activo en el proceso de desorción. En una variante, la superficie se deriva con reactivos adsorbentes y/o captura que se enlazan selectivamente a la proteína de interés. En otra variante, la superficie se deriva con moléculas absorbentes de energía que no se desorben cuando se impactan con el láser. En otra variante, la superficie se deriva con moléculas que se enlazan a la proteína de interés y que contienen un enlace fotolítico que se rompe en aplicación de láser. En cada uno de estos métodos, el agente de derivación se sitúa generalmente en una ubicación específica sobre la superficie del sustrato donde la muestra se aplica. Ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5,719,060 y WO 98/59361 que

se incorporan en la presente a manera de referencia. Los dos métodos se pueden combinar, por ejemplo, al utilizar una superficie de afinidad SELDI para capturar un analito y al adicionar líquido que contiene matriz al analito de captura
5 para proporcionar el material absorbente de energía.

Para información adicional, con respecto a los espectrómetros de masa, ver, por ejemplo, Principles of Instrumental Analysis, 3rd edition., Skoog, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1985; y Kirk-Othmer Encyclopedia of
10 Chemical Technology, 4th ed. Vol. 15 (John Wiley & Sons, Nueva York 1995), pp. 1071-1094.

La detección del nivel de la proteína ROB02 dependerá típicamente en la detección de la intensidad de señal. Esto, a su vez, puede reflejar la cantidad y carácter
15 de un péptido enlazado al sustrato. Por ejemplo, en ciertas modalidades, la resistencia de la señal de los valores pico de los espectros de una primera muestra y una segunda muestra se pueden comparar (por ejemplo visualmente, por análisis de computadora, etc.) para determinar las cantidades relativas
20 de las biomoléculas particulares. Los programas de software tal como el programa Biomarker Wizard (Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, Calif.) se puede utilizar para ayudar en el análisis de los espectros de masa. Los espectrómetros de masa y sus técnicas son bien conocidos para aquellas personas de
25 experiencia en el campo.

En algunas modalidades de estos ensayos, métodos, y sistemas descritos en la presente, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando técnicas de electroforesis en gel, en particular SDS-PAGE (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida de Dodecilsulfato de Sodio), especialmente
5 PAGE bidimensional (2D-PAGE), SDS-PAGE preferiblemente bidimensional (2D-SDS-PAGE). De acuerdo con un acuerdo particular, el ensayo se basa en el 2D-PAGE, en particular, utilizando gradientes de pH inmovilizados (IPGs) con un
10 intervalo de pH preferiblemente por arriba de pH 4-9.

En algunas modalidades de estos ensayos, modalidades, y sistemas descritos en la presente, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando técnicas de electroforesis en gel, en particular, las técnicas
15 mencionadas en lo anterior combinadas con otros métodos de separación de proteínas, particularmente métodos conocidos por aquellas personas expertas en el campo, en particular, cromatografía y/o exclusión de tamaño.

En algunas modalidades de estos ensayos, métodos, y
20 sistemas descritos en la presente, los niveles de proteína ROBO2 se miden utilizando técnicas de resonancia, en particular, resonancia de superficie de plasma.

En algunas modalidades de estos ensayos, métodos, y sistemas descritos en la presente, los niveles de proteína
25 ROBO2 se miden utilizando un biochip de proteína. Un biochip

comprende generalmente un sustrato sólido que tiene una superficie sustancialmente plana, a la cual un reactivo de captura (por ejemplo, un reactivo adsorbente o afinidad) se une. Frecuentemente, la superficie de un biochip comprende una pluralidad de ubicaciones direccionables que tienen un reactivo de captura enlazado. El biochip también puede incluir un reactivo de captura enlazado que sirve como un control. Los biochips de proteínas son biochips adaptados para la captura de polipéptidos. Muchos biochip de proteína se describen en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, biochips de proteínas producidos por CIPHERGEN Biosystems, Inc. (Fremont, Calif.), Zyomyx (Hayward, Calif.), Invitrogen (Carlsbad, Calif.), Biacore (Uppsala, Sweden) y Procognia (Berkshire, UK). Ejemplos de tales biochips de proteína se describen en las siguientes patentes o solicitudes de patente publicadas: patente de Estados Unidos No. 6,225,047 (Hutchens & Yip); patente de Estados Unidos No. 6,537,749 (Kuimelis y Wagner) patente de Estados Unidos No. 6,329,209 (Wagner y colaboradores); Publicación Internacional PCT No. WO 00156934 (Englert y colaboradores); Publicación Internacional PCT No. WO 031048768 (Boutell y colaboradores) y patente de Estados Unidos No. 5,242,828 (Bergstrom y colaboradores).

Los niveles o valores de umbral de referencia de los niveles de proteína ROBO2 utilizados para comparación con el nivel de la proteína ROBO2 de un sujeto pueden variar,

dependiendo en el aspecto o modalidad descritos en la presente que se práctica, como será entenderá por toda esta especificación, y a continuación. Un valor de umbral de referencia se puede basar en un valor de muestra individual, tal como por ejemplo, un valor obtenido de una muestra biológica del sujeto que se somete a prueba, pero en un punto temprano en el tiempo (por ejemplo, en un primer punto de tiempo (t1), por ejemplo, un primer nivel de biomarcador medido, o en un segundo punto de tiempo (t2), por ejemplo,).

Un valor de umbral de referencia también se puede basar en un agrupamiento de muestras, por ejemplo, valor(es) obtenido de las muestras de un agrupamiento de sujetos que se someten a prueba. Por ejemplo, en algunas modalidades, los valores de umbral de referencia para la proteína ROBO2 se basan en el valor de 50% medido (por ejemplo, medio) de la proteína ROBO2 medida en los sujetos que se sabe tienen enfermedad de riñón crónica o proteinuria. Por ejemplo, los sujetos en el 50% superior (por ejemplo en o por arriba del nivel medio) para la proteína ROBO2 se pueden seleccionar para estar en riesgo de tener enfermedad de riñón crónica o proteinuria. El valor(es) de referencia también se puede basar en un agrupamiento de muestras que incluyen o que excluyen la muestra(s) que se somete a prueba. El valor de referencia se puede basar en un gran número de muestras, tal como de población de sujetos sanos del grupo de edad de concordancia

cronológica, o de sujetos quienes no tienen o no tienen un riesgo de enfermedad de riñón crónica o proteinuria. En algunas modalidades, el valor de referencia puede ser por lo menos uno, más típicamente por lo menos dos, desviaciones
5 estándares por arriba del medio o mediano de cualquiera de estos ensayos o un medio o mediano predeterminado.

Para evaluar el riesgo de un sujeto que experimenta probablemente o tiene enfermedad de riñón crónica o proteinuria por los ensayos, métodos, y sistemas como se
10 describen en la presente, un "valor de umbral de referencia" es típicamente un valor de umbral de referencia predeterminado, tal como la proteína ROBO2 en la orina, suero o sangre media obtenida de una población de sujetos sanos que están en el grupo de edad cronológica coincidentes con la edad
15 cronológica del sujeto sometido a prueba. Como se indica en lo anterior, en algunas situaciones, las muestras de referencia también pueden ser del mismo género y/o coincidentes basados en la etnicidad. En algunas modalidades, el valor de umbral de referencia para la proteína ROBO2 es el
20 nivel medio para ese biomarcador en un tipo de muestra biológica, por ejemplo, orina, sangre, suero, en un panes de sujetos para la misma etnicidad, por ejemplo, Caucásicos, Negros, Hispánicos, Asiáticos, y Asiáticos-Indios, Paquistaníes, de Oriente Medio, las Islas del Pacifico.

25 Para evaluar el riesgo de un sujeto que experimenta

probablemente o que tiene enfermedad de riñón crónica o proteinuria por los ensayos, métodos, y sistemas como se describe en la presente, el nivel de umbral de referencia para la proteína ROBO2 puede ser un nivel predeterminado, tal como un promedio o medio de los niveles obtenidos de una población de sujetos sanos que están en el grupo cronológico de edad de concordancia con la edad cronológica del sujeto sometido a prueba. Alternativamente, el nivel de umbral de referencia para la proteína ROBO2 puede ser un nivel de referencia histórico para el sujeto particular que se obtuvo de una muestra derivada del mismo sujeto, pero en un punto temprano en el tiempo y/o cuando el sujeto no tuvo un riesgo de enfermedad de riñón crónica o proteinuria. En algunos casos, el nivel de umbral de referencia para la proteína ROBO2 puede ser un nivel de referencia histórico de la proteína ROBO2 para un grupo particular de sujetos quienes han tenido enfermedad de riñón crónica o proteinuria debido a, por ejemplo, la diabetes.

En algunas modalidades, los sujetos sanos se seleccionan como los sujetos de control. En algunas modalidades, los controles son controles de edad de concordancia. El sujeto sano se puede utilizar para obtener un nivel de umbral de referencia de la proteína ROBO2 en, por ejemplo, una muestra de orina o suero. Un sujeto "sano" o muestra de un sujeto "sano" o individuo como se utiliza en la

presente es la misma como aquella comúnmente entendida por una persona experta en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar métodos comúnmente conocidos para evaluar la función renal, como se describe en la presente, para seleccionar
5 sujetos de control como sujetos sanos para la diagnosis y métodos del tratamiento descritos en la presente. En algunas modalidades, los sujetos con buena salud sin signos o síntomas de que sugieren enfermedad de riñón crónica se pueden reclutar como sujetos de control sanos. Los sujetos se
10 evalúan basados en evaluaciones extensivas consistidas de historial médico, historial familiar, exámenes físicos y renales por médicos, pruebas de laboratorio. Ejemplos de análisis de enfermedad de riñón crónica y/o proteinuria incluyen, pero no se limitan a detectar el nivel de proteínas
15 específicas o moléculas en una muestra de orina, sangre o suero, tal como, por ejemplo, albumina, calcio, colesterol, conteo de sangre completo (CBC), electrolitos, magnesio, fosforo, potasio, sodio, o cualquier combinación de los mismos; ensayos para detectar, por ejemplo, eliminación de
20 creatinina; niveles de creatinina; BUN (nitrógeno de urea en la sangre); a través del uso de técnicas o procedimientos específicos, tal como un escaneo CT abdominal, MRI abdominal, ultrasonido abdominal, biopsia de riñón, escaneo de riñón, ultrasonido de riñón; a través de la detección de cambios en
25 los resultados de ensayos o pruebas para eritropoyetina, PTH;

prueba de densidad ósea, o Vitamina D; o cualquier combinación de tales métodos y ensayos de detección.

Las poblaciones de edad de concordancia (de los cuales los valores de referencia se pueden obtener) son
5 idealmente la misma edad cronológica como el sujeto o individuo que se somete a prueba, pero también son aceptables poblaciones aproximadamente de edad de concordancia. Las poblaciones aproximadamente de edad de concordancia pueden estar dentro de 1, 2, 3, 4, o 5 años de la edad cronológica
10 del individuo que se somete a prueba, o pueden ser grupos de diferentes edades cronológicas que abarcan la edad cronológica del individuo que se someta a prueba.

Un sujeto que se compara a su "grupo de edad de concordancia cronológica" esta generalmente refiriéndose a la
15 comparación del sujeto con una edad de concordancia cronológica dentro de un intervalo de 5 a 20 años. Aproximadamente las poblaciones con edad de concordancia pueden estar en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 15, o 20 años de incrementos (por ejemplo un grupo de "incremento de 5 años"
20 puede servir como la fuente para valores de referencia para un sujeto de 62 años de edad que podría incluir individuos de 58-62 años de edad, individuos de 59-63 años de edad, individuos de 60-64 años de edad, individuos de 61-65 años de edad, o individuos de 62-66 años de edad). En una definición
25 más amplia, cuando existen espacios más grandes entre los

grupos de edad cronológica diferentes, por ejemplo, cuando hay algunos grupos de edad cronológica diferentes disponibles para valores de referencia, y los espacios entre los grupos de edad cronológica diferentes exceden los incrementos de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 15, o 20 años descritos en la presente, entonces el "grupo de edad de concordancia cronológica" pueden referirse al grupo de edad que es más cercano a coincidir con la edad cronológica del sujeto (por ejemplo cuando los valores de referencia disponibles para un grupo de edad más grande (por ejemplo, 80-90 años) y un grupo de edad más joven (por ejemplo, 20-30 años), un grupo de edad de concordancia cronológica para uno de 51 años puede usar el grupo de edad más joven (20-30 años), que es más cercano a la edad cronológica para el sujeto de prueba, como el nivel de referencia.

Otros factores que se consideran mientras que se seleccionan sujetos de control incluyen, pero no se limitan a, especie, género, etnicidad, y así sucesivamente. Por consiguiente, en algunas modalidades, un nivel de referencia puede ser un nivel de referencia predeterminado, tal como un promedio o mediana de niveles obtenidos de una población de sujetos de control sanos que son de edad de concordancia con el género del sujeto sometido a prueba. En algunas modalidades, un nivel de referencia puede ser un nivel de referencia predominado, tal como un promedio o mediana de

niveles obtenidos de una población de sujetos de control sanos que son de etnicidad de concordancia con la etnicidad del sujeto sometido a prueba (por ejemplo, Caucásico, Negro, Hispánico, Asiático y Asiático-Indio, Paquistaníes, de Oriente Medio y de las Islas del Pacífico). En otras modalidades, tanto la edad cronológica como el género de la población de sujetos sanos son coincidentes con la edad cronológica y género del sujeto sometido a prueba, respectivamente. En otras modalidades, tanto la edad cronológica como la etnicidad de la población de los sujetos sanos coinciden con la edad cronológica y etnicidad del sujeto sometido a prueba, respectivamente. En otras modalidades, la edad cronológica, género, y etnicidad de la población de los sujetos de control sanos todos coinciden con la edad cronológica, género, y etnicidad del sujeto sometido a prueba, respectivamente.

El proceso para comprar un nivel de proteína ROB02 en una muestra biológica de un sujeto y un nivel de umbral de referencia para la proteína ROB02 se puede llevar a cabo en cualquier manera conveniente apropiada y conocida por una persona de experiencia en la técnica. Generalmente, los valores de los niveles de proteína ROB02 determinados utilizando los ensayos, métodos, y sistemas descritos en la presente pueden ser valores cuantitativos (por ejemplo, valores cuantitativos de concentración, tales como miligramos

de proteína ROBO2 por litro (por ejemplo, mg/L) de muestra, o una cantidad absoluta). Alternativamente, los valores de los niveles de proteína ROBO2 pueden ser cualitativos dependiendo de las técnicas de medición, y de esta manera el modo para

5 comparar un valor de un sujeto y un valor de referencia puede variar dependiendo de la tecnología de medición empleada. Por ejemplo, la comparación se puede hacer al inspeccionar los datos numéricos, al inspeccionar las representaciones de los datos (por ejemplo al inspeccionar las representaciones

10 graficas tales como graficas de barras o líneas), y al utilizar desviaciones estándares de, por ejemplo, por lo menos una, o por lo menos dos desviaciones estándares. En un ejemplo, cuando un ensayo cualitativo se utiliza para medir los niveles de proteína ROBO2, los niveles se pueden comparar

15 al comparar visualmente la intensidad del producto de reacción coloreado, o al comparar los datos de las mediciones densitométricas o espectrométricas del producto de reacción coloreado (por ejemplo, al comparar los datos numéricos o datos gráficos, tales como graficas de barras, derivadas del

20 dispositivo de medición).

Como se describe en la presente, los niveles de proteína ROBO2 se pueden medir cuantitativamente (valores absolutos) o cualitativamente (valores relativos). En algunas modalidades, los valores cuantitativos de los niveles de la

25 proteína ROBO2 en las muestras biológicas pueden indicar un

nivel dado (o grado) de riesgo de enfermedad de riñón crónica o proteinuria.

En algunas modalidades, la comparación se lleva a cabo para determinar la magnitud de la diferencia entre los valores de un sujeto y los valores de referencia (por ejemplo, comparando el "sufijo" o porcentaje de diferencia entre los niveles de proteína ROBO2 medidos obtenidos de un sujeto y el valor de proteína ROBO2 de umbral de referencia). Una diferencia de veces se puede determinar al medir la concentración absoluta de los niveles de proteína ROBO2, y al comparar aquella del valor absoluto al nivel de proteína ROBO2 de umbral de referencia, o una diferencia de veces se puede medir por la diferencia relativa entre el valor de referencia y un valor de muestra, donde ni el valor es una medición de la concentración absoluta, y/o donde ambos valores se miden simultáneamente. Por ejemplo, un ELISA mide el contenido de concentración absoluta de una proteína de la cual se determina un cambio de veces en comparación con la concentración absoluta de la misma proteína en la referencia. Como otro ejemplo, un arreglo de anticuerpo mide la concentración relativa de la cual se determina un cambio de veces. Por consiguiente, la magnitud de la diferencia entre el valor medido y el valor de referencia que sugiere o indica una diagnosis particular dependerá en el método que se practica.

Como será evidente para aquellas personas de experiencia en la técnica, cuando las mediciones del replicado se toman para la medición de los niveles de proteína ROBO2, los valores medidos de los sujetos se pueden
5 comparar con los niveles de proteína ROBO2 de umbral de referencia, y toman en cuenta las mediciones replicadas. Las mediciones replicadas se pueden tomar en cuenta al utilizar ya sea el medio o mediana de los valores medidos.

En algunas modalidades, el proceso para comparar
10 puede ser manual o puede, preferiblemente, ser automatizado. Por ejemplo, un dispositivo de ensayo (tal como un luminómetro para medir las señales quimioluminiscentes) pueden incluir circuitos y software que les permite comparar un valor de un sujeto con valor de referencia para la
15 proteína ROBO2. Alternativamente, un dispositivo separado (por ejemplo, una computadora digital) se puede utilizar para comparar los niveles de proteína ROBO2 medidos del sujeto(s) y los niveles de umbral de referencia para la proteína ROBO2. Los dispositivos automatizados para la comparación pueden
20 incluir valores de referencia almacenados para la proteína ROBO2, o pueden comparar los niveles de proteína ROBO2 medidos del sujeto(s) con referencia a los niveles de umbral para la proteína ROBO2 que se derivan de muestras de referencia contemporáneamente medidas.

25 En algunas modalidades, un sujeto sometido a prueba

para los niveles de proteína ROBO2 se asigna en uno de dos o más grupos (estados) basado en los resultados de los ensayos, métodos, y sistemas descritos en la presente. Los ensayos de diagnóstico, métodos, y sistemas descritos en la presente se
5 pueden utilizar para clasificar entre una variedad de diferentes estados.

Por consiguiente, en algunas modalidades, la determinación si un sujeto tiene un alto riesgo de tener enfermedad de riñón crónica o proteinuria (estado: bajo
10 riesgo v. alto riesgo) se lleva a cabo utilizando los ensayos de diagnóstico, métodos, y sistemas descritos en la presente. Las cantidades o patrones de biomarcadores de la proteína ROBO2 determinados por ser característicos de varios estados de riesgo, por ejemplo, alto, medio, o bajo son
15 identificados. El riesgo de desarrollar enfermedad de riñón crónica o proteinuria se determina al medir la proteína ROBO2 sola o en combinación con otros biomarcadores conocidos, y luego ya sea enviarlos a un algoritmo de comparación o compararlos con una cantidad de referencia (por ejemplo, una
20 cantidad de referencia de corte como se describe en la presente) que se asocia con el nivel de riesgo particular.

En algunas modalidades, se proporcionan en la presente ensayos de diagnósticos, métodos, y sistemas para determinar la gravedad o estado o riesgo de tener una
25 enfermedad de riñón crónica o proteinuria en un sujeto. Cada

etapa de enfermedad de riñón crónica, por ejemplo, tiene una cantidad característica de proteína ROBO2 o cantidades relativas de proteína ROBO2. La etapa de una enfermedad se determina al medir la proteína ROBO2, sola o en combinación con otros biomarcadores, y luego ya sea enviarlas a un algoritmo de comparación o al compararlas con una cantidad de referencia y/o patrón de biomarcadores que se asocia con la etapa particular, por ejemplo, que tan pronto el sujeto desarrollará probablemente la enfermedad de riñón crónica o proteinuria. Por ejemplo, se puede clasificar entre probablemente tener enfermedad de riñón crónica o proteinuria dentro de un año (por ejemplo, una prognosis deficiente) o un sujeto tendrá probablemente enfermedad de riñón crónica o proteinuria en los siguientes 5 años.

Las modalidades adicionales de los ensayos de diagnóstico, métodos, y sistemas relacionados con la comunicación de los resultados o diagnosis o ambos a los técnicos, médicos o pacientes, por ejemplo. En ciertas modalidades, las computadoras se utilizan para comunicar los resultados de ensayo o diagnosis o ambos a partes interesadas, por ejemplo, médicos y sus pacientes. En algunas modalidades, los ensayos se llevan a cabo o los resultados del ensayo se analizan en un país o jurisdicción que difiere del país o jurisdicción a lo cual los resultados o diagnósticos se comunican, por ejemplo. En algunas

modalidades, un riesgo de tener enfermedad de riñón crónica o proteinuria, basado en los niveles de la proteína ROBO2 en una muestra biológica del sujeto se comunica al sujeto después de que se obtiene los niveles o pronosis. La

5 pronosis o diagnosis se puede comunicar al sujeto por el médico que trata al sujeto. Alternativamente, la pronosis o diagnosis se puede enviar al sujeto por correo electrónico o comunicar al sujeto por teléfono. Una computadora se puede utilizar para comunicar la pronosis o diagnosis por correo

10 electrónico o teléfono, o a través del internet utilizando un servicio de inicio de sesión de paciente de compuerta de seguridad. En ciertas modalidades, el mensaje que contienen los resultados de la pronosis o prueba de diagnóstico se pueden generar y enviar automáticamente al sujeto utilizando

15 una combinación de hardware y software de computadora que será familiares para los artífices expertos en telecomunicaciones. En ciertas modalidades de los ensayos, métodos, y sistemas descritos en la presente, todas o algunas de las etapas del método, incluyendo el ensayo de las

20 muestras, diagnosis de las enfermedades, y comunicación de los resultados del ensayo o diagnosis, se pueden llevar a cabo en jurisdicciones diversas (por ejemplo, extranjeras).

En algunas modalidades de los ensayos de diagnóstico, métodos y sistemas para calificar o evaluar un

25 riesgo de enfermedad de riñón crónica o proteinuria descritas

en la presente, los ensayos, métodos, o sistemas comprenden además manejar el tratamiento o sujeto basado en la determinación del riesgo de tener una enfermedad de riñón crónica o proteinuria. Tal manejo incluyen las acciones de

5 médico o especialista clínico subsecuente a determinar el riesgo del sujeto de tener enfermedad de riñón crónica o proteinuria, por ejemplo, si un médico hace una diagnosis del sujeto en riesgo de enfermedad de riñón crónica o proteinuria, entonces puede seguirse un cierto régimen de

10 tratamiento. Un régimen adecuado de tratamiento puede incluir, sin limitación, un programa de ejercicio supervisado; control de la presión arterial, ingesta de azúcar y/o niveles de lípidos; y terapias de fármacos. En algunas modalidades, un diagnóstico de un riesgo de tener

15 enfermedad de riñón crónica o proteinuria probar además determinar si el paciente está sufriendo de una enfermedad de riñón crónica, o si el paciente está sufriendo de una enfermedad relacionada. También, si la prueba de diagnóstico da un resultado no concluyente en el riesgo de estado de

20 evento adverso mayor, se pueden solicitar pruebas adicionales. En algunas modalidades de los ensayos de diagnóstico, métodos, y sistemas para calificar o evaluar un riesgo de enfermedad de riñón crónica o proteinuria descrita en la presente, si un médico hace una diagnosis del sujeto

25 que no está en riesgo de enfermedad de riñón crónica o

proteinuria, entonces no se proporciona tratamiento.

El ensayo y los métodos de detección de ROBO2 descritos en la presente se pueden automatizar utilizando sistemas robóticos dirigidos por computadora. Una muestra
5 biológica, tal como orina, plasma, o muestra de sangre, se pueden inyectar en un sistema, tal como un dispositivo microfluídico que se ejecuta completamente por una estación robótica de entrada de muestra a salida de resultado.

Por consiguiente, también se proporcionan en la
10 presente, en algunos aspectos sistemas (y medio leíble por computadora para provocar que los sistemas de computadora) lleven a cabo un método para determinar si un individuo tiene una enfermedad de riñón crónica o proteinuria o una predisposición a una enfermedad de riñón crónica o
15 proteinuria basado en los perfiles de expresión o información de secuencia.

En algunos aspectos, se proporcionan en la presente sistemas para evaluar si un sujeto tiene o está en riesgo incrementado de enfermedad de riñón crónica o proteinuria,
20 los sistemas que comprenden: (a) un módulo de determinación configurado para recibir por lo menos una muestra biológica y llevar a cabo por lo menos un análisis en la muestra biológica para medir un nivel de ROBO2 en la muestra biológica o determinar la relación de expresión de ROBO2
25 relativa con un nivel de referencia predeterminado o de

umbral y para enviar la relación de nivel o expresión medida;
(b) un dispositivo de almacenamiento configurado para almacenar información de salida de datos del módulo de determinación; (c) un módulo de comparación adaptado para
5 recibir la entrada del dispositivo de almacenamiento y comparar los datos almacenados en el dispositivo de almacenamiento con por lo menos un nivel de ROBO2 de umbral de referencia, en donde si el nivel de proteína ROBO2 medido es por lo menos el mismo o más alto que el nivel de umbral de
10 referencia, el módulo de comparación proporciona información a un módulo de salida en que la muestra biológica se asocia con un sujeto que se desvía del nivel de biomarcador de umbral de referencia; y (d) un módulo de salida para mostrar la información al usuario.

15 En todos los aspectos de la invención, los métodos para determinar los niveles de proteína ROBO2 se pueden llevar a cabo utilizando una máquina o sistema automatizado. Tales máquinas y sistemas generan un reporte, tal como mostrar un reporte en una pantalla visible o un reporte
20 imprimible que indica los niveles de proteína ROBO2 y/o reportan un incremento o de la misma como un nivel de umbral de referencia para la proteína ROBO2, y/o si el sujeto del cual se obtiene la muestra está en riesgo de enfermedad de riñón crónica o proteinuria.

25 Por consiguiente, algunas modalidades descritas en

la presente también proporcionan una máquina, sistemas de computadora y medios leíbles por computadora para llevar a cabo las etapas de (i) determinar los niveles de proteína ROBO2, y (ii) indicar o reportar si un sujeto está en riesgo
5 de tener enfermedad de riñón crónica o proteinuria.

Las modalidades de estos aspectos se describen a través de módulos funcionales, que se definen por instrucciones ejecutables por computadora registradas en un medio leíble por computadora y que provocan que una
10 computadora lleve a cabo etapas de método cuando se ejecutan. Los módulos se han segregado por función por consideración de claridad. Sin embargo, se debe entender que los módulos necesarios no corresponden a bloques discretos de códigos y las funciones descritas se pueden llevar a cabo por la
15 ejecución de varias porciones de códigos almacenadas en varios medios ejecutadas en varios tiempos. Adicionalmente, se debe apreciar que los módulos pueden llevar a cabo otras funciones, de esta manera los módulos no se limitan a tener ningunas funciones particulares o conjunto de funciones.

20 El medio leíble por computadora puede ser cualquier medio tangible disponible que se puede acceder por una computadora. El medio leíble por computadora incluye medios volátiles y no volátiles, removibles y no removibles tangibles implementados en cualquier método o para
25 almacenamiento de información tal como instrucciones leíbles

por computadora, estructuras de datos, módulos de programa u otros datos. El medio leíble por computadora incluye, pero no se limita a, RAM (memoria de acceso aleatorio), ROM (memoria solo de lectura), EPROM (memoria solo de lectura programable
5 borrrable), EEPROM (memoria solo de lectura programable eléctricamente borrrable), memoria flash u otra tecnología de memoria, CD-ROM (memoria solo de lectura de disco compacto), DVDs (discos versátiles digitales) u otros medios de almacenamiento ópticos, casetes magnéticos, cinta magnética,
10 almacenamiento de disco magnético u otro medio de almacenamiento magnético, otros tipos de memoria volátil y no volátil, y cualquier otro medio tangible que se puede utilizar para almacenar la información deseada y que se puede acceder por una computadora e incluyendo, y cualquier
15 combinación adecuados de lo anterior.

Los datos leíbles por computadora incorporados en uno o más medios leíbles por computadora, o medio leíble por computadora, pueden definir instrucciones, por ejemplo, como parte de uno o más programas, que, como resultado de ser
20 ejecutados por una computadora, indican a la computadora llevar a cabo una o más de las funciones descritas en la presente (por ejemplo, en relación a un sistema, o medio leíble por computadora), y/o varias modalidades, variaciones y combinaciones de los mismos. Tales instrucciones se pueden
25 escribir en cualquiera de una pluralidad de lenguajes de

programación, por ejemplo, Java, J#, Visual Basic, C, C#, C++, Fortran, Pascal, Eiffel, Basic, lenguaje de ensamblaje COBOL, y similares, o cualquiera de una variedad de combinaciones de los mismos. El medio leíble por computadora
5 o en el cual tales instrucciones se incorporan pueden recibir en uno o más de los componentes de cualquiera del sistema, o medio leíble por computadora descrito en la presente, que se puede distribuir a través de uno o más de tales componentes, y puede estar en transición entre los mismos.

10 El medio leíble por computadora puede ser transportable tal que las instrucciones almacenadas en el mismo se pueden cargar en cualquier otra fuente de computadora para implementar los aspectos de la presente invención descritos en la presente. Además, se debe apreciar
15 que las instrucciones almacenadas en el medio leíble por computadora, o el medio leíble por computadora, descrito en lo anterior, no se limitan instrucciones incorporadas como parte de un programa de aplicación que se ejecuta en una computadora hospedera. Más bien, las instrucciones se pueden
20 incorporar como cualquier tipo de código de computadora (por ejemplo, software o microcódigo) que se puede emplear para programar una computadora para implementar los aspectos de la presente invención. Las instrucciones ejecutables por computadora se pueden escribir en un lenguaje de computadora
25 adecuado o combinación de varios lenguajes. Los métodos de

biología computacional básicos son conocidos por aquellas personas de experiencia ordinaria en la técnica y se describen en, por ejemplo, Setubal and Meidanis y colaboradores, *Introduction to Computational Biology Methods* 5 (PWS Publishing Company, Boston, 1997); Salzberg, Searles, Kasif, (Ed.), *Computational Methods in Molecular Biology*, (Elsevier, Amsterdam, 1998); Rashidi and Buehler, *Bioinformatics Basics: Application in Biological Science and Medicine* (CRC Press, London, 2000) and Ouelette and Bzevanis 10 *Bioinformatics: A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins* (Wiley & Sons, Inc., 2^{da} ed., 2001).

Los módulos funcionales de ciertas modalidades de los aspectos descritos en la presente incluyen un módulo de determinación, un dispositivo de almacenamiento, un módulo de 15 comparación y un módulo de visualización. Los módulos funcionales se pueden ejecutar en una, o múltiples, computadoras, o al utilizar una, o múltiples, redes de computadora o sistemas de computadora.

En algunos aspectos, se proporcionan en la presente 20 sistemas de computadora que se pueden utilizar para determinar si un sujeto es probable que tenga o esté en riesgo de enfermedad de riñón crónica o proteinuria. En algunas modalidades, un sistema de computadora se conecta a un módulo de determinación y se configura para obtener los 25 datos de salida de un módulo de determinación con respecto a

una muestra biológica, donde el módulo de determinación se configura para detectar los niveles de la proteína ROBO2 en una muestra biológica obtenida del sujeto; y donde el sistema de computadora comprende (a) un dispositivo de almacenamiento configurado para almacenar la salida de datos del módulo de determinación así como datos de referencia; donde el dispositivo de almacenamiento se conecta a (b) un módulo de comparación que en algunas modalidades, se adapta para comparar los datos de salida almacenados en el dispositivo de almacenamiento con los datos de referencia almacenados, y en modalidades alternativas, adaptadas para comparar los datos de salida con las mismas, donde el módulo de comparación produce datos de reporte y se conecta a (c) un módulo de visualización para mostrar una página del contenido recuperado (es decir, datos de reporte en el módulo de comparación) para el usuario en una computadora cliente, en donde el contenido recuperado puede indicar los niveles de ROBO2, y/o la probabilidad de que el sujeto experimente enfermedad de riñón crónica o proteinuria en el futuro.

En algunas modalidades, el módulo de determinación tiene instrucciones ejecutables por computadora para proporcionar datos de expresión, información de secuencia, información relacionada con la información de secuencia en forma leíble por computadora. Como se utiliza en la presente, "información de secuencia" se refiere a cualquier secuencia

de nucleótidos y/o aminoácidos, incluyendo, pero no limitado a secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos de longitud completa, secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos parciales, o secuencias mutadas. Por otra parte, la
5 información "relacionada con" la información de secuencia incluye la detección de la presencia o ausencia de una secuencia (por ejemplo, detección de una mutación o supresión), determinación de la concentración de una secuencia en la muestra (por ejemplo, niveles de expresión de
10 secuencia de aminoácidos, o niveles de expresión de nucleótidos (RNA o DNA)), y similares. El término "información de secuencia" se propone para incluir la presencia o ausencia de modificaciones postraduccionales (por ejemplo fosforilación, glicosilación, sumilación,
15 farnesilación, y similares).

Como un ejemplo, los módulos de determinación para determinar la secuencia ROBO2 o la información de expresión de ácido nucleico pueden incluir sistemas conocidos para el análisis de secuencia automatizado que incluye pero no limita
20 a Escáneres Fluorescentes Hitachi FMBIO^{MR} y Hitachi FMBIO^{MR} II (disponibles de Hitachi Genetic Systems, Alameda, California); Sistemas de Análisis Genéticos de Electroforesis de 96 Capilares Completamente Automatizado SPECTRUMEDIX^{MR} SCE 9610 (disponible de SpectruMedix LLC, State College,
25 Pennsylvania); Secuenciador ABI PRISM^{MR} 377 DNA, Secuenciador

ABI^{MR} 373 DNA, Analizador Genético ABI PRISM^{MR} 310, Analizador Genético ABI PRISM^{MR} 3100, y Analizador ABI PRISM^{MR} 3700 DNA (disponible de Applied Biosystems, Foster City, California); Molecular Dynamics FLUORIMAGER^{MR} 575, Escáneres Fluorescentes SI, y Escáneres Fluorescentes Molecular Dynamics FLUORIMAGER^{MR} 595 (disponibles de Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra); Sistema de Secuenciación de DNA GENOMYXSC^{MR} (disponible de Genomix Corporation (Foster City, California); y Secuenciador de DNA PHARMACIA ALF^{MR} y Pharmacia ALFEXPRESS^{MR} (disponibles de Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra).

En algunas modalidades para determinar la información de secuencia o proteína, los módulos de determinación incluyen sistemas para análisis de proteínas y DNA. Por ejemplo, los sistemas de espectrometrías de masas y que incluyen sistemas de Ionización de Desorción de Láser Asistida por Matriz-Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF); sistemas de perfilado de arreglo SELDI-TOF-MS ProteinChip, por ejemplo Máquinas con el software CIPHERGEN PROTEIN BIOLOGY SYSTEM II^{MR}; sistemas para analizar los datos de expresión génica (ver por ejemplo U.S. 2003/0194711); sistemas para el análisis de expresión basado en arreglos, por ejemplo los sistemas de arreglo HT y los sistemas de arreglo de cartucho disponibles de Affymetrix (Santa Clara, CA 95051) AutoLoader,

COMPLETE GENECHIP^{MR} Instrument System, Fluidics Station 450, Kit de Software Hybridization Oven 645, QC Toolbox, Escáner 3000 7G, Escáner 3000 7G más el Sistema de Genotipificación objetivo, Sistema de Asociación de Genoma Completo Escáner 3000 7G, Instrumento GENETITAN^{MR}, Estación de Arreglo GeneChip^{MR}, Arreglo HT; un sistema ELISA automatizado (por ejemplo DSX^{MR} o DS2^{MR} de Dynax, Chantilly, VA o el ENEASYSTEM III^{MR}, TRITURUS^{MR}, THE MAGO^{MR} Plus); Densitómetros (por ejemplo X-Rite-508-Spectro Densitometer^{MR}, El densitómetro HYRYS^{MR} 2); sistemas de hibridación in situ de fluorescencia automatizados (ver por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 6,136,540); sistemas de formación de imágenes en gel 2D acoplados con el software de formación de imágenes 2-D; lectores de microplacas; Clasificadores de células activadas con fluorescencia (FACS) (por ejemplo Citómetro de Flujo FACSVantage SE, Becton Dickinson); analizadores de radioisótopos (por ejemplo contadores de centelleo), o una combinación de los mismos.

En algunas modalidades de este aspecto y todos estos aspectos de la presente invención se pueden utilizar una variedad de programas y formatos de software para almacenar la información de nivel de proteína biomarcadora en el dispositivo de almacenamiento. Cualquier variedad de formatos de estructuración de procesador de datos (por ejemplo, archivo de datos o base de datos) se pueden emplear

para obtener o crear un medio que tenga registrado en el mismo la información de secuencia o la información del nivel de expresión.

La información de la expresión de ROBO2 o la
5 información relacionada con la información de la expresión de ROBO2 determinada en el módulo de determinación se puede leer por el dispositivo de almacenamiento. Como se utiliza en la presente el "dispositivo de almacenamiento" se propone para incluir cualquier aparato de computación o procesamiento
10 adecuado u otro dispositivo configurado o adaptado para almacenar datos o información. Ejemplos del aparato electrónico adecuado para el uso con la presente invención incluyen aparatos de computación independientes, redes de telecomunicaciones de datos, incluyendo redes de área local
15 (LAN), redes de área amplia (WAN), sistemas de almacenamiento de nube, Internet, Intranet, y Extranet, y sistemas de procesamiento de computadora locales y distribuidos. Los dispositivos de almacenamiento también pueden incluir, pero no se limitan a: medios de almacenamiento magnéticos, tales
20 como discos flexibles, medios de almacenamiento de disco duro, cinta magnética, medio de almacenamiento óptico, tal como CD-ROM, DVD, medios de almacenamiento electrónicos tal como RAM, ROM, EPROM, EEPROM y similares, sistemas de almacenamiento de nube, discos duros generales e híbridos de
25 estas categorías tales como medios de almacenamiento

ópticos/magnéticos. El dispositivo de almacenamiento se adapta o se configura para tenerlo registrado sobre la misma información de secuencia o información de nivel de expresión. Tal información se puede proporcionar en forma digital que se
5 puede transmitir y leer electrónicamente, por ejemplo a través del Internet, a través de un sistema de nube, o en un disco flexible, a través de USB (bus de serie universal), o a través de cualquier otro modo adecuado de comunicación.

Como se utiliza en la presente, "información de
10 nivel de expresión" se refiere a cualquier información de nivel de expresión de nucleótidos y/o aminoácidos, incluyendo pero no limitado a secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos de longitud completa, secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos parciales, o secuencias mutadas. Por otra parte,
15 la información "relacionada a" la información de nivel de expresión incluye detección de la presencia o ausencia de una secuencia (por ejemplo, presencia o ausencia de una secuencia de aminoácidos, secuencia de nucleótidos, o modificación postraducciona), determinación de la concentración de una
20 secuencia en la muestra (por ejemplo, niveles de secuencia de aminoácidos, o niveles de expresión de nucleótidos (RNA o DNA), o nivel de modificación postraducciona), y similares.

Como se utiliza en la presente, "almacenado" se refiere a un proceso para codificar información en el
25 dispositivo de almacenamiento. Aquellas personas expertas en

la técnica pueden adoptar fácilmente cualquiera de los métodos actualmente conocidos para grabar información en el medio conocido para generar fabricaciones que comprenden la información de secuencia o información de nivel de expresión.

5 Una variedad de programas y formatos de software se pueden utilizar para almacenar la información de secuencia o información de nivel de expresión en el dispositivo de almacenamiento. Cualquier variedad de formatos de estructuración de procesador de datos (por ejemplo, archivo
10 de texto o base de datos) se pueden emplear para obtener o crear un medio que tenga grabado en el mismo la información de secuencia o información de nivel de expresión.

Al proporcionar la información de secuencia o la información de nivel de expresión en la forma leíble por
15 computadora, se puede utilizar la información de secuencia o la información de nivel de expresión en forma leíble en el módulo de comparación para comparar una secuencia específica o perfil de expresión con los datos de referencia dentro del dispositivo de almacenamiento. Por ejemplo, los programas de
20 búsqueda se pueden utilizar para identificar fragmentos o regiones de las secuencias que coinciden con una secuencia particular (datos de referencia, por ejemplo, información de secuencia obtenida de una muestra de control) o comparación directa del nivel de expresión determinado que se puede
25 comparar al nivel de expresión de datos de referencia (por

ejemplo, información de nivel de expresión obtenida de una muestra de control). La comparación hecha en la forma leíble por computadora proporciona un resultado de comparación leíble por computadora que se puede procesar por una variedad de medios. El contenido basado en el resultado de comparación se puede recuperar del módulo de comparación para indicar una enfermedad o desorden específico, tal como enfermedad de riñón crónica o proteinuria.

En algunas modalidades, los datos de referencia almacenados en el dispositivo de almacenamiento para ser leídos por el módulo de comparación son la secuencia ROBO2 o datos de información de expresión obtenidos de una muestra biológica de control del mismo tipo como la muestra biológica que se somete a prueba. Alternativamente, los datos de referencia son una base de datos, por ejemplo, una parte de la secuencia del genoma completo de un organismo, o familia de proteínas de secuencias, o un perfil de nivel de expresión (RNA, proteína o péptido). En algunas modalidades, los datos de referencia son información de secuencia o perfiles de nivel de expresión que son indicativos de una enfermedad específica o desorden, tal como enfermedad de riñón crónica o proteinuria.

En algunas modalidades, los datos de referencia se graban electrónica o digitalmente y se anotan datos de bases que incluyen, pero no se limitan a proteína de GenBank (NCBI)

y bases de datos de DNA tales como el genoma, ESTs, SNPS, Traces, Celara, Lecturas Ventor, lecturas Watson, HGTS, y similares; bases de datos Swiss Institute of Bioinformatics, tal como ENZYME, PROSITE, SWISS-2DPAGE, Swiss-Prot y bases de
5 datos TrEMBL; el paquete de software Melanie o el servidor ExPASy WWW, y similares; los SWISS-MODEL, Swiss-Shop y otras herramientas computacionales basadas en red; la base de datos de Comprehensive Microbial Resource (disponible de The Institute of Genomic Research). La información resultante se
10 puede almacenar en una base de datos relacionados que se puede emplear para determinar homologías entre los datos de referencia o genes o proteínas dentro y entre los genomas.

Al proporcionar los niveles de ROBO2 en forma leíble en el módulo de comparación, se puede utilizar para
15 comparar con los niveles de umbral de referencia de ROBO2 dentro del dispositivo de almacenamiento. La comparación hecha en la forma leíble por computadora proporciona un contenido leíble por computadora que se puede procesar por una variedad de medios.

20 El "módulo de comparación" puede utilizar una variedad de programas de software disponibles y formatos para la comparación operativa para comparar la secuencia ROBO2 o la información de nivel de expresión determinado en el módulo de determinación a la secuencia ROBO2 de referencia o los
25 datos de nivel de expresión. En algunas modalidades, el

módulo de comparación se configura para utilizar las técnicas de reconocimiento de patrón para comparar los datos de la secuencia ROBO2 o nivel de expresión de una o más entradas a uno o más patrones de datos de referencia. El módulo de
5 comparación se puede configurar utilizando software comercialmente disponible o libremente disponible existente para comparar los patrones, y se puede utilizar para comparaciones de datos particulares que se conducen. El módulo de comparación proporciona información leíble por
10 computadora relacionada con la información de secuencia que puede incluir, por ejemplo, detección de la presencia o ausencia de una secuencia (por ejemplo, detección de una mutación o supresión (proteína o DNA), información con respecto a alelos distintos, detección de la modificación
15 pos-traducciona, u omisión o repetición de la secuencia); determinación de la concentración de una secuencia en la muestra (por ejemplo, secuencia de aminoácidos/niveles de expresión de proteínas, o niveles de expresión de nucleótidos (RNA o DNA), o niveles de modificación pos-traducciona o
20 modificación de un perfil de expresión.

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

25 En algunas modalidades, el módulo de comparación

lleva a cabo comparaciones con espectros de espectrometría de masas, por ejemplo comparaciones de información de secuencia de fragmentos de péptido que se pueden llevar a cabo utilizando espectros procesados en MATLAB con la escritura
5 llamada "Qcealign" (ver por ejemplo WO2007/022248, incorporada en la presente a manera de referencia) y "Qpeaks" (Spectrum Square Associates, Ithaca, NY), o software CIPHERGEN Peaks 2.1^{MR}. Los espectros procesados luego se pueden alinear utilizando algoritmos de alineación que
10 alinean los datos de la muestra a los datos de control utilizando el algoritmo de entropía mínima al tomar los datos corregidos de línea base (ver por ejemplo Publicación WIPO WO2007/022248, incorporada en la presente a manera de referencia). El resultado de comparación se puede procesar
15 adicionalmente al calcular las relaciones. Los perfiles de expresión de la proteína se pueden discernir.

Cualquier software de comparación disponible se puede utilizar, incluyendo pero no limitado a, el paquete CIPHERGEN Express (CE) y Biomarker Patterns Software (BPS),
20 CIPHERGEN Biosystems, Inc., CA, EUA. El análisis comparativo se puede hacer con el software del sistema de chip de proteína (por ejemplo The Proteinchip suite for Bio-Rad Laboratories).

El módulo de comparación, o cualquier otro modo
25 descrito en la presente, puede incluir un sistema de

operación (por ejemplo, UNIX) en el cual se ejecuta un sistema de manejo de base de datos relacionado, una aplicación de la Red Mundial, y un servidor de la red mundial. La aplicación de la red Mundial incluye el código
5 ejecutable necesario para la generación de declaraciones de lenguaje de base de datos (por ejemplo, declaraciones Structured Query Language (SQL)). Generalmente, los ejecutables incluirán declaraciones SQL incluidas. Además, la aplicación de la Red Mundial puede incluir un archivo de
10 configuración que contiene apuntadores y direcciones a las diversas entidades de software que comprenden el servidor así como las diversas bases de datos externas e internas que se deben acceder para dar servicio a las solicitudes de los usuarios. El archivo de configuración también dirige las
15 solicitudes para las fuentes del servidor al hardware apropiado -- como puede ser necesario el servidor se debe distribuir sobre dos o más computadoras separadas. En algunas modalidades, el servidor de la Red Mundial soporta un protocolo TCP/IP. Las redes locales tal como esta son algunas
20 veces referidas como "Intranets". Una ventaja de tales Intranets es que permiten una fácil comunicación con las bases de datos de dominio público que residen en la Red Mundial (por ejemplo, el sitio GenBank o Swiss Pro de la Red Mundial). De esta manera, en algunas modalidades preferidas,
25 los usuarios pueden acceder directamente a los datos (a

través de los enlaces Hypertext, por ejemplo) que residen en las bases de datos de Internet utilizando una interfaz HTML proporcionada por los buscadores por la Red y servidores de la Red.

5 En algunas modalidades, el módulo de comparación compara los perfiles de expresión génica. Por ejemplo, la detección de los perfiles de expresión génica se pueden determinar utilizando la versión de software Affymetrix Microarray Suite 5.0 (MAS 5.0) (disponibles de Affymetrix,
10 Santa Clara, California) para analizar la abundancia relativa de un gen o genes sobre la base de la intensidad de la señal de los conjuntos de sondas, y los archivos de datos MAS 5.0 se pueden transferir en una base de datos y analizar con el software Microsoft Excel y GeneSpring 6.0 (disponibles de
15 Agilent Technologies, Santa Clara, California). El algoritmo de detección del software MAS 5.0 se puede utilizar para obtener un estudio general compresivo de cómo se detectan muchos transcritos en las muestras dadas y permite un análisis comparativo de 2 o más conjunto de datos de
20 microarreglos.

 En algunas modalidades, el módulo de comparación compara los perfiles de expresión de la proteína. Cualquier software de comparación disponible se puede utilizar, incluyendo pero no limitado a, el paquete Ciphergen Express
25 (CE) y Biomarker Patterns Software (BPS) (disponibles de

Ciphergen Biosystems, Inc., Freemont, California). El análisis comparativo se puede hacer con el software de sistema de chip de proteína (por ejemplo, El Paquete Proteinchip (disponibles de Bio-Rad Laboratories, Hercules, California). Los algoritmos para identificar los perfiles de expresión pueden incluir el uso de algoritmos de optimización tal como el algoritmo de varianza media (por ejemplo algoritmo JMP Genomics disponibles de JMP Software Cary, North Carolina).

10 El módulo de comparación proporciona el resultado de comparación leíble por computadora que se puede procesar en la forma leíble por computadora por criterios predefinidos, o criterios definidos por un usuario, para proporcionar un contenido basado en parte en el resultado de comparación que se puede almacenar y enviar como sea solicitado por un usuario utilizando un módulo de visualización. El módulo de visualización permite la vista de un contenido basado en parte en el resultado de comparación para el usuario, en donde el contenido es una señal
20 indicativa de una enfermedad de riñón crónica o proteinuria. Tal señal, puede ser por ejemplo, una visualización del contenido indicativo de la presencia o ausencia de una enfermedad de riñón crónica o proteinuria en un monitor de computadora, una página impresa del contenido que indica la
25 presencia o ausencia de una enfermedad de riñón crónica o

proteinuria de una impresora, o una luz o sonido indicativo de la presencia o ausencia de una enfermedad de riñón crónica o proteinuria.

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

En algunas modalidades, el contenido basado en el
resultado de comparación se muestra en un monitor de
computadora. En una modalidad de la invención, el contenido
basado en el resultado de comparación se muestra a través de
15 medios imprimibles. En una modalidad de la invención, el
contenido basado en el resultado de comparación se muestra
como una luz o sonido indicador. El módulo de visualización
puede ser cualquier dispositivo adecuado configurado para
recibir de una computadora y mostrar la información leíble
20 por computadora a un usuario. Ejemplos no limitantes
incluyen, por ejemplo, computadoras de propósito general
tales como aquellas basadas en el procesador de tipo Intel
PENTIUM, dispositivos de computadora y tableta Apple,
Motorola PowerPC, Sun UltraSPARC, procesadores Hewlett-
25 Packard PA-RISC, cualquiera de una variedad de procesadores

disponibles de Advanced microDevices (AMD) of Sunnyvale, California, o cualquier otro tipo de procesador, dispositivos de pantalla visual tal como dispositivos de tableta, dispositivos móviles de teléfonos inteligentes, pantallas de panel plano, tubos de rayos de cátodos y similares, así como impresoras de computadora de varios tipos.

En algunas modalidades, un Buscador de la Red Mundial se utiliza para proporcionar una interfaz de usuario para mostrar el contenido basado en el resultado de comparación. Se debe entender que otros módulos de la invención se pueden adaptar para tener una interfaz de buscador de la Red. A través del buscador de la Red, un usuario puede construir solicitudes para recuperar datos del módulo de comparación. De esta manera, el usuario indicará típicamente y hará clic a los elementos de interfaz de usuario tales como botones, menús desplegable, barras de deslizamiento y similares empleados convencionalmente en las interfaces de usuario gráficas. Las solicitudes formuladas de esta manera con el servidor de la Red del usuario se transmiten a una aplicación de la red que las formatea para producir una petición que se puede emplear para extraer la información pertinente relacionada con la información de secuencia, por ejemplo, visualización de una indicación de la presencia o ausencia de mutación o supresión (DNA o proteína); visualización de los niveles de expresión de una

secuencia de aminoácidos (proteína); visualización de los niveles de expresión de nucleótidos (RNA o DNA); visualización de la expresión SNP, o perfiles de mutación, o haplotipos, o visualización de información basada en los mismos. En una modalidad, la información de secuencia de los datos de muestra de referencia también se muestra.

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

En algunas modalidades, el contenido basado en el resultado de comparación que se muestra es una señal (por ejemplo señal positiva o negativa) indicativa de la presencia o ausencia de una enfermedad de riñón crónica o proteinuria, de esta manera solo una indicación positiva o negativa se puede mostrar.

De esta manera, se proporcionan en la presente sistemas (y medio leíble por computadora para provocar que los sistemas de computadora) lleven a cabo ensayos y métodos para determinar si un individuo tiene una enfermedad de riñón crónica o proteinuria o una pre-disposición, para una enfermedad de riñón crónica o proteinuria basados en los perfiles de expresión o información de secuencia.

Los sistemas y el medio leíble por computadora, son

simplemente modalidades ilustrativas de la invención para llevar a cabo los ensayos y métodos para determinar si un individuo tiene una enfermedad o desorden en específico o una pre-disposición, para una enfermedad o desorden específico
 5 basado en los perfiles de expresión o información de secuencia, y no se proponen para limitar el alcance de la invención. Las variaciones de los sistemas, y el medio leíble por computadora, son posibles y se proponen para estar dentro del alcance de la invención.

10 Los módulos del sistema o los utilizados en el medio leíble por computadora, pueden asumir numerosas configuraciones. Por ejemplo, la función se puede proporcionar en una máquina individual o se puede distribuir sobre múltiples máquinas.

15 ***Robo2 es una Proteína de podocitos Localizada en la Superficie Celular Basal del Podocito de Ratón***

Durante el desarrollo del riñón, el mRNA de *Robo2* se expresa en la mesénquima metanefrica que circunda la yema ureterica arborizante y después en el extremo próximo del
 20 cuerpo en forma de S (Piper y colaboradores, 2000), la ubicación de los podocitos primordiales. Para investigar si el *Robo2* también se implica en la maduración de podocitos, además de su función en la inducción temprana del riñón, los inventores llevaron a cabo la hibridación *in situ*
 25 *in situ* y encontraron que el mRNA de *Robo2* se expresó en la

etapa del bucle capilar del desarrollo de glomérulos de embriones de ratón en el día embrionario 16.5 (E16.5) (**FIGS. 5A y 5B**). La proteína Robo2 se volvió detectable por la tinción de inmunofluorescencia en el desarrollo de glomérulos
 5 alrededor de E14.5 y alcanzó la expresión pico a E16.5 (**FIGS. 5C-5E**). Aunque la expresión disminuyó después de E17.5 durante el desarrollo (**FIG. 5F**), la expresión Robo2 específica se mantuvo en los glomérulos después del nacimiento y fue detectable en los ratones adultos a las 5
 10 semanas de edad (**FIGS. 5G, 5H, 5L-5M**).

Para determinar la ubicación celular del Robo2 en el glomérulo en desarrollo, los inventores llevaron a cabo la inmunohistoquímica de etiqueta doble con los marcadores específicos de tipo de célula glomerular. Los inventores
 15 descubrieron que la proteína Robo2 se co-localizó con nefrina (**FIGS. 1A-1C**) y la podocina (**FIGS. 1D-1F**), dos proteínas asociadas a slit-diafragma de podocitos, el robo2 también se expresó en los glomérulos con la proteína adaptadora de interacción de nefrina en Nck (**FIGS. 1G, 1I**) y con WT 1, un
 20 constituyente de los núcleos de podocitos (**FIGS. 5H-5K**). El etiquetado doble con anticuerpos contra nidógeno, un marcador de membrana de no basal (**FIGS. 1J-1L y 1P**) y Pecaml, un marcador de células endoteliales (**FIGS. 1M-1O, 5M**) mostraron que el Robo2 se situó adyacente a la superficie externa de la
 25 membrana basal glomerular y estuvo ausente de células

endoteliales. La microscopia confocal de alta resolución
 mostró además que Robo2 subcelular no fue más abundante en la
 superficie basal de los podocitos (**FIG. 1Q**). La microscopia
 electrónica de inmuno-oro de riñones de ratón posnatales con
 5 un anticuerpo contra el dominio citoplásmico estableció que
 el Robo2 se situó en los procesos basales de podocitos
 cercano a la cara citoplásmica del slit-diafragma (**FIG. 1R**).
 Estos resultados muestran que el robo2 es una proteína de
 podocitos y su localización subcelular basal en los procesos
 10 basales indica que desempeña una función en la regulación de
 la estructura de proceso basal de podocitos.

***El Dominio Intracelular Robo2 Interactúa Directamente con los
 Dominios SH3 de la Proteína Adaptadora Nck***

El acoplamiento del dominio extracelular de nefrina
 15 conduce a la fosforilación de tirosina de su dominio
 intracelular por las Src cinasas y el reclutamiento del
 dominio SH2 de la proteína adaptadora Nck, que a su vez
 induce la polimerización de la actina (Jones y colaboradores,
 2006; Verma y colaboradores, 2006). El Nck lleva un dominio
 20 SH2 en la C-terminal y tres dominios SH3 cerca de la N-
 terminal. La polimerización de actina es mediada por los
 dominios SH3 de Nck (Rivera y colaboradores, 2004), que
 pueden reclutar varios reguladores de citoesqueleto
 incluyendo N-WASP y Pak (Jones y colaboradores, 2006).
 25 Previos estudios han mostrado que los dominios SH3 del

Dreadlock no homólogo de Nck de *Drosophila* también interactúan directamente con el dominio intracelular de Robo para inhibir la polimerización de la actina (Fan y colaboradores, 2003; Yang and Bashaw, 2006).

5 Los inventores probaron si el Nck de mamífero también puede interactuar directamente con el Robo2 en el podocito para regular el citoesqueleto de la F-actina. Para contestar esta pregunta, los inventores utilizaron un ensayo de dos híbridos de levadura para examinar si el Robo2
10 interactuó con Nck. Puesto que dos Ncks de mamífero (es decir, Nck1, Nck2) comparten una estructura y función similar en el desarrollo del riñón (Jones y colaboradores, 2006), los inventores utilizaron Nck1 en este estudio y observaron que el dominio intracelular de Robo2 interactuó directamente con
15 Nck1 (FIGS. 2A-2C). El mapeo de sitio de enlace en Robo2 para Nck1 mostró que la secuencia de aminoácidos 1085 a 1301, que contiene 4 motivos ricos en prolina, fue crucial para la interacción (**FIGS. 2A y 2C**). La ausencia de esta región rica en prolina previno su interacción con Nck1 (**FIG. 2A**). El
20 mapeo de sitio de enlace en Nck1 para Robo2 mostró que los primeros dos dominios SH3 se requirieron para su interacción con el Robo2 debido a que la supresión de cualquiera o ambos de ellos anuló la interacción (**FIG. 2B**). De esta manera la interacción de Robo2 y Nck1 fue mediada por dos dominios de
25 proteínas bien caracterizados, los dominios SH3 y los motivos

ricos en prolina (**FIG. 2C**). CD2AP, otra proteína adaptadora de podocitos, también lleva tres dominios SH3 en su N-terminal (Shih y colaboradores, 2001), pero no detectó ninguna interacción entre CD2AP y Robo2 en cualquiera de los
 5 ensayos de dos híbridos o co-precipitación de levadura. Estas observaciones indican que la ligación entre Robo2 y Nck1 en el podocito es una interacción específica.

El Robo2 de Longitud Completa Forma un Complejo con Nefrina a través de Nck

10 Los inventores confirmaron la interacción entre Robo2 y Nck por ensayos de extracción y co-precipitación. El robo2 de longitud completa humana etiquetada con His y myc (His-myc-Robo2) o el robo2 humana etiquetada con His y myc con una supresión del dominio de enlace a Nck1 (His-myc-
 15 Robo2- Δ NBD) se expresaron en las células HEK. Las células HEK transfectadas se estimularon con medio acondicionado con Slit2 (preparado de células establemente transfectadas Slit2) para activar el robo2 e incrementar el enlace Nck (Fan y colaboradores, 2003). El Nck se extrajo con His-mycRobo2 de
 20 los lisados de células HEK utilizando cuentas de Ni-NTA pero no con His-myc-Robo2- Δ NBD (**FIG. 2D**). Puesto que el dominio SH2 de Nck interactúa con las fosfotirosinas en el dominio citoplásmico de nefrina (NCD) (Jones y colaboradores, 2006; Verma y colaboradores, 2006), los inventores examinaron si el
 25 robo2 formó un complejo con nefrina a través del Nck

utilizando un ensayo de co-precipitación. Para establecer la prueba del principio, los inventores co-expresaron el robo2 y la nefrina en célula HEK con Fyn sinasa para incrementar la fosforilación de nefrina (Verma y colaboradores, 2006). La extracción de His-myc-Robo2 de los lisados de células HEK con cuentas de Ni-NTA co-precipitó el Nck y la nefrina cuando el Fyn se expresó (**FIG. 2E**). En el orden inverso, la extracción de la His-myc-nefrina co-precipitó el Nck y Robo2 cuando la Fyn cinasa se expresó (**FIG. 2F**). Adicionalmente, los precipitados preparados con el anticuerpo anti-Nck contuvieron tanto Robo2 como nefrina cuando el Fyn se sobre expresó (**FIG. 6A**). Estos datos indican que la nefrina, Nck, y Robo2 forman un complejo in vitro. Para variedad de estos descubrimientos in vivo, los inventores inmunoprecipitaron el robo2 de lisados de riñón de ratón recién nacido y descubrieron que el Nck y la nefrina se co-precipitaron (**FIG. 2G**). A la inversa, los precipitados preparados con el anticuerpo anti-nefrina también contuvieron Nck y Robo2 (**FIG. 2H**). Puesto que la nefrina se expresa de manera única en los podocitos, y Nck y Robo2 también se sitúan en estas células en el riñón, estos resultados indican que la nefrina, Nck, y Robo2 son capaces de formar un complejo en los podocitos.

Para determinar la función de Slit2 en la formación del complejo de proteína Robo2-Nck-nefrina, la His-myc-Robo2, nefrina, y Fyn se co-expresaron en células HEK que se

estimularon con un medio acondicionado con Slit2 o un medio acondicionado de control sin Slit2 antes de la co-precipitación (**FIG. 21**). Los inventores observaron que la estimulación de Slit2 incremento el robo2 que se enlaza a Nck y la formación del complejo con nefrina. Ambas relaciones de Nck1 versus Robo2 y nefrina versus Robo2 se incrementó después de la estimulación con Slit2 (**FIG. 2J**). Consistente con este descubrimiento, los inventores observaron que la Slit2 se expresó en gran medida en los glomérulos de ratón recién nacidos (**FIGS. 6B, 6C**).

La Señalización Slit2-Robo2 Inhibe la Polimerización de Actina Inducida por Nefrina

Puesto que Slit se enlaza a Robo para reclutar Dock y srGAPs para inhibir la polimerización de la actina (Fan y colaboradores, 2003), los inventores desean probar si Robo2 también recluta Nck para inhibir la polimerización de actina en células de mamífero, una función opuesta a la nefrina que promueve la polimerización de actina. Para tratar esta pregunta, los inventores estudiaron la polimerización de actina al analizar las colas de F-actina en las células que expresan la proteína quimérica CD16/7-NCD como se describe previamente (Jones y colaboradores, 2006; Verma y colaboradores, 2006). Este modelo utiliza los dominios extracelulares y transmembrana de los receptores Fc de inmunoglobulina humana CD16 y CD7 fusionados al dominio

citoplásmico de nefrina (NCD). CD 16/7-HA, en la cual NCD se reemplaza por una etiqueta HA, se utilizó como un control negativo. Estas proteínas quiméricas se co-expresaron con Robo2 en células HEK y se agruparon por el tratamiento con el anticuerpo anti-CD16 y un anticuerpo secundario conjugado a rodamina. Los inventores primero examinaron si el agrupamiento de dominio citoplásmico de nefrina podría reclutar Robo2. Los inventores observaron que el acoplamiento de CD16/7-NCD llevó Robo2 en las agrupaciones puesto que la mayoría de el robo2 se co-localizó con las agrupaciones CD16/7-NCD (**FIGS. 6D-6F**). Sin embargo, ninguna co-localización de el robo2 se observó ya sea con el control CD16/7-HA (**FIG. 6D'**) o con el constructo Robo2- Δ NBD (**FIG. 6E'**), en el cual el dominio de enlace Robo2 Nck (NBD) se suprimió. Interessantemente, en ausencia de Slit2, la co-localización de CD16/7-NCD y Robo2 se redujo significativamente (**FIG. 6F'**). Estos datos proporcionan evidencia adicional de que el dominio citoplásmico de nefrina es capaz de formarse en complejo con el dominio intracelular Robo2 en presencia de Slit2 y valida el modelo para determinar si la formación de un complejo de Robo2-Nck-nefrina afecta la polimerización de actina.

Las células HEK que expresan CD16/7-NCD y Robo2 se estimularon con Slit2 o el medio acondicionado de control sin Slit2 mientras que se agrupó por el anticuerpo anti-CD16. La

polimerización de actina se evaluó al cuantificar el número de células HEK con colas de F-actina visibles (Rivera y colaboradores, 2004). Los inventores observaron que ~80% de células agrupadas CD16/7-NCD formaron colas de F-actina que se podrían revelar por la tinción de faloidina como se reportó previamente (Jones y colaboradores, 2006; Verma y colaboradores, 2006). En la estimulación de Slit2, sin embargo, el número de células con colas de F-actina se redujo significativamente a aproximadamente 40% (**FIGS. 3A y 3C**). Solo algunas células se observaron que contienen colas de F-actina más cortas cuando las proteínas CD16/7-HA de control se agruparon (**FIGS. 3B y 3C**). Para investigar además si esta inhibición de la polimerización de actina requirió Nck, los inventores repitieron este ensayo utilizando Robo2 sin el dominio de enlace Nck (Robo2- Δ NBD) para determinar si el bloqueo de Nck que se enlaza a Robo2 previno la inhibición de Slit2-Robo2 en la polimerización de actina inducida por nefrina. CD16/7-NCD se co-expresó con ya sea Robo2 de longitud completa (**FIG. 7A**) o Robo2- Δ NBD (**FIG. 7B**) en células HEK. Los inventores observaron que la supresión del dominio de enlace Nck en Robo2 comprometió significativamente la inhibición de Slit2-Robo2 en la polimerización de actina inducida por nefrina (**FIG. 7C**).

El estudio previo ha mostrado que la nefrina se enlaza al citoesqueleto de F-actina (Yuan y colaboradores,

2002). Para determinar si la señalización Slit2-Robo2 podría inhibir la F-actina asociada a nefrina, los inventores inmunoprecipitaron CD16/7-NCD y CD16/7-HA con el anticuerpo anti-CD16 y examinaron la cantidad de F-actina en los precipitados por el tinción de Western. Los inventores observaron que la abundancia de la F-actina asociada con nefrina se redujo significativamente en la estimulación de Slit2 (**FIGS. 3D y 3E**). A la inversa, el ensayo de inmunoprecipitación in vivo mostró que la F-actina asociada con nefrina se inmunoprecipitó por un anticuerpo anti-nefrina de riñones de ratones nulos recién nacidos *Robo2* fue significativamente incrementado comparado con aquella de riñones de ratón heterocigotos de tipo silvestre *Robo2* (**FIGS. 3F y 3G**). Tomados conjuntamente, estos resultados indican que la señalización Slit2-Robo2 inhibe la polimerización de actina inducida por nefrina.

La pérdida de Robo2 en los Podocitos Provoca una Estructura de Proceso Basal Alterada en los Ratones

Los inventores y otros han mostrado previamente que casi todos los ratones nulos homocigotos *Robo2* en el antecedente genético mezclado murieron poco después del nacimiento debido a un fenotipo CAKUT grave (Grieshammer y colaboradores, 2004; Lu y colaboradores, 2007; Wang y colaboradores, 2011). Después de criar ratones con el alelo mutante *Robo2*^{de15} durante cinco generaciones en el antecedente

genético C57BL/6, el acoplamiento de padres heterocigotos *Robo2*^{de15/+} reveló tres ratones nulos homocigotos *Robo2*^{de15/de15} que sobrevivieron durante 3 semanas (entre un total de 160 ratones analizados en el destete). Para determinar si el

5 *Robo2* se requirió para la formación de proceso basal de podocitos durante el desarrollo, los inventores examinaron la ultra estructura de los glomérulos en ratones nulos *Robo2* en el nacimiento y 3 semanas de edad. Aunque el cuerpo de podocitos, procesos basales y slit-diafragma se formaron en

10 nacimiento, la microscopia electrónica de transmisión mostró el borramiento de proceso basal focal en ratones nulos homocigotos *Robo2*^{de15/de15} recién nacidos (**FIGS. 8A-8F**). Por la microscopia electrónica de exploración, los inventores observaron los procesos basales de interdigitalización

15 irregulares en ratones nulos homocigotos *Robo2*^{de15/de15} en el nacimiento y 3 semanas de edad (**FIGS. 4A-4H**). Estos descubrimientos indican que el *Robo2* es requerido para el patrón de procesamiento de basal de podocitos normales durante el desarrollo del riñón.

20 Par examinar la función de *Robo2* y el mantenimiento de la estructura de proceso basal en glomérulos maduros, los inventores generaron ratones inactivados *robo2* específicos de podocitos al cruzar ratones *Robo2*^{flox/flox} condicionales con ratones heterocigotos *Robo2*^{de15/+}; *Tg*^{Nphs2-Cre/+} que llevan un

25 transgen de podocina-Cre. Veinte ratones mutantes *Robo2*

específicos de podocitos con el genotipo *Robo2*^{de15/flox}; *Tg*^{Nphs2Cre/+} y 20 ratones de control de la misma camada se analizaron hasta un año de edad. Ratones inactivados *Robo2* específico de podocitos fueron viables y fértiles. Sin embargo, mostraron procesos basales de podocitos inusualmente amplios y borramiento de proceso basal segmentario focal en un mes (**FIGS. 4I-4M**). A las 6 semanas de edad los ratones mutantes desarrollaron microalbuminuria significativa, que se detectó por ambos análisis ELISA y Western (**FIGS. 4N y 4O**). Además, la microscopia electrónica de exploración reveló defectos de patrón de procesos basales en ratones inactivados específicos de podocitos *Robo2*. En lugar de los procesos basales secundarios de interdigitalización similares a cremallera ordenados en ratones inactivados específicos de podocitos de *Robo2*, de tipo silvestre mostraron patrón de interdigitalización de proceso basal irregular y desorganizado en un mes (**FIGS. 8G-8J**). Estos defectos fueron más obvios a través del tiempo. A los siete meses de edad, los procesos basales abiertamente desorganizados, más cortos y divagantes se observaron en ratones inactivados específicos de podocitos *Robo2* (**FIGS. 8K-8N**), que fueron similares al fenotipo de ratones nulos *Robo2* de tres semanas de edad. Aunque los ratones inactivados específicos de podocitos *Robo2* mostraron un número de podocitos normal, la deposición de matriz se incrementó significativamente en los glomérulos

(FIGS. 8O-8T, Tablas 1 y 2). Estos cambios morfológicos indican que el *Robo2* desempeña una función en la regulación y mantenimiento de la estructura de proceso basal de podocitos glomerular.

5 ***La Pérdida de Robo2 Alivia el Defecto Estructural de los Podocitos en Ratones Nulos de Nefrina***

Ratones homocigotos de nefrina desarrollan un fenotipo característico con dilatación del espacio de Bowman, procesos basales anormalmente amplios, ausencia de slit-diafragma glomerulares, y proteinuria significativa (Done y colaboradores, 2008; Hamano y colaboradores, 2002). Puesto que *Robo2* formó un complejo con nefrina, y la señalización Slit2-*Robo2* inhibió la polimerización de actina inducida por nefrina, los inventores quisieron saber si la pérdida de

10 *Robo2* modificaría el fenotipo de podocitos en ratones nulos de nefrina. Para probar esta hipótesis de una posible interacción genética entre *Robo2* y nefrina, los inventores generaron ratones inactivados doblemente de *Robo2*-nefrina y *Robo2*^{-/-} *Nphs1*^{-/-} *Robo2*^{flox/flox}; *Tg*^{Nphs2-Cre/+}; *Nphs1*^{-/-} de línea

15 germinal y específicos de podocitos. Como el homocigoto individual *Nphs1*^{-/-}, los ratones doblemente inactivados

20 ¹ single homozygote, *Robo2*^{-/-}, *Nphs1*^{-/-} (4/4, 100%) y *Robo2*^{flox/flox}; *Tg*^{Nphs-Cre/+}; *Nphs1*^{-/-} (3/3, 100%) murieron dentro de 10 horas después del nacimiento, el análisis histológico,

25 sin embargo, reveló que la morfología de los glomérulos en

los ratones doblemente homocigotos *Robo2*^{-/-} *Nphs*^{-/-} parecieron relativamente normales comparados con el fenotipo en ratones homocigotos de nefrina individuales *Nphs1*^{-/-} que tuvieron un espacio de Bowman dilatado (**FIGS. 8U-8X**). El número de

5 glomérulos con el espacio de Bowman dilatado se redujo significativamente en ratones homocigotos dobles *Robo2*^{-/-} *Nphs1*^{-/-} (2/55, 3.6%) comparados con los ratones nulos individuales de nefrina (31/122, 25.4%) (**FIGS. 8Y y Tabla 3**). Además, el análisis de la ultra estructura glomerular por la

10 microscopia electrónica de exploración mostró que la estructura del proceso basal de podocitos de interdigitalización se observó en solamente 1 (6.67%) de 150 glomérulos de ratones homocigotos individuales de nefrina (**FIGS. 4P y 4Q**) comparados con homocigotos individuales con

15 100% en *Robo2*^{-/-} (**FIGS. 4T y 4U**) y controles de tipo silvestre (**FIG. 4V y 4W**). Notablemente el patrón de interdigitalización de nulos procesos basales de podocitos se restauró en 12 (75%) de 16 glomérulos de riñones de ratón recién nacido homocigotos dobles *Robo2*^{-/-}; *Nph1r*^{-/-} (**FIGS. 4R y 4S, Tabla 4**),

20 indicando que una pérdida concomitante de *Robo2* y nefrina alivió el fenotipo estructural del proceso basal de podocitos en estos ratones. Estos descubrimientos indican que las interacciones físicas de *Robo2*-Nck-nefrina descritas en lo anterior tienen un efecto sustancial en la morfología de

25 proceso basal de podocitos in vivo cuando los niveles de

expresión de *Robo2* y nefrina se alteran genéticamente.

Los podocitos muestran un grado notable de plasticidad. Durante el desarrollo se diferencian de células epiteliales cuboidales simples en las células que llevan
5 proceso elaborado que los inventores reconocen como podocitos maduros (Reeves y colaboradores, 1978). Esta plasticidad se retiene después de la maduración. Se observa más gráficamente como borramiento de proceso basal reversible después de la neutralización de carga superficial experimental con sulfato
10 de protamina y restauración con heparina (Seiler y colaboradores, 1975) y durante la recaída y remisión de la proteinuria en niños con enfermedad de intercambio mínimo (Nachman y colaboradores, 2008). Los cambios más sutiles en los procesos basales se presentan probablemente bajo
15 condiciones fisiológicas en respuesta a señales positivas y negativas en la forma de estímulos hemodinámicos, hormonales o paracrinós. Dada la abundancia de la F-actina en los procesos basales, es probablemente, sin que se desee ser limitado por la teoría, que tales estímulos llevan a cabo
20 estos cambios sutiles en respuesta a las señales positivas y negativas transducidas al citoesqueleto de F-actina. Las señales positivas demasiadas o no balanceadas pueden conducir a un fenotipo de enfermedad. De hecho, aunque un ligando fisiológico todavía no se ha identificado, es claro que la
25 agrupación y fosforilación de la nefrina induce la

polimerización de actina al reclutar en Nck, un mecanismo que se puede implicar en la proteinuria inducida en 1 ratas por un anticuerpo monoclonal nefritogénico al dominio extracelular de nefrina (Topham y colaboradores, 1999) y en
5 casos de síndrome nefrótico congénito que desarrolla a los anticuerpos anti-nefrina después del trasplante renal (Patrakka y colaboradores, 2002).

Los estudios de los inventores descritos en la presente revelan otro nivel de regulación negativa de la
10 polimerización de actina de podocitos en la cual Robo2, cuando se enlaza por Slit, inhibe la polimerización de actina inducida por nefrina. Los inventores proponen, sin que se desee ligado o limitado por la teoría, que la señalización de SLIT-ROBO2 puede inhibir la polimerización de actina inducida
15 por nefrina para mantener la estructura del proceso basal de podocitos normal como sigue: bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo, durante el desarrollo del proceso basal), el acoplamiento de nefrina conduce a la fosforilación del Y1 191/1208/1232 intracelular al cual el dominio Nck SH2 se
20 enlaza (Jones y colaboradores, 2006; Verma y colaboradores, 2006). Nck a su vez recluta reguladores de citoesqueleto tal como N-WASP a través de sus dominios SH3 para promover la polimerización de actina para la extensión del proceso basal de podocitos o propagación (**FIG. 8Z**). La secreción local y el
25 enlace de Slit incrementa la interacción de Robo2 con Nck a

través de su región rica en prolina y los primeros dos dominios SH3 de Nck. El secuestro de los primeros dos dominios SH3 de Nck por Robo2 inhibiría la polimerización de actina mediada por nefrina Nck y disminuiría la F-actina asociada con la nefrina para mantener un citoesqueleto de F-actina dinámico y balanceado la estructura del proceso basal de podocitos normal (**FIG. 8Z**). Además de dirigir la inhibición de la polimerización de actina inducida por nefrina a través de Nck, la señalización de SLIT-ROBO2 puede inactivar la polimerización de actina a través de otras rutas, tal como reclutamiento de Ena, Abl, srGAPs para regular negativamente el citoesqueleto de F-actina como se reporta previamente (Bashaw y colaboradores, 2000; Wong y colaboradores, 2001). En ausencia de la señalización Slit2-Robo2 (por ejemplo, cuando Robo2 se inactiva), los efectos inhibidores de Robo2 en la polimerización inducida por nefrina se pierden. Los dominios SH3 de Nck son capaces de interactuar con reguladores de citoesqueleto corriente abajo para incrementar la polimerización de actina (**FIG. 8Z**), lo cual puede explicar la estructura del proceso basal de podocitos alterada identificada en los ratones mutantes Robo2. Los resultados de los inventores descritos en la presente soportan de esta manera un mecanismo mediante el cual la señalización de SLIT-ROBO puede regular la plasticidad de podocitos al regular negativamente el

citoesqueleto de F-actina, que es similar a la función de la señalización de SLIT-ROBO en la orientación de conos desarrollados de axones (Guan y Rao, 2003). El descubrimiento patológico de la deposición de matriz incrementada en los glomérulos de ratón mutante *Robo2* representa probablemente una respuesta secundaria.

Aunque es claro de los estudios de los inventores descritos en la presente que *Robo2* se sitúa en la superficie basal de los podocitos y forman complejo con otras proteínas slit-diafragma de proceso basal establecido a través de su dominio extracelular, permanece incierto si actualmente forma parte del slit-diafragma mismo. Interessantemente, el dominio extracelular de *Robo2* se asemeja a aquel de la nefrina que tiene ocho motivos similares a inmunoglobulina (Ig) y un dominio de fibronectina mientras que *Robo2* tiene cinco motivos similares a Ig y tres dominios de fibronectina (**FIG. 8Z**) (Tryggvason y colaboradores, 2006). Los inventores han probado la interacción entre el dominio intracelular de *Robo2* y el dominio citoplásmico de nefrina en el ensayo de dos híbridos de levadura. Los datos bioquímicos de los inventores (**FIGS. 2E y 2F**) tampoco soportaron una interacción directa entre estos dos receptores in vitro. Sin embargo, es posible que el dominio extracelular de *Robo2* pueda asociarse con el dominio extracelular de nefrina in vivo en las membranas celulares de los procesos basales adyacentes a través de una

trans-interacción en el slit-diafragma.

Los inventores descubrieron que ratones inactivados nulos homocigotos Robo2 y específicos de podocitos desarrollaron un patrón de interdigitalización de proceso
5 basal alterado, un fenotipo que es diferente de aquel de los ratones nulos de nefrina (Hamano y colaboradores, 2002; Done, 2008). Esto no es sorprendente puesto que la nefrina y Robo2 desempeñan funciones opuestas en la regulación de citoesqueleto de F-actina de podocitos. Mientras que la
10 señalización de nefrina induce la polimerización de actina localizada, la señalización Slit2-Robo2 actúa como un regulador negativo en la polimerización de actina para mantener la plasticidad y dinámica del proceso basal de podocitos. Hay que destacar que un defecto de organización de
15 proceso basal similar se observa en los ratones en los cuales el factor de despolimerización de actina Cofilin-1, otro regulador negativo del citoesqueleto de F-actina en los podocitos, se inactiva (Garg y colaboradores, 2010). Esto indica que la ausencia de ya sea un factor de promoción de
20 polimerización de actina tal como señalización de nefrina o un factor inhibidor de tal como señalización Robo2 afectará la estructura normal de los podocitos. De esta manera el balance entre los reguladores de citoesqueleto de F-actina positivo y negativo en los podocitos es importante para
25 mantener la estructura de proceso basal normal. La

recuperación de este equilibrio al desactivar tantas señales positivas (nefrina) como negativas (Robo2) puede explicar la restauración de la irrigación del proceso basal de podocitos y el fenotipo glomerular más leve en ratones inactivados
5 dobles Robo2-nefrina. Los estudios de los inventores descritos en la presente mostraron que las funciones dobles de la nefrina como un componente esencial de slit-diafragma para controlar la selectividad glomerular que por otra parte (Tryggvason y colaboradores, 2006) tiene un regulador de la
10 morfología del proceso basal a través de su interacción con el citoesqueleto de actina (Jones y colaboradores, 2006; Verma y colaboradores, 2006) por la otra. Mientras que la señalización Robo2 contrarresta claramente los efectos de señalización positivos de la nefrina en los procesos basales,
15 permanece para ser determinados si también afecta la integridad de slit-diafragma.

Por consiguiente, como se describe en la presente, los inventores han identificado Robo2 como un nuevo componente de la unión intercelular de podocitos en el riñón.
20 Los inventores han mostrado interacciones entre Robo2 y nefrina utilizando técnicas bioquímicas, funcionales y genéticas y han mostrado que la señalización Slit2-Robo2 inhibe la dinámica de la actina inducida por nefrina. Los resultados de los inventores indican que la señalización
25 Robo2 actúa como un regulador negativo en la nefrina para

modular la arquitectura del proceso basal de podocitos. Este estudio extiende el entendimiento de los inventores de la función de la señalización de SLIT-ROBO e identifica un mecanismo de interferencia novedoso por el cual el receptor
5 de señal guía Robo podría influir en la dinámica del citoesqueleto de F-actina.

A menos que se defina de otra manera en la presente, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente solicitud tendrán los significados
10 que se entienden comúnmente por aquellas personas de experiencia ordinaria en la técnica la cual esta descripción pertenece. Se debe entender que esta invención no se limita a la metodología particular, protocolos, y reactivos, etc., descritos en la presente y como tal deben variar. La
15 terminología utilizada en la presente es para el propósito de describir modalidades particulares solamente, y no se propone para limitar el alcance de la presente invención, que se define solamente por las reivindicaciones. Las definiciones de los términos comunes en la inmunología, y la biología
20 molecular se pueden encontrar en Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 18th Edition, publicada por Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-18-2); Robert S. Porter y colaboradores (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-
25 9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology y

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

totalidades.

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

Como se utiliza en la presente el término "que consiste esencialmente de" se refiere a aquellos elementos requeridos para una modalidad dada. El término permite la
10 presencia de elementos adicionales que no afectan materialmente la característica(s) básica y novedosa o funcional de esa modalidad de la invención.

El término "que consiste de" se refiere a composiciones, métodos, y componentes respectivos de los
15 mismos como se describe en la presente, que son exclusivos de cualquier elemento no citado y en esta descripción de la modalidad.

Además, a menos que se requiera de otra manera por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y
20 los términos plurales incluirán el singular. Como se utiliza en esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera. De esta manera, por ejemplo, las referencias al
25 "métodos" incluyen uno o más métodos, y/o etapas del tipo

descrito en la presente y/o que serán evidentes para aquellas personas expertas en la técnica en la lectura de esta descripción y así sucesivamente.

Diferente en los ejemplos de operación, o donde se
5 indique de otra manera, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción utilizados en la presente se debe de entender como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente." El término "aproximadamente" cuando se
10 utiliza en relación con los porcentajes puede significar $\pm 1\%$.

Se debe entender que esta invención no se limita a la metodología particular, protocolos, y reactivos, etc., descritos en la presente y como tal pueden variar. La terminología utilizada en la presente es para el propósito de
15 describir modalidades particulares solamente, y no se proponen para limitar el alcance de la presente invención, que se define solamente por las reivindicaciones.

Todas las patentes y otras publicaciones identificadas se incorporan expresamente en la presente a
20 manera de referencia para el propósito de describir y divulgar, por ejemplo, las metodologías descritas en tales publicaciones que se pueden utilizar en relación con la presente invención. Estas publicaciones se proporcionan solamente para su descripción antes de la fecha de
25 presentación de la presente solicitud. Nada en este aspecto

se debe considerar como una admisión de que los inventores no tienen derecho a anteceder tal descripción en virtud de la técnica previa o por cualquier otra razón. Todas las declaraciones en cuanto a la fecha o representación a los
5 contenidos de estos documentos se basa en información disponible a los solicitantes y no constituye ninguna admisión en la exactitud de las fechas o contenidos de estos documentos.

Las modalidades de los diversos aspectos descritos
10 en la presente se pueden ilustrar por los siguientes párrafos numerados:

2. Un método para el tratamiento de enfermedad de riñón crónica en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar a un sujeto que tiene o está en
15 riesgo de una enfermedad de riñón crónica una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende un inhibidor de ROBO2.

3. Un método para la reducción de proteinuria en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar
20 a un sujeto que tiene o está en riesgo de proteinuria una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende un inhibidor de ROBO2.

4. El método de cualquiera de los párrafos 1 o 2, en donde el inhibidor de ROBO2 es un anticuerpo de bloqueo
25 o un fragmento de enlace a antígeno del mismo específico

para ROBO2, una molécula anti-sentido específica para ROBO2, un RNA de interferencia corto (siRNA) específico para ROBO2, un inhibidor de molécula pequeña de ROBO2, un polipéptido inhibidor de ROBO2, o un análogo estructural ROBO2.

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

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

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

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

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

terapéutico adicional.

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

11. Un método que comprende:

a. someter a ensayo una muestra de prueba biológica
de un sujeto para determinar un nivel de expresión
del polipéptido ROBO2 o un RNA que codifica un
10 polipéptido ROBO2;

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

15 c. diagnosticar al sujeto como en necesidad de
tratamiento o terapia para la enfermedad de riñón
crónica

12. El método del párrafo 10, en donde el ensayo de
nivel de expresión del polipéptido ROBO2 se lleva a cabo
20 utilizando un anticuerpo o un fragmento de enlace a
antígeno del mismo específico para el polipéptido ROBO2.

13. El método del párrafo 10, en donde el ensayo de
nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido
ROBO2 se lleva a cabo utilizando PCR o un ensayo de
25 hibridación

14. El método de cualquiera de los párrafos 10-12, en donde la muestra de prueba biológica es una biopsia de riñón, muestra de orina, sangre, suero, o células formadas en pelotillas de una muestra de orina.
- 5 15. El método de cualquiera de los párrafos 10-13 en donde el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 es por lo menos 20% por arriba del nivel de umbral de referencia.
- 10 16. El método de cualquiera de los párrafos 10-13, en donde el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 r el nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 es por lo menos dos desviaciones estándares por arriba del nivel de umbral de referencia.
- 15 17. Un ensayo que comprende:
- a. poner en contacto una muestra de prueba bilógica aislada de un sujeto con un reactivo que detecta el polipéptido ROBO2 o un RNA que codifica un polipéptido ROBO2; y
 - 20 b. medir el nivel del polipéptido ROBO2 o un RNA que codifica un polipéptido ROBO2,
 - c. en donde un nivel incrementado del polipéptido ROBO2 o un RNA que codifica un polipéptido ROBO2, relativo con una muestra biológica normal,
 - 25 identifica un sujeto que tiene enfermedad de riñón

crónica y/o progresión de la enfermedad de riñón
crónica o proteinuria.

18. El ensayo del párrafo 16, en donde la detección de
nivel de expresión del polipéptido ROBO2 se lleva a cabo
5 utilizando un anticuerpo o fragmento de enlace a
antígeno del mismo específico para el polipéptido ROBO2.

19. El ensayo del párrafo 16, en donde la detección del
nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido
ROBO2 se lleva a cabo utilizando PCR o un ensayo de
10 hibridación.

20. El ensayo de cualquiera de los párrafos 16-18, en
donde la muestra de prueba biológica es una biopsia de
riñón, muestra de orina, sangre, suero, o células
formadas en pelletillas de una muestra de orina.

15 21. El ensayo de cualquiera de los párrafos 16-19, en
donde el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el
nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido
ROBO2 es por lo menos 20% por arriba del nivel de umbral
de referencia.

20 22. El ensayo de cualquiera de los párrafos 16-19, en
donde el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el
nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido
ROBO2 es por lo menos dos desviaciones estándares por
arriba del nivel de umbral de referencia.

25 23. El ensayo de cualquiera de los párrafos 16-21, en

donde el sujeto se ha diagnosticado con diabetes o presión arterial alta.

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

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

b. un módulo de comparación configurado para recibir el nivel de expresión del polipéptido ROBO2 o el nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 determinado por el módulo de medición y llevar a cabo por lo menos un análisis para determinar si el nivel de expresión del ROBO2 o el nivel de expresión del RNA que codifica un polipéptido ROBO2 es mayor que un nivel de referencia pre-determinado o relación, y para proporcionar un contenido recuperado; y

c. un módulo de visualización para mostrar un contenido basado en la salida de datos del módulo de comparación, en donde el contenido comprende una señal indicativa de que el nivel de expresión o la relación del ROBO2 o RNA es mayor que el nivel de

referencia predeterminado o relación, o una señal indicativa que el nivel o relación de expresión de ROBO2 no es mayor que el nivel de referencia o relación predeterminada.

5 25. El sistema del párrafo 23, en donde el contenido mostrado en el módulo de visualización comprende además una señal indicativa de que el sujeto está siendo recomendado para recibir un régimen de tratamiento particular.

10 26. Un sistema para determinar si un sujeto está en riesgo de una enfermedad de riñón crónica o proteinuria, o tiene una enfermedad de riñón crónica que comprende:

15 a. un módulo de determinación configurado para recibir por lo menos una muestra de prueba obtenida de un sujeto y llevar a cabo por lo menos un análisis en la por lo menos una muestra de prueba para determinar la presencia o ausencia de cualquiera de las siguientes condiciones:

20 i. una relación de expresión de ROBO2 mayor que una relación predeterminada, o
 ii. un nivel de expresión de ROBO2 mayor que un nivel predeterminado

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

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

27. El sistema del párrafo 25, en donde el contenido mostrado en el módulo de visualización comprende además una señal indicativa del sujeto que está siendo recomendado para recibir un régimen de tratamiento particular.

28. Un método para tratar un sujeto humano con un riesgo de una enfermedad de riñón crónica o proteinuria, que comprende administrar un tratamiento o terapia para prevenir la ocurrencia de la enfermedad de riñón crónica o proteinuria a un sujeto humano quien se determina que tiene un nivel de proteína ROBO2 por arriba del nivel de umbral de referencia.

29. El método del párrafo 27, en donde el nivel de proteína ROBO2 es por lo menos 20% por arriba del nivel de referencia.

30. El método del párrafo 27, en donde el nivel de la proteína ROBO2 es por lo menos dos desviaciones estándares por arriba del nivel de referencia.

5 31. El método de cualquiera de los párrafos 27-29, en donde el tratamiento o terapia para prevenir la ocurrencia de la enfermedad de riñón crónica o proteinuria comprende un inhibidor de ROBO2.

10 32. El método del párrafo 30, en donde el inhibidor de ROBO2 es un anticuerpo de bloqueo o fragmento de enlace a antígeno del mismo específico para ROBO2, una molécula anti-sentido específica para ROBO2, un RNA de interferencia corto (siRNA) específico para ROBO2, un inhibidor de molécula pequeña de ROBO2, un polipéptido inhibidor de ROBO2, o un análogo estructural ROBO2.

15 33. El método de cualquiera de los párrafos 30-31, en donde el inhibidor de ROBO2 bloquea o reduce el enlace de SLIT, a Nck, o ambos.

20 34. El método de cualquiera de los párrafos 30-32, en donde el inhibidor de ROBO2 es específico para el dominio de enlace Ig1 SLIT, los dominios de enlace Ig1 e Ig2 SLIT, el dominio de enlace intracelular Nck, o cualquier combinación de los mismos.

25 35. El método del párrafo 31, en donde el polipéptido inhibidor de ROBO2 es una proteína de fusión ROBO2 negativa dominante, un polipéptido que comprende un

dominio extracelular ROBO2 sin el dominio intracelular, o un polipéptido que comprende un dominio intracelular ROBO2 sin el dominio extracelular.

5 36. Un inhibidor de ROBO2 para el uso en el tratamiento de una enfermedad de riñón crónica.

37. Un inhibidor de ROBO2 para el uso en el tratamiento de proteinuria.

38. El uso de cualquiera de los párrafos 35 o 36, en donde el inhibidor de ROBO2 es un anticuerpo de bloqueo
10 o un fragmento de enlace a antígeno del mismo específico para ROBO2, una molécula anti-sentido específica para ROBO2, un RNA de interferencia corto (siRNA) específico para ROBO2, un inhibidor de molécula pequeña de ROBO2, un polipéptido inhibidor de ROBO2, o un análogo
15 estructural ROBO2.

39. El uso de cualquiera de los párrafos 35-37, en donde el inhibidor de ROBO2 bloquea o reduce el enlace de ROBO2 a SLIT, a Nck, o ambos.

40. El uso de cualquiera de los párrafos 35-38, en donde
20 inhibidor de ROBO2 es específico para el dominio de enlace Ig1 SLIT, los dominios de enlace Ig1 e Ig2 SLIT, el dominio de enlace intracelular Nck, o cualquier combinación de los mismos.

41. El uso del párrafo 37, en donde el polipéptido
25 inhibidor de ROBO2 es una proteína de fusión ROBO2

negativa dominante, un polipéptido que comprende un dominio extracelular ROBO2 sin el dominio intracelular, o un polipéptido que comprende un dominio intracelular ROBO2 sin el dominio extracelular.

- 5 42. El uso de cualquiera de los párrafos 35-40, en donde la enfermedad de riñón crónica o proteinuria es provocada por nefropatía diabética o presión arterial alta.

Esta invención se ilustra adicionalmente por los
10 siguientes ejemplos que no se deben considerar como limitantes.

EJEMPLOS

Hibridación In Situ de Tejido, Inmunohistoquímica, y Microscopia Electrónica de Inmuno-oro

- 15 El análisis de hibridación in situ se llevó a cabo con ribosondas Robo2 etiquetadas con digoxigenina como se describe previamente (Grieshammer y colaboradores, 2004). La inmunohistoquímica se llevó a cabo en tejidos de riñón embriónicos de ratón fijados en 4% de paraformaldehído y en
20 tejidos de riñón de ratones adultos fijados en metanol. Para la microscopia electrónica de inmuno-oro, los riñones de ratones de tipo silvestre se disecaron y se fijaron en paraformaldehído-lisina-periodato (PLP). Las secciones ultra delgadas del riñón de ratón se prepararon y se incubaron con
25 anticuerpo anti-Robo2 de cabra (DAKO Corporation) y un

anticuerpo secundario acoplado a 10 nm de oro coloidal (Ted Pella).

Ensayos de Dos Híbridos de Levadura, Co-Precipitación y Polimerización de Actina.

5 El sistema de dos híbridos de levadura DUPLEX-A™ (OriGene Tech) se utilizó para caracterizar la interacción de Robo2 y Nck1 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cultivo celular, la co-precipitación de la proteína etiquetada con His, y la inmunoprecipitación se llevaron a
10 cabo como se reporta previamente (Fan y colaboradores, 2003). Para la inmunoprecipitación endógena, se utilizaron riñones de ratones recién nacidos. La reticulación mediada por anticuerpos CD16 de las proteínas de fusión CD16/7 y el ensayo de polimerización de actina se llevaron a cabo como se
15 describe previamente (Jones y colaboradores, 2006; Rivera y colaboradores, 2004; Verma y colaboradores, 2006).

Estudio de Ratón Inactivado, Microscopia Electrónica de Transmisión y Exploración y Análisis Glomerular de Riñón

Los protocolos de ratones se aprobaron por the
20 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at Boston University Medical Center (#14388). La generación y generación y genotipificación del alelo condicional *Robo2*^{flox}, el alelo mutante de línea germinal *Robo2*^{del5} (también llamado *Robo2*⁻ intercambiabilmente en este documento), y el alelo de
25 tipo silvestre *Robo2*^{+/-} se describieron previamente (Lu y

colaboradores, 2007; Wang y colaboradores, 2011). Para generar ratones inactivados dobles *Robo2*-nefrina, los ratones *Robo2*^{+/-} se cruzaron con ratones *Nphs1*^{+/-} que se generaron previamente (Hamano y colaboradores, 2002). Para la

5 microscopía electrónica de transmisión, los riñones se fijaron, se incubaron en 2% de glutaraldehído en cacodilato de sodio 0.15 M, se deshidrataron en etanol graduado, se incrustaron en Epon, se seccionaron y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las secciones de riñón

10 ultradelgadas se examinaron utilizando un microscopio electrónico JEM-1011. Para la microscopía electrónica de exploración, los riñones se prepararon siguiendo el protocolo estándar. Para los estudios patológicos de riñón, los riñones se fijaron en 4% de paraformaldehído, se incrustaron en

15 parafina, se seccionaron, y se tiñeron utilizando métodos de ácido periódico de Schiff (PAS) o eosina-hematoxilina (H&E) estándares. Para la cuantificación del número de podocitos, se utilizó WT1 como un marcador nuclear de podocitos y la tinción de inmunoperoxidasa se llevó a cabo en las secciones

20 de riñón siguiendo el protocolo estándar. Los núcleos de podocitos positivos WT1 en cada sección cruzada glomerular se contaron. Para el análisis de proteinuria, especímenes de orina "mancha" de ratones de 6 semanas de edad se examinaron utilizando un equipo de cuantificación ELISA de albuminuria

25 de murino (Exocell) de acuerdo con la instrucción del

fabricante y una tira reactiva de orina (Multistix, Bayer, IN) como un método de clasificación.

Hibridación e Inmunohistoquímica In Situ de Tejido

El análisis de hibridación in situ se llevó a cabo con ribosondas *Robo2* etiquetadas con digoxigenina como se describe previamente (Grieshammer y colaboradores, 2004). El cDNA de *Robo2* se linealizó con *NotI* y las sondas se generaron utilizando el equipo de etiquetado y detección DIG DNA (Roche Applied Science). La hibridación se llevó a cabo en secciones congeladas de riñón embrionario de ratón incrustadas en OCT fijadas en 4% de paraformaldehído. La inmunohistoquímica se llevó a cabo en los tejidos de riñón embrionarios de ratón fijados en 4% de paraformaldehído seguido por 30% de crioprotección de sacarosa (Mugford y colaboradores, 2008) y en tejidos de riñón de ratones adultos fijados en metanol. Los riñones de ratón incrustados en el compuesto OCT se congelaron y se seccionaron utilizando Cryostat a 8-10 μ m. Las secciones se tiñeron con anticuerpos primarios y se siguieron por anticuerpos secundarios conjugados con FITC o Cy3 apropiados. Los anticuerpos primarios utilizados en este estudio incluyen los que están en contra de ROBO2 (R&D System, Abnova, Santa Cruz Biotechnology), nefrina (sintetizada personalizada) (Topham y colaboradores, 1999), Nck (Upstate/Millipore), podocina (Sigma), nidógeno (Santa Cruz Biotechnology), Pecam1 (BD Biosciences), WT1 (Santa Cruz

Biotechnology), SLIT2 (Santa Cruz Biotechnology), PDGFR beta (Cell Signaling), Sinaptopodina (Santa Cruz Biotechnology). Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal de exploración de láser de disco giratorio de múltiples puntos Perkin Elmer UltraView LCI y un microscopio de exploración de láser confocal Zeiss LSM 510 con un objetivo de inmersión en aceite de 60x.

Microscopía Electrónica de Inmuno-oro

Riñones de ratón de tipo silvestre se diseccionaron y se fijaron para paraformaldehído (PLP) a 4°C durante la noche. El tejido se lavó en 1x PBS y se deshidrató en etanol graduado y se incrustó en resina blanca LR (Electron Microscopy Sciences). Las secciones ultradelgadas del riñón de ratón se prepararon y se transfectaron a rejillas de oro recubiertas con Formvar, y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 1% y 5% de suero de cabra normal en 1x PBS. Las secciones luego se incubaron con anticuerpo anti-Robo2 de cabra con una dilución de 1:50 en DAKO (DAKO Corporation) a 4°C durante la noche. El suero no inmune se utilizó como un control. Después de tres lavadas con 1x PBS, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario IgG acoplado a 10 nm de oro coloidal (Ted Pella) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las secciones se pos-fijaron finalmente con 1% de glutaraldehído y se contrastaron con acetato de uranilo. Las secciones se examinaron con un microscopio electrónico de

transmisión JEM-1011 (JEOL, Tokio, Japón) a 80kV, y las imágenes se adquirieron utilizando un sistema de formación de imágenes digital AMT (Advanced Microscopy Techniques, Danvers, MA.) y se importaron en Adobe Photoshop. La
 5 localización subcelular del Robo2 teñido con partículas de oro en los glomérulos se reconoció en las micrografías electrónicas digitales en comparación con las micrografías de control teñidas con suero no inmune.

Ensayo de Dos Híbridos de Levadura

10 El sistema de dos híbridos de levadura DUPLEX-A^{MR} (OriGene Tech, Rockville, MD) se utilizó para caracterizar la interacción de Robo2 y Nck1. Los cDNAs que codifican el dominio intracelular de Robo2 humano y sus formas truncadas se clonaron en el vector pJG4-5 en sitios *EcoRI/XhoI*,
 15 fusionándolas al dominio de activación de transcripción de B42. Los cDNAs del Nck1 humano y sus formas truncadas se clonaron en el vector pEG202 en *EcoRI/XhoI* para fusionarlas al DNA que enlaza el dominio de LexA. El gen *lacZ* en el constructo pSH18-34 y el gen LEU2 en el genoma de levadura de
 20 cepa EGY48 se utilizaron como genes reportadores. Los constructos pEG202, pSH18-34, y pJG4-5 se co-transfectaron en células EGY48 de levadura. La interacción se consideró positiva si las células de levadura se volvieron azules en presencia de X-gal y se desarrollaron en ausencia de leucina.

25 ***Cultivo Celular, Constructos de DNA, Transfección, Co-***

Precipitación y Tinción Western

Las células HEK (293T) se transfectaron a 60% de confluencia utilizando la transfección de fosfato de calcio. Para hacer las proteínas de fusión etiquetadas con his- y myc C-terminales, la nefrina y Robo2 humanos de longitud completa se clonaron en el vector pSecTag B (Invitrogen) en los sitios de restricción *Hind* III/*Eco*R1 y *Eco*R1/*Xho*I respectivamente. El Robo2- Δ NBD se obtuvo al suprimir el dominio de enlace Nck (FIG. 2C) utilizando el equipo de mutagénesis dirigida al sitio QUIKCHANGE (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El Robo2 y Nck1 no etiquetados se clonaron en el vector pCS2 (Addgene) en los sitios *Eco*R1/*Xho*I, la nefrina en los sitios *Hind*III/*Eco*R1. Los constructos Slit2 etiquetados con Fyn y myc humanos se han reportado previamente (Li y colaboradores, 2008; Wong y colaboradores, 2001). Los constructos CD16/7-NCD y CD16/7-HA también se reportaron previamente (Verma y colaboradores, 2006). Para detectar la interacción de Robo2 y Nck1, el Robo2 o Robo2- Δ NBD humanos etiquetados con His y myc C-terminales se expresaron en células HEK. Cuarenta y ocho horas post-transfección, las células se lisaron en la solución amortiguadora de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, 0.5% de TX100, 1x de inhibidor de proteasa [pH 8.0]). Los lisados celulares se centrifugaron durante 10 min a 4°C; los sobrenadantes se incubaron con resina Ni-NTA (Qiagen) a

4°C durante 2 horas para precipitar el His-Robo2, la resina NTA sin Ni se utilizó como un control. La resina se lavó tres veces con solución amortiguadora de lavado (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM, 0.5% de TX100 [pH 8.0]) y se
5 calentó a 95°C durante 10 min. Los precipitados se resolvieron en geles SDS-PAGE y se tiñeron con anticuerpos anti-Nck1 monoclonales de conejo, anti-myc de conejo (Cell Signaling) en una dilución de 1:1000. Para examinar la interacción triple entre Robo2, Nck1, y nefrina, His-myc-
10 Robo2 o His-myc-Robo2- Δ NBD se co-expresaron en células HEK con nefrina humana y Fyn humana. El His-myc-Robo2 se precipitó con cuentas de Ni-NTA como se describe en lo anterior. Para confirmar la triple interacción, la His-myc-nefrina se co-expresó con Robo2, y Fyn en las células HEK y
15 la His-myc-nefrina se extrajo en cuentas de Ni-NTA. Los precipitados se tiñeron con anticuerpos anti-myc policlonales de conejo, anti-Nck1 monoclonales de conejo, anti-nefrina monoclonales de conejo, anti-Robo2 monoclonal de ratón (R&D systems), y anti-Fyn policlonal de conejo (Santa Cruz
20 Biotechnology) en una dilución de 1:1000. Para la co-inmunoprecipitación de las proteínas endógenas, los riñones de ratones recién nacidos se homogenizaron en la solución amortiguadora RIPA (Tris 50 mM [pH 7.4], NaCl 150 mM, 0.1% de SDS, 1% de NP-40, 0.5% de desoxicolato de sodio, Na_3VO_4 1 mM,
25 NaF 1 mM, 1x de inhibidor de proteasa) sobre hielo. Las

muestras se centrifugaron durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se incubó con 1 µg de anticuerpo anti-Robo2 monoclonal de ratón (R&D Systems) durante 1 hora a 4°C. El IgG de cabra de control (Santa Cruz Biotechnology) se utilizó
5 como un control. Las muestras luego se mezclaron con 30 µl de suspensión de cuentas de proteína A/G más agarosa (Santa Cruz Biotechnology) y se incubaron adicionalmente durante 12 horas a 4°C. Las cuentas luego se lavaron tres veces en la solución amortiguadora RIPA y las proteínas se eluyeron en 1x de
10 solución amortiguadora de carga de proteína al calentar a 95°C durante 10 min. Los precipitados se resolvieron en geles de SDS-PAGE y se tiñeron con anticuerpos anti-Robo2 de ratón, anti-nefrina de conejo, y anti-Nck1 de conejo como se describe en lo anterior. La actina se tiñó con anticuerpo de
15 ratón anti-beta-actina de Sigma. La intensidad de las bandas se midió utilizando el ImageJ. Para la detección de proteinuria, las muestras de orinad de ratones se recolectaron y se diluyeron con 1x de solución amortiguadora de carga de proteína a una dilución de 1:100. Las proteínas
20 de orina luego se resolvieron en geles de SDS-PAGE y la albúmina purificada se utilizó como un control (MP Biomedicals). Los geles se tiñeron con anticuerpo policlonal anti-albúmina de conejo (MP Biomedicals).

Reticulación de CD16/7-NCD y Ensayo de Polimerización de
25 ***Actina***

La reticulación mediada por anticuerpo CD16 de las proteínas de fusión CD16/7 se han descrito previamente (Jones y colaboradores, 2006; Rivera y colaboradores, 2004; Verma y colaboradores, 2006). Brevemente, CD16/7-NCD o CD16/7-HA se co-expresaron en células HEK con Robo2. Después de 24 horas, las células se transfirieron y se sembraron en cubreobjetos de vidrio recubiertos con polilisina durante otras 24 horas. Las células luego se incubaron con 1 µg/ml de anti-CD16 monoclonal de ratón (Beckman Coulter) durante 30 min a 37°C, se lavaron una vez con DMEM, se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con rodamina (Thermo Scientific) se diluyeron en el medio acondicionado con Slit2 (Wong y colaboradores, 2001) o el medio acondicionado de control durante 30 min y se fijaron en 4% de paraformaldehído en 1x PBS. La F-actina se tiñó utilizando faloidina conjugada con FITC (Invitrogen) de acuerdo con la instrucción del fabricante. Los atados de F-actina recientemente formados se adhieren a la nefrina agrupada (CD16/7-NCD) y parece colas de cometa (es decir las colas de actina en el texto de principal) bajo microscopio de fluorescencia. En este experimento, los inventores analizaron solo los atados de F-actina formados por el agrupamiento del CD16/7-NCD y unido a los agrupamientos. Las células con las colas de F-actina se contaron y se compararon a las células transfectadas CD16/7-NCD totales. La fórmula de cuantificación es: Porcentaje % =

(número de células transfectadas con colas de F-actina/número total de células transfectadas) x 100. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal LSM510 con un objetivo de inmersión en aceite 60x.

5 ***Generación y Caracterización de Ratones Inactivados Específicos de podocitos de Robo2 y Ratones Desactivados dobles Robo2-Nefrina***

La generación y genotipificación del alelo condicional $Robo2^{flox}$, el alelo mutante de línea germinal
 10 $Robo2^{del5}$ (también llamado $Robo2^-$ intercambiabilmente en este documento), y el alelo de tipo silvestre $Robo2^+$ se describieron previamente (Lu y colaboradores, 2007; Wang y colaboradores, 2011). El esquema de reproducción estándar se siguió para generar ratones desactivados $Robo2^{del5/flox};Tg^{Nphs2-}$
 15 $Cre/+$ específicos de podocitos $Robo2$, que llevan un alelo $Robo2^{del5}$ y un alelo $Robo2^{flox}$. En este mutante compuesto, la Cre recombinasa específica de podocitos conducida por el promotor de podocina suprime solo el alelo $Robo2^{flox}$ para facilitar la penetración de un fenotipo debido a que el otro
 20 alelo, $Robo2^{del5}$, se ha suprimido ubicuamente de la expresión de línea germinal. La autenticidad de los ratones $Robo2^{del5/flox};Tg^{Nphs2-Cre/+}$ se determinó por la genotipificación de DNA de cola para la presencia de los alelos $Robo2^{del5}$ y $Robo2^{flox}$ así como el transgen $Tg^{Nphs2-Cre}$. Los ratones $Robo2^{flox/+}$
 25 de crías de camadas F2 sin el alelo $Robo2^{del5}$ y el transgen

Tg^{Nphs2- Cre} se utilizaron como controles. Para generar los ratones inactivados dobles *Robo2*-nefrina, los ratones heterocigotos *Robo2*^{+/-} se cruzaron con ratones heterocigotos *Nphs1*^{+/-} que se generaron previamente (Hamano y colaboradores, 5 2002). Después de la generación de ratones heterocigotos dobles *Robo2*^{+/-}; *Nphs1*^{+/-}, la cruce de los ratones heterocigotos dobles se llevó a cabo para generar ratones homocigotos dobles *Robo2*^{-/-}; *Nphs1*^{-/-}, así como homocigotos individuales *Nphs1*^{+/-}, homocigotos individuales *Robo2*^{-/-} y controles de tipo 10 silvestre *Robo2*^{+/+}; *Nphs1*^{+/+}. Los protocolos de ratón se probaron por the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at Boston University Medical Center (#14388).

Microscopía Electrónica de Transmisión y Exploración

Para la microscopía electrónica de transmisión, los 15 riñones se disecaron de ratones nudos homocigotos *Robo2* y ratones inactivados específicos de podocitos se fijaron en PLP a 4°C durante la noche, y luego se incubaron en 2% de glutaraldehído en cacodilato de sodio de 0.15 M durante 6 horas. Después del lavado en 1x PBS, los riñones fijos se 20 deshidrataron en etanol graduado, se incrustaron en Epon, se seccionaron y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las secciones de riñón ultradelgadas se prepararon y se examinaron utilizando un microscopio electrónico JEM-1011. Las crías de camadas de tipo silvestre se utilizaron 25 como controles. Para la microscopía electrónica de

exploración, las muestras de riñón de los ratones nulos homocigotos *Robo2*, ratones inactivados específicos de podocitos, ratones nulos homocigotos de nefrina, y ratones homocigotos dobles de *Robo2*-nefrina se prepararon siguiendo el protocolo descrito previamente (Friedman y Ellisman, 1981) con menores modificaciones. Brevemente, el riñón se perfusionó con solución de 2.5% de glutaraldehído y 2% de paraformaldehído en solución amortiguadora de cacodilato 0.1M (Karnovsky's fixative, Electron Microscopy Sciences), y se fijaron subsecuentemente en fijador de Karnovsky durante 24 hrs seguido por pos-fijación en 2% de solución de tetraóxido de osmio (Electron Microscopy Sciences). Las muestras de riñón se crio-fracturaron, se deshidrataron y se secaron utilizando hexametildisilazano (Electron Microscopy Sciences). Las muestras de riñón se formaron en imágenes utilizando microscopios electrónicos de exploración Amray 1000A y Jeol 6340F. Tres glomérulos de cada animal se examinaron para proporcionar imágenes representativas.

Estudios de Patología de Riñón de Ratones, Cuantificación de Número de podocitos, y Análisis de Proteinuria

Para estudios patológicos de riñón, los riñones se disecaron y se fijaron en 4% de paraformaldehído durante la noche, y luego se trataron una serie de etanol graduado para la incrustación en parafina. Los bloques de parafina de riñón se seccionaron a 4 μ m utilizando un microtomo MT-920 (MICROM)

y se tiñeron utilizando métodos de ácido Periódico de Schiff (PAS) o eosina-hematoxilina (H&E) estándares. Los glomérulos se examinaron y se evaluaron para la deposición de matriz, glomérulosclerosis segmentaria, y dilataciones del espacio de Bowman utilizando un microscopio de luz Olympus BHT equipado con un sistema de cámara digital SPOT. Para la cuantificación del número de podocitos, se utilizó el WT1 como un marcador nuclear de podocitos y la tinción de inmunoperoxidasa se llevó a cabo en las secciones de riñón siguiendo el protocolo descrito previamente (Sanden y colaboradores, 2003). Brevemente, las secciones de riñón incrustadas en parafina en ratones inactivos específicos de podocitos *Robo2*^{del5/flox}; *Tg*^{Nphs2-Cre/+} de 4 años de edad y 4 ratones de control de tipo silvestre de edad de concordancia se seccionaron a 4 µm y se tiñeron con anticuerpo WT1 (Santa Cruz Biotechnology) después de la recuperación del antígeno por microondas. El anticuerpo secundario biotinilado y el equipo Vectastain ABC (Vector Laboratories) se utilizaron para detectar la señal WT1. Los núcleos de podocitos positivos WT1 en cada sección transversal glomerular se contaron en 165 glomérulos totales de cuatro ratones mutantes y 166 glomérulos de cuatro ratones de control. Para el análisis de proteinuria, especímenes de "muestra" de orina de ratones de 6 semanas de edad se examinaron utilizando un equipo de cuantificación ELISA de albúmina de murino sensible (Exocell) de acuerdo con la

instrucción del fabricante y una tira reactiva de orina (Multistix de Bayer, IN) como un método de clasificación. La albúmina de suero se normalizó con creatinina para proporcionar una relación de albúmina/creatinina. La creatinina en la orina se determinó utilizando el equipo de detección de creatinina (Sigma) de acuerdo con la instrucción del fabricante. La albúmina de orina también se examinó por 12% de SDS-PAGE y se tiñó con anticuerpo de anti-albúmina (MP Biomedicals). Los datos de los mutantes y los controles se analizaron utilizando la prueba t de Student, ANOVA de una vía, y la prueba de Chi-al cuadrado.

Tabla 1. Análisis Cuantitativo de Glomérulos con Expansión de Matriz Incrementada en Ratones Inactivados Específicos de podocitos de Robo2 de 2 a 9 Meses de Edad (Mutantes) Comparados con los Controles (Tipo silvestre)

Genotipo	Ratón ID#	Edad (meses)	Glomérulos totales contados	Glomérulos con expansión de matriz mesangial	% de Glomérulos con expansión de matriz mesangial*
Mutante	4048	2	96	13	12.35%
Mutante	1721	3	107	18	16.82%
Mutante	4005	6	103	17	16.51%
Mutante	1190	7	102	20	19.61%
Mutante	2396	9	80	14	17.50%
Total de Mutantes			488	82	16.80%
Tipo silvestre	4058	2	90	4	4.44%
Tipo silvestre	4052	3	105	6	5.71%
Tipo silvestre	3919	6	107	4	3.74%

Tipo silvestre	1191	7	103	5	4.85%
Tipo silvestre	2385	9	106	5	4.72%
Total de tipo silvestre			511	24	4.70%

$*p < 0.01$, $n=5$, t -test.

Tabla 2. Análisis Cuantitativo de Glomérulos con Expansión de Matriz Incrementada en Ratones Inactivados Específicos de podocitos de Robo2 de 12 Meses de Edad (Mutantes) Comparados con los Controles (Tipo silvestre)

Genotipo	Ratón ID#	Edad (meses)	Glomérulos totales contados	Glomérulos con expansión de matriz mesangial	% de Glomérulos con expansión de matriz mesangial*
Mutante	1844	12	136	17	12.50%
Mutante	1847	12	125	18	14.40%
Mutante	1877	12	127	11	8.66%
Mutante	1878	12	132	20	15.15%
Mutante	1948	12	142	28	19.72%
Total de Mutantes			662	94	14.20%
Tipo silvestre	1901	12	125	5	4.00%
Tipo silvestre	2429	12	179	8	4.47%
Tipo silvestre	2834	12	154	9	5.84%
Tipo silvestre	2836	12	159	7	4.40%
Tipo silvestre	2837	12	124	5	4.03%
Total de tipo silvestre			741	34	4.59%

$*p < 0.01$, $n=5$, t -test.

Tabla 3. Análisis de Morfología de Glomérulos con Espacio de Bowman Dilatado en Ratones Homocigotos Individuales $Nphs1^{-/-}$,

(*Robo2*^{+/-}; *Nphs1*^{-/-}) Comparados con los Recién Nacidos Homocigotos Dobles *Robo2*^{-/-}; *Nphs1*^{-/-} por Histología

Genotipo	Glomérulos totales contados	Glomérulos con espacio de Bowman dilatado	% de Glomérulos con espacio de Bowman dilatado
<i>Robo2</i> ^{+/-} \ <i>Nphs1</i> ^{+/-}	122	31	25.4%
<i>Robo2</i> ^{-/-} \ <i>Nphs1</i> ^{+/-}	55	2	3.6%
<i>Robo2</i> ^{+/-} \ <i>Nphs1</i> ^{+/-}	158	3	1.9%
<i>Robo2</i> ^{+/-} ; <i>Nphs1</i> ^{+/-}	271	1	0.4%

Nota: El glomérulo se registró como positivo con el espacio de Bowman dilatado si el glomérulo mostró fenotipo similar como se muestra en la Fig. S4U, y se registró como negativo si el glomérulo similar como se muestra en la FIG. 8V-8X se observó. Tres ratones de cada genotipo se analizaron. El homocigoto individual *Robo2*^{-/-} (*Robo2*^{-/-}; *Nphs1*^{+/-}) y el de tipo silvestre (*Robo2*^{+/-}; *Nphs1*^{+/-}) se utilizaron como controles.

Tabla 4. Análisis de Morfología de Fenotipo del Proceso Basal (FP) de Interdigitalización de podocitos Glomerular en Ratones Recién Nacidos Homocigotos individuales *Nphs1*^{-/-} (*Robo2*^{+/-}; *Nphs1*^{-/-}) Comparados con los Homocigotos Dobles *Robo2*^{-/-}; *Nphs1*^{-/-} por Microscopía Electrónica de Exploración

Genotipo	Glomérulos totales contados	Glomérulos con estructura FP de interdigitalización	% de Glomérulos con estructura FP de interdigitalización
<i>Robo2</i> ^{+/-} \ <i>Nphs1</i> ^{+/-}	15	1	6.67%
<i>Robo2</i> ^{-/-} \ <i>Nphs1</i> ^{+/-}	16	12	75%
<i>Robo2</i> ^{+/-} \ <i>Nphs1</i> ^{+/-}	13	13	100%
<i>Robo2</i> ^{+/-} ; <i>Nphs1</i> ^{+/-}	13	13	100%

REFERENCIAS

- Bashaw, G. J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T., and Goodman, C. S. (2000). Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the Roundabout receptor. *Cell* 101, 703-715.
- 5 Dickson, B. J., and Gilestro, G. F. (2006). Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 651-675.
- Done, S. C, Takemoto, M., He, L., Sun, Y., Hultenby, K., Betsholtz, C, and Tryggvason, K. (2008). Nephrin is involved
- 10 in podocyte maturation but not survival during glomerular development. *Kidney Int* 73, 697-704.
- Fan, X., Labrador, J. P., Hing, H., and Bashaw, G. J. (2003). Slit stimulation recruits Dock and Pak to the Roundabout receptor and increases Rac activity to regulate axon
- 15 repulsion at the CNS midline. *Neuron* 40, 113-127.
- Faul, C, Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Kim, K., and Mundel, P. (2007). Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 17, 428-437.
- 20 Furness, P. N., Hall, L. L., Shaw, J. A., and Pringle, J. H. (1999). Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 14, 1234-1237.
- Garg, P., Verma, R., Cook, L., Soofi, A., Venkatareddy, M., George, B., Mizuno, K., Gurniak, C., Witke, W., and Holzman, L. B. (2010). Actin-depolymerizing factor cofilin-1 is
- 25

necessary in maintaining mature podocyte architecture. *J Biol Chem* 285, 22676-22688.

Grieshammer, U., Le, M., Plump, A. S., Wang, F., Tessier-Lavigne, M., and Martin, G. R. (2004). SLIT2-mediated ROBO2
5 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev Cell* 6, 709-717. Guan, K. L., and Rao, Y. (2003). Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat Rev Neurosci* 4, 941-956.

Hamano, Y., Grunkemeyer, J. A., Sudhakar, A., Zeisberg, M.,
10 Cosgrove, D., Morello, R., Lee, B., Sugimoto, H., and Kalluri, R. (2002). Determinants of vascular permeability in the kidney glomerulus. *J Biol Chem* 277, 31154-31162.

Jones, N., Blasutig, I. M., Eremina, V., Ruston, J. M., Bladt, F., Li, H., Huang, H., Larose, L., Li, S. S., Takano,
15 T., y colaboradores (2006). Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* 440, 818-823.

Lu, W., van Eerde, A. M., Fan, X., Quintero-Rivera, F., Kulkarni, S., Ferguson, H. L., Kim, H., Fan, Y., Xi, Q., Li,
20 Q. G., y colaboradores (2007). Disruption of ROBO2 is associated with urinary tract anomalies and confers risk of vesicouretral reflux. *Am J Hum Genet* 80, 616-632.

Nachman, P. H., Jennette, J. C, and Falk, R. J. (2008). Primary glomerular disease. In Brenner & Rector's *The Kidney*,
25 B. M. Brenner, ed. (Philadelphia, Saunders), pp. 987-1066.

- Patrakka, J., Ruotsalainen, V., Reponen, P., Qvist, E., Laine, J., Holmberg, C, Tryggvason, K., and Jalanko, H. (2002). Recurrence of nephrotic syndrome in kidney grafts of patients with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type: role of nephrin. *Transplantation* 73, 394-403.
- Piper, M., Anderson, R., Dwivedy, A., Weinl, C, van Horck, F., Leung, K. M., Cogill, E., and Holt, C. (2006). Signaling mechanisms underlying Slit2-induced collapse of *Xenopus* retinal growth cones. *Neuron* 49, 215-228.
- Piper, M., Georgas, K., Yamada, T., and Little, M. (2000). Expression of the vertebrate Slit gene family and their putative receptors, the Robo genes, in the developing murine kidney. *Mech Dev* 94, 213-217.
- Reeves, W., Caulfield, J. P., and Farquhar, M. G. (1978). Differentiation of epithelial foot processes and filtration slits: sequential appearance of occluding junctions, epithelial polyanion, and slit membranes in developing glomeruli. *Lab Invest* 39, 90-100.
- Rivera, G. M., Briceno, C. A., Takeshima, F., Snapper, S. B., and Mayer, B. J. (2004). Inducible clustering of membrane - targeted SH3 domains of the adaptor protein Nck triggers localized actin polymerization. *Curr Biol* 14, 11-22.
- Seiler, M. W., Venkatachalam, M. A., and Cotran, R. S. (1975). Glomerular epithelium: structural alterations induced by polycations. *Science* 189, 390-393.
- Shih, N. Y., Li, J., Cotran, R., Mundel, P., Miner, J. H.,

- and Shaw, A. S. (2001). CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol* 159, 2303-2308.
- 5 Topham, P. S., Kawachi, H., Haydar, S. A., Chugh, S., Addona, T. A., Charron, K. B., Holzman, L. B., Shia, M., Shimizu, F., and Salant, D. J. (1999). Nephrogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular domain of rat nephrin. *J Clin Invest* 104, 1559-1566.
- Tryggvason, K., Patrakka, J., and Wartiovaara, J. (2006). Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of
- 10 proteinuria. *N Engl J Med* 354, 1387-1401.
- Verma, R., Kovari, I., Soofi, A., Nihalani, D., Patrie, K., and Holzman, L. B. (2006). Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest* 116,
- 15 1346-1359.
- Wang, H., Li, Q., Liu, J., Mendelsohn, C, Salant, D. J., and Lu, W. (2011). Noninvasive assessment of antenatal hydronephrosis in mice reveals a critical role for Robo2 in maintaining anti-reflux mechanism. *PLoS One* 6, e24763.
- 20 Wong, K., Ren, X. R., Huang, Y. Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S. M., Mei, L., y colaboradores (2001). Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway. *Cell* 107, 209-221.
- 25 Yuan, H., Takeuchi, E., and Salant, D. J. (2002). Podocyte

slit-diaphragm protein nephrin is linked to the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F585-591.

Friedman, P. L., and Ellisman, M. H. (1981). Enhanced visualization of peripheral nerve and sensory receptors in
5 the scanning electron microscope using cryofracture and osmium-thiocarbohydrazide -osmium impregnation. *J Neurocytol* 10, 111-131.

Li, X., Gao, X., Liu, G., Xiong, W., Wu, J., and Rao, Y. (2008). Netrin signal transduction and the guanine nucleotide
10 exchange factor DOCK180 in attractive signaling. *Nat Neurosci* 11, 28-35.

Mugford, J. W., Sipila, P., Kobayashi, A., Behringer, R. R., and McMahon, A. P. (2008). *Hoxd1* 1 specifies a program of metanephric kidney development within the intermediate
15 mesoderm of the mouse embryo. *Dev Biol* 319, 396-405.

Sanden, S. K., Wiggins, J. E., Goyal, M., Riggs, L. K., and Wiggins, R. C. (2003). Evaluation of a thick and thin section method for estimation of podocyte number, glomerular volume, and glomerular volume per podocyte in rat kidney with Wilms' tumor- 1 protein used as a podocyte nuclear marker. *J Am Soc Nephrol* 14, 2484-2493.
20

RESUMEN DE LA INVENCION

Se proporcionan en la presente métodos para el tratamiento de enfermedad de riñón crónica y proteinuria y para la diagnosis de enfermedad de riñón crónica y monitoreo
5 de los efectos del tratamiento en la progresión de la enfermedad de riñón crónica y proteinuria en base a funciones inesperadas para la ruta de señalización de SLIT-ROBO en la regulación del citoesqueleto de F-actina de podocito y la estructura de proceso basal en el riñón.

DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION

ASSIGNMENT

The Undersigned **Weining Lu, Xueping Fan** and **David J. Salant** acting as Inventor(s) of Colombian Patent Application corresponding to the National Phase of International Application No.
PCT/US2013/020280

Titled: SLIT-ROBO SIGNALING FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT OF KIDNEY DISEASE

with domicile at 91 Oakmere Street West Roxbury, MA 02132, USA; 57 Sherbrooke Avenue Braintree, MA 02184, USA, and 161 Allerton Road Newton, MA 02461, USA, respectively; hereby declare that he (she, they) assigns (assign) all rights of ownership as well as all rights and privileges relating thereto without exception over the following patent application in Colombia:
National Phase of International Application No.
PCT/US2013/020280

Titled: SLIT-ROBO SIGNALING FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT OF KIDNEY DISEASE
to
BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATION

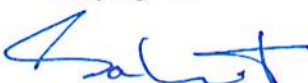
domiciled at One Boston Medical Center Place, Boston, MA 02118, USA

The assignor and the assignee sign this document as proof of their acceptance of the assignment.

Given and signed on the 27th day of
June of 2014


Signature of Assignor
Weining Lu


Signature of Assignor
Xueping Fan


Signature of Assignor
David J. Salant

Signature of Assignee
BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATION

DOCUMENTO DE TRASPASO DE
SOLICITUD DE PATENTE

CESION

El (Los) Suscrito(s) **Weining Lu, Xueping Fan** y **David J. Salant** en calidad de inventor(es) de la solicitud de patente en Colombia correspondiente a la Fase Nacional de la Solicitud Internacional No.
PCT/US2013/020280

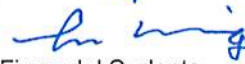
Titulada:

con domicilio en 91 Oakmere Street West Roxbury, MA 02132, EEUU; 57 Sherbrooke Avenue Braintree, MA 02184, EEUU, y 161 Allerton Road Newton, MA 02461, EEUU, respectivamente; declara(n) por el presente documento que cede(n) todos los derechos de propiedad que le correspondan, así como las prerrogativas, sin excepción alguna, sobre la siguiente solicitud de patente en Colombia:
Fase Nacional de la Solicitud internacional No.
PCT/US2013/020280
Titulada:

a **BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATION**, domiciliada en One Boston Medical Center Corporation, Boston, MA 02118, EEUU

El cedente y el cesionario firman este documento como prueba de su aceptación de la cesión.

Dado y firmado a los 27th días del mes
de June de 2014


Firma del Cedente
Weining Lu


Firma del Cedente
Xueping Fan


Firma Del cedente
David J. Salant

Firma del Cesionario
BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATION

**DOCUMENT OF ASSIGNMENT OF
PATENT APPLICATION**

ASSIGNMENT

The Undersigned **Weining Lu, Xueping Fan** and **David J. Salant** acting as Inventor(s) of Colombian Patent Application corresponding to the National Phase of International Application No.
PCT/US2013/020280

Titled: SLIT-ROBO SIGNALING FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT OF KIDNEY DISEASE

with domicile at 91 Oakmere Street West Roxbury, MA 02132, USA; 57 Sherbrooke Avenue Braintree, MA 02184, USA, and 161 Allerton Road Newton, MA 02461, USA, respectively; hereby declare that he (she, they) assigns (assign) all rights of ownership as well as all rights and privileges relating thereto without exception over the following patent application in Colombia:

National Phase of International Application No.
PCT/US2013/020280

Titled: SLIT-ROBO SIGNALING FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT OF KIDNEY DISEASE

to

BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATION

domiciled at One Boston Medical Center Place, Boston, MA 02118, USA

The assignor and the assignee sign this document as proof of their acceptance of the assignment.

Given and signed on the _____ day of _____ of 20____

Signature of Assignor
Weining Lu

Signature of Assignor
Xueping Fan

Signature of Assignor
David J. Salant

Signature of Assignee
BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATION

**DOCUMENTO DE TRASPASO DE
SOLICITUD DE PATENTE**

CESION

El (Los) Suscrito(s) **Weining Lu, Xueping Fan** y **David J. Salant** en calidad de inventor(es) de la solicitud de patente en Colombia correspondiente a la Fase Nacional de la Solicitud Internacional No.
PCT/US2013/020280

Titulada:

con domicilio en 91 Oakmere Street West Roxbury, MA 02132, EEUU; 57 Sherbrooke Avenue Braintree, MA 02184, EEUU, y 161 Allerton Road Newton, MA 02461, EEUU, respectivamente; declara(n) por el presente documento que cede(n) todos los derechos de propiedad que le correspondan, así como las prerrogativas, sin excepción alguna, sobre la siguiente solicitud de patente en Colombia:

Fase Nacional de la Solicitud internacional No.
PCT/US2013/020280

Titulada:

a **BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATION**, domiciliada en One Boston Medical Center Corporation, Boston, MA 02118, EEUU

El cedente y el cesionario firman este documento como prueba de su aceptación de la cesión.

Dado y firmado a los _____ días del mes de _____ de 20__

Firma del Cedente
Weining Lu

Firma del Cedente
Xueping Fan

Firma Del cedente
David J. Salant

Firma del Cesionario
BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATION

Brigard & Castro

BOGOTÁ - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros), **BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATION**, domiciliado(s) en One Boston Medical Center Corporation, Boston, MA 02118, EEUU

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñanzas, lemas comerciales, nombres comerciales, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio y/o dirección; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o MARTIN E. TORRES CARDOZO**, domiciliado(s) en la calle 70A No. 4-41, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 20____

Firma

Nombre

Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We), **BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATION**, domiciled in One Boston Medical Center Place, Boston, MA 02118, USA

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or MARTIN E. TORRES CARDOZO**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names, slogans and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name, domicile and address related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages: claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoint **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO and/or MARTIN E. TORRES CARDOZO**, domiciled in calle 70A No. 4-41, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in

this 30th day of June 20¹⁴

Signature

Name

Title

David Beck
VP & General Counsel

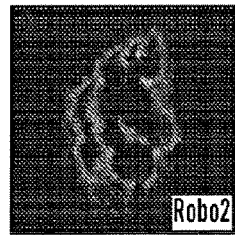


FIG. 1A

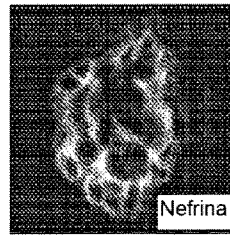


FIG. 1B

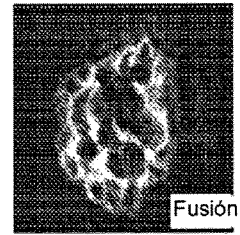


FIG. 1C

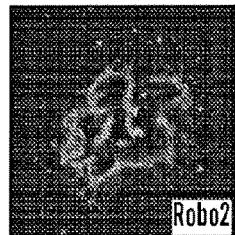


FIG. 1D

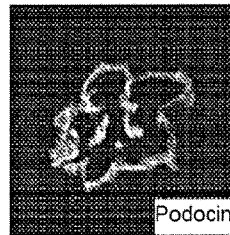


FIG. 1E

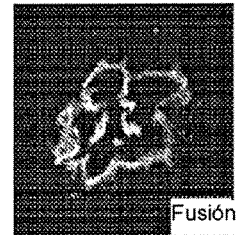


FIG. 1F

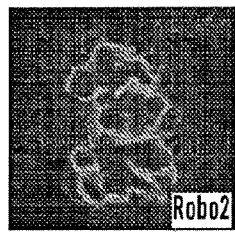


FIG. 1G

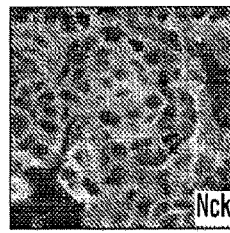


FIG. 1H

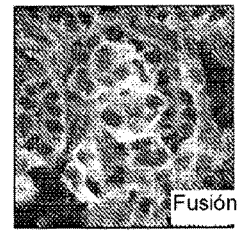


FIG. 1I

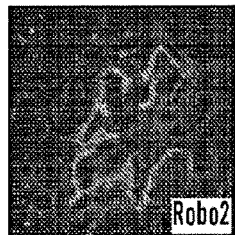


FIG. 1J

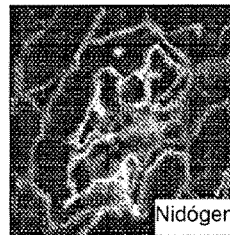


FIG. 1K

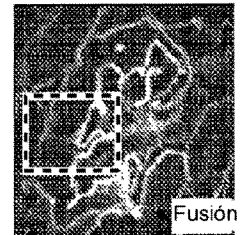


FIG. 1L

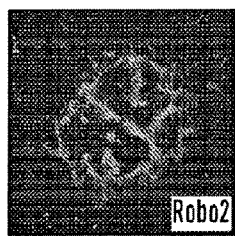


FIG. 1M

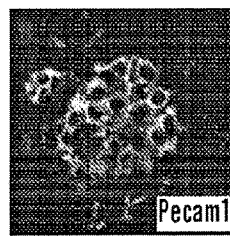


FIG. 1N

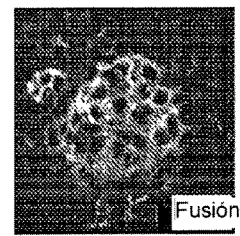


FIG. 1O

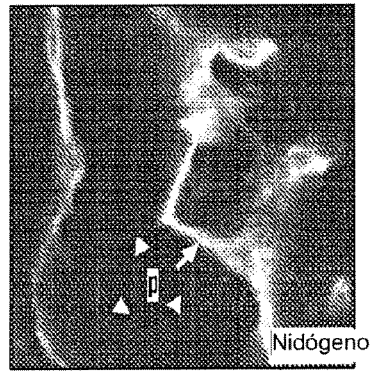


FIG. 1P

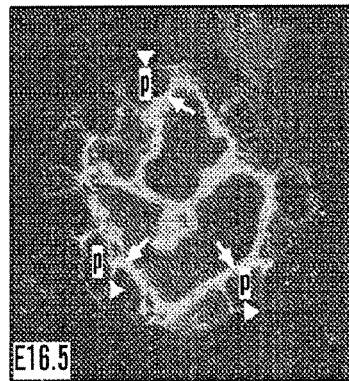


FIG. 1Q

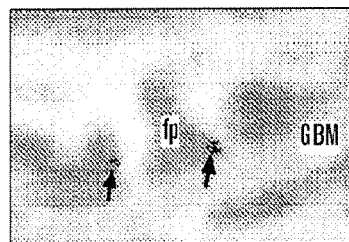
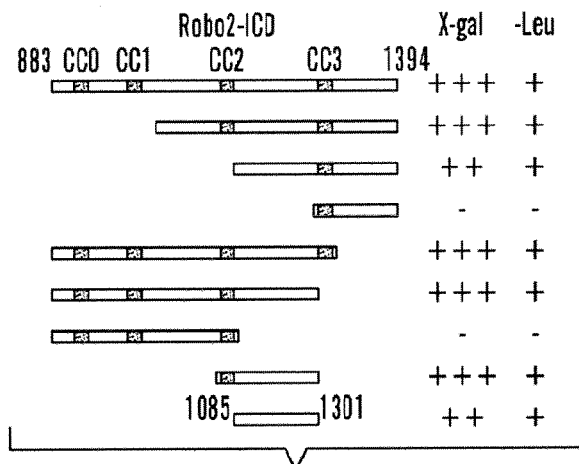
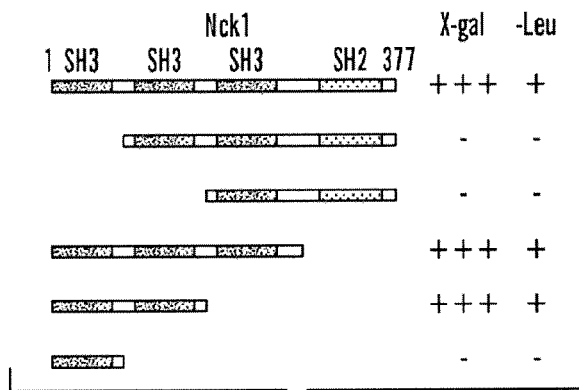
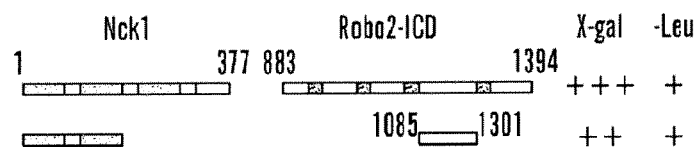
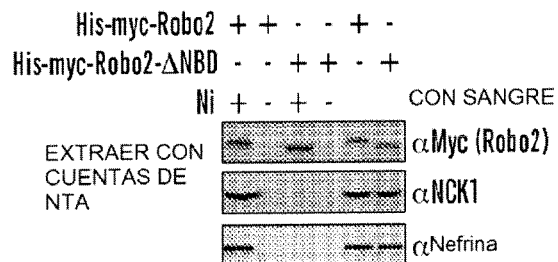
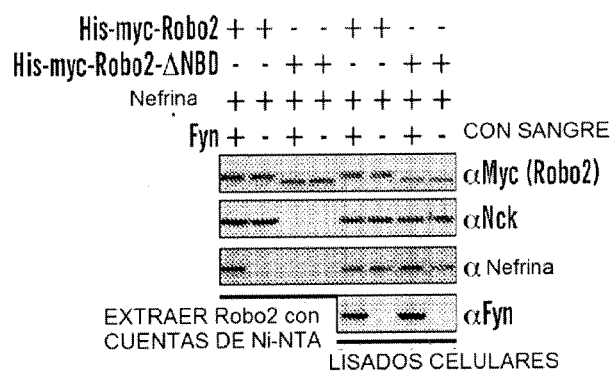
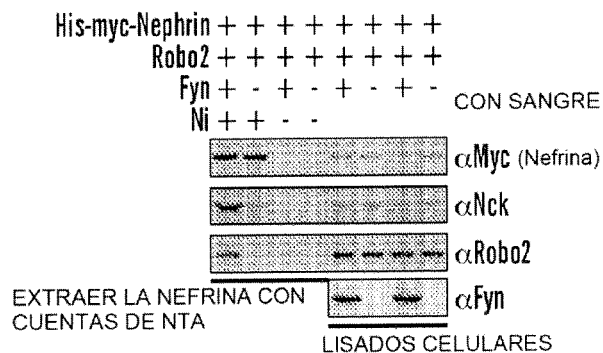


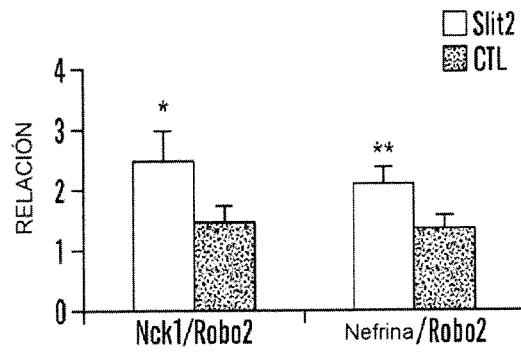
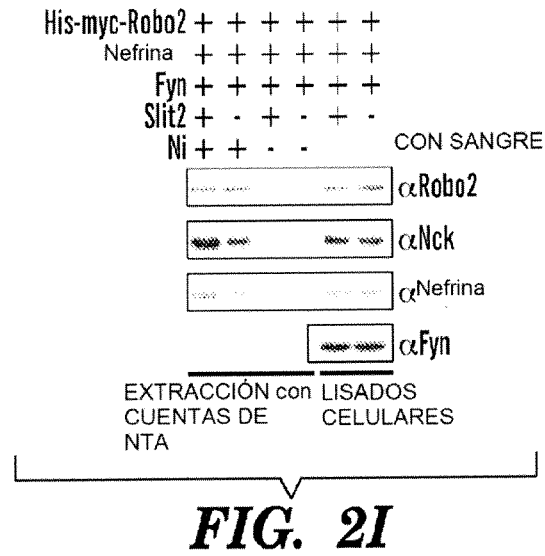
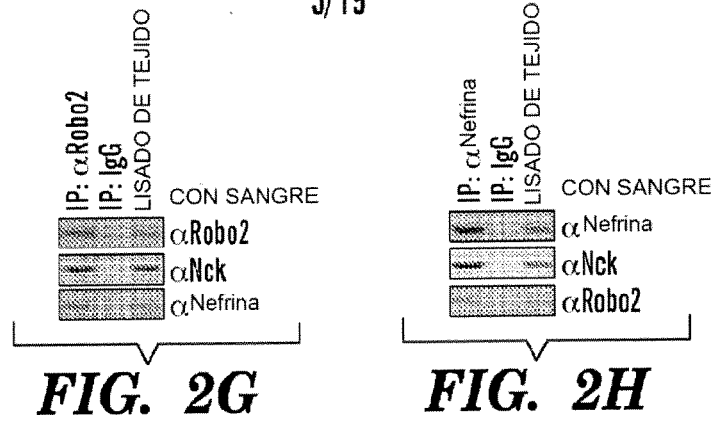
FIG. 1R

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

TELEHYAVEQQENGYOSDSWCPPPLVQTYLHQGLEDELEEDDDRVTPPVVRGVASSPA
 ISFGQQSTATLTTPSPREEMQPMQLQAHLDLTRYQCFDIKQTWHIQSNNQEPQPPVPPL
 GYVSGALISDLETDVADDDADDEEEALEIPRPLRALDQTPGSSMDNLDSSVTGKAFTSS
 QRPRPTSPFSTDSNTSAALSQSQRPRPTKHKGGRMDQQPA

FIG. 2C

**FIG. 2D****FIG. 2E****FIG. 2F**

**FIG. 2J**

6/19

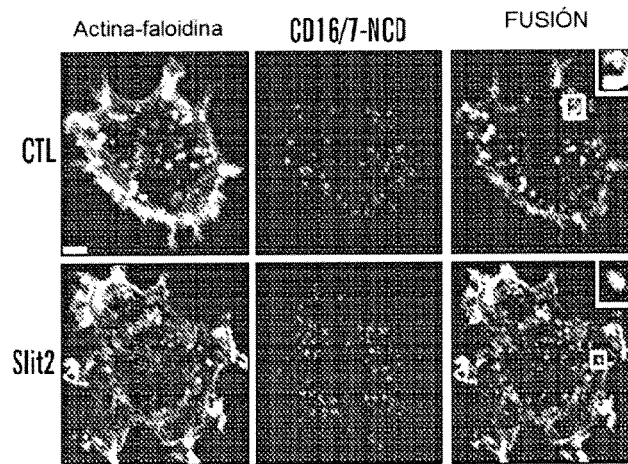


FIG. 3A

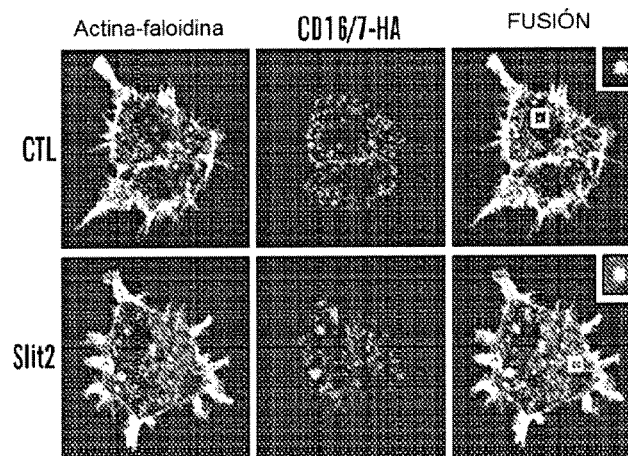


FIG. 3B

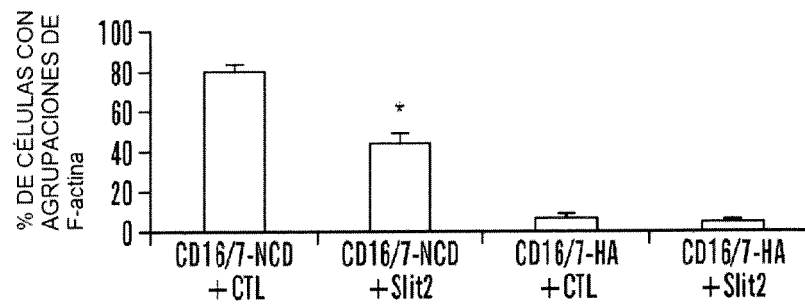
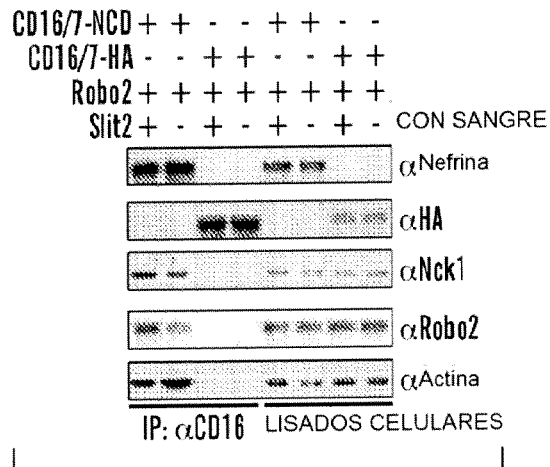
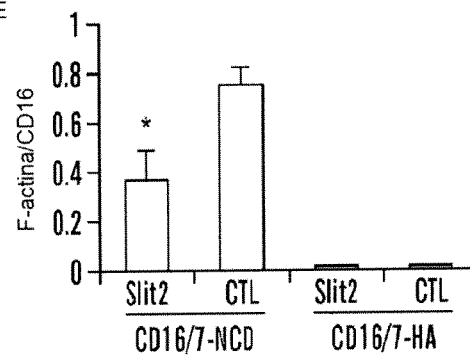
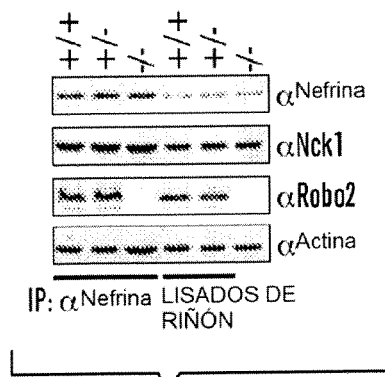
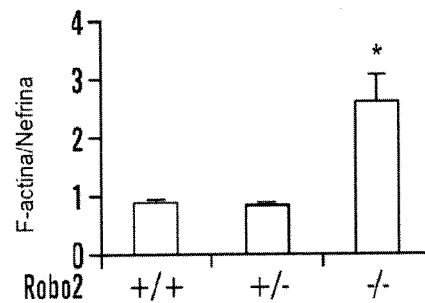


FIG. 3C

**FIG. 3D****FIG. 3E****FIG. 3F****FIG. 3G**

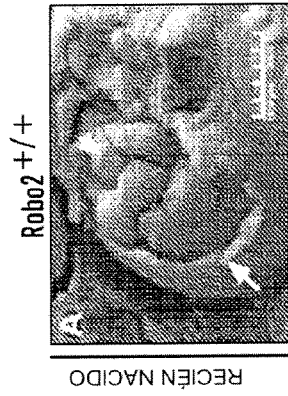


FIG. 4A

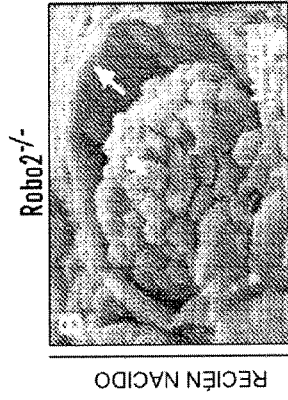


FIG. 4B

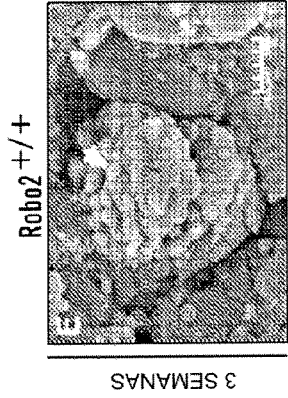


FIG. 4E

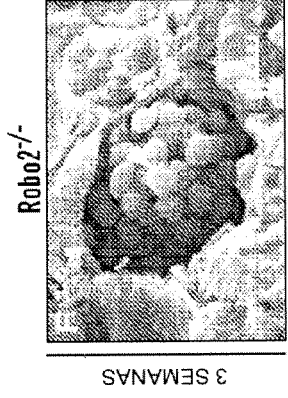


FIG. 4F

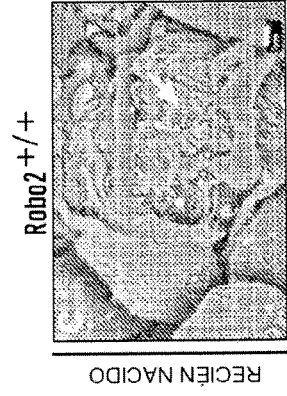


FIG. 4C

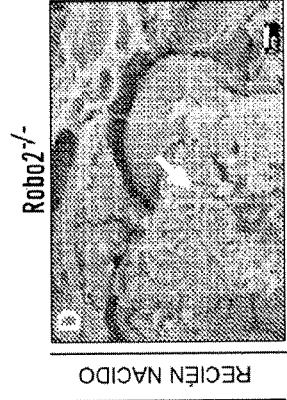


FIG. 4D

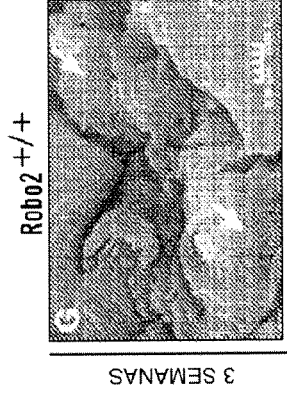


FIG. 4G

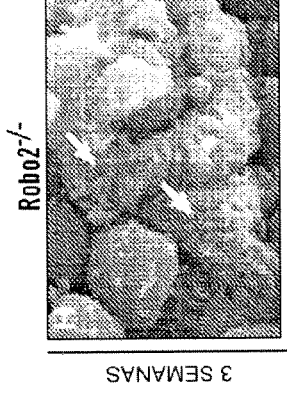
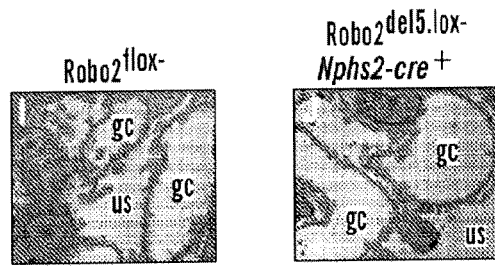
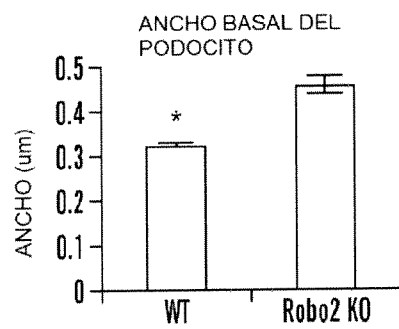
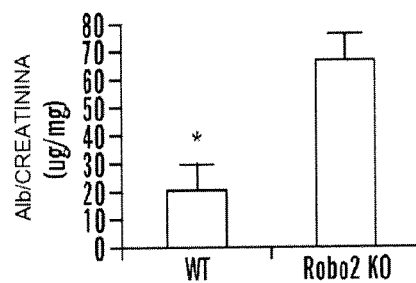
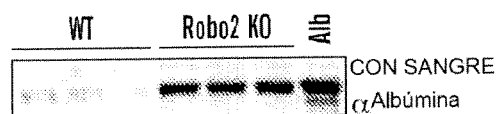


FIG. 4H

**FIG. 4I****FIG. 4J****FIG. 4K****FIG. 4L****FIG. 4M****FIG. 4N****FIG. 4O**

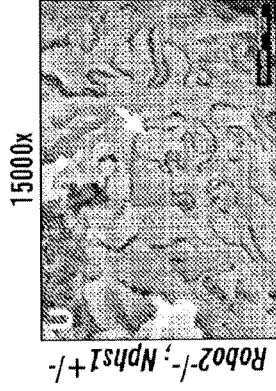


FIG. 4U

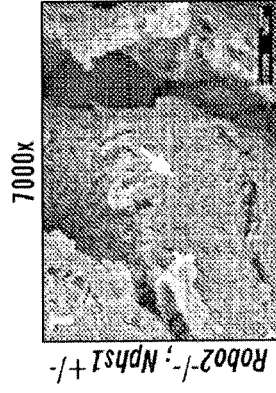


FIG. 4T

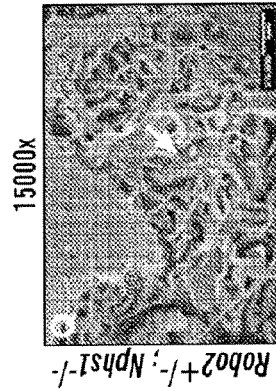


FIG. 4Q

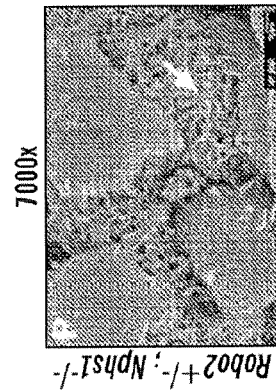


FIG. 4P

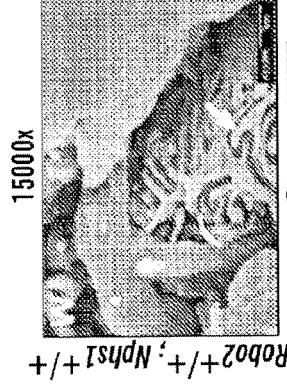


FIG. 4W

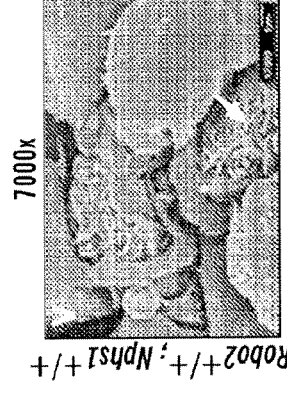


FIG. 4V

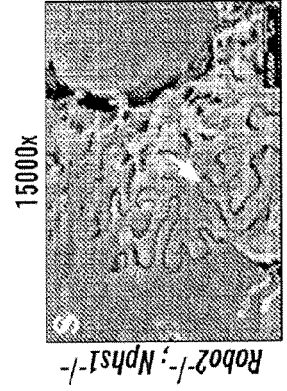


FIG. 4S

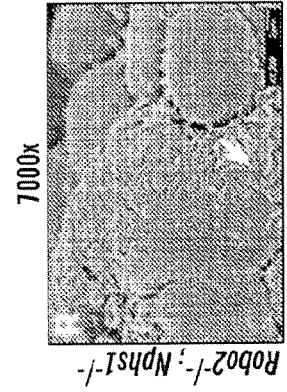


FIG. 4R



FIG. 5A



FIG. 5B

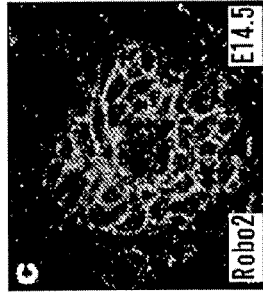


FIG. 5C

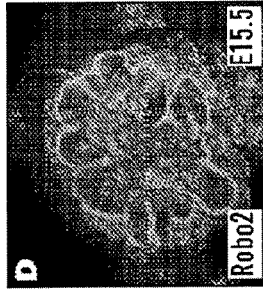


FIG. 5D

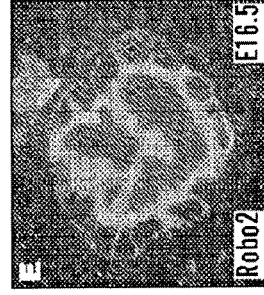


FIG. 5E



FIG. 5F

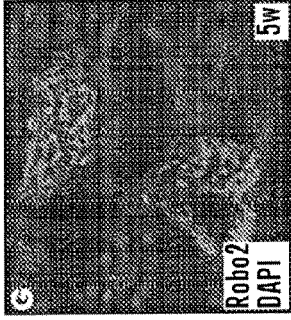


FIG. 5G

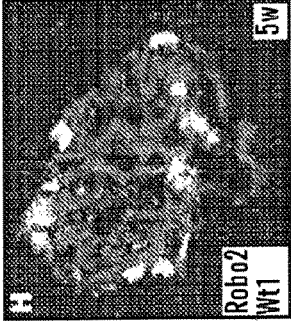


FIG. 5H

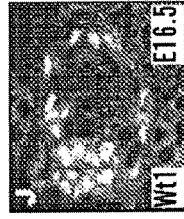


FIG. 5I



FIG. 5J

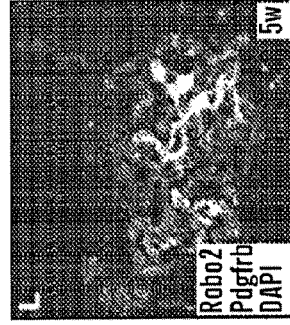


FIG. 5L

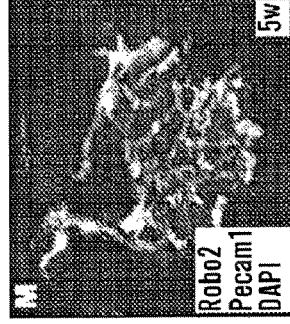
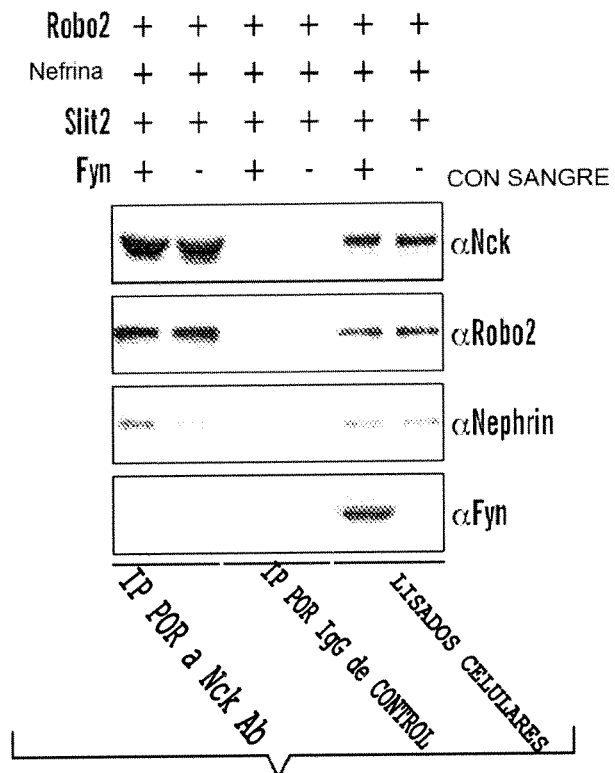
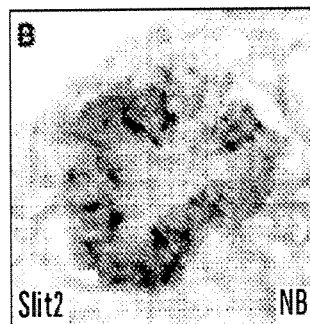
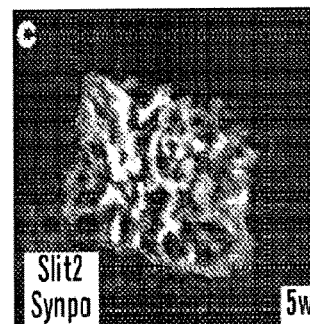
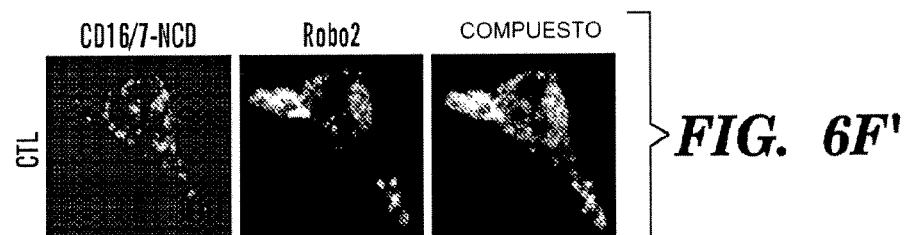
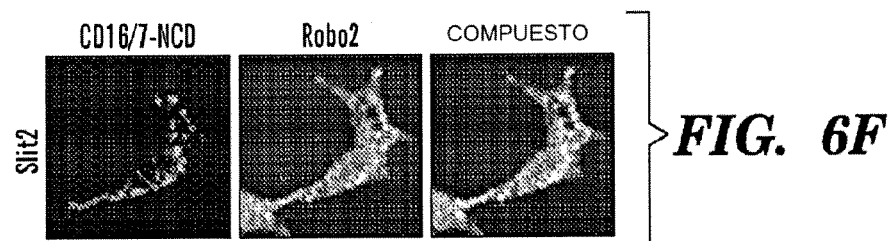
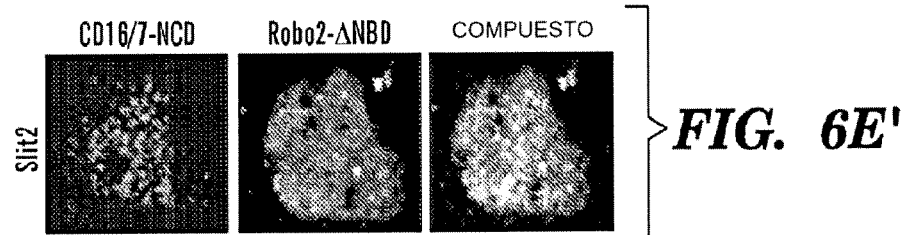
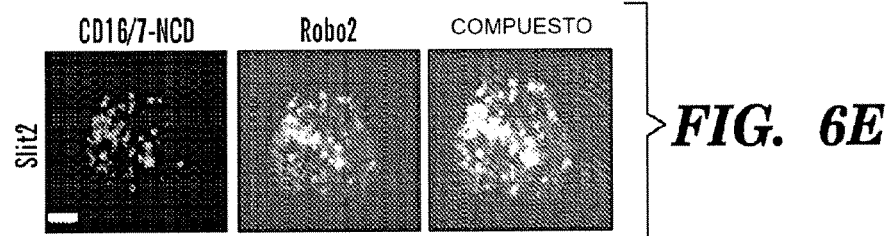
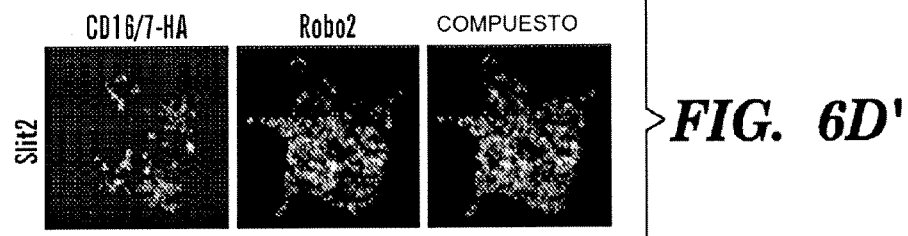
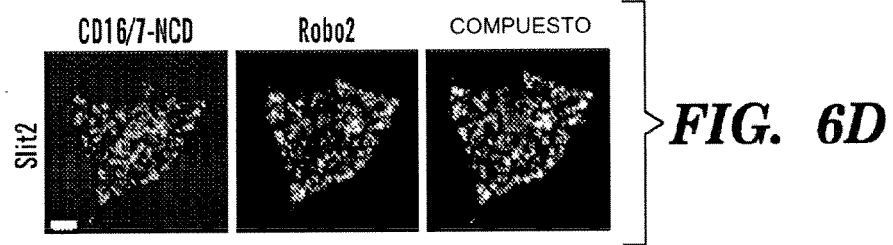


FIG. 5M

**FIG. 6A****FIG. 6B****FIG. 6C**



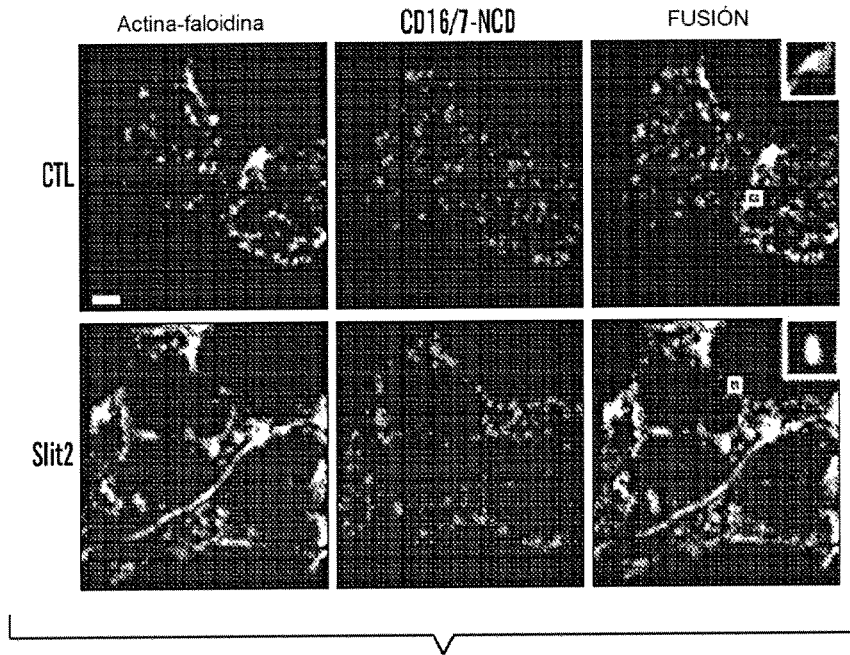


FIG. 7A

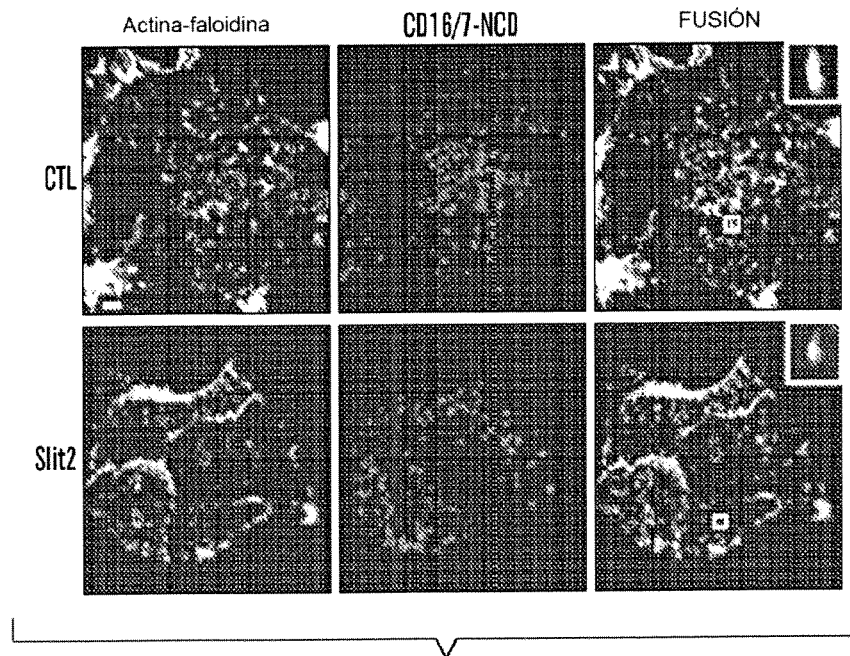
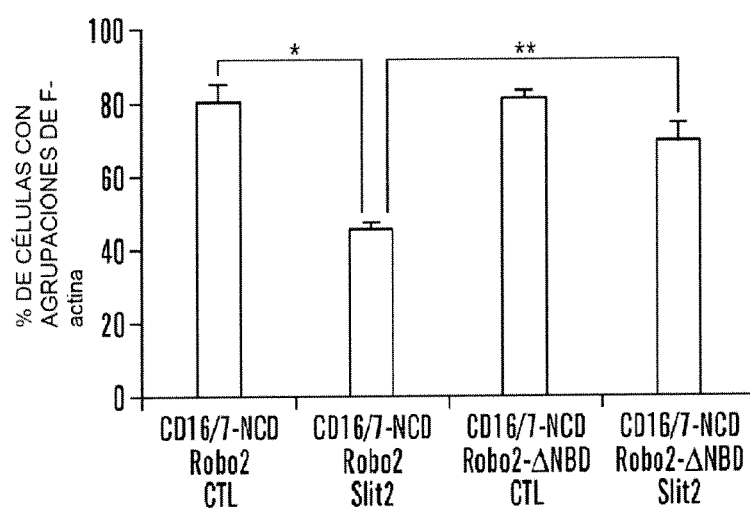
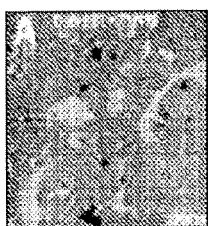
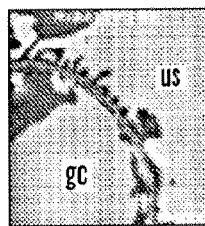
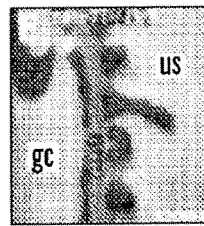
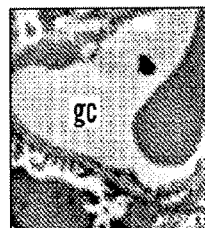
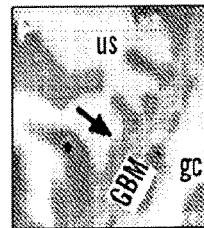
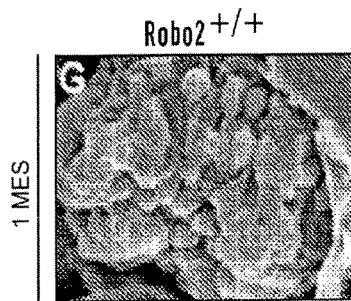
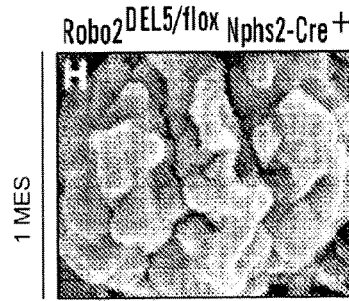
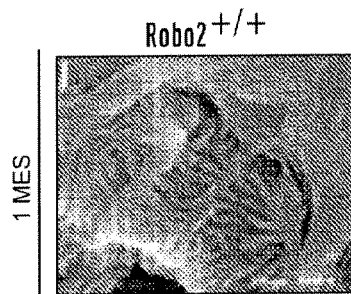
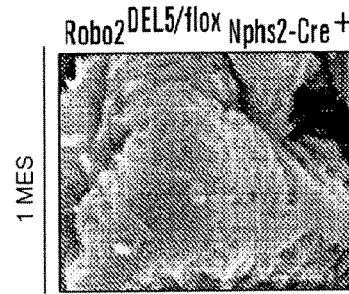
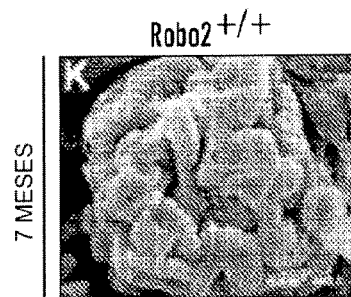
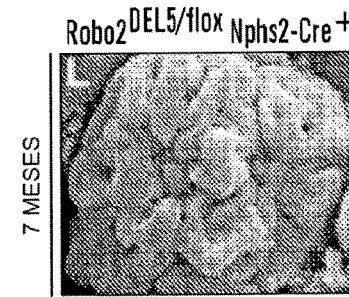
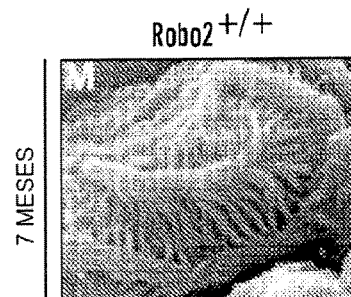
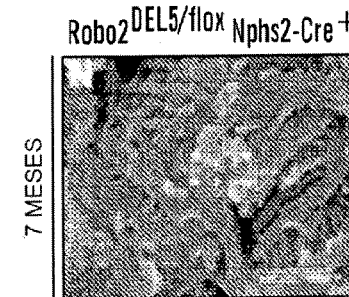


FIG. 7B

**FIG. 7C****FIG. 8A****FIG. 8C****FIG. 8E****FIG. 8B****FIG. 8D****FIG. 8F**

**FIG. 8G****FIG. 8H****FIG. 8I****FIG. 8J****FIG. 8K****FIG. 8L****FIG. 8M****FIG. 8N**

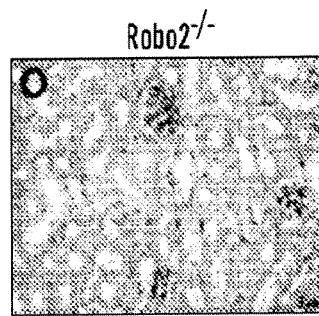


FIG. 8O

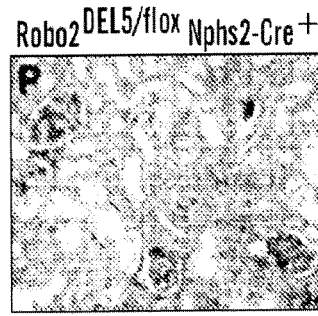


FIG. 8P

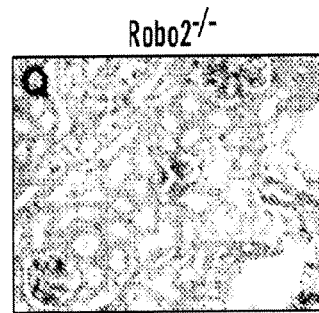


FIG. 8Q

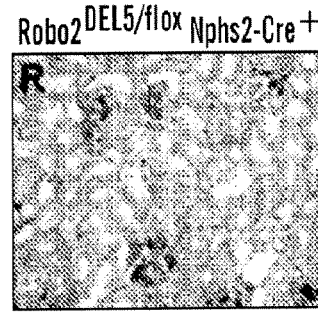


FIG. 8R

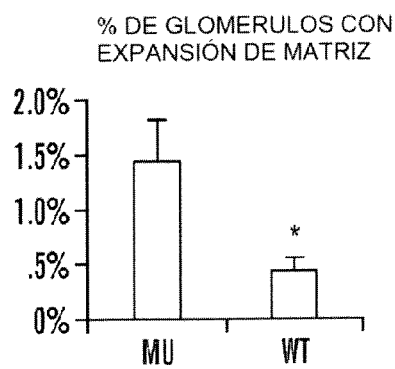


FIG. 8S

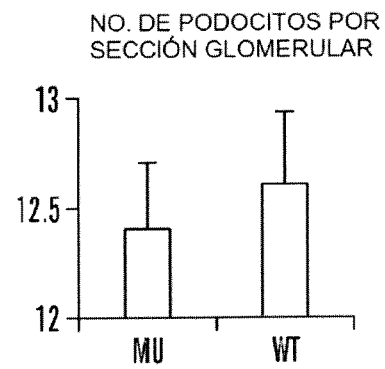


FIG. 8T

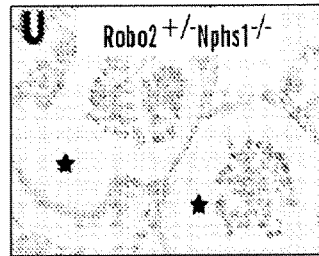


FIG. 8U

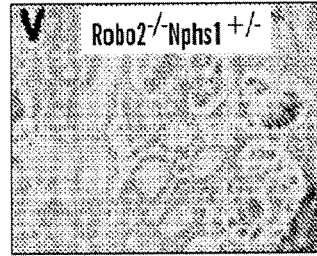


FIG. 8V

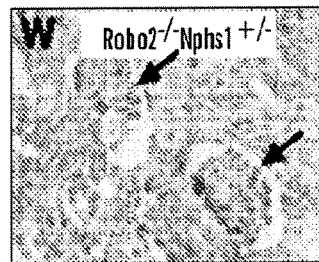


FIG. 8W

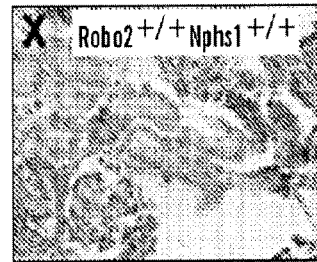


FIG. 8X

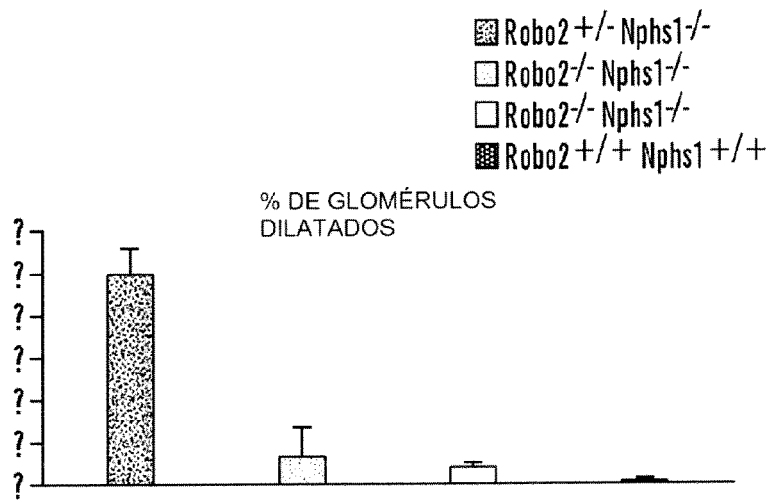


FIG. 8Y

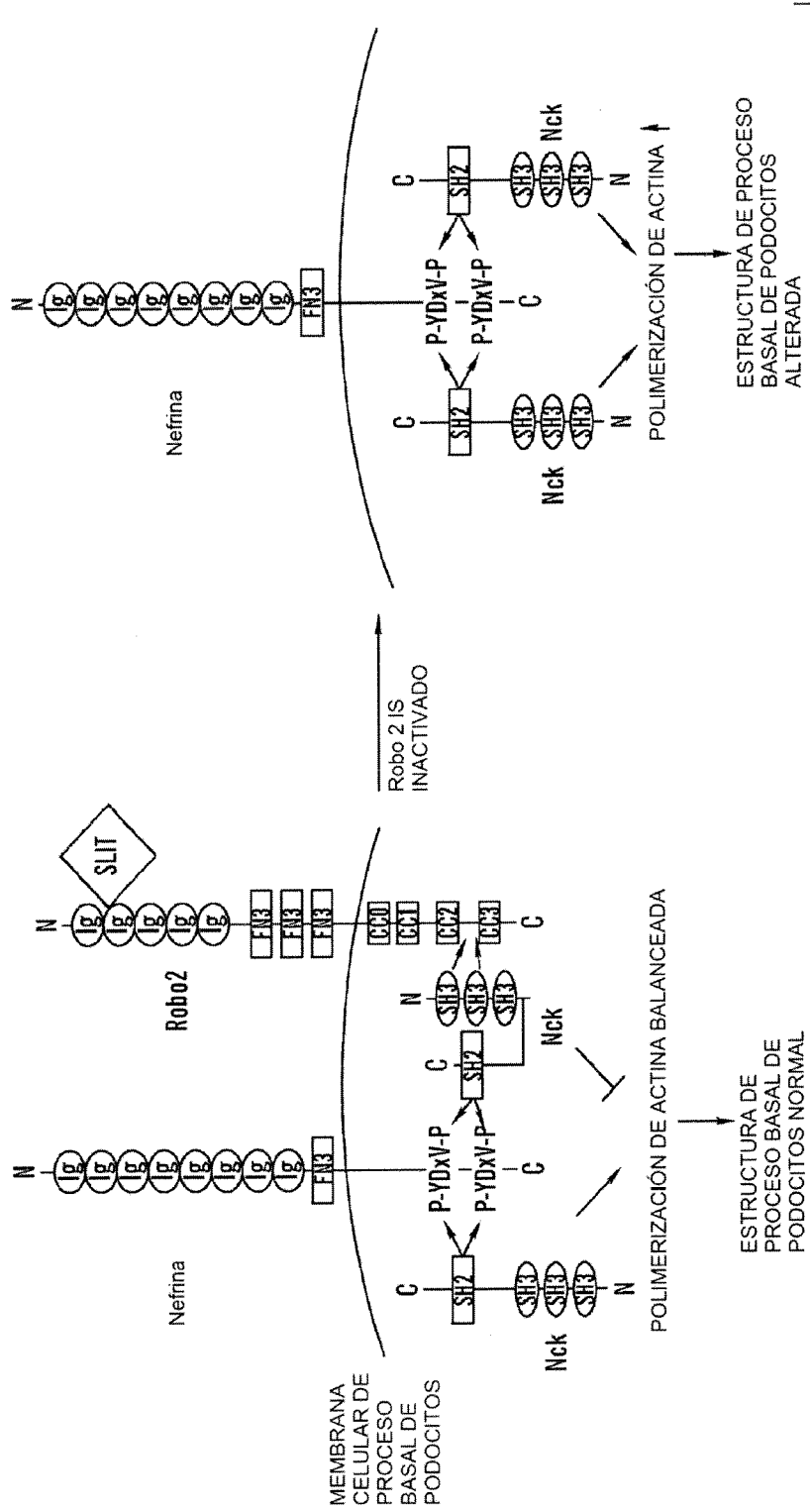


FIG. 8Z

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BOSTON MEDICAL CENTER CORPORATION

<120> SEÑALIZACIÓN DE SLIT-ROBO PARA DIAGNOSIS Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD DEL RINÓN

<130> 701586-072811-PCT

<140> PCT/US2013/020280

<141> 2013-01-04

<150> 61/583,379

<151> 2012-01-05

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1394

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Arg Arg His Glu Arg Val Thr Arg Arg Met Trp Thr Trp Ala
1 5 10 15

Pro Gly Leu Leu Met Met Thr Val Val Phe Trp Gly His Gln Gly Asn
20 25 30

Gly Gln Gly Gln Gly Ser Arg Leu Arg Gln Glu Asp Phe Pro Pro Arg
35 40 45

Ile Val Glu His Pro Ser Asp Val Ile Val Ser Lys Gly Glu Pro Thr
50 55 60

Thr Leu Asn Cys Lys Ala Glu Gly Arg Pro Thr Pro Thr Ile Glu Trp
65 70 75 80

Tyr Lys Asp Gly Glu Arg Val Glu Thr Asp Lys Asp Asp Pro Arg Ser
85 90 95

His Arg Met Leu Leu Pro Ser Gly Ser Leu Phe Phe Leu Arg Ile Val
100 105 110

His Gly Arg Arg Ser Lys Pro Asp Glu Gly Ser Tyr Val Cys Val Ala
115 120 125

Arg Asn Tyr Leu Gly Glu Ala Val Ser Arg Asn Ala Ser Leu Glu Val
130 135 140

Ala Leu Leu Arg Asp Asp Phe Arg Gln Asn Pro Thr Asp Val Val Val
145 150 155 160

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

420

425

430

Pro Pro Ile Ile Leu Gln Gly Pro Ala Asn Gln Thr Leu Ala Val Asp
435 440 445

Gly Thr Ala Leu Leu Lys Cys Lys Ala Thr Gly Asp Pro Leu Pro Val
450 455 460

Ile Ser Trp Leu Lys Glu Gly Phe Thr Phe Pro Gly Arg Asp Pro Arg
465 470 475 480

Ala Thr Ile Gln Glu Gln Gly Thr Leu Gln Ile Lys Asn Leu Arg Ile
485 490 495

Ser Asp Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Val Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu
500 505 510

Thr Ser Trp Ser Ala Val Leu Asp Val Thr Glu Ser Gly Ala Thr Ile
515 520 525

Ser Lys Asn Tyr Asp Leu Ser Asp Leu Pro Gly Pro Pro Ser Lys Pro
530 535 540

Gln Val Thr Asp Val Thr Lys Asn Ser Val Thr Leu Ser Trp Gln Pro
545 550 555 560

Gly Thr Pro Gly Thr Leu Pro Ala Ser Ala Tyr Ile Ile Glu Ala Phe
565 570 575

Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser Trp Gln Thr Val Ala Asn His Val Lys
580 585 590

Thr Thr Leu Tyr Thr Val Arg Gly Leu Arg Pro Asn Thr Ile Tyr Leu
595 600 605

Phe Met Val Arg Ala Ile Asn Pro Gln Gly Leu Ser Asp Pro Ser Pro
610 615 620

Met Ser Asp Pro Val Arg Thr Gln Asp Ile Ser Pro Pro Ala Gln Gly
625 630 635 640

Val Asp His Arg Gln Val Gln Lys Glu Leu Gly Asp Val Leu Val Arg
645 650 655

Leu His Asn Pro Val Val Leu Thr Pro Thr Thr Val Gln Val Thr Trp
660 665 670

Thr Val Asp Arg Gln Pro Gln Phe Ile Gln Gly Tyr Arg Val Met Tyr
675 680 685

Arg Gln Thr Ser Gly Leu Gln Ala Thr Ser Ser Trp Gln Asn Leu Asp
690 695 700

Ala Lys Val Pro Thr Glu Arg Ser Ala Val Leu Val Asn Leu Lys Lys
705 710 715 720

Gly Val Thr Tyr Glu Ile Lys Val Arg Pro Tyr Phe Asn Glu Phe Gln
725 730 735

Gly Met Asp Ser Glu Ser Lys Thr Val Arg Thr Thr Glu Glu Ala Pro
740 745 750

Ser Ala Pro Pro Gln Ser Val Thr Val Leu Thr Val Gly Ser Tyr Asn
755 760 765

Ser Thr Ser Ile Ser Val Ser Trp Asp Pro Pro Pro Pro Asp His Gln
770 775 780

Asn Gly Ile Ile Gln Glu Tyr Lys Ile Trp Cys Leu Gly Asn Glu Thr
785 790 795 800

Arg Phe His Ile Asn Lys Thr Val Asp Ala Ala Ile Arg Ser Val Ile
805 810 815

Ile Gly Gly Leu Phe Pro Gly Ile Gln Tyr Arg Val Glu Val Ala Ala
820 825 830

Ser Thr Ser Ala Gly Val Gly Val Lys Ser Glu Pro Gln Pro Ile Ile
835 840 845

Ile Gly Arg Arg Asn Glu Val Val Ile Thr Glu Asn Asn Asn Ser Ile
850 855 860

Thr Glu Gln Ile Thr Asp Val Val Lys Gln Pro Ala Phe Ile Ala Gly
865 870 875 880

Ile Gly Gly Ala Cys Trp Val Ile Leu Met Gly Phe Ser Ile Trp Leu
885 890 895

Tyr Trp Arg Arg Lys Lys Arg Lys Gly Leu Ser Asn Tyr Ala Val Thr
900 905 910

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Phe Gly Gln Gln Ser Thr Ala Thr Leu Thr Pro Ser Pro
1160 1165 1170

Arg Glu Glu Met Gln Pro Met Leu Gln Ala His Leu Asp Glu Leu
1175 1180 1185

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

<210> 2
 <211> 8374
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 gcgctggagg agggaggcgg aaggacagcg ctgcgccacc acccgaggga gggagcgcgg 60
 tagctgcagg caggggaggg agaggaaaga aaaggaagga cggctcccag acagagagtg 120

ggagaaaaccg	gggagcagcg	ggagcagcag	gtccggggggg	agctgttccg	ctgcgctgcc	180
ctcgttattc	acacggacgc	tgcggagctt	cccagggctg	cttccctgtc	cccctgggtg	240
gaggctgccg	tctaaacctg	actccagagt	ttaagatgca	atggccagaa	gacatgaacg	300
tgtcactaga	aggatgtgga	catgggctcc	gggactgttg	atgatgactg	tgggtgtttg	360
gggtcatcag	gggaatggac	aaggccaagg	atcgcgtctt	cgccaggagg	actttcccc	420
gcggattgtg	gagcatcctt	ccgatgtcat	cgtctctaag	ggcgagccca	cgactctgaa	480
ctgcaaggcg	gagggccggc	caacgcccac	cattgagtgg	tacaaagatg	gggagcgagt	540
ggagactgac	aaggacgatc	cccggtccca	caggatgctt	ctgcccagcg	gatccttatt	600
cttcttgcg	atcgtgcacg	ggcgcaggag	taaacctgat	gaaggaagct	acgtttgtgt	660
tgcgaggaac	tatcttggtg	aagcagtgag	tcgaaatgcg	tctctggaag	tggcattggt	720
acgagatgac	ttccgacaaa	accccacaga	tgttgtagtg	gcagctggag	agcctgcaat	780
cctggagtgc	cagcctcccc	ggggacaccc	agaaccacc	atctactgga	aaaaagacaa	840
agttcgaatt	gatgacaagg	aagaaaagaat	aagtatccgt	ggtggaaaac	tgatgatctc	900
caataccagg	aaaagtgatg	cagggatgta	tacttggtgt	ggtaccaata	tgggtgggaga	960
aagggacagt	gaccagcag	agctgactgt	ctttgaacga	cccacatttc	tcaggaggcc	1020
aattaaccag	gtggtactgg	aggaagaagc	tgtagaatth	cgttgtcaag	tccaaggaga	1080
tcctcaacca	actgtgaggt	ggaaaaagga	tgatgcagac	ttgccaagag	gaaggatatga	1140
catcaaagac	gattacacac	taagaattaa	aaagaccatg	agtacagatg	aaggcaccta	1200
tatgtgtatt	gctgagaatc	gggttggaag	aatggaagcc	tctgctacac	tcaccgtccg	1260
agctccccca	cagtttgtgg	ttcggccaag	agatcagatt	gttgctcaag	gtcgaacagt	1320
gacatttccc	tgtgaaacta	aaggaaaccc	acagccagct	gttttttggc	agaaagaagg	1380
cagccagaac	ctacttttcc	caaaccaacc	ccagcagccc	aacagtagat	gctcagtgtc	1440
accaactgga	gacctcacia	tcaccaacat	tcaacgttcc	gacgcgggtt	actacatctg	1500
ccaggcttta	actgtggcag	gaagcatttt	agcaaaagct	caactggagg	ttactgatgt	1560
tttgacagat	agacctccac	ctataattct	acaaggccca	gccaaccaa	cgctggcagt	1620
ggatggtaca	gcgttactga	aatgtaaagc	cactggtgat	cctcttcctg	taattagctg	1680
gttaaaggag	ggatttactt	ttccgggtag	agatccaaga	gcaacaattc	aagagcaagg	1740
cacactgcag	attaagaatt	tacggatttc	tgatactggc	acttatactt	gtgtggctac	1800
aagttcaagt	ggagagactt	cctggagtgc	agtgctggat	gtgacagagt	ctggagcaac	1860
aatcagtaaa	aactatgatt	taagtgcctt	gccagggcca	ccatccaaac	cgcaggtcac	1920
tgatgttact	aagaacagtg	tcacctgtgc	ctggcagcca	ggtacccttg	gaacccttcc	1980
agcaagtgca	tatatcattg	aggctttcag	ccaatcagtg	agcaacagct	ggcagaccgt	2040

ggcaaaccat gtaaagacca ccctctatac tgtaagagga ctgcggccca atacaatcta	2100
cttattcatg gtcagagcga tcaacccccca aggtctcagt gacccaagtc ccatgtcaga	2160
tcctgtgctg acacaagata tcagcccacc agcacaagga gtggaccaca ggcaagtgca	2220
gaaagagcta ggagatgtcc ttgtccgtct tcataatcca gttgtgctga ctcccaccac	2280
ggttcaggtc acatggacgg ttgatcgcca accccagttt atccaaggct accgagtgat	2340
gtatcgtcag acttcaggtc tgcaggcgac atcttcgtgg cagaatttag atgccaaaagt	2400
cccgactgaa cgaagtgtctg tcttagtcaa cctgaaaaag ggggtgactt atgaaattaa	2460
agtacggcca tattttaatg agttccaagg aatggatagt gaatctaaaa cggttcgtac	2520
tactgaagaa gcccgaagtg ccccaccaca gtctgtcact gtactgacag ttggaagcta	2580
caatagcaca agtattagtg tttcctggga tcctcctcct ccagatcacc agaatggaat	2640
tatccaagaa tacaagatct ggtgtctagg aaatgaaacg cgattccata tcaacaaaac	2700
tgtggatgca gccattcggg ccgtaataat tgggtggatta ttcccaggta ttcaataccg	2760
ggtagaggtt gcagctagta ccagtgcagg ggttggagta aagagtgagc cacagccaat	2820
aataatcggg agacgcaatg aagttgtcat tactgaaaac aataacagca taactgagca	2880
aatcactgat gtggtgaagc aaccagcctt tatagctggt attggtggtg cctgctgggt	2940
aattctgatg ggtttttagca tatggttgta ttggcgaaga aagaagagga agggactcag	3000
taattatgct gttacgtttc aaagaggaga tggaggacta atgagcaatg gaagccgtcc	3060
aggtcttctc aatgctggtg atcccagcta tccatggctt gctgattctt ggccagccac	3120
gagcttgcca gtaaataata gcaacagtgg cccaaatgag attggaaaatt ttggccgtgg	3180
agatgtgctg ccaccagttc caggccaagg ggataaaaca gcaacgatgc tctcagatgg	3240
agccatttat agtagcattg acttcactac caaaaccagt tacaacagtt ccagccaaat	3300
aacacagggt accccatatg ccacgacaca gatcttgcac tccaacagca tacatgaatt	3360
ggctgtcgat ctgcctgatc cacaatggaa aagctcaatt cagcaaaaaa cagatctgat	3420
gggatttggt tattctctac ctgatcagaa caaaggtaac aatggtggga aagggtggaaa	3480
aaagaagaaa aataaaaaact cttctaaacc acagaaaaac aatggatcca cttgggccaa	3540
tgtccctcta cctccccccc cagtccagcc cttcctggc acggagctgg aacactatgc	3600
agtggaacaa caagaaaatg gctatgacag tgatagctgg tgcccaccat tgccagtaca	3660
aacttactta caccaaggtc tggaagatga actggaagaa gatgatgata ggggtcccaac	3720
acctcctgtt cgaggcgtgg cttcttctcc tgctatctcc tttggacagc agtccactgc	3780
aactcttact ccatccccac gggaagagat gcaaccatg ctgcaggctc acctggatga	3840
gttgacaaga gcctatcagt ttgatatagc aaaacaaaca tggcacattc aaagcaataa	3900
tcaacctcca cagcctccag ttccaccgtt aggttatgtg tctggagcct tgatttctga	3960
tttggaacg gatgttgacg atgatgatgc cgacgacgaa gaggaagctt tagaaatccc	4020

caggccccctg	agagcactgg	accagactcc	tggatccagc	atggacaatc	tagacagctc	4080
tgtgacagga	aaagccttta	cctcctctca	aagacctcga	cctaccagcc	cattttctac	4140
tgacagtaac	accagtgcag	ccctgagtca	aagtcagagg	cctcggccca	ctaaaaaaca	4200
caagggaggg	cggatggacc	aacaaccagc	attgcctcat	cgaaggggaa	gaatgacaga	4260
tgaggaggcc	ttggtgccct	atagcaagcc	cagtttccca	tctccagggt	gccacagctc	4320
atcaggaaca	gcttcttcta	agggatccac	tggacctagg	aaaaccgagg	tgttgagagc	4380
aggccaccag	cgcaatgcc	gcgaccttct	tgacatagga	tatatgggct	ccaacagtca	4440
aggacagttt	acagggtgaat	tatagtaa	at	at	at	4500
accatcaggt	ccggactcat	ggaagtgatg	actctaaaca	gtgcaatgaa	caatttattt	4560
atgtactatt	aaaagaactg	taaatgcaat	gtaaagacac	acagccacac	atatcccaca	4620
gatattttca	ttgtgttctt	ctcttaagta	caccacccac	cttaactctt	tcttgtcagg	4680
agtatataaa	aaagaaagaa	aacaaaactc	gccctacagg	aagaaaagga	ttctcctctg	4740
tatataat	cttttgtgca	ttgctatgca	agctcactct	ttttagctct	gctcatatta	4800
ttgtctgttc	ttattgggtct	gttggtactat	atgtgaatta	ataggctgtg	gtgccatata	4860
ttacttttta	attgtgtaac	ttttatgttt	aaattttgca	ctgcaatttt	atttgggtgat	4920
aagcaca	ctctactcct	catgacatga	agaaaaagac	tgaatgtgaa	gggagtttct	4980
gtactgtaag	ctagattgga	taatgatggc	tgtaacaaat	catgttagat	ggttttcagt	5040
tgggggtgtag	aaataggaag	atgcaaagga	acaatgggtg	tggcaaagtc	ttctttgaat	5100
atcaggggact	gagtcaataa	aaaaaatagt	agaaagggtg	cttttactat	tgacaaaagc	5160
cggggtcaaa	aaaagtagtt	taagtcttaa	gactgaatat	gcattaaagt	atgcaggtag	5220
caaagatgta	ataaatttgc	ttaaaaaaag	aaattaaagt	ttattttaga	atcaatttta	5280
cctgtcattg	taattgaccc	atctgagaat	tacaataagc	aagaggaaat	taagggtgtt	5340
tgcaagagct	gtattttatat	tacagttttt	taaaaacatt	ttctgaatta	tcgtaattaa	5400
gctctccaac	tcgttaagtc	agaatataat	atgaagttcc	ccaaggaaac	gaacaaaatg	5460
aactctagaa	tatctagcaa	atagttaaag	aagcaattta	ttattagggc	atactcgggc	5520
tgtttccaaa	tataaactct	attgcaatat	cttatttcat	ctttctaata	catgtacagt	5580
gcacactaga	ggatagagct	gcatcactta	aattcatgac	ttaaaaaata	atacagttta	5640
tatacaactt	gttttttatt	tgattaagaa	gtgaagttta	cgccacccaa	tgtatagcca	5700
aattgtacgt	gcttaaaaaa	cagtgccgag	agtatgttca	gttcgcagta	agtagattta	5760
ttggaataaa	tattctatgg	tacattctca	gaaattggct	tccaactaaa	atacgtttga	5820
cccattttga	ataaggaaat	tgaaaagaaa	aatttaaaag	gagaaaaaaa	tgcatgttta	5880
taaacttttt	aaataaaacc	agaccttgta	agtggacatt	aataattgtc	ctgcctcatt	5940

tgttttcacg	actttgacaa	caagaagttc	ctgaacatta	gtcatgtatg	ctcagaataa	6000
atgtgacttt	gaaatatatg	ttagctactg	tacatgtata	gtcagtcaag	tagaagagga	6060
ccttcctgaa	attccccactt	gtgacatttt	cccatggggtt	tcctacacaa	tcttaaattt	6120
tatttctgtc	tatactttct	caaatttttc	ctatgataag	ttcagttggt	ggtactcttc	6180
taaaaatatt	caacgtgatt	aggatcagtt	ctaaaatacg	ggaccccttt	gagtgacaat	6240
tcgcactcca	tgcattattg	gctcagtagc	caatttttgt	cacgtcggtt	taacaaggag	6300
atgacataat	taaacatttc	catcctttct	attccctgag	actgcatcag	cacaggcaag	6360
tatagaatgt	aatgttcttc	atgggcccc	ccagcttttt	ggtgccatgt	aattttattc	6420
ttcgctgaag	agaaaaagaa	ttctgagaca	cagttattaa	accctttatc	aactttctac	6480
catcagtgcc	tgaattctaa	tgcagtggtg	tttctctggg	acaaagagac	tgaggaagat	6540
gaaaagtttc	ttcaaagagt	gaatacatac	ttattcacaa	ctctaggatg	tgaggacttt	6600
aaatatctct	ttatgaagtt	ccctgcctaa	cctcttttcta	tttaaaggca	aacaaatttc	6660
gaagagggtt	tgtgttccct	ctttatgttt	ctctatgacc	cagtttagtc	taaaacctta	6720
gttcattaca	tatacaacac	atagcctttg	atccctggta	actggcaggt	gttggtgatt	6780
aataaaccaa	ggcttcaaag	tgaagtatgt	gtgtgcagat	gacttttgga	ataacgtggg	6840
catagcatca	taccttcctg	attgtcttca	gcatataaaa	attaactggt	gtagttaaaa	6900
ttatgtcagt	gcagagcttg	tggttacttg	gaatgttctt	tcagaatagt	ccatgttgcc	6960
tattaaacct	agttttaaac	acattgggca	gtcaatttat	gcacccaaaa	tatcaccttc	7020
aggtagattg	agggcaagat	aaaatgctgt	atgtagctat	acaaaggaat	tcagaaacat	7080
tactggaaa	caaagccttt	gtcagcttgc	tactgacaaa	gtagtaaaaa	gctactaatc	7140
agtgttgagt	cagatgtcaa	cagaaaaata	caaataccta	tgagagccac	agcagtttct	7200
cgtttcatag	ccgattcaat	gaatatgatt	agaaattcac	tgagctcact	cttgcagggt	7260
taaatggagg	cctgcataag	gactgcaaga	ggaaatctgg	gtgggagaga	atgtaatctg	7320
atcttgcaat	cataggcaat	gctgcaatgc	aatcatgtcc	aatacaagca	cagcttcatt	7380
cataacagga	aacgtcttct	ttgggaaaa	agctctattg	gtgccccaac	tcaggatatgc	7440
cagtgtatgc	aggtggagtc	gccctacccc	tcttccaaac	atgtcctgtg	agatttttaa	7500
aataagatgg	gatagtacag	gggcatgaaa	agaattgatt	ccttcacagg	atttgaatcc	7560
agttcaaggg	agaatgtaga	aaattcaaaa	ccaacatata	aggtatcaca	caaccaagaa	7620
aagtaaaacc	attgcaagtt	tacttgcgtt	gagtacaaaa	cagatttaat	ggtgttctat	7680
gtcatagttt	aatgctctgg	gtatttaaat	atgttttcaa	caggatttga	gttgaaagtt	7740
tgtaatgtgc	tttgatggaa	cacctctcaa	tttctattca	ataaaacttat	gtaattgtcc	7800
attgacaata	taatgataac	agtaccattg	aactctaaac	tgtggtttat	cttcactact	7860
gggaagcaac	tgtgcatcag	tattaaagat	atgcagaaac	ataatattca	ctaatttggt	7920

catctgcttc tgtatattgt ttatggaatt acatggcaag aactgttcta aagcaacatg	7980
tctttccaca ttatttttaga ggtgaaatta cttttgtttt gcttctctat aatgtgtact	8040
tcaaatgaaa caccatactt ttttctaaaa aaagatgttc aatttactaa tttttttaa	8100
tctcataatt taaaaagcat ttgttgtgat tttaaagtgt tgcaagaaaa gggattttgt	8160
ggccgtgggt agacttttta tactttgttt tatagatgga ttttttttaa ctgtagtttg	8220
tttaagtcac caagcagcat ccaaaatctt aatgtgtttc atttgatgtt gttagatcag	8280
agaagaaaatt ggcataaaat cggttaatag tattgtcaaa gaattgtgta ttgtgtactc	8340
actgggaaaa aataaaatat attcacattt caaa	8374

<210> 3
 <211> 1378
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Met Ser Leu Leu Met Phe Thr Gln Leu Leu Cys Gly Phe Leu Tyr
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

His Gly Arg Arg Ser Lys Pro Asp Glu Gly Ser Tyr Val Cys Val Ala
 100 105 110

Arg Asn Tyr Leu Gly Glu Ala Val Ser Arg Asn Ala Ser Leu Glu Val
 115 120 125

Ala Leu Leu Arg Asp Asp Phe Arg Gln Asn Pro Thr Asp Val Val Val
 130 135 140

Ala Ala Gly Glu Pro Ala Ile Leu Glu Cys Gln Pro Pro Arg Gly His
 145 150 155 160

Pro Glu Pro Thr Ile Tyr Trp Lys Lys Asp Lys Val Arg Ile Asp Asp

165

170

175

Lys Glu Glu Arg Ile Ser Ile Arg Gly Gly Lys Leu Met Ile Ser Asn
180 185 190

Thr Arg Lys Ser Asp Ala Gly Met Tyr Thr Cys Val Gly Thr Asn Met
195 200 205

Val Gly Glu Arg Asp Ser Asp Pro Ala Glu Leu Thr Val Phe Glu Arg
210 215 220

Pro Thr Phe Leu Arg Arg Pro Ile Asn Gln Val Val Leu Glu Glu Glu
225 230 235 240

Ala Val Glu Phe Arg Cys Gln Val Gln Gly Asp Pro Gln Pro Thr Val
245 250 255

Arg Trp Lys Lys Asp Asp Ala Asp Leu Pro Arg Gly Arg Tyr Asp Ile
260 265 270

Lys Asp Asp Tyr Thr Leu Arg Ile Lys Lys Thr Met Ser Thr Asp Glu
275 280 285

Gly Thr Tyr Met Cys Ile Ala Glu Asn Arg Val Gly Lys Met Glu Ala
290 295 300

Ser Ala Thr Leu Thr Val Arg Ala Pro Pro Gln Phe Val Val Arg Pro
305 310 315 320

Arg Asp Gln Ile Val Ala Gln Gly Arg Thr Val Thr Phe Pro Cys Glu
325 330 335

Thr Lys Gly Asn Pro Gln Pro Ala Val Phe Trp Gln Lys Glu Gly Ser
340 345 350

Gln Asn Leu Leu Phe Pro Asn Gln Pro Gln Gln Pro Asn Ser Arg Cys
355 360 365

Ser Val Ser Pro Thr Gly Asp Leu Thr Ile Thr Asn Ile Gln Arg Ser
370 375 380

Asp Ala Gly Tyr Tyr Ile Cys Gln Ala Leu Thr Val Ala Gly Ser Ile
385 390 395 400

Leu Ala Lys Ala Gln Leu Glu Val Thr Asp Val Leu Thr Asp Arg Pro
405 410 415

Pro Pro Ile Ile Leu Gln Gly Pro Ala Asn Gln Thr Leu Ala Val Asp
420 425 430

Gly Thr Ala Leu Leu Lys Cys Lys Ala Thr Gly Asp Pro Leu Pro Val
 435 440 445

Ile Ser Trp Leu Lys Glu Gly Phe Thr Phe Pro Gly Arg Asp Pro Arg
 450 455 460

Ala Thr Ile Gln Glu Gln Gly Thr Leu Gln Ile Lys Asn Leu Arg Ile
 465 470 475 480

Ser Asp Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Val Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu
 485 490 495

Thr Ser Trp Ser Ala Val Leu Asp Val Thr Glu Ser Gly Ala Thr Ile
 500 505 510

Ser Lys Asn Tyr Asp Leu Ser Asp Leu Pro Gly Pro Pro Ser Lys Pro
 515 520 525

Gln Val Thr Asp Val Thr Lys Asn Ser Val Thr Leu Ser Trp Gln Pro
 530 535 540

Gly Thr Pro Gly Thr Leu Pro Ala Ser Ala Tyr Ile Ile Glu Ala Phe
 545 550 555 560

Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser Trp Gln Thr Val Ala Asn His Val Lys
 565 570 575

Thr Thr Leu Tyr Thr Val Arg Gly Leu Arg Pro Asn Thr Ile Tyr Leu
 580 585 590

Phe Met Val Arg Ala Ile Asn Pro Gln Gly Leu Ser Asp Pro Ser Pro
 595 600 605

Met Ser Asp Pro Val Arg Thr Gln Asp Ile Ser Pro Pro Ala Gln Gly
 610 615 620

Val Asp His Arg Gln Val Gln Lys Glu Leu Gly Asp Val Leu Val Arg
 625 630 635 640

Leu His Asn Pro Val Val Leu Thr Pro Thr Thr Val Gln Val Thr Trp
 645 650 655

Thr Val Asp Arg Gln Pro Gln Phe Ile Gln Gly Tyr Arg Val Met Tyr
 660 665 670

Arg Gln Thr Ser Gly Leu Gln Ala Thr Ser Ser Trp Gln Asn Leu Asp
 675 680 685

Ala Lys Val Pro Thr Glu Arg Ser Ala Val Leu Val Asn Leu Lys Lys
 690 695 700

Gly Val Thr Tyr Glu Ile Lys Val Arg Pro Tyr Phe Asn Glu Phe Gln
 705 710 715 720

Gly Met Asp Ser Glu Ser Lys Thr Val Arg Thr Thr Glu Glu Ala Pro
 725 730 735

Ser Ala Pro Pro Gln Ser Val Thr Val Leu Thr Val Gly Ser Tyr Asn
 740 745 750

Ser Thr Ser Ile Ser Val Ser Trp Asp Pro Pro Pro Pro Asp His Gln
 755 760 765

Asn Gly Ile Ile Gln Glu Tyr Lys Ile Trp Cys Leu Gly Asn Glu Thr
 770 775 780

Arg Phe His Ile Asn Lys Thr Val Asp Ala Ala Ile Arg Ser Val Ile
 785 790 795 800

Ile Gly Gly Leu Phe Pro Gly Ile Gln Tyr Arg Val Glu Val Ala Ala
 805 810 815

Ser Thr Ser Ala Gly Val Gly Val Lys Ser Glu Pro Gln Pro Ile Ile
 820 825 830

Ile Gly Arg Arg Asn Glu Val Val Ile Thr Glu Asn Asn Asn Ser Ile
 835 840 845

Thr Glu Gln Ile Thr Asp Val Val Lys Gln Pro Ala Phe Ile Ala Gly
 850 855 860

Ile Gly Gly Ala Cys Trp Val Ile Leu Met Gly Phe Ser Ile Trp Leu
 865 870 875 880

Tyr Trp Arg Arg Lys Lys Arg Lys Gly Leu Ser Asn Tyr Ala Val Thr
 885 890 895

Phe Gln Arg Gly Asp Gly Gly Leu Met Ser Asn Gly Ser Arg Pro Gly
 900 905 910

Leu Leu Asn Ala Gly Asp Pro Ser Tyr Pro Trp Leu Ala Asp Ser Trp
 915 920 925

Pro Ala Thr Ser Leu Pro Val Asn Asn Ser Asn Ser Gly Pro Asn Glu
 930 935 940

Ile Gly Asn Phe Gly Arg Gly Asp Val Leu Pro Pro Val Pro Gly Gln
945 950 955 960

Gly Asp Lys Thr Ala Thr Met Leu Ser Asp Gly Ala Ile Tyr Ser Ser
965 970 975

Ile Asp Phe Thr Thr Lys Thr Ser Tyr Asn Ser Ser Ser Gln Ile Thr
980 985 990

Gln Ala Thr Pro Tyr Ala Thr Thr Gln Ile Leu His Ser Asn Ser Ile
995 1000 1005

His Glu Leu Ala Val Asp Leu Pro Asp Pro Gln Trp Lys Ser Ser
1010 1015 1020

Ile Gln Gln Lys Thr Asp Leu Met Gly Phe Gly Tyr Ser Leu Pro
1025 1030 1035

Asp Gln Asn Lys Gly Asn Asn Gly Gly Lys Gly Gly Lys Lys Lys
1040 1045 1050

Lys Asn Lys Asn Ser Ser Lys Pro Gln Lys Asn Asn Gly Ser Thr
1055 1060 1065

Trp Ala Asn Val Pro Leu Pro Pro Pro Pro Val Gln Pro Leu Pro
1070 1075 1080

Gly Thr Glu Leu Glu His Tyr Ala Val Glu Gln Gln Glu Asn Gly
1085 1090 1095

Tyr Asp Ser Asp Ser Trp Cys Pro Pro Leu Pro Val Gln Thr Tyr
1100 1105 1110

Leu His Gln Gly Leu Glu Asp Glu Leu Glu Glu Asp Asp Asp Arg
1115 1120 1125

Val Pro Thr Pro Pro Val Arg Gly Val Ala Ser Ser Pro Ala Ile
1130 1135 1140

Ser Phe Gly Gln Gln Ser Thr Ala Thr Leu Thr Pro Ser Pro Arg
1145 1150 1155

Glu Glu Met Gln Pro Met Leu Gln Ala His Leu Asp Glu Leu Thr
1160 1165 1170

Arg Ala Tyr Gln Phe Asp Ile Ala Lys Gln Thr Trp His Ile Gln
1175 1180 1185

Ser Asn Asn Gln Pro Pro Gln Pro Pro Val Pro Pro Leu Gly Tyr

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

<210> 4

<211> 8689

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

ctcctctctt ttggaaaccg gagaggtgga gggaggggcaa caccgctgca aaggagaggc	60
ccgccaaagtc tgcccgctg caaagtgttg ctttgacaca ttcttattat ggaagttaag	120
taaaaatata gacatattaa aaaataactc cggacgtgga gctgctacgg agaaggaaac	180
cgggggaaaag aaaaccagta ggcaggccaa tggtttttcg gcagcgcgct ggcaagtttg	240

tggaacactt tctaggaatt aggtcttttc ctcccccttc atcatcttga cttctgaagg	300
aagaacttgg ctttggattg cagtggagcc taaggagaga gggtagaca cactcgaata	360
atccctctgg ctgggctgaa tttgtgggaa tttaggaagc cagagtgctg gaaatacagc	420
agcctttgaa gtacctctg ttaatttgga tggatctcag tgtgccccgt tcgagacctc	480
tccaccaacc ctttctgac ttgcgatttg ctcttcttga ctttaattag tatctaggaa	540
agtctaaact ttggacctac ctcttttttt gatactcatt tttgtacttt tgctctctgg	600
gattggtttc ttaaagaatc tggatccttt ttaatatgtc aaaatgagtc tgctgatgtt	660
tacacaacta ctgctctgtg gatTTTTata tgttcgggtt gatggatcgc gtcttcgcca	720
ggaggacttt cccccgcgga ttgtggagca tccttccgat gtcacgtct ctaagggcga	780
gcccacgact ctgaactgca aggcggaggg ccggccaacg cccaccattg agtgggtacaa	840
agatggggag cgagtggaga ctgacaagga cgatccccg tcccacagga tgcttctgcc	900
cagcggatcc ttattcttct tgcgcatcgt gcacgggcgc aggagtaaac ctgatgaagg	960
aagctacgtt tgtgttgca ggaactatct tggagaagca gtgagtcgaa atgctctct	1020
ggaagtggca ttgttacgag atgacttccg aaaaaacccc acagatgttg tagtggcagc	1080
tggagagcct gcaatcctgg agtgccagcc tccccgggga caccagaac ccaccatcta	1140
ctggaaaaaa gacaaagtgc gaattgatga caaggaagaa agaataagta tccgtgggtg	1200
aaaactgatg atctccaata ccaggaaaag tgatgcaggg atgtatactt gtgttggtac	1260
caatatggtg ggagaaaggg acagtgaccc agcagagctg actgtctttg aacgaccac	1320
atttctcagg aggccaaatta accaggtggt actggaggaa gaagctgtag aatttcgttg	1380
tcaagtcaa ggagatcctc aaccaactgt gaggtggaaa aaggatgatg cagacttgcc	1440
aagaggaagg tatgacatca aagacgatta cacactaaga attaaaaaga ccatgagtac	1500
agatgaaggc acctatatgt gtattgctga gaatcgggtt ggaaaaatgg aagcctctgc	1560
tacactcacc gtccgagctc cccacagtt tgtggttcgg ccaagagatc agattgttgc	1620
tcaaggctga acagtgacat ttccctgtga aactaaagga aaccacagc cagctgtttt	1680
ttggcagaaa gaaggcagcc agaacctact tttcccaaac caaccacagc agcccaacag	1740
tagatgctca gtgtcaccaa ctggagacct cacaatcacc aacattcaac gttccgacgc	1800
gggttactac atctgccagg ctttaactgt ggcaggaagc atttttagcaa aagctcaact	1860
ggaggttact gatgttttga cagatagacc tccacctata attctacaag gcccagccaa	1920
ccaaacgctg gcagtggatg gtacagcgtt actgaaatgt aaagccactg gtgatcctct	1980
tcctgtaatt agctggttaa aggagggtt tacttttccg ggtagagatc caagagcaac	2040
aattcaagag caaggcacac tgcagattaa gaatttacgg atttctgata ctggcactta	2100
tacttgtgtg gctacaagtt caagtggaga gacttcctgg agtgcagtgc tggatgtgac	2160
agagtctgga gcaacaatca gtaaaaaacta tgatttaagt gacctgccag ggccaccatc	2220

caaaccgcag gtcactgatg ttactaagaa cagtgtcacc ttgtcctggc agccaggtac	2280
ccctggaacc cttccagcaa gtgcatatat cattgaggct ttcagccaat cagtgagcaa	2340
cagctggcag accgtggcaa accatgtaaa gaccaccctc tatactgtaa gaggactgcg	2400
gccaataca atctacttat tcatggtcag agcgatcaac cccaaggtc tcagtgaccc	2460
aagtcccatg tcagatcctg tgcgcacaca agatatcagc ccaccagcac aaggagtgga	2520
ccacaggcaa gtgcagaaag agctaggaga tgtccttgtc cgtcttcata atccagttgt	2580
gctgactccc accacggttc aggtcacatg gacggttgat cgccaacccc agtttatcca	2640
aggctaccga gtgatgtatc gtcagacttc aggtctgcag gcgacatctt cgtggcagaa	2700
tttagatgcc aaagtcccga ctgaacgaag tgctgtctta gtcaacctga aaaagggggt	2760
gacttatgaa attaaagtac ggccatattt taatgagttc caaggaatgg atagtgaatc	2820
taaaacgggtt cgtactactg aagaagcccc aagtgcccc ccacagtctg tcactgtact	2880
gacagttgga agctacaata gcacaagtat tagtgtttcc tgggatcctc ctctccaga	2940
tcaccagaat ggaattatcc aagaatacaa gatctggtgt ctaggaaatg aaacgcgatt	3000
ccatatcaac aaaactgtgg atgcagccat tcggtccgta ataattggtg gattattccc	3060
aggatttcaa taccgggtag aggttgacgc tagtaccagt gcagggggtg gagtaaagag	3120
tgagccacag ccaataataa tcgggagacg caatgaagtt gtcattactg aaaacaataa	3180
cagcataact gagcaaatca ctgatgtggt gaagcaacca gcctttatag ctggtattgg	3240
tggtgcctgc tgggtaattc tgatggggtt tagcatatgg ttgtattggc gaagaaagaa	3300
gaggaagggg ctcagtaatt atgctgttac gtttcaaaga ggagatggag gactaatgag	3360
caatgggaagc cgtccaggtc ttctcaatgc tgggtgatccc agctatccat ggcttgctga	3420
ttcttgGCCa gccacgagct tgccagtaaa taatagcaac agtggcccaa atgagattgg	3480
aaattttggc cgtggagatg tgctgccacc agttccaggc caaggggata aaacagcaac	3540
gatgctctca gatggagcca tttatagtag cattgacttc actaccaaaa ccagttacaa	3600
cagttccagc caaataacac aggctacccc atatgccag acacagatct tgcattccaa	3660
cagcatacat gaattggctg tcgatctgcc tgatccacaa tggaaaagct caattcagca	3720
aaaaacagat ctgatgggat ttggttattc tctacctgat cagaacaaag gtaacaatgg	3780
tgggaaagggt ggaaaaaaga agaaaaataa aaactcttct aaaccacaga aaaacaatgg	3840
atccacttgg gccaatgtcc ctctacctcc ccccccagtc cagccccttc ctggcacgga	3900
gctggaacac tatgcagtgg aacaacaaga aaatggctat gacagtgata gctggtgccc	3960
accattgcca gtacaaactt acttacacca aggtctggaa gatgaactgg aagaagatga	4020
tgataggggtc ccaacacctc ctgttcgagg cgtggcttct tctcctgcta tctcctttgg	4080
acagcagtcc actgcaactc ttactccatc cccacgggaa gagatgcaac ccatgctgca	4140

ggctcacctg gatgagttga caagagccta tcagtttgat atagcaaaac aaacatggca	4200
cattcaaagc aataatcaac ctccacagcc tccagttcca ccgttaggtt atgtgtctgg	4260
agccttgatt tctgatttgg aaacggatgt tgcagatgat gatgccgacg acgaagagga	4320
agcttttagaa atccccaggc ccctgagagc actggaccag actcctggat ccagcatgga	4380
caatctagac agctctgtga caggaaaagc ctttacctcc tctcaaagac ctcgacctac	4440
cagcccattt tctactgaca gtaacaccag tgcagccctg agtcaaagtc agaggcctcg	4500
gcccaactaaa aaacacaagg gagggcggat ggaccaacaa ccagcattgc ctcatcgaag	4560
ggaaggaatg acagatgagg aggccttggg gccctatagc aagcccagtt tcccatctcc	4620
aggtagggcac agctcatcag gaacagcttc ttctaaggga tccactggac ctaggaaaac	4680
cgagggtgttg agagcaggcc accagcgcaa tgccagcgac cttcttgaca taggatatat	4740
gggctccaac agtcaaggac agtttacagg tgaattatag taaatgagag gagacataca	4800
aagctgctct gaaggaccat cagggtccgga ctcatggaag tgatgactct aaacagtgca	4860
atgaacaatt tattttatgta ctattaaaaa aactgtaaat gcaatgtaaa gacacacagc	4920
cacacatatc ccacagatat ttctattgtg ttcttctctt aagtacacca cccaccttaa	4980
ctcttttcttg tcaggagtat ataaaaaaga aagaaaacaa aactcgccct acaggaagaa	5040
aaggattctc ctctgtatat aatttctttt gtgcattgct atgcaagctc actcttttta	5100
gctctgctca tattattgtc tgttcttatt ggtctgttgt actatatgtg aattaatagg	5160
ctgtggtgcc atatattaac ttttaattgt gtaactttta tgtttaaatt ttgactgca	5220
attttatttg gtgataagca caaatctcta ctccatcatga catgaagaaa aagactgaat	5280
gtgaagggag tttctgtact gtaagctaga ttggataatg atggctgtaa caaatcatgt	5340
tagatggttt tcagttgggg tgtagaaata ggaagatgca aaggaacaat ggtgttggca	5400
aagtcttctt tgaatatcag ggactgagtc aataaaaaaa atagtagaaa ggtggctttt	5460
actattgaca aaagccgggg tcaaaaaaag tagtttaagt ctttaagactg aatatgcatt	5520
aaagtatgca ggtagcaaag atgtaataaa ttgtcttaaa aaaagaaatt aaagttttat	5580
ttagaatcaa ttttacctgt cattgtaatt gacccatctg agaattacaa taagcaagag	5640
gaaattaagg tgttttgcaa gagctgtatt tatattacag ttttttaaaa acattttctg	5700
aattatcgta attaagctct ccaactcgtt aagtcagaat ataatatgaa gttccccaag	5760
gaaacgaaca aaatgaactc tagaatatct agcaaatagt taaagaagca atttattatt	5820
agggcatact cgggctgttt ccaaataata actctattgc aatatcttat ttcatttttc	5880
taatacatgt acagtgcaca ctagaggata gagctgcac acttaaaattc atgacttaaa	5940
aaataataca gtttatatac aacttgtttt ttatttgatt aagaagtga gtttacgccca	6000
cccaatgtat agccaaattg tacgtgctta aaaaacagtg ccgagagtat gttcagttcg	6060
cagtaagtag atttattgga ataaatattc tatggtacat tctcagaaat tggcttccaa	6120

ctaaaatacg	tttgacccat	tttgaataag	gaaattgaaa	agaaaaat	aaaaggagaa	6180
aaaaatgcat	gtttataaac	tttttaaata	aaaccagacc	ttgtaagtgg	acattaataa	6240
ttgtcctgcc	tcatttgttt	tcacgacttt	gacaacaaga	agttcctgaa	cattagtcac	6300
gtatgctcag	aataaatgtg	actttgaaat	atatgttagc	tactgtacac	gtatagtcag	6360
tcaagtagaa	gaggaccttc	ctgaaattcc	cacttgtagc	attttcccat	gggtttccta	6420
cacaatctta	aattttat	ctgtctatac	tttctcaa	ttttcctatg	ataagttcag	6480
ttgttggtac	tcttctaaaa	atattcaacg	tgattaggat	cagttctaaa	atacgggacc	6540
cctttgagtg	acaattcgca	ctccatgcat	tattggctca	gtagccaatt	tttgtcacgt	6600
cgttataaca	aggagatgac	ataattaaac	atttccatcc	tttctattcc	ctgagactgc	6660
atcagcacag	gcaagtatag	aatgtaatgt	tcttcatggg	ccccaccagc	tttttggtgc	6720
catgtaattt	atttcttcgc	tgaagagaaa	aagaattctg	agacacagtt	attaaaccct	6780
ttatcaactt	tctaccatca	gtgcctgaat	tctaattgcag	tgtgatttct	ctgggacaaa	6840
gagactgagg	aagatgaaaa	gtttcttcaa	agagtgaata	catacttatt	cacaactcta	6900
ggatgtgagg	actttaaata	tctctttatg	aagttccctg	cctaacctct	ttctatttaa	6960
aggcaacaa	atttgaaga	ggttttgtgt	tccctcttta	tgtttctcta	tgaccagtt	7020
tagtctaaaa	ccttagttca	ttacatatac	aacacatagc	ctttgatccc	tggttaactgg	7080
caggtgttgg	tgattaataa	accaaggctt	caaagtgaag	tatgtgtgtg	cagatgactt	7140
ttggaataac	gtgggcatag	catcatacct	tcctgattgt	cttcagcata	taaaaattaa	7200
ctgtttagt	taaaattatg	tcagtgcaga	gcttgtgggt	acttggaatg	ttctttcaga	7260
atagtccatg	ttgcctatta	aacctagttt	taaacacatt	gggcagtcaa	tttatgcacc	7320
caaaatatca	ccctcaggta	gattgagggc	aagataaaat	gctgtatgta	gctatacaaa	7380
ggaattcaga	aacattactg	gaaagcaaag	cctttgtcag	cttgctactg	acaaagtagt	7440
aaaaagctac	taatcagtgt	tgagtcagat	gtcaacagaa	aaatacaaat	acctatgaga	7500
gccacagcag	tttctcgttt	catagccgat	tcaatgaata	tgattagaaa	ttcactgagc	7560
tcactcttgc	aggtttaaat	ggaggcctgc	ataaggactg	caagaggaaa	tctgggtggg	7620
agagaatgta	atctgatcct	gcactcatag	gcaatgctgc	aatgcaatca	tgtccaatac	7680
aagcacagct	tcattcataa	caggaaacgt	cttctttggg	aaaatagctc	tattggtgcc	7740
caaactcagg	tatgccagt	tatgcagggt	gagtcgccct	accttcttc	caaacatgtc	7800
ctgtgagatt	tttaaaataa	gatgggatag	tacaggggca	tgaaaagaat	tgattccttc	7860
acaggatttg	aatccagttc	aagggagaat	gtagaaaatt	caaaaccaac	atataaggta	7920
tcacacaacc	aagaaaagta	aaaccattgc	aagtttactt	gcgttgagta	caaaacagat	7980
ttaatgggtg	tctatgtcat	agtttaatgc	tctgggtatt	taaatatggt	ttcaacagga	8040

tttgagttga aagtttgtaa tgtgctttga tggaacacct ctcaatttct attcaataaa	8100
cttatgtaat tgtccattga caatataatg ataacagtac cattgaactc taaactgtgg	8160
tttatcttca ctactgggaa gcaactgtgc atcagtatta aagatatgca gaaacataat	8220
attcactaat ttgttcatct gcttctgtat attgtttatg gaattacatg gcaagaactg	8280
ttctaaagca acatgtcttt ccacattatt ttagagggtga aattactttt gttttgcttc	8340
tctataatgt gtacttcaaa tgaaacacca tacttttttc taaaaaaaga tgttcaattt	8400
actaattttt ttaaactctca taattttaaaa agcatttggt gtgattttta agtggttgc	8460
gaaaagggat tttgtggccg tgggtagact ttttatactt tgttttatag atggattttt	8520
tttaactgta gtttgtttaa gtcaccaagc agcatccaaa atcttaatgt gtttcatttg	8580
atgttggttag atcagagaag aaattggcat aaaatcgggt aatagtattg tcaaagaatt	8640
gtgtattgtg tactcactgg gaaaaataa aatatattca catttcaaa	8689

<210> 5
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Thr Glu Leu Glu His Tyr Ala Val Glu Gln Gln Glu Asn Gly Tyr Asp
 1 5 10 15

Ser Asp Ser Trp Cys Pro Pro Leu Pro Val Gln Thr Tyr Leu His Gln
 20 25 30

Gly Leu Glu Asp Glu Leu Glu Glu Asp Asp Asp Arg Val Pro Thr Pro
 35 40 45

Pro Val Arg Gly Val Ala Ser Ser Pro Ala Ile Ser Phe Gly Gln Gln
 50 55 60

Ser Thr Ala Thr Leu Thr Pro Ser Pro Arg Glu Glu Met Gln Pro Met
 65 70 75 80

Leu Gln Ala His Leu Asp Glu Leu Thr Arg Ala Tyr Gln Phe Asp Ile
 85 90 95

Ala Lys Gln Thr Trp His Ile Gln Ser Asn Asn Gln Pro Pro Gln Pro
 100 105 110

Pro Val Pro Pro Leu Gly Tyr Val Ser Gly Ala Leu Ile Ser Asp Leu
 115 120 125

Glu Thr Asp Val Ala Asp Asp Asp Ala Asp Asp Glu Glu Glu Ala Leu
 130 135 140

Glu Ile Pro Arg Pro Leu Arg Ala Leu Asp Gln Thr Pro Gly Ser Ser
145 150 155 160

Met Asp Asn Leu Asp Ser Ser Val Thr Gly Lys Ala Phe Thr Ser Ser
165 170 175

Gln Arg Pro Arg Pro Thr Ser Pro Phe Ser Thr Asp Ser Asn Thr Ser
180 185 190

Ala Ala Leu Ser Gln Ser Gln Arg Pro Arg Pro Thr Lys His Lys Gly
195 200 205

Gly Arg Met Asp Gln Gln Pro Ala
210 215

<210> 6
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Thr Glu Leu Glu His Tyr Ala Val Glu Gln Gln Glu Asn Gly Tyr Asp
1 5 10 15

Ser Asp Ser Trp Cys Pro Pro Leu Pro Val Gln Thr Tyr Leu His Gln
20 25 30

Gly Leu Glu Asp Glu Leu Glu Glu Asp Asp Asp Arg Val Pro Thr Pro
35 40 45

Pro Val Arg Gly Val Ala Ser Ser Pro Ala Ile Ser Phe Gly Gln Gln
50 55 60

Ser Thr Ala Thr Leu Thr Pro Ser Pro Arg Glu Glu Met Gln Pro Met
65 70 75 80

Leu Gln Ala His Leu Asp Glu Leu Thr Arg Ala Tyr Gln Phe Asp Ile
85 90 95

Ala Lys Gln Thr Trp His Ile Gln Ser Asn Asn Gln Pro Pro Gln Pro
100 105 110

Pro Val Pro Pro Leu Gly Tyr Val Ser Gly Ala Leu Ile Ser Asp Leu
115 120 125

Glu Thr Asp Val Ala Asp Asp Asp Ala Asp Asp Glu Glu Glu Ala Leu
130 135 140

Glu Ile Pro Arg Pro Leu Arg Ala Leu Asp Gln Thr Pro Gly Ser Ser
145 150 155 160

Met Asp Asn Leu Asp Ser Ser Val Thr Gly Lys Ala Phe Thr Ser Ser
165 170 175

Gln Arg Pro Arg Pro Thr Ser Pro Phe Ser Thr Asp Ser Asn Thr Ser
180 185 190

Ala Ala Leu Ser Gln Ser Gln Arg Pro Arg Pro Thr Lys Lys His Lys
195 200 205

Gly Gly Arg Met Asp Gln Gln Pro Ala
210 215