



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 350 269**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61P 17/02** (2006.01)

**C07K 16/22** (2006.01)

**C07K 14/71** (2006.01)

**C07K 14/475** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07717966 .1**

96 Fecha de presentación : **18.01.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1984522**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2008**

54

Título: **Métodos de aumento de la función linfática.**

30

Prioridad: **18.01.2006 US 760328 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.01.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.01.2011**

73

Titular/es: **The General Hospital Corporation**  
**55 Fruit Street**  
**Boston, Massachusetts 02114, US**

72

Inventor/es: **Kajiya, Kentaro y**  
**Detmar, Michael**

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 350 269 T3

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

**MÉTODOS DE AUMENTO DE LA FUNCIÓN LINFÁTICA****DESCRIPCIÓN**

5

**ANTECEDENTES**

El sistema linfático vascular está compuesto de una densa red de capilares de paredes finas que drenan la linfa rica en proteínas del espacio extracelular. Sus principales papeles incluyen el mantenimiento de la homeostasis tisular de líquidos y la mediación de la respuesta inmune aferente (Oliver et al. (2002) Genes Dev. 16:773-83; Witte et al. (2001) Microsc. Res. Tech. 55:122-45). Una función conocida de los vasos linfáticos es el drenaje de líquido tisular de tejidos normales e inflamados (Kunstfeld et al. (2004) Blood 104:1048-57).

La publicación internacional de patente número WO 2005/097187 describe que el daño en la piel, tal como el daño en la piel inducido por UVB aguda, se puede reducir en un sujeto, administrando a un sujeto que tiene, o está expuesto a, daño en la piel inducido por UVB aguda, un agente que inhibe la señalización de VEGF.

El artículo titulado "Upregulation of neuropilin-1 by basic fibroblast growth factor enhances vascular smooth muscle cell migration in response to VEGF" de Liu et al. (Cytokine, vol. 32:5, p. 206-212 (2005)) describe que la neuropilina-1 (NRP-1) es un co-receptor para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Durante la neovascularización, las células vasculares del músculo liso (VSMC) y pericitos modulan la función de las células endoteliales. Los factores que median NRP-1 en las VSMC humanas (hVSMC) permanecen por elucidar. Se estudiaron varias citoquinas angiogénicas para identificar factores que aumentan la expresión de NRP-1 en hVSMC. El tratamiento de hVSMC con factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF) indujo expresiones del ARNm y proteína de NRP-1 mientras que el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de tipo insulínico-1 e interleuquina-1 $\beta$  no. b-FGF

indujo la fosforilación de Erk-1/2 y JNK. Los inhibidores de MEK1/2 y factor nuclear kappa B (NF-κB) (U0126 y TLCK, respectivamente) bloquearon la capacidad de b-FGF de inducir la expresión del ARNm de NRP-1, pero la inhibición de la actividad  
5 JNK (SP600125) o PI3-quinasa (wortmanina) no. Además, el aumento en la expresión de NRP-1 por b-FGF aumentó la migración de hVSMC en respuesta a VEGF165. Este efecto era dependiente de la unión de VEGF165 a VEGFR-2, ya que anticuerpos bloqueantes contra VEGFR-2, pero no contra VEGFR-1, inhibieron la migración  
10 inducida por VEGF165. En conclusión, b-FGF aumentó la expresión de NRP-1 en hVSMC que a su vez aumentó el efecto de VEGF165 en migración celular. La migración aumentada de las hVSMC estaba mediada a través de la unión de VEGF165 tanto a NRP-1 como a VEGFR-2, ya que la inhibición de VEGFR-2 en estas células  
15 bloqueó los efectos de la migración celular mediados por VEGF.

El artículo titulado "Overexpression of VEGF-C causes transient lymphatic hyperplasia but not increased lymphangiogenesis in regenerating skin" de Goldman et al. (Circ. Res., vol. 96:11 p. 1193-9 (2005)) describe que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-C es necesario para la  
20 linfangiogénesis y tiene potencial para terapia linfangiogénica en enfermedades que carecen de drenaje linfático adecuado. Sin embargo, la capacidad de VEGF-C de aumentar el crecimiento linfático funcional sostenible en tejidos permanece poco claro. Para abordar esto, se evaluó la sobreexpresión de VEGF-C en  
25 linfangiogénesis adulta en piel en regeneración. Se usó un modelo de regeneración de piel de cola de ratón que incorpora una suspensión de células tumorales que sobreexpresan VEGF-C, lo que proporciona un suplemento continuo de exceso de VEGF-C al  
30 medio natural de regeneración durante más de 25 días, o células tumorales control transfectadas de otra manera idénticas. Se encontró que el exceso de VEGF-C no aumentó la velocidad de migración de células linfáticas endoteliales (LEC), la densidad de vasos linfáticos o la tasa de funcionalidad, incluso aunque  
35 anteriormente estaba presente hiperplasia linfática. Además, la hiperplasia desapareció cuando los niveles de VEGF-C

disminuyeron, lo que se produjo después de 25 días, lo que hace los linfáticos indistinguibles de aquellos en los grupos control. In vitro, se mostró que mientras el VEGF-C derivado de células pudo inducir quimioatracción de LEC a través de una  
5 membrana (que implica trans migración de tipo ameboidea), no aumentó la quimioinvasión de LEC en una matriz de fibrina tridimensional (que requiere migración proteolítica). Estos resultados sugieren que mientras que el exceso de VEGF-C puede aumentar la proliferación temprana de LEC y producir hiperplasia  
10 de vasos linfáticos, no aumenta la tasa fisiológica de migración o funcionalidad, y por sí mismo no puede sostener ningún efecto duradero en tamaño, densidad u organización linfática en piel adulta en regeneración.

#### 15 **COMPENDIO**

Se describe que tanto la irradiación aguda como crónica con UVB de piel murina produce agrandamiento importante de vasos linfáticos. Sorprendentemente, estos vasos linfáticos agrandados están funcionalmente deteriorados y son hiperpermeables,  
20 detectado mediante linfangiografía intravital. Los niveles de expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-A, pero no de los factores linfangiogénicos conocidos VEGF-C o -D aumentaron en epidermis irradiada con UVB. La sobreexpresión dirigida de VEGF-A en epidermis de ratones transgénicos produjo  
25 agrandamiento y fuga incrementados de vasos linfáticos después de irradiación aguda con UVB, mientras que el bloqueo sistémico de la señalización de VEGF-A previno en gran parte anomalías en los vasos linfáticos y fotodaño inducido por UVB. En conjunto, estos descubrimientos indican que los vasos linfáticos  
30 son diana de fotodaño cutáneo inducido por UVB y que VEGF-A media el deterioro de la función de vasos linfáticos y por tanto contribuye a los efectos adversos de la irradiación de UVB sobre la piel.

En un aspecto, la divulgación presenta métodos de reducir  
35 el daño en la piel inducido por UVB disminuyendo la actividad o niveles de VEGF-A en la piel, por ejemplo, en la cara, pecho,

cuello, manos u otras regiones del cuerpo. Estos métodos pueden incluir además aumentar la actividad o niveles de un factor linfangiogénico, por ejemplo, VEGF-C o VEGF-D, en la piel.

En otro aspecto, la divulgación presenta métodos de reducir edema disminuyendo la actividad o niveles de VEGF-A.

En aún otro aspecto, la divulgación presenta métodos de reducir el daño en la piel inducido por UVB, por ejemplo, en la cara, pecho, cuello, manos u otras regiones de cuerpo, fomentando la función linfática.

En todavía otro aspecto, la divulgación presenta métodos de cribado para un inhibidor de la actividad de VEGF-A proporcionando una célula con un receptor transmembrana que se puede unir y responder a VEGF-A; poniendo en contacto la célula con un polipéptido que incluye VEGF-A o un fragmento del mismo en presencia de un compuesto de prueba, por ejemplo, un producto o extracto natural; y evaluando la unión del polipéptido a la célula, en donde un compuesto de prueba que inhibe la unión del polipéptido a la célula es un inhibidor de la actividad de VEGF-A.

En aún otro aspecto, la divulgación presenta métodos de cribado para un inhibidor de la actividad VEGF-A al proporcionar un primer polipéptido que incluye una parte de un receptor transmembrana que se puede unir a VEGF-A; poner en contacto el polipéptido con un segundo polipéptido que incluye VEGF-A o un fragmento del mismo en presencia de un compuesto de prueba, por ejemplo un producto o extracto natural; y evaluar la unión del primer polipéptido al segundo polipéptido, en donde un compuesto de prueba que inhibe la unión del primer polipéptido al segundo polipéptido es un inhibidor de la actividad VEGF-A.

En todavía otro aspecto, de cribado para un inhibidor de la expresión de VEGF-A, el método comprende: (a) proporcionar una célula que tiene una región promotora de VEGF-A; (b) exponer la célula a radiación UVB; (c) antes, durante o después de b), poner en contacto la célula con un compuesto de prueba, por ejemplo, un producto o extracto natural; y (d) medir la expresión dirigida por la región promotora, en donde un

compuesto de prueba que disminuye la expresión es un inhibidor de la expresión de VEGF-A.

En un aspecto, la divulgación presenta un método de tratar a un sujeto que tiene daño en la piel inducido por UVB, por ejemplo, en la cara, pecho, cuello, manos u otras regiones del cuerpo. El método incluye administrar, al sujeto, una cantidad terapéuticamente eficaz de un modulador de VEGF/VEGFR.

En una forma de realización, el modulador es un antagonista de VEGF-A/VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2). Un antagonista de VEGF-A/VEGFR es un agente que directa o indirectamente disminuye la actividad de VEGF-A/VEGFR en una célula o en el sujeto. Los antagonistas incluyen ácidos nucleicos y proteínas, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos solubles de receptores de VEGF-A. Por ejemplo, el antagonista puede ser una proteína que interacciona con VEGF-A y, por ejemplo, reduce la afinidad de unión de VEGF-A a VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) de la superficie celular. Por ejemplo, la proteína puede ser (i) un anticuerpo que reconoce VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2), o (ii) una proteína que incluye una región extracelular del VEGFR, por ejemplo, un receptor soluble de VEGF-A (por ejemplo, fusionada a un dominio Fc). Los ejemplos de antagonistas incluyen: una molécula de ácido nucleico que se puede unir o inhibir de otra manera el ARNm de VEGF-A, por ejemplo, la producción, procesamiento o traducción de ARNm. Aún otros antagonistas incluyen: una proteína VEGF-A o fragmento de la misma dominante negativo y un agente que disminuye la expresión del ácido nucleico de VEGF-A (por ejemplo, un factor de transcripción artificial o ácido nucleico que codifica un factor de transcripción artificial).

En algunas realizaciones, el modulador disminuye el nivel endógeno de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2).

En una forma de realización el modulador es un agonista de VEGF-C/D/VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3). Un agonista de VEGF-C/D/VEGFR es un agente que directa o indirectamente aumenta la actividad de VEGF-C/D/VEGFR en el sujeto.

Muchos agonistas de VEGF-C/D/VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) aumentan la actividad de señalización de VEGFR. Los ejemplos de

agonistas de VEGF-C/D/VEGFR incluyen una proteína que incluye un polipéptido VEGF-C/D (por ejemplo, modificado en su forma heterodimérica madura) o un fragmento biológicamente activo del mismo, un ácido nucleico que codifica un VEGF-C/D o un fragmento biológicamente activo del mismo.

Los moduladores se pueden usar para tratar una afección en la que se desea una función de vasos linfáticos aumentada. Tales afecciones incluyen edema, por ejemplo, debido a la irradiación UVB. Otras afecciones en las que se desea función de vasos linfáticos aumentada incluyen piel envejecida o piel dañada, por ejemplo piel dañada por UVB. Aún otras afecciones incluyen las producidas en parte por un factor genético o medioambiental, por ejemplo radiación ultravioleta. Por ejemplo, la afección es daño a la matriz extracelular de la piel, por ejemplo producido por envejecimiento o exposición excesiva a luz ultravioleta.

En otro aspecto, la divulgación presenta un método de identificar un compuesto que modula la función linfática. El método incluye: proporcionar una célula u organismo en el que se puede seguir la actividad VEGF-A/VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2); poner en contacto la célula u organismo con un compuesto de prueba y evaluar la actividad VEGF-A/VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) en la célula u organismo. Por ejemplo, la célula incluye un indicador de la actividad de VEGF-A/VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) o un organismo que comprende tal célula. La actividad de VEGF-A/VEGFR se puede evaluar mediante evaluación, por ejemplo, de la expresión de proteína o ARNm o la actividad indicadora. Un cambio en la actividad indicadora u otro parámetro relevante, por ejemplo, indica un cambio en la actividad VEGF-A/VEGFR. El método puede incluir además evaluar el efecto del compuesto de prueba sobre la proliferación celular o la migración celular, por ejemplo, proliferación o migración de células linfáticas endoteliales.

En una forma de realización, el indicador es un gen que comprende una secuencia que codifica una proteína detectable y un promotor operativamente unido que incluye una región del promotor del gen VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2), por

ejemplo, una región desde el sitio de inicio de la transcripción hasta una posición al menos 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000 o 5000 bases en dirección 5', desde el codón iniciador MET hasta una posición al menos 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000 o 5000 bases en dirección 5' o desde la caja TATA hasta una posición al menos 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000 o 5000 bases en dirección 5'.

La célula u organismo es en general de mamífero, por ejemplo, humano o no humano, por ejemplo, un ratón, rata, hámster, cobaya, mono, etcétera.

En aún otro aspecto, la divulgación presenta un método para evaluar un compuesto de prueba, por ejemplo, un compuesto que se aplica por vía tópica a un organismo de prueba, por ejemplo un organismo transgénico que incluye un indicador de la actividad de la vía VEGF-A/VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2). El método incluye poner en contacto un compuesto de prueba con el organismo de prueba y evaluar la actividad de la vía VEGF-A/VEGFR. Por ejemplo, la evaluación puede incluir evaluar la expresión de proteína o ARNm de VEGF-A, VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) o un gen o producto génico que está regulado por VEGFR. El método también puede incluir evaluar el compuesto de prueba en presencia de otro modulador de la vía VEGF-A/VEGFR, por ejemplo, en presencia de una proteína que incluya VEGF soluble, una proteína que incluya un dominio extracelular soluble de VEGFR o un anticuerpo contra VEGF-A o VEGFR.

En una forma de realización, el indicador es un gen que incluye una secuencia que codifica una proteína detectable y un promotor operativamente unido que incluye una región del promotor del gen VEGF o VEGFR, por ejemplo, una región desde el sitio de inicio de la transcripción hasta una posición al menos 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000 o 5000 bases en dirección 5', desde el codón iniciador MET hasta una posición al menos 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000 o 5000 bases en dirección 5' o desde la caja TATA hasta una posición al menos 100, 200, 300, 500, 800, 1000, 2000 o 5000 bases en dirección 5'. El método también puede incluir evaluar dos o más de tales indicadores.

El método puede incluir seleccionar un compuesto de prueba (por ejemplo, de una librería de compuestos de prueba), si altera (por ejemplo aumenta o disminuye) la actividad de la vía VEGF/VEGFR. Se puede formular un compuesto de prueba  
5 seleccionado, por ejemplo, como una composición farmacéutica, por ejemplo, adecuada para administración tópica u otra vía de administración. El método puede incluir además administrar la composición farmacéutica a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene o está expuesto a un trastorno descrito aquí.

10 En un aspecto, la invención presenta un método para identificar un agente que modula, por ejemplo reduce, daño en la piel, por ejemplo, daño a la piel inducido por radiación tal como daño en piel inducido por UVB crónica o aguda. El método incluye identificar un agente que modula, por ejemplo,  
15 disminuye, la señalización de VEGF-A (por ejemplo, un agente que reduce la expresión, actividad o niveles de VEGF-A o de un receptor de VEGF (VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2)) y correlacionar la capacidad de un agente para modular la señalización, niveles o actividad de VEGF-A con la capacidad para modular el daño en  
20 la piel, por ejemplo, daño en la piel inducido por radiación tal como daño en piel inducido por UVB crónica o aguda. El método puede incluir además seleccionar un agente identificado, por ejemplo, un agente que modula el daño a la piel.

En una forma de realización, el agente se identifica  
25 evaluando la capacidad de un agente de prueba de interaccionar con, por ejemplo, unirse a, VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2). En otra forma de realización, el agente se identifica evaluando el efecto de un agente de prueba para interaccionar con una región reguladora de VEGF-A o VEGFR, por ejemplo, un  
30 promotor, por ejemplo, un promotor de VEGF-A o VEGFR. En otra forma de realización, el agente se identifica evaluando el efecto del agente de prueba en la producción de VEGF-A en una célula de piel, por ejemplo, un queratinocito. En otra forma de  
realización, el agente se identifica evaluando, por ejemplo,  
35 evaluando de forma cuantitativa o cualitativa, la capacidad de un agente de prueba de modular señalización aguda de VEGF-A en

un modelo de animal completo, por ejemplo, en un animal transgénico para VEGF-A tal como un animal que sobreexpresa VEGF-A.

El agente de prueba puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico (por ejemplo, un antisentido, ribozima), un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo), un fragmento peptídico o un peptidomimético. El agente de prueba se puede evaluar en una forma purificada, por ejemplo al menos el 10, el 50, el 70, el 80, el 90 o el 99% puro, por ejemplo, en una composición homogénea que no incluye otros agentes de prueba. En otra forma de realización preferida, el agente de prueba es un miembro de una librería combinatoria, por ejemplo una librería combinatoria de péptidos. En una forma de realización preferida, se prueban una pluralidad de agentes de prueba, por ejemplo miembros de una librería. Preferiblemente, los agentes de prueba de la pluralidad, por ejemplo, librería, comparten características estructurales o funcionales.

El método puede incluir comparar, correlacionar o asociar el efecto del agente sobre la expresión, niveles o actividad de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2), con un efecto predicho del agente en un mamífero, por ejemplo, un ser humano, por ejemplo, que proporciona (por ejemplo, al gobierno, personal sanitario, compañía de seguros o paciente) material informativo, comercial o instrucciones, por ejemplo, material impreso o material legible por ordenador (por ejemplo una etiqueta, un correo electrónico), relacionado con el agente o su uso, identificando los efectos del agente como un efecto posible o predicho del agente en un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Por ejemplo, el método puede incluir identificar el agente como un agente que reduce el daño a piel inducido por UVB aguda, por ejemplo, en seres humanos, si disminuye la expresión, niveles o actividad de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2), comparado con una referencia. La identificación puede estar en forma de material informativo, comercial o instrucciones, por ejemplo, como se describe aquí. En una forma de realización, el método incluye correlacionar un valor para el efecto del agente con la

capacidad de reducir el daño a la piel, por ejemplo, generando un conjunto de datos que correlacionen un valor para el efecto del agente con la capacidad de reducir el daño a la piel.

En una forma de realización, el método incluye al menos dos  
5 pasos de evaluación, por ejemplo, el método incluye un primer paso de evaluar el agente de prueba en un primer sistema, por ejemplo, un sistema sin células, basado en células, de tejido o un modelo animal, y un segundo paso de evaluar el agente de prueba en un segundo sistema, por ejemplo, un segundo sistema de  
10 células o tejidos o en un animal no humano. En una forma de realización, uno de los pasos de evaluación incluye evaluar el efecto del agente sobre la piel de un sujeto o explante de piel, por ejemplo, evaluando la presencia, extensión o tipo de daño a la piel en la piel, preferiblemente antes y después de  
15 exposición aguda a UVB. El sujeto puede ser un animal de experimentación o un ser humano. En una forma de realización, la primera evaluación incluye probar el efecto del agente de prueba sobre un promotor de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) que está unido a una secuencia heteróloga tal como un gen indicador,  
20 y la segunda evaluación incluye administrar el agente de prueba a un sistema, por ejemplo un sistema de células o animal y evaluar el efecto del agente en el daño a la piel y/o producción de VEGF. En algunas formas de realización, el método incluye dos pasos de evaluación en el mismo tipo de sistema, por ejemplo, el  
25 agente se reevalúa en un animal no humano después de una primera evaluación en el mismo animal no humano o uno diferente. Las dos evaluaciones pueden estar separadas por cualquier extensión de tiempo, por ejemplo, días, semanas, meses o años.

En una forma de realización preferida, el paso de  
30 identificación incluye: (a) proporcionar un agente a una célula, tejido o animal no humano cuyo genoma incluye un ácido nucleico exógeno que incluye una región reguladora de un gen VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) (véase, por ejemplo, Gille et al., EMBO J. 1997 vol. 16(4):750-9 para el promotor de VEGF-A y  
35 Giraud et al., J Biol Chem. 1998 vol. 273(34):22128-35 para el promotor de VEGFR-2 (flkl1)), operativamente unido a una secuencia

heteróloga, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido indicador (por ejemplo, un polipéptido indicador colorimétrico (por ejemplo, LacZ), luminométrico, por ejemplo, luciferasa, o fluorescentemente detectable, por ejemplo, GFP, EGFP, BFP, RFP); (b) evaluar la capacidad de un agente de prueba de modular la expresión del polipéptido indicador en la célula, tejido o animal no humano; y (c) seleccionar un agente de prueba que modula la expresión del polipéptido indicador como un agente que modula el daño a la piel inducido por UVB aguda.

En una forma de realización, el animal es un roedor experimental. El animal puede ser un animal experimental de tipo salvaje o transgénico, por ejemplo un roedor transgénico para VEGF-A, por ejemplo un ratón transgénico para VEGF-A. El sujeto también puede ser un ser humano. En una forma de realización preferida, el paso de evaluación comprende administrar el agente al sujeto y evaluar el daño a la piel (por ejemplo, daño en la piel producido por exposición aguda a UVB). En otra forma de realización, la célula o tejido es una célula de piel, por ejemplo, un queratinocito, o tejido de piel, por ejemplo, un explante de piel. En aún otra forma de realización, una célula, por ejemplo, una célula de piel, por ejemplo, un queratinocito, o tejido de piel, por ejemplo, un explante de piel, deriva de un animal transgénico.

En otro aspecto, la invención presenta una composición para su uso en un método de tratar un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano. El método incluye (a) identificar un sujeto expuesto a, o que tiene, edema o daño en la piel, por ejemplo, debido a exposición a radiación, por ejemplo, exposición crónica o aguda a UVB; y (b) administrar al sujeto un agente (por ejemplo, un producto o extracto natural) que modula la señalización de VEGF-A en el sujeto, por ejemplo, administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente que disminuye la actividad, nivel o expresión de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2), por ejemplo, un agente descrito aquí. Preferiblemente, el agente se administra a la piel del sujeto, por ejemplo, por vía tópica. En

una forma de realización preferida, se previenen o reducen eritema, inflamación, edema, ampollas, hinchazón y/o quemaduras solares inducidas por UVB aguda. La exposición aguda a UVB significa exposición a al menos una MED de luz UVB, preferiblemente al menos 2, 3 o 5 MED. En una forma de realización, el sujeto se expone a entre 3-8 MED, por ejemplo, 3-5, 5-7 o 7-8 MED. En algunas formas de realización, el sujeto se expondrá, se expone o se ha expuesto al sol cuando el índice de UV es de moderado a extremo, por ejemplo, durante un tiempo suficiente para producir quemaduras. El sujeto puede mostrar uno o más síntomas de exposición aguda a UVB, por ejemplo inflamación, eritema, hinchazón, ampollas, dolor o edema de la piel. Típicamente, el sujeto tiene al menos 5 años de edad. Preferiblemente, el sujeto tiene al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 años de edad o más.

En una forma de realización preferida, el agente se administra a través de un transportador liposómico, por ejemplo, un liposoma de lecitina o un liposoma de alquilfosfolípido. El agente se puede administrar a la cara, pecho, cuello, manos y otras regiones del cuerpo. El tratamiento puede implicar más de una administración, por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro administraciones, del agente. El tratamiento también puede implicar la administración diaria del agente.

En una forma de realización, el método incluye administrar el agente en combinación con un segundo tratamiento, por ejemplo, un segundo tratamiento para la piel, por ejemplo, un protector solar, antibiótico, hidratante, un ácido retinoico, un derivado retinoide o un ácido alfa-hidroxi. En algunas formas de realización, el agente se administra al sujeto en combinación con un dispositivo de liberación controlada, por ejemplo, un polímero, micropartícula o malla biocompatible. El dispositivo puede reducir la degradación y controlar la liberación del agente.

En algunas formas de realización, el método incluye evaluar el daño en la piel del sujeto. La evaluación se puede realizar antes, durante y/o después de la administración del agente. Por

ejemplo, se puede realizar la evaluación al menos 4 horas, 8 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 4, 7, 14 o más días antes y/o después de la administración.

En una forma de realización preferida, la administración de un agente se puede realizar: antes de la exposición a la luz UVB, por ejemplo, antes de la exposición al sol; cuando se advierte o diagnostica el daño en la piel (por ejemplo, quemadura solar, hinchazón, eritema y/o inflamación) inducido por UVB crónica o aguda; al tiempo en que se empieza un tratamiento para un trastorno relacionado con daño en la piel o empieza a ejercer su efecto; o en general, según se necesita para mantener la salud de la piel.

El periodo durante el que se administra el agente, o el periodo durante el que mantienen niveles clínicamente eficaces en el sujeto, puede ser a corto plazo, por ejemplo, durante un día, dos días, una semana, o a largo plazo, por ejemplo, durante seis meses o más o un año o más, o a corto plazo, durante menos de un año, seis meses, un mes, dos semanas o menos.

La identificación de un sujeto en necesidad de daño en la piel alterada la puede realizar, por ejemplo, el sujeto, personal sanitario, un suministrador de un tratamiento para el daño en la piel u otra persona. El agente lo puede administrar, por ejemplo, el sujeto, personal sanitario, un suministrador de un tratamiento para el daño en la piel u otra persona. Asimismo, la evaluación del efecto en el daño en la piel la puede realizar, por ejemplo, el sujeto, personal sanitario, un suministrador de un tratamiento para el daño en la piel u otra persona.

Un agente que disminuye la señalización de VEGF-A puede ser, por ejemplo: una proteína que se une a VEGF-A o una proteína que se une a VEGFR-2. Por ejemplo, tales proteínas de unión se pueden unir e inhibir VEGF-A o unir e inhibir la actividad de VEGFR-2. La proteína de unión puede inhibir la capacidad de VEGF-A o VEGFR-2 de interaccionar entre sí o con otro compañero de unión. En una forma de realización, la proteína de unión es un anticuerpo que se une específicamente a

VEGF-A o VEGFR-2, por ejemplo, un anticuerpo que rompe la capacidad de VEGF o VEGFR-2 de unirse a un compañero de unión o entre sí. Otro agente ejemplar es un VEGF-A mutado inactivo que se une a VEGF-A o VEGFR-2 pero interrumpe la señalización de VEGF. Aún otro agente ejemplar es VEGFR-2 (por ejemplo, una variante sin señalización) o un fragmento del mismo (por ejemplo, un dominio extracelular de VEGFR-2) que se une a VEGF-A o VEGFR-2- pero interrumpe la señalización de VEGF-A. Agentes ejemplares adicionales incluyen una molécula de ácido nucleico de VEGF-A o VEGFR-2 que se puede unir a la secuencia de ácido nucleico de VEGF-A o VEGFR-2 celular, por ejemplo ARNm y puede inhibir la expresión de la proteína, por ejemplo, una molécula antisentido, ARNip o ribozima.

Por ejemplo, se pueden tratar sujetos con antagonistas de VEGF, por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF tales como bevacizumab; o antagonistas del receptor de VEGF, por ejemplo, anticuerpos anti-receptor de VEGF.

Los inhibidores y antagonistas del receptor de VEGF de ejemplo incluyen inhibidores de la actividad tirosina quinasa del receptor de VEGF. 4-[4-(1-Amino-1-metiletil)fenil]-2-[4-(2-morfolin-4-il-etil)fenilamino]pirimidin-5-carbonitrilo (JNJ-17029259) es uno de una clase estructural de 5-cianopirimidinas inhibidores selectivos, nanomolar que están disponibles por vía oral, de receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR-2). Ejemplos adicionales incluyen: PTK-787/ZK222584 (Astra-Zeneca), SU5416, SU11248 (Pfizer) y ZD6474 ([N-(4-bromo-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxi]-quinazolin-4-amina]). Aún otros agentes que se pueden usar son inhibidores de tirosinas quinasa de amplia especificidad, por ejemplo SU6668. Véase, por ejemplo, Bergers, B. et al. (2003) J. Clin. Invest. 111, 1287-1295.

En otra forma de realización preferida, VEGF-A o VEGFR-2 se inhiben disminuyendo el nivel de expresión de un gen endógeno de VEGF-A o VEGFR-2, por ejemplo, disminuyendo la transcripción del gen VEGF-A o VEGFR-2. En una forma de realización preferida, la transcripción del gen VEGF-A o VEGFR-2 se puede disminuir por:

alteración de las secuencias reguladoras del gen endógeno de VEGF-A o VEGFR-2, por ejemplo, mediante la adición de una secuencia reguladora negativa, tal como un sitio de unión a ADN para un represor transcripcional, o mediante la eliminación de una secuencia reguladora positiva, tal como un potenciador o un sitio de unión a ADN para un activador transcripcional. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo que se une a VEGF-A o VEGFR-2 es un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo quimérico humanizado o monoclonal humano.

En una forma de realización, un agente que disminuye la expresión de VEGF es una molécula de ácido nucleico de VEGF-A o VEGFR-2 que se puede unir a una secuencia de ácido nucleico de VEGF-A o VEGFR-2 celular, por ejemplo ARNm, y puede inhibir la expresión de la proteína, por ejemplo un antisentido, una molécula de ARNip o una ribozima.

La composición terapéutica además se usa para aumentar la actividad de uno más factores linfogénicos, por ejemplo, aumentar la actividad de proteínas linfogénicas naturales tales como VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) en el sujeto. La actividad de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) se puede aumentar, por ejemplo, administrando un agente que aumente la actividad de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3). En una forma de realización preferida, un agente que aumenta la actividad de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) puede ser uno o más de los siguientes: un polipéptido VEGF-C o -D, o un fragmento biológicamente activo del mismo, por ejemplo, un polipéptido derivado de VEGF-C o -D; un ácido nucleico que codifica un polipéptido VEGF-C o -D o un fragmento biológicamente activo del mismo.

En una forma de realización preferida, VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) se aumenta por un agente que induce la expresión de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3). En formas de realización preferidas, un agente que induce la expresión de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) se administra por vía tópica. En formas de realización preferidas, el agente se administra a un sujeto suficientemente antes de la

exposición a UVB, por ejemplo, exposición al sol, de modo que el efecto en linfogénesis está presente en la piel del sujeto al tiempo de la exposición a UVB.

La actividad de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) también se puede aumentar mediante liberación controlada al sujeto de un ácido nucleico de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) o una proteína o fragmento VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3). Se puede administrar al sujeto un ácido nucleico, proteína o fragmento VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) en combinación con un dispositivo de liberación controlada, por ejemplo, un polímero, micropartícula o malla biocompatible. El dispositivo puede reducir la degradación y controlar la liberación del ácido nucleico, proteína o fragmento de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3). Tal sistema biocompatible de liberación controlada de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) se puede administrar al sujeto, por ejemplo, mediante inyección o implantación, por ejemplo, por vía intramuscular, subcutánea, intravenosa o en un órgano, cavidad articular o en una lesión.

El nivel de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) también se puede aumentar aumentando la actividad endógena de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3). La actividad se puede aumentar aumentando el nivel de expresión del gen, por ejemplo aumentando la transcripción del gen VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3); aumentando la estabilidad del ARNm de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3), por ejemplo, alterando la estructura secundaria o terciaria del ARNm; aumentando la traducción del ARNm de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3), por ejemplo, cambiando la secuencia del ARNm de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3); y/o aumentando la estabilidad de la proteína VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3). La transcripción del gen VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) se puede aumentar, por ejemplo, cambiando las secuencias reguladoras del gen VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) endógeno. En una forma de realización, la secuencia reguladora se puede cambiar mediante: la adición de un elemento

regulador positivo (tal como un potenciador o un sitio de unión a ADN para un activador transcripcional); la delección de un elemento regulador negativo (tal como un sitio de unión a ADN para un represor transcripcional) y/o cambio de la secuencia reguladora endógena, o elementos en ella, por la de otro gen, permitiendo de esta manera que se transcriba el gen de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) de forma más eficaz.

En otro aspecto, la invención presenta composiciones que contienen un agente, por ejemplo, un agente descrito aquí, por ejemplo, un agente identificado mediante un método de cribado descrito aquí, que disminuye la expresión, actividad o nivel de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2), para reducir el daño a la piel inducido por UVB crónica o aguda. En una forma de realización preferida, la composición es una composición cosmética, por ejemplo, formulada para administración tópica. En una forma de realización preferida, la composición también tiene una fragancia, un conservante u otro ingrediente cosmético, por ejemplo, un hidratante o un agente de protección solar, por ejemplo metoxicinamato de octilo, ácido aminobenzoico, oxibenzona, padimato O, homosalato o dióxido de titanio. La composición se puede suministrar en un champú, aceite, crema, loción, jabón, espuma, gel u otra preparación cosmética. En una forma de realización preferida, la composición también tiene un ingrediente cosmético, por ejemplo, una fragancia o un hidratante.

En otro aspecto, la invención presenta el uso de un agente, por ejemplo, un agente descrito aquí, por ejemplo, un agente identificado mediante un método de cribado descrito aquí, que disminuye la expresión, actividad o nivel de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo VEGFR-2), para la preparación de un medicamento para reducir el daño en la piel inducido por UVB crónica o aguda. En algunas formas de realización, el medicamento comprende además un agente que aumenta la expresión, actividad o nivel de VEGF-C, VEGF-D o VEGFR-3.

En otro aspecto, la invención presenta una composición para su uso en un método de modular el daño a la piel en un sujeto.

El método incluye suministrar al sujeto una composición que contiene un agente que afecta la expresión, actividad o nivel de un componente de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2), por ejemplo, un agente descrito aquí, por ejemplo, un agente  
5 identificado mediante un método de cribado descrito aquí, y suministrar al sujeto instrucciones para la aplicación del agente, por ejemplo, para tratar daño a la piel tal como daño a la piel inducido por UVB aguda.

En otro aspecto, la invención presenta un kit para modular  
10 el daño a la piel de un sujeto que incluye una composición descrita aquí, por ejemplo, una composición que contiene un agente que afecta la expresión, actividad o nivel de un componente de VEGF o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2); e instrucciones para el uso, por ejemplo instrucciones para  
15 aplicar la composición a un área del cuerpo en necesidad de tratamiento para daño en la piel inducido por UVB aguda, por ejemplo, eritema, hinchazón, quemadura solar y/o inflamación. En una forma de realización preferida, la composición también tiene un ingrediente cosmético, por ejemplo, una fragancia o  
20 hidratante.

Se define una cantidad eficaz del agente de la presente invención como la cantidad de una composición que, tras administración a un sujeto (por ejemplo, un ser humano), reduce el daño en la piel en el sujeto. La cantidad eficaz a ser  
25 administrada a un sujeto típicamente se basa en una variedad de factores que incluyen la edad, sexo, área de superficie, peso y estado de la piel. El área de superficie corporal se puede determinar aproximadamente de la altura y el peso del paciente. Véase, por ejemplo, Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals,  
30 Ardley, Nueva York, 1970, 537. Las dosis eficaces variarán, como reconocen los expertos en la materia, dependiendo de la vía de administración, uso de excipiente y la posibilidad de co-uso con otros tratamientos tal como el uso de otros compuestos moduladores del daño en la piel.

35 En otro aspecto, la divulgación presenta un método que incluye: aplicar, a una región de la piel de un sujeto humano

(por ejemplo, antebrazos, piernas, espalda, torso, cabeza, cara, cuero cabelludo, una cantidad protectora de un inhibidor de la señalización de VEGF; y exponer el sujeto a irradiación, por ejemplo, a la luz solar, por ejemplo luz solar directa o  
5 intensa, o a una luz UV, por ejemplo, como en un salón de bronceado. Una cantidad protectora es una cantidad suficiente para reducir el daño en la piel a un nivel detectable o estadísticamente significativo.

En otro aspecto, la divulgación presenta métodos de seguir  
10 un sujeto o células de un sujeto, por ejemplo células de la piel. Los métodos incluyen evaluar la expresión de uno o más de VEGF-A, -C y -D. Un aumento en los niveles de VEGF-A y un descenso en los niveles de VEGF-C o -D, relativos a una referencia (por ejemplo, células control o sin irradiar) puede  
15 indicar que el sujeto o células del sujeto están expuestas a o han estado expuestas a condiciones de daño en la piel, por ejemplo irradiación, por ejemplo, irradiación UVB.

Como se usa aquí, la exposición a radiación UVB significa exposición a luz solar natural o radiación UVB artificial (por  
20 ejemplo a una lámpara solar UVB, por ejemplo para bronceado o para fototerapia, por ejemplo, para tratamiento de psoriasis, dermatitis atópica o vitíligo) de al menos una MED.

Los detalles de uno o más formas de realización de la invención se explican en las figuras acompañantes y la  
25 descripción posterior. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán aparentes de la descripción y figuras y de las reivindicaciones.

#### **DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

30 Las figuras 1A-B son micrografías de muestras de tejido de piel teñidas con hematoxilina/eosina que muestran el agrandamiento de los vasos linfáticos después de irradiación crónica de UVB (figura 1B), pero no en piel irradiada de referencia (figura 1A). Barras de escala: 100  $\mu$ m.

35 Las figuras 1C-D son micrografías de inmunofluorescencias para CD31 y LYVE-1 en muestras de tejido de piel irradiadas con

UVB (figura 1D) o irradiada de referencia (figura 1C). Las muestras de piel irradiadas con UVB mostraron aumento moderado de vasos sanguíneos CD31+/LYVE-1- en piel irradiada con UVB (figura 1D). Los vasos linfáticos cutáneos positivos para LYVE-1  
5 aumentaron mucho de tamaño, con formas irregulares y algunas veces recubrimiento celular endotelial incompleto, mientras que en los animales irradiados de referencia solo se encontraron vasos linfáticos normales, colapsados (figura 1D). Barras de escala: 100  $\mu$ m.

10 Las figuras 1E-G son gráficos de barras que representan análisis morfométricos de muestras de piel de ratones irradiados con UVB crónica e irradiados de referencia. La figura 1E muestra el área cubierta por vasos linfáticos en muestras de piel de ratones irradiados con UVB crónica e irradiados de referencia.  
15 La figura 1F muestra el tamaño medio de vasos linfáticos en muestras de piel de ratones irradiados con UVB crónica e irradiados de referencia. La figura 1G muestra la densidad de vasos linfáticos en muestras de piel de ratones irradiados con UVB crónica e irradiados de referencia. El área cubierta por  
20 vasos linfáticos (figura 1E) y el tamaño medio de los vasos linfáticos (figura 1F) aumentaron significativamente en piel irradiada con UVB comparada con piel irradiada de referencia (\*\*,  $p < 0,01$ ).

Las figuras 2A-F son fotografías de orejas de ratón con  
25 colorante azul de Evans inyectado por vía intradérmica. Las figuras 2A-C muestran ratones irradiados de referencia. Las figuras 2D-F muestran ratones irradiados crónicamente con UVB. Se muestra la diseminación del colorante 1 minuto (Figuras 2A y 2D), 3 minutos (figuras 2 B y E) y 5 minutos (figuras 2C y 2F)  
30 después de la inyección. 1 y 3 minutos después de la inyección de la tinta, se visualizaron vasos linfáticos marcadamente dilatados en piel de ratón irradiada crónicamente con UVB (figuras 2D-E), comparado con ratones irradiados de referencia (figuras 2A-B). Después de 5 minutos, el colorante azul de Evans se había  
35 extravasado de los vasos linfáticos en piel irradiada

crónicamente con UVB (figura 2F), mientras que no se observó tal fuga en ratones irradiados de referencia (figura 2C).

Las figuras 3A-C son gráficos de barras que muestran el análisis cuantitativo de RT-PCR a tiempo real de los ARN totales aislados de la epidermis de la piel de oreja 48 horas después de la irradiación crónica de UVB. La expresión del ARNm de VEGF-A (figura 3A) aumentó en epidermis irradiada con UVB, comparada con controles irradiados de referencia (\*\*\*,  $p < 0,01$ ). Por el contrario, los niveles de expresión de VEGF-C (figura 3B) y VEGF-D (figura 3C) eran comparables en ambos grupos.

Las figuras 4A-I son fotografías de orejas de ratón con colorante azul de Evans inyectado por vía intradérmica. Las figuras 4A-C muestran ratones irradiados de referencia (0  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ). Las figuras 4D-F muestran ratones dos días después de una única dosis de 40  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  de UVB (0,5 MED). Las figuras 4G-I muestran ratones dos días después de una única dosis de 80  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  de UVB (1 MED). La diseminación del colorante se muestra 1 minuto (figuras 2A, 2D y 2G), 3 minutos (figuras 2B, 2E y 2H) y 5 minutos (figuras 2C, 2F y 2I) después de la inyección. La irradiación con una dosis de 80  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  de UVB (1 MED) produjo agrandamiento de vasos linfáticos cutáneos (figuras 4G-H) y fuga pronunciada (figura 4I).

Las figuras 4J-L son micrografías de inmunofluorescencia para CD31 y LYVE-1 en muestra de piel irradiada con 0  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  (figura 4J), 40  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  (figura 4K) y 80  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  (figura 4L). Los análisis de inmunofluorescencia diferencial de secciones de piel para LYVE-1 y CD31 revelaron agrandamiento marcado de vasos linfáticos LYVE-1+ después de irradiación de UVB con 80  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  (figura 4L). No se observaron tales cambios en piel no irradiada (figura 4J) o en piel irradiada con 40  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  (figura 4K). Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

Las figuras 5A-D son micrografías de inmunofluorescencia para CD31 y LYVE-1 en muestras de piel de ratones de tipo salvaje (figuras 5A y 5C) y transgénicos para VEGF (figuras 5B y 5D) irradiados con un única dosis de 40  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  de UVB (figuras 5C-D) o irradiados de referencia (figuras 5A-B). Los ratones

transgénicos para VEGF irradiados de referencia mostraron un ligero aumento en el tamaño de los vasos linfáticos (figura 5B), comparado con los ratones de tipo salvaje (figura 5A). Los vasos linfáticos aumentaron drásticamente en ratones transgénicos de VEGF irradiados con UVB (figura 5D), asociado con la formación de edema. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

Las figuras 5E-F son gráficos de barras que muestran análisis morfométricos de muestras de piel de ratones de tipo salvaje y transgénicos para VEGF irradiados con UVB crónica e irradiados de referencia. La figura 5E representa el tamaño medio de los vasos linfáticos en muestras de piel de ratones de tipo salvaje y transgénicos para VEGF irradiados con UVB crónica e irradiados de referencia. La figura 5F representa la densidad de vasos linfáticos en muestras de piel de ratones de tipo salvaje y transgénicos para VEGF irradiados con UVB crónica e irradiados de referencia. Los análisis morfométricos mostraron un aumento de 1,3 veces en el tamaño de vasos linfáticos en ratones transgénicos para VEGF irradiados de referencia comparados con ratones de tipo salvaje (\*,  $p < 0,05$ ) y un aumento de 1,9 veces después de irradiación con UVB (\*\*,  $p < 0,01$ ) (figura 5E). La densidad de los vasos linfáticos era comparable en todos los grupos (figura 5F).

Las figuras 6A-D son micrografías de inmunofluorescencia para CD31 y tinción de Hoechst (figuras 6A-B) o CD31 y LYVE-1 (figuras 6C-D) en muestras de piel de ratones irradiados con una única dosis de 54  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  de irradiación UVB un día después de inyección intraperitoneal de un anticuerpo bloqueante contra VEGF-A (figuras 6B y 6D) o de IgG control (figuras 6A y 6C). Las tinciones de doble inmunofluorescencia para CD31 y LYVE-1 2 días después de la irradiación con UVB revela agrandamiento de los vasos linfáticos positivos para LYVE-1 (puntas de flecha), así como una dilatación moderada de vasos sanguíneos CD31+/LYVE-1- (flecha) en ratones tratados con IgG control (figuras 6A y 6C). El tratamiento con anti-VEGF-A previno el agrandamiento de vasos linfáticos y sanguíneos (figuras 6B y 6D). Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

**DESCRIPCIÓN DETALLADA**

La irradiación ultravioleta B (UVB) de la piel induce eritema, degradación de las moléculas de la matriz extracelular y arrugas en la piel. Los vasos linfáticos desempeñan un papel importante en mantener el equilibrio líquido en piel normal. Se ha encontrado que la irradiación de UVB tanto aguda como crónica de piel murina produce agrandamiento importante de vasos linfáticos. Sorprendentemente, estos vasos linfáticos agrandados estaban funcionalmente deteriorados y eran hiperpermeables, detectado mediante linfangiografía intravital. Los niveles de expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-A, pero no de VEGF-C o -D estaban aumentados en epidermis irradiada con UVB. La sobreexpresión dirigida de VEGF-A en la epidermis de ratones transgénicos produjo agrandamiento aumentado y, sorprendentemente, también fuga de vasos linfáticos después de irradiación aguda de UVB, mientras que el bloqueo sistémico de la señalización de VEGF-A previno en gran parte anomalías en los vasos linfáticos y también previno fotodaño inducido por UVB. En conjunto, estos descubrimientos indican a los vasos linfáticos como nuevas dianas para prevenir el fotodaño cutáneo inducido por UVB, y también sugieren que el fomento de la función linfática, por ejemplo, mediante factores linfoangiogénicos tales como VEGF-C, puede aliviar los efectos dañinos de la irradiación UVB -que están mediados en parte por VEGF-A- en la piel. Según esto, esta solicitud presenta métodos de tratar (por ejemplo, reducir, aliviar o prevenir) el daño en la piel (por ejemplo, inducido por UVB) disminuyendo los niveles de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2), por ejemplo, en la piel, de un sujeto.

VEGF y los receptores de VEGF se revisan, por ejemplo, en Shibuya y Claesson-Welsh (2006) Exp. Cell Res. 312:549-60; Byrne et al. (2005) J. Cell. Mol. Med. 9:777-94; y Coultas et al. (2005) Nature 438:937-45.

35

Daño por UVB

El índice UV (desarrollado por la Agencia de protección medioambiental de los Estados Unidos) indica la intensidad de los rayos UV del sol en un día determinado. Hay cuatro categorías- moderado (índice de UV es menor de 3), alto (índice de UV es de 3 a 6), muy alto (el índice de UV es de 6 a 10) y extremo (el índice de UV es mayor de 10). Un índice de UV moderado significa que se necesitará más de una hora para que se quememe piel; un nivel extremo significa que se necesitarán menos de 15 minutos. El índice se incluye con frecuencia en la información meteorológica. Clínicamente, la exposición a UVB se mide en dosis mínima de eritema (MED). Una MED es la cantidad de UV requerida para producir una quemadura solar en piel sensible. El daño en la piel de moderado a grave inducido por UVB aguda, por ejemplo, quemadura solar, se puede producir a 3-8 MED.

15

#### Métodos de cribado

Existen numerosos métodos para evaluar si un agente puede modular la señalización de VEGF-A, por ejemplo, la expresión génica, actividad o nivel de VEGF-A o VEGFR. En una forma de realización, se evalúa la capacidad de un agente de prueba para modular, por ejemplo, aumentar o disminuir, por ejemplo, de forma permanente o temporal, la expresión del promotor del gen de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) mediante, por ejemplo, ensayo de transcripción de indicador (por ejemplo, LacZ o GFP o luciferasa) rutinario. Por ejemplo, una célula o animal transgénico cuyo genoma comprende un gen indicador unido operativamente a un promotor de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2), se puede poner en contacto con un agente de prueba, y la capacidad del agente de prueba de aumentar o disminuir la actividad del indicador es indicativa de la capacidad del agente de modular el daño en la piel por UVB aguda. En otra forma de realización, la capacidad de un agente de prueba para modular la expresión génica de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2), o la actividad o nivel de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) se evalúa en un animal transgénico, por ejemplo, el animal transgénico descrito aquí.

También se puede evaluar el efecto del agente de prueba en la expresión génica de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) o actividad o nivel de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) en una célula, lisado celular o sujeto, preferiblemente un mamífero experimental no humano y más preferiblemente un roedor (por ejemplo, una rata, ratón o conejo), o explante (por ejemplo, piel) del mismo. Los métodos para evaluar la expresión génica de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) se conocen bien en la técnica, por ejemplo, análisis por Northern, ensayo de protección de ribonucleasa, transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) o hibridación in situ de ARN (véase, por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3<sup>a</sup> ed. 2001)). El nivel de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) se puede controlar mediante, por ejemplo, análisis de inmunotransferencia, inmunoensayo o hibridación in situ. La actividad de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2), por ejemplo, unión al promotor y/o actividad transcripcional alterada, se puede determinar mediante, por ejemplo, ensayo de cambio de movilidad electroforética, huella de ADN o ensayo de gen indicador. Preferiblemente, el efecto de un agente de prueba en la expresión génica de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) o la actividad o nivel de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) se observa como un cambio en el daño en la piel en un sujeto. Más preferiblemente, el efecto de un agente de prueba en la expresión génica de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) o la actividad o nivel de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) se evalúa en una célula transgénica o un animal no humano, o explante o célula derivada del mismo, que tiene la señalización de VEGF alterada, comparado con una célula o animal no humano de tipo salvaje, o explante o célula derivado del mismo.

El agente de prueba se puede administrar a una célula, extracto celular, explante o sujeto que expresa un transgén que comprende el promotor del gen de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) fusionado a *LacZ*. (El aumento o inhibición de la transcripción del transgén, por ejemplo, un indicador, por ejemplo, *LacZ* o *GFP*, como resultado del efecto del agente de

prueba en el promotor del gen de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) o factores que regulan la transcripción del promotor del gen de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2), se puede observar fácilmente como un cambio en color. Los niveles del transcrito del indicador, y por tanto de la actividad del promotor del gen de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2), se pueden controlar mediante métodos establecidos, por ejemplo, análisis por Northern, ensayo de protección de ribonucleasa, transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) o hibridación *in situ* de ARN (véase, por ejemplo, Cuncliffe et al. (2002) *Mamm. Genome* 13:245). Los agentes se pueden evaluar usando un sistema sin células, por ejemplo, un medio que comprende el promotor del gen VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2)-transgén indicador (por ejemplo, promotor del gen VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2)-transgén *LacZ*), factores de transcripción que se unen al promotor del gen VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2), un lisado celular crudo o extracto nuclear y el agente de prueba (por ejemplo, un agente descrito aquí), en donde se detecta un efecto del agente en la actividad del promotor del gen VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) como un cambio de color.

En algunas formas de realización, se proporcionan VEGF-A, y fragmentos biológicamente activos del mismo como polipéptidos purificados. Los polipéptidos purificados incluyen polipéptidos que se generan *in vitro* (por ejemplo, mediante traducción *in vitro* o mediante el uso de un sintetizador automatizado de péptidos) y polipéptidos que se expresan inicialmente en una célula (por ejemplo, una célula procariota, una célula eucariota, una célula de insecto, una célula de levadura, una célula de mamífero, una célula vegetal) y posteriormente se purifican. Las células que expresan un polipéptido purificado pueden incluir una célula que codifican un gen endógeno, células transducidas con un vector de expresión que codifica un polipéptido y células que se manipulan experimentalmente para inducir la expresión de un gen endógeno que no se expresa típicamente en ese tipo celular (por ejemplo, tecnología de

activación génica). En algunas formas de realización, los polipéptidos son proteínas de fusión (por ejemplo una fusión VEGFR-glutación-S-transferasa) que puede incluir un sitio de corte de proteasa para permitir el corte y separación de la proteína de fusión en polipéptidos separados. En algunas formas de realización, un polipéptido puede incluir una secuencia de aminoácidos que facilita la purificación del polipéptido (por ejemplo, una etiqueta de múltiples histidinas, una etiqueta FLAG, etc.). Los métodos para aislar proteínas de células o polipéptidos que se expresan en células, incluyen purificación por afinidad, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía líquida de alta resolución y otros métodos de purificación cromatográfica. Los polipéptidos se pueden estar modificados postraduccionalmente, por ejemplo, glicosilados.

En otro aspecto, la invención incluye métodos para cribar compuestos de prueba para identificar un compuesto que modula una interacción proteína-proteína entre un polipéptido VEGF-A y un polipéptido VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2). Se describe un método útil para el cribado de alto rendimiento de compuestos capaces de modular interacciones proteína-proteína entre reguladores transcripcionales en Lepourcelet *et al.*, *Cancer Cell* 5: 91-102 (2004). Típicamente, se proporciona un primer compuesto. El primer compuesto es un polipéptido VEGF-A o un fragmento biológicamente activo del mismo, o el primer compuesto es un polipéptido VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) o un fragmento biológicamente activo del mismo. Se proporciona un segundo compuesto que es diferente del primer compuesto y que está marcado. El segundo compuesto es un polipéptido VEGF-A o un fragmento biológicamente activo del mismo, o el segundo compuesto es un polipéptido VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) o un fragmento biológicamente activo del mismo. Se proporciona un compuesto de prueba. Se ponen en contacto entre sí el primer compuesto, segundo compuesto y compuesto de prueba. La cantidad de marcador unido al primer compuesto se determina después. Un cambio en la interacción proteína-proteína entre el primer compuesto y el segundo compuesto evaluado como marcador unido es

indicativo de la utilidad del compuesto en modular una interacción proteína-proteína entre el polipéptido VEGF-A y el VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2). En algunas formas de realización, el cambio se evalúa relativo a la misma reacción sin añadir el compuesto de prueba.

En ciertas formas de realización, el primer compuesto proporcionado está unido a un soporte sólido. Los soportes sólidos incluyen, por ejemplo, resinas, por ejemplo, agarosa, bolas y placas multipocillo. En ciertas formas de realización, el método incluye un paso de lavado después del paso de contacto, para separar el marcador unido y sin unir.

En ciertas formas de realización, se pone en contacto con el primer compuesto y el segundo compuesto una pluralidad de compuestos de prueba. Los diferentes compuestos de prueba se pueden poner en contacto con los otros compuestos en grupos o por separado. En ciertas formas de realización, cada uno de los compuestos de prueba se pone en contacto tanto con el primer compuesto como con el segundo compuesto en pocillos separados. Por ejemplo, el método puede cribar librerías de compuestos de prueba. Las librerías de compuestos de prueba se discuten en detalle anteriormente. Las librerías pueden incluir, por ejemplo, productos naturales, productos químicos orgánicos, péptidos y/o péptidos modificados, incluyendo, por ejemplo, D-aminoácidos, aminoácidos no convencionales y aminoácidos N-sustituidos. Típicamente, las librerías están en una forma compatible con cribado en placas multipocillos, por ejemplo placas de 96 pocillos. El ensayo es particularmente útil para la ejecución automatizada en un formato multipocillo en el que muchos de los pasos están controlados por ordenador y se llevan a cabo por equipo robótico. Las librerías también se pueden usar en otros formatos, por ejemplo, librerías químicas sintéticas fijadas a un soporte sólido y disponible para liberación en microgotas.

En ciertas formas de realización, el primer compuesto es un polipéptido VEGF-A, o un fragmento del mismo, y el segundo compuesto es un polipéptido VEGFR (por ejemplo VEGFR-2), o un

fragmento del mismo. El soporte sólido al que se une el primer compuesto puede ser, por ejemplo, bolas de sepharosa, bolas de SPA (microesferas que incorporan un centelleante) o una placa multipocillo. Las bolas de SPA se pueden usar cuando el ensayo se realiza sin un paso de lavado, por ejemplo en un ensayo de centelleo de proximidad. Las bolas de sepharosa se pueden usar cuando el ensayo se realiza con un paso de lavado. El segundo compuesto se puede marcar con cualquier marcador que permita su detección, por ejemplo un radiomarcador, un agente fluorescente, biotina, una etiqueta peptídica o un fragmento de enzima. El segundo compuesto también puede estar radiomarcado, por ejemplo con  $^{125}\text{I}$  o  $^3\text{H}$ .

En ciertas formas de realización, se usa la actividad enzimática de una enzima químicamente conjugada a, o expresada como una proteína de fusión con, el primer o segundo compuesto, para detectar la proteína unida. También está incluido un ensayo de unión en el que se usa un método inmunológico estándar para detectar proteína unida. En ciertas otras formas de realización, la interacción de un polipéptido VEGF-A, o fragmento del mismo, y un polipéptido VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2), o fragmento del mismo, se detecta mediante transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) entre un fluoróforo donante unido covalentemente a VEGF-A (por ejemplo, un grupo fluorescente químicamente conjugado a VEGF-A, o una variante de la proteína fluorescente verde (GFP) expresada como una proteína quimérica VEGF-A-GFP) y un fluoróforo aceptor unido covalentemente al polipéptido VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2), o fragmento del mismo, donde hay un solapamiento adecuado del espectro de emisión del donante y el espectro de excitación del aceptor para dar transferencia de energía no radiactiva eficaz cuando los fluoróforos se acercan mediante la interacción proteína-proteína de un polipéptido VEGF-A y un polipéptido VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2).

En otras formas de realización, la interacción proteína-proteína se detecta reconstituyendo los dominios de una enzima,

por ejemplo,  $\beta$ -galactosidasa (véase, Rossi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:8405-8410 (1997)).

En aún otras formas de realización, la interacción proteína-proteína se evalúa mediante imágenes de relación de fluorescencia (Bacsikai *et al.*, Science 260:222-226 (1993)) de construcciones quiméricas adecuadas de polipéptidos EspF<sub>v</sub> y polipéptidos Tir o N-WASP en células, o mediante variantes del ensayo de los dos híbridos (Fearon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7958-7962 (1992); Takacs *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10375-10379 (1993); Vidal *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10315-10320 (1996); Vidal *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10321-10326 (1996)) empleando construcciones adecuadas de polipéptidos VEGF-A y VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2) y ajustados para un ensayo de alto rendimiento para detectar compuestos que inhiben la interacción VEGF-A/VEGFR. Estas formas de realización tienen la ventaja de que la permeabilidad celular de los compuestos que actúan como moduladores en el ensayo está asegurada.

Por ejemplo, en un ensayo, pero no el único ensayo, los polipéptidos VEGF-A, o fragmentos de los mismos, se adsorben a placas de ELISA. Los polipéptido VEGF-A se exponen después a los compuestos de prueba, seguido por proteínas de fusión glutatión-S-transferasa (GST)-polipéptido VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2). La proteína unida se detecta con anticuerpo de cabra anti-GST, IgG anti-cabra acoplada a fosfatasa alcalina (AP) y sustrato de AP. Los compuestos que interfieren con las interacciones proteína-proteína producen señales reducidas de AP en las placas de ELISA.

### 30 Agentes ejemplares

Se pueden usar una variedad de agentes como un modulador de VEGF (por ejemplo, VEGF-A, -C o -D) o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2 o -3) para tratar o prevenir daño en la piel. El agente puede ser cualquier tipo de compuesto que se puede administrar a un sujeto (por ejemplo, anticuerpos, proteínas, péptidos, glicoproteínas, glicopéptidos). En una forma de realización, el

modulador de VEGF/VEGFR es un compuesto biológico, por ejemplo, una proteína que tiene un peso molecular de entre 5-300 kDa.

Por ejemplo, un modulador de VEGF/VEGFR puede inhibir la unión de VEGF a un VEGFR o puede prevenir la transducción de señales mediada por VEGF, por ejemplo, transducida por la proteína VEGFR, por ejemplo, VEGFR-2. Un modulador de VEGF/VEGFR que se une a VEGF puede alterar la conformación de VEGF, impedir la unión de VEGF a VEGFR, o disminuir de otra manera la afinidad de VEGF por un VEGFR o prevenir la interacción entre VEGF y un VEGFR. De forma alternativa, un modulador de VEGF/VEGFR puede estimular la unión de VEGF a un VEGFR o puede inducir la transducción de señales de VEGFR activando el VEGFR en ausencia de VEGF.

Un modulador VEGF/VEGFR (por ejemplo, un anticuerpo) se puede unir a VEGF o a un VEGFR con una  $K_d$  de menos de  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  o  $10^{-10}$  M. En una forma de realización, el modulador de VEGF/VEGFR se une a VEGF (es decir, a VEGF-A con una afinidad al menos, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 o 1000 mejor que su afinidad por una proteína diferente de VEGF-A, por ejemplo, VEGF-C o VEGF-D). Un modulador preferido de VEGF/VEGFR se une específicamente a VEGF o VEGFR, tal como un anticuerpo específico de VEGF o VEGFR.

Los moduladores ejemplares de VEGF/VEGFR incluyen anticuerpos que se unen a VEGF o VEGFR y formas solubles de VEGFR que compiten con VEGFR de la superficie celular para la unión a VEGF. Un ejemplo de una forma soluble de VEGFR es una proteína que incluye al menos una parte del dominio extracelular de un VEGFR (por ejemplo, un fragmento soluble de unión a VEGF de VEGFR-2 o VEGFR-3, por ejemplo, que incluye una parte que se une a VEGF).

Una forma soluble ejemplar de la proteína VEGFR incluye una región de la proteína VEGFR que se une a VEGF, por ejemplo, un dominio extracelular, por ejemplo, dominio en la región extracelular. Esta región puede estar físicamente asociada, por ejemplo fusionada a otra secuencia de aminoácidos, por ejemplo, un dominio Fc, en su extremo N o C. La región de VEGFR puede

estar espaciada por un espaciador de la secuencia heteróloga de aminoácidos. También se pueden usar otras formas solubles de VEGFR, por ejemplo, formas que no incluyen un dominio Fc.

Moduladores ejemplares de VEGF/VEGFR incluyen anticuerpos que se unen a VEGF y/o a VEGFR. En una forma de realización, el anticuerpo inhibe la interacción entre VEGF y un VEGFR, por ejemplo, bloqueando físicamente la interacción, disminuyendo la afinidad de VEGF y/o VEGFR por su homólogo, interrumpiendo o desestabilizando los complejos de VEGF, secuestrando VEGF o un VEGFR, o dirigiendo VEGF o VEGFR para degradación. En una forma de realización, el anticuerpo se puede unir a VEGF o VEGFR en un epítipo que incluye uno o más residuos de aminoácidos que participan en la interfaz de unión VEGF/VEGFR. Tales residuos de aminoácidos se pueden identificar, por ejemplo, mediante barrido de alanina. En otra forma de realización, el anticuerpo se puede unir a residuos que no participan en la unión VEGF/VEGFR. Por ejemplo, el anticuerpo puede alterar una conformación de VEGF o VEGFR y por tanto reducir la afinidad de unión, o el anticuerpo puede impedir estéricamente la unión VEGF/VEGFR.

Además de los anticuerpos que se unen a VEGF y/o VEGFR, se pueden usar otros anticuerpos. En una forma de realización, el anticuerpo puede prevenir la activación de un evento o actividad mediada por VEGF/VEGFR.

Como se usa aquí, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que incluye al menos una región variable de inmunoglobulina, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que proporciona un dominio variable de inmunoglobulina o una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de cadena pesada (H) (abreviada aquí como VH) y una región variable de cadena ligera (L) (abreviada aquí como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de cadena pesada (H) y dos regiones variables de cadena ligera (L). El término "anticuerpo" abarca fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla,

fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fd, fragmentos Fv y fragmentos dAb) así como anticuerpos completos, por ejemplo, inmunoglobulinas intactas y/o de longitud total de los tipos IgA, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgE, IgD, IgM  
5 (así como subtipos de las mismas). Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de los tipos kappa o lambda. En una forma de realización, el anticuerpo está glicosilado. Un anticuerpo puede ser funcional para citotoxicidad dependiente de anticuerpo y/o citotoxicidad mediada por complemento, o puede no  
10 ser funcional para una o ambas de estas actividades.

Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" ("CDR"), entremezcladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones marco"  
15 (FR). La extensión de las FR y CDR se ha definido con precisión (véase, Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE UU, Publicación del NIH No. 91-3242; y Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917). Aquí se  
20 usan las definiciones de Kabat. Cada VH y VL típicamente está compuesta de tres CDR y cuatro FR, organizadas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Un "dominio de inmunoglobulina" se refiere a un dominio de  
25 los dominios variable o constante de moléculas de inmunoglobulina. Los dominios de inmunoglobulina típicamente contienen dos láminas β formadas de alrededor de siete hebras β, y un puente disulfuro conservado (véase, por ejemplo, A.F. Williams y A.N. Barclay (1988) *Ann. Rev Immunol.* 6:381-405). Una  
30 "secuencia del dominio variable de inmunoglobulina" se refiere a una secuencia de aminoácidos que puede formar una estructura suficiente para poner la secuencia CDR en una conformación adecuada para la unión al antígeno. Por ejemplo, la secuencia puede incluir toda o parte de la secuencia de aminoácidos de un  
35 dominio variable natural. Por ejemplo, la secuencia puede omitir uno, dos o más aminoácidos N- o C-terminales, aminoácidos

internos, puede incluir una o más inserciones o aminoácidos terminales adicionales o puede incluir otras alteraciones. En una forma de realización, un polipéptido que incluye una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina se puede asociar con otra secuencia de dominio variable de inmunoglobulina para formar una estructura de unión diana (o "sitio de unión al antígeno"), por ejemplo, una estructura que interacciona con VEGFR.

La cadena VH o VL del anticuerpo puede incluir además todo o parte de una región constante de cadena pesada o ligera, para formar de esta manera una cadena de inmunoglobulina pesada o ligera, respectivamente. En una forma de realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina. Las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas pueden estar unidas por puentes disulfuro. La región constante de la cadena pesada típicamente incluye tres dominios constantes, CH1, CH2 y CH3. La región constante de la cadena ligera típicamente incluye un dominio CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos típicamente median la unión del anticuerpo a tejidos o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

Una o más regiones de un anticuerpo pueden ser humanas, efectivamente humanas o humanizadas. Por ejemplo, una o más de las regiones variables pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, una o más de las CDR, por ejemplo HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3, pueden ser humanas. Cada una de las CDR de la cadena ligera puede ser humana. HC CDR3 puede ser humana. Una o más de las regiones marco pueden ser humanas, por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y FR4 de la HC o la LC. En una forma de realización, todas las regiones marco son humanas, por ejemplo, derivadas de una célula somática humana, por ejemplo, una célula hematopoyética que produce

inmunoglobulinas o una célula no hematopoyética. En una forma de realización, las secuencias humanas son secuencias de la línea germinal, por ejemplo, codificadas por un ácido nucleico de la línea germinal. Una o más de las regiones constantes pueden ser humanas, efectivamente humanas o humanizadas. En otra forma de realización, al menos el 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 92, el 95 o el 98% de las regiones marco (por ejemplo, FR1, FR2 y FR3, colectivamente, o FR1, FR2, FR3 y FR4, colectivamente) o el anticuerpo entero puede ser humano, efectivamente humano o humanizado. Por ejemplo, FR1, FR2 y FR3, colectivamente pueden ser al menos el 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 92, el 95, el 98 o el 99% idénticas o completamente idénticas a una secuencia humana codificada por un segmento de línea germinal humana.

Una región variable de inmunoglobulina "efectivamente humana" es una región variable de inmunoglobulina que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos marco humanos de modo que la región variable de la inmunoglobulina no produzca una respuesta inmunogénica en un ser humano normal. Un anticuerpo "efectivamente humano" es un anticuerpo que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos humanos de modo que el anticuerpo no provoca una respuesta inmunogénica en un ser humano normal.

Una región variable de inmunoglobulina "humanizada" es una región variable de inmunoglobulina que se modifica de modo que la forma modificada provoca menos respuesta inmune en un ser humano de lo que lo hace la forma sin modificar, por ejemplo, se modifica para incluir un número suficiente de de posiciones de aminoácidos marco humanos de modo que la región variable no provoque una respuesta inmune en un ser humano normal. Las descripciones de inmunoglobulinas "humanizadas" incluyen, por ejemplo, las patentes de EE UU Nos. 6.407.213 y 5.693.762. En algunos casos, las inmunoglobulinas humanizadas pueden incluir un aminoácido no humano en una o más posiciones de aminoácidos marco.

Los anticuerpos que se unen a VEGF o VEGFR se pueden generar por varios medios, incluyendo inmunización, por ejemplo,

usando un animal o métodos in vitro tal como presentación en fagos. Se puede usar todo o parte de VEGF o VEGFR como inmunógeno o como una diana para selección. Por ejemplo, se puede usar como inmunógeno VEGF o un fragmento del mismo, VEGFR  
5 o un fragmento del mismo. En una forma de realización, el animal inmunizado contiene células productoras de inmunoglobulinas con loci de inmunoglobulinas naturales, humanos o parcialmente humanos. En una forma de realización, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humana.  
10 Por ejemplo, es posible manipular cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de loci de Ig humanas. Según esto, usando la tecnología del hibridoma, se pueden producir y seleccionar anticuerpos monoclonales específicos de antígeno al menos parcialmente  
15 humanos, con la especificidad deseada. Véase, por ejemplo, XENOMOUSE™, Green *et al.* (1994) *Nat. Gen.* 7:13-21; US 2003-0070185; patente de EE UU No. 5.789.650 y WO 96/34096.

Los anticuerpos no humanos contra VEGF y VEGFR también se pueden producir, por ejemplo, en un roedor. El anticuerpo no  
20 humano se puede humanizar, por ejemplo, como se describe en EP 239 400; patentes de EE UU Nos. 6.602.503; 5.693.761; y 6,407,213, desinmunizar o modificar de otra manera para hacerlos efectivamente humanos.

EP 239 400 (Winter *et al.*,) describe la alteración de  
25 anticuerpos mediante sustitución (dentro de una región variable determinada) de sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) para una especie con los de otra. Típicamente, se sustituyen las CDR de un anticuerpo no humano (por ejemplo, murino) en las regiones correspondientes en un anticuerpo humano  
30 usando tecnología de ácidos nucleicos recombinantes para producir secuencias que codifican el anticuerpo sustituido deseado. Se pueden añadir segmentos de genes de la región constante humana del isotipo deseado (normalmente gamma I para CH y kappa para CL) y los genes humanizados de las cadenas  
35 pesada y ligera se pueden coexpresar en células de mamífero para producir un anticuerpo humanizado soluble. También se pueden

usar otros métodos para humanizar anticuerpos. Por ejemplo, otros métodos pueden representar la estructura tridimensional del anticuerpo, posiciones marco que están en proximidad tridimensional a determinantes de unión, y secuencias de péptidos inmunogénicos. Véase, por ejemplo, WO 90/07861; patentes de EE UU Nos. 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; y 5.530.101; Tempest *et al.* (1991) *Biotechnology* 9:266-271 y patente de EE UU No. 6.407.213.

Se pueden producir anticuerpos monoclonales completamente humanos que se unen a VEGF y VEGFR, por ejemplo, usando esplenocitos humanos cebados *in vitro*, como describen Boerner *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147:86-95. Se pueden preparar mediante clonación de repertorio como describen Persson *et al.* (1991) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:2432-2436 o Huang y Stollar (1991) *J. Immunol. Methods* 141:227-236; también patente de EE UU No. 5.798.230. También se pueden usar grandes librerías de presentación en fagos humanas no inmunizadas para aislar anticuerpos de alta afinidad que se pueden desarrollar como terapéuticos humanos usando tecnología estándar de fagos (véase, por ejemplo, Hoogenboom *et al.* (1998) *Immunotechnology* 4:1-20; Hoogenboom *et al.* (2000) *Immunol Today* 2:371-378; y US 2003-0232333).

Se pueden producir anticuerpos y otras proteínas descritas aquí en células procariotas y eucariotas. En una forma de realización, los anticuerpos (por ejemplo, scFv) se expresan en una célula de levadura tal como *Pichia* (véase, por ejemplo, Powers *et al.* (2001) *J. Immunol. Methods* 251:123-35), *Hanseula*, o *Saccharomyces*.

Se pueden producir anticuerpos, en particular anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, en células de mamífero. Células huésped de mamífero de ejemplo para la expresión recombinante incluyen las de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO negativas para dihidrofolato reductasa, descritas en Urlaub y Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador de selección DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp (1982) *Mol.*

*Biol.* 159:601-621), líneas celulares linfocíticas, por ejemplo, células de mieloma NS0 y células SP2, células COS, K562 y una célula de un animal transgénico, por ejemplo, un mamífero transgénico. Por ejemplo, la célula es una célula mamaria  
5 epitelial.

Además de la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de inmunoglobulina, los vectores recombinantes de expresión pueden llevar secuencias adicionales de ácido nucleico, tales como, secuencias que regulan la replicación del  
10 vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes de marcadores de selección. El gen del marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véase, por ejemplo, las patentes de EE UU Nos. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Genes  
15 de marcadores seleccionables de ejemplo incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped *dhfr*<sup>-</sup> con selección/amplificación con metotrexato) y el gen *neo* (para selección con G418).

En un sistema de ejemplo para expresión recombinante de un  
20 anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa o una parte de unión a antígeno del mismo), se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo en células CHO *dhfr*<sup>-</sup> por transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro  
25 del vector de expresión recombinante, los genes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo están cada uno operativamente unidos a elementos reguladores potenciador/promotor (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tal como un elemento regulador potenciador de CMV/promotor de AdMLP  
30 o un elemento regulador potenciador de SV40/promotor de AdMLP) para dirigir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también lleva un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las  
35 células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del

anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Se usan técnicas estándar de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, para transfectar las células huésped, para seleccionar los transformantes, para  
5 cultivar las células huésped y para recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Por ejemplo, algunos anticuerpos se pueden aislar mediante cromatografía de afinidad con una proteína A o proteína G.

Los anticuerpos (y fusiones de Fc) también pueden incluir  
10 modificaciones, por ejemplo, modificaciones que alteran la función de Fc, por ejemplo, para disminuir o eliminar la interacción con un receptor de Fc o con Clq o con ambos. Por ejemplo, la región constante de IgG1 humana se puede mutar en uno o más residuos, por ejemplo, uno o más de los residuos 234 y  
15 237, según la numeración en la patente de EE UU No. 5.648.260. Otras modificaciones ejemplares incluyen las descritas en la patente de EE UU No. 5.648.260.

Para algunas proteínas que incluyen un dominio Fc, el sistema de producción de anticuerpo/proteína se puede diseñar  
20 para sintetizar anticuerpos u otras proteínas en las que la región Fc está glicosilada. Por ejemplo, el dominio Fc de las moléculas de IgG está glicosilado en la asparraguina 297 en el dominio CH2. El dominio Fc también puede incluir otras modificaciones postraduccionales eucariotas. En otros casos, la  
25 proteína se produce en una forma que no está glicosilada.

Los anticuerpos y otras proteínas también se pueden producir por un animal transgénico. Por ejemplo, la patente de EE UU No. 5.849.992 describe un método para expresar un anticuerpo en la glándula mamaria de un mamífero transgénico. Se  
30 construye un transgén que incluye un promotor específico de leche y las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo de interés, por ejemplo, un anticuerpo descrito aquí, y una secuencia señal para secreción. La leche producida por las hembras de tales mamíferos transgénicos incluye, secretada en  
35 ella, la proteína de interés, por ejemplo, un anticuerpo o una

proteína de fusión de Fc. La proteína se puede purificar de la leche, o para algunas aplicaciones, usar directamente.

Los métodos descritos en el contexto de anticuerpo se pueden adaptar a otras proteínas, por ejemplo, fusiones de Fc y  
5 fragmentos solubles de receptores.

En ciertas realizaciones, se usan antagonistas ácidos nucleicos para disminuir la expresión de un gen endógeno que codifica VEGF o VEGFR. En una forma de realización, el antagonista de ácido nucleico es un ARNip que se dirige al ARNm  
10 que codifica VEGF o un VEGFR. También se pueden usar otros tipos de ácidos nucleicos antagonísticos, por ejemplo un ARNbc, una ribozima, un formador de hélice triple o un ácido nucleico antisentido. En algunas formas de realización, los antagonistas ácido nucleico se pueden dirigir a dianas efectoras posteriores  
15 de la activación de VEGFR.

Los ARNip son ARN bicatenarios (ARNbc) pequeños que opcionalmente incluyen salientes. Por ejemplo, la región dúplex de un ARNip tiene alrededor de 18 a 25 nucleótidos de longitud, por ejemplo, alrededor de 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos de  
20 longitud. Típicamente, las secuencias ARNip son exactamente complementarias al ARNm diana. Se pueden usar los ARNbc y los ARNip en particular para silenciar la expresión génica en células de mamífero (por ejemplo, células humanas). Los ARNip también incluyen los ARN horquillados cortos (ARNhc) con tallos  
25 de 29 pares de bases y salientes 3' de 2 nucleótidos. Véase, por ejemplo, Clemens *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6499-6503; Billy *et al.* (2001) *Proc. Natl. Sci. USA* 98:14428-14433; Elbashir *et al.* (2001) *Nature*. 411:494-8; Yang *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:9942-9947; Siolas *et al.*  
30 (2005), *Nat. Biotechnol.* 23(2):227-31; 20040086884; U.S. 20030166282; 20030143204; 20040038278; y 20030224432.

Los agentes antisentido puede incluir, por ejemplo, desde alrededor de 8 hasta alrededor de 80 nucleobases (es decir, desde alrededor de 8 hasta alrededor de 80 nucleótidos), por  
35 ejemplo, desde alrededor de 8 hasta alrededor de 50 nucleobases, o desde alrededor de 12 hasta alrededor de 30 nucleobases. Los

compuestos antisentido incluyen ribozimas, oligonucleótidos de secuencia externa de guía (EGS) (oligozimas) y otros ARN catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que hibridan con el ácido nucleico diana y modulan su expresión. Los  
5 compuestos anti-sentido pueden incluir un tramo de al menos ocho nucleobases consecutivas que son complementarias a una secuencia en el gen diana. Un oligonucleótido no necesita ser el 100% complementario a su secuencia diana de ácido nucleico para ser específicamente hibridable. Un oligonucleótido es  
10 específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido a la diana interfiere con la función normal de la molécula diana para producir una pérdida de utilidad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar unión no específica del oligonucleótido a secuencias diferentes de la diana en  
15 condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo o tratamiento terapéutico o, en el caso de ensayos in vitro, en condiciones en las que se realiza los ensayos.

La hibridación de nucleótidos antisentido con ARNm (por  
20 ejemplo, un ARNm que codifica VEGF o VEGFR) puede interferir con una o más de las funciones normales del ARNm. Las funciones del ARNm a ser interferidas incluyen todas las funciones clave tales como, por ejemplo, translocación del ARN al sitio de traducción de proteínas, traducción de la proteína a partir del ARN, ajuste  
25 del ARN para dar una o más especies de ARNm y actividad catalítica a la que se puede dedicar el ARN. También se puede interferir la unión de proteína(s) específica(s) al ARN mediante hibridación de oligonucleótidos antisentido con el ARN.

Los compuestos antisentido ejemplares incluyen secuencias  
30 de ADN o ARN que hibridan específicamente con el ácido nucleico diana, por ejemplo, el ARNm que codifica VEGF o VEGFR. La región complementaria se puede extender entre alrededor de 8 hasta alrededor de 80 nucleobases. Los compuestos pueden incluir una o más nucleobases modificadas. Las nucleobases modificadas pueden  
35 incluir, por ejemplo, pirimidinas 5'-sustituidas tales como 5-yodouracilo, 5-yodocitosina y C5-propinil pirimidinas tales como

C5-propinilcitosina y C5-propiniluracilo. Otras nucleobases modificadas adecuadas incluyen N<sup>4</sup>-alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)aminocitosinas y N<sup>4</sup>,N<sup>4</sup>-dialquil(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)aminocitosinas. Las nucleobases modificadas también pueden incluir 8-aza-7-deazapurinas 7-sustituidas y 7-  
5 deazapurinas 7-sustituidas, tales como por ejemplo, 7-yodo-7-deazapurinas, 7-ciano-7-deazapurinas, 7-aminocarbonil-7-deazapurinas. Ejemplos de estas incluyen 6-amino-7-yodo-7-deazapurinas, 6-amino-7-ciano-7-deazapurinas, 6-amino-7-aminocarbonil-7-deazapurinas, 2-amino-6-hidroxi-7-yodo-7-  
10 deazapurinas, 2-amino-6-hidroxi-7-ciano-7-deazapurinas y 2-amino-6-hidroxi-7-aminocarbonil-7-deazapurinas. Además, N<sup>6</sup>-alquil(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)aminopurinas y N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-dialquil(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)aminopurinas, incluyendo N<sup>6</sup>-metilaminoadenina y N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-dimetilaminoadenina, también son nucleobases modificadas adecuadas. De forma similar,  
15 otras purinas 6-sustituidas incluyendo, por ejemplo, 6-tioguanina, pueden constituir nucleobases modificadas apropiadas. Otras nucleobases adecuadas incluyen 2-tiouracilo, 8-bromoadenina, 8-bromoguanina, 2-fluoroadenina y 2-fluoroguanina. Los derivados de cualquiera de las nucleobases  
20 modificadas mencionadas anteriormente también son apropiados. Los sustituyentes de cualquiera de los compuestos precedentes pueden incluir alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>30</sub>, arilo, aralquilo, heteroarilo, halo, amino, amido, nitro, tio, sulfonilo, carboxilo, alcoxi, alquilcarbonilo, alcoxycarbonilo y  
25 similares.

Las descripciones de otros tipos de agentes ácido nucleico también están disponibles. Véase, por ejemplo, patentes de EE UU Nos. 4.987.071; 5.116.742; y 5.093.246; Woolf et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA; Antisense RNA and DNA*, D.A. Melton, Ed., Cold  
30 Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988); 89:7305-9; Haselhoff y Gerlach (1988) *Nature* 334:585-59; Helene, C. (1991) *Anticancer Drug Des.* 6:569-84; Helene (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; y Maher (1992) *Bioassays* 14:807-15.

También se pueden usar factores de transcripción artificiales para regular la expresión de VEGF o un VEGFR. El  
35 factor de transcripción artificial se puede diseñar o

seleccionar de una librería, por ejemplo, para capacidad de unirse a una secuencia en un gen endógeno que codifica VEGF o VEGFR, por ejemplo, en una región reguladora, por ejemplo, el promotor. Por ejemplo, el factor de transcripción artificial se  
5 puede preparar mediante selección in vitro (por ejemplo, usando presentación en fagos, patente de EE UU No. 6.534.261) o in vivo, o mediante diseño basado en un código de reconocimiento (véase, por ejemplo, WO 00/42219 y la patente de EE UU No. 6.511.808). Véase, por ejemplo, Rebar *et al.* (1996) *Methods*  
10 *Enzymol* 267:129; Greisman y Pabo (1997) *Science* 275:657; Isalan *et al.* (2001) *Nat. Biotechnol* 19:656; y Wu *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:344 para, entre otras cosas, métodos para crear librerías de dominios de dedo de zinc variados.

Opcionalmente, se puede fusionar un factor de transcripción  
15 artificial a un dominio regulador transcripcional, por ejemplo, un dominio de activación para activar la transcripción o a un dominio de represión para reprimir la transcripción. En particular, se pueden usar dominios de represión para disminuir la expresión de genes endógenos que codifican VEGF o VEGFR. El  
20 factor de transcripción artificial puede estar codificado él mismo por un ácido nucleico heterólogo que se distribuye a una célula o la proteína misma se puede distribuir a una célula (véase, por ejemplo, la patente de EE UU no. 6.534.261). El ácido nucleico heterólogo que incluye una secuencia que codifica  
25 el factor de transcripción artificial puede estar operativamente unido a un promotor inducible, por ejemplo, para permitir el control fino del nivel del factor de transcripción artificial en la célula, por ejemplo, una célula endotelial.

### 30 Administración

Se puede administrar un agente descrito aquí de forma sistémica o local, por ejemplo, por vía tópica. La administración tópica de un agente descrito aquí es la vía preferida de administración. Para la aplicación tópica, las  
35 composiciones de la presente invención pueden incluir un medio compatible con una célula, explante o sujeto. Tales

composiciones farmacéuticas tópicas pueden existir en muchas formas, por ejemplo, en forma de una solución, crema, pomada, gel loción, champú, jabón o aerosol. Se pueden emplear una amplia variedad de materiales soporte en la composición de esta  
5 invención tales como alcoholes, gel de aloe vera, alantoína, glicerina, aceites de vitamina A y E, aceites minerales y polietilenglicoles. Otros aditivos, por ejemplo, conservantes, fragancia, protector solar u otros ingredientes cosméticos, pueden estar presentes en la composición.

10 Un vehículo preferido para la distribución tópica es liposomas. Se pueden usar los liposomas para que lleven y distribuyan un agente, por ejemplo, un agente descrito aquí, a una célula. Se pueden encontrar directrices detalladas en, por ejemplo, Yarosh et al. (2001) Lancet 357: 926 y Bouwstra et al.  
15 (2002) Adv. Drug Deliv. Rev. 54 Suppl 1:S41.

Para la administración sistémica, el agente se puede administrar a través de la vía oral o la vía parenteral, incluyendo por vía subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa u otra vía. Para la administración local, se  
20 administran por vía tópica, transdérmica, transmucosa, intranasal u otra vía. Se puede poner en contacto una célula extracelular o intracelularmente con el agente, por ejemplo, mediante microinyección o transfección. El agente se puede aplicar y eliminar inmediatamente, aplicar y no eliminar y/o  
25 aplicar repetidamente con frecuencia constante, creciente o decreciente y/o a dosis o concentraciones crecientes o decrecientes. Se puede usar simultáneamente más de una vía de administración, por ejemplo, administración tópica en asociación con administración oral. Los ejemplos de formas farmacéuticas  
30 parenterales incluyen soluciones acuosas del principio activo, en una solución salina isotónica, glucosa al 5% u otros excipientes farmacéuticamente aceptables bien conocidos. Los agentes solubilizantes tales como ciclodextrinas u otros agentes solubilizantes que conocen los expertos en la materia, se pueden  
35 utilizar como excipientes farmacéuticos para la distribución de la composición moduladora de pigmento.

La composición se puede suministrar como, por ejemplo, un cosmético, una medicación o un producto para el cuidado de la piel. La composición también se puede formular en formas farmacéuticas para otras vías de administración usando métodos convencionales. Se puede formular una composición farmacéutica, por ejemplo, en formas farmacéuticas para administración oral como un polvo o gránulo, o en una cápsula, un comprimido (cada uno incluye formulaciones de liberación con el tiempo y liberación sostenida), o un sello de gel, con soportes farmacéuticos opcionales adecuados para preparar composiciones sólidas, tales como vehículos (por ejemplo, almidón, glucosa, azúcar de fruta, sacarosa, gelatina y similares), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio), disgregantes (por ejemplo, almidón y celulosa cristalina) y aglutinantes (por ejemplo, lactosa, manitol, almidón y goma arábiga). Cuando la composición es una inyección, por ejemplo, se pueden usar solventes (por ejemplo, agua destilada para inyección), estabilizantes (por ejemplo, edetato de sodio), agentes isotonzantes (por ejemplo, cloruro de sodio, glicerina y manitol), agentes para ajustar el pH (por ejemplo ácido clorhídrico, ácido cítrico e hidróxido de sodio), agentes suspensores (por ejemplo, metilcelulosa) y similares.

El agente puede contener otros ingredientes farmacéuticos, por ejemplo, un segundo tratamiento para la piel, por ejemplo, un hidratante, un protector solar.

#### Kits

Se puede proporcionar un agente descrito aquí (por ejemplo, anticuerpo contra VEGF o un agente que modula VEGF o VEGFR) en un kit. El kit incluye: (a) un agente, por ejemplo, una composición que incluye un agente, y (b) material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, instrucciones, comercial u otro material que se refiera a los métodos descritos aquí y/o al uso de VEGF o VEGFR para los métodos descritos aquí. Por ejemplo, el material informativo se refiere a daño en piel por UVB aguda, por ejemplo, quemadura solar.

En una forma de realización, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar un agente descrito aquí en una forma adecuada para realizar los métodos descritos aquí, por ejemplo, en una dosis, forma farmacéutica, o forma de administración adecuadas (por ejemplo, una dosis, forma farmacéutica o forma de administración descritos aquí). Las dosis, formas farmacéuticas y formas de administración preferidas son tópica y percutánea. En otra forma de realización, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar un agente descrito aquí a un sujeto adecuado, por ejemplo, un ser humano, por ejemplo un ser humano que tiene, o está expuesto a, daño por UVB aguda.

El material informativo de los kits no está limitado en su forma. En muchos casos, el material informativo, por ejemplo, instrucciones, se proporciona en materia impresa, por ejemplo, un texto, dibujo y/o fotografía impresos, por ejemplo una etiqueta u hoja impresa. Sin embargo, el material informativo también se puede proporcionar en otros formatos, tales como Braille, material legible por ordenador, grabación en video o grabación de audio. En otra forma de realización, el material informativo del kit es información de contacto, por ejemplo una dirección física, dirección de correo electrónico, página web o número de teléfono, donde el usuario del kit puede obtener información sustancial sobre VEGF o VEGFR y/o su uso en los métodos descritos aquí. Por supuesto, el material informativo también se puede proporcionar en cualquier combinación de formatos.

Además del agente descrito aquí, la composición del kit puede incluir otros ingredientes, tales como un solvente o tampón, un estabilizante, un conservante, una fragancia u otro ingrediente cosmético, y/o un segundo agente para tratar una afección o trastorno descritos aquí. De forma alternativa, los otros ingredientes pueden estar incluidos en el kit, pero en diferentes composiciones o envases que un agente descrito aquí. En tales formas de realización, el kit puede incluir instrucciones para mezclar un agente descrito aquí y los otros

ingredientes o para usar un agente descrito aquí junto con los otros ingredientes.

Se puede proporcionar un agente descrito aquí en cualquier forma, por ejemplo, forma líquida, seca o liofilizada. Se  
5 prefiere que un agente descrito aquí esté sustancialmente puro y/o estéril. Cuando se proporciona un agente descrito aquí en una solución líquida, la solución líquida preferiblemente es una solución acuosa, siendo preferida una solución acuosa estéril. Cuando se proporciona un agente descrito aquí como una forma  
10 seca, en general la reconstitución es mediante la adición de un solvente adecuado. El solvente, por ejemplo, agua o tampón estéril, se puede proporcionar opcionalmente en el kit.

El kit puede incluir uno o más envases para la composición que contiene un agente descrito aquí. En algunas formas de  
15 realización, el kit contiene envases, separadores o compartimentos separados para la composición y el material informativo. Por ejemplo, la composición puede estar contenida en una botella, vial o jeringuilla, y el material informativo puede estar contenido en una funda o paquete de plástico. En  
20 otras formas de realización, los elementos separados del kit están contenidos en un envase único sin dividir. Por ejemplo, la composición está contenida en una botella, vial o jeringuilla que tiene adherida a la misma el material informativo en forma de una etiqueta. En algunas formas de realización, el kit  
25 incluye una pluralidad (por ejemplo, un paquete) de envases individuales, que cada uno contiene una o más formas farmacéuticas unitarias (por ejemplo, una forma farmacéutica descrita aquí) de un agente descrito aquí. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringuillas, ampollas, paquetes de  
30 hojas metálicas o paquetes blíster, que contiene cada uno una única dosis unitaria de un agente descrito aquí. Los envases de los kits pueden ser herméticos y/o impermeables.

El kit opcionalmente incluye un dispositivo adecuado para la administración de la composición, por ejemplo, una  
35 jeringuilla, inhalante, pipeta, pinzas, cuchara medidora, cuentagotas (por ejemplo, cuentagotas ocular), hisopo (por

ejemplo, un hisopo de algodón o un hisopo de madera) o cualquier dispositivo de distribución. En una forma de realización preferida, el dispositivo es un hisopo.

## 5 EJEMPLOS

### **Materiales y métodos**

#### *Pauta de irradiación con UVB*

Se expusieron ratones hembra sin pelo Skh1 (8 semanas de edad) a irradiación con UVB como se describe, usando un banco de cuatro lámparas fluorescentes igualmente espaciadas (Southern New England Ultraviolet, Bradford, CN) (Kochevar et al. (1993) J. Invest. Dermatol. 100:186-93). Los ratones (n = 7 por grupo) se irradiaron de referencia o se expusieron a irradiación con UVB tres veces a la semana durante 10 semanas con una dosis inicial de 40 mJ/cm<sup>2</sup> (0,5 dosis mínima de eritema; MED) y aumentos graduales en incrementos de 0,5 MED hasta una dosis máxima de 4,5 MED. La dosis acumulada total de UVB fue 5,46 J/cm<sup>2</sup>. No se observaron reacciones agudas de quemaduras solares.

En estudios adicionales, ratones hembras Skh1 de 8 semanas, ratones transgénicos FVB con sobreexpresión específica en la piel de VEGF164 murino bajo el control del promotor K14 (Detmar et al. (1998) J. Invest. Dermatol. 111:1-6) o ratones FVB de tipo salvaje (n = 5 por grupo) se irradiaron con una única dosis de 40 mJ/cm<sup>2</sup> (0,5 MED) o 80 mJ/cm<sup>2</sup> (1 MED) de UVB. Además, se trataron ratones de tipo salvaje (n = 5/grupo) con 50 µg de anticuerpo neutralizante anti-VEGF de ratón (R&D Systems, Minneapolis, MN) o con 50 µg de IgG control mediante inyección intraperitoneal 24 horas antes de la exposición a 54 mJ/cm<sup>2</sup> de irradiación UVB como se ha descrito (Hirakawa et al. (2005) Blood 105:2392-9). Todos los estudios animales fueron aprobados por el subcomité sobre el cuidado en investigación animal del Massachusetts General Hospital.

35 *Linfangiografía intravital*

Se anestesiaron ratones (n = 7/grupo) usando avertina (0,4 g/kg, Sigma) y se inyectó por vía intradérmica 1 µl de una solución al 1% de colorante azul de Evans en NaCl en la superficie interna del borde de la oreja, usando una jeringuilla  
5 Hamilton de 10 µl para visualizar los vasos linfáticos. Las orejas de los ratones se fotografiaron 1, 3 y 5 minutos después de la inyección de colorante.

*RT-PCR cuantitativa a tiempo real*

10 Se aisló el ARN celular total de la piel completa del lomo de ratones 2 días después de la última irradiación con UVB (n = 7/grupo), usando el reactivo TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguido por tratamiento con DNasa RQ1, sin RNasa (Promega, Madison, WI). La piel completa se homogenizó usando Tissue Lyser  
15 (Qiagen GmbH, Alemania). Se investigaron los niveles de expresión del ARNm de VEGF-A, -C y -D mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, usando el sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA) como se ha descrito (Hong et al. (2004) Nat. Genet. 36:683-5).  
20 Los cebadores y sondas para VEGF-A, -C y -D murinos se describieron previamente (Kunstfeld et al. (2004) Blood 104:1048-57). Cada reacción se multiplexó con cebadores (directo 5'-TCACTGGCATGGCCTTCC-3' (SEQ ID NO:1), inverso 5'-GGCGGGCAGTCAGATCCA-3' (SEQ ID NO:2)) y sonda (5'-JOE-TTCCTACCCCAATGTGTCCGTCG-TAMRA-3' (SEQ ID NO:3)) para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como un control interno.

*Inmunotinción y análisis morfométrico de vasos asistido por ordenador*  
30

Los análisis de inmunofluorescencia se realizaron en secciones criostáticas de 6 µm de tejidos de ratón, usando anticuerpo policlonales contra LYVE-1 murino (Banerji et al. (1999) J. Cell Biol. 144:789-801), CD31 murina (BD Biosciences,  
35 Pharmingen, San Diego, CA) y los correspondientes anticuerpos secundarios marcados con ALEXA FLUOR® 488 o ALEXA FLUOR® 594

(Molecular Probes, Eugene, OR) (Kajiya et al. (2005) EMBO J. 24:2885-95). Las secciones se examinaron mediante un microscopio Nikon E-600 (Nikon, Melville, NY) y las imágenes se capturaron con una cámara digital SPOT™ (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI). Los análisis morfométricos se realizaron usando software IPLAB™ (Scanalytics, Fairfax, VA) como se ha descrito (Hirakawa et al. (2005) Blood 105:2392-9). Se examinaron tres campos diferentes de cada sección y se determinaron el número de vasos por micrómetro cuadrado, el tamaño medio de los vasos y el área relativa de tejido ocupada por los vasos linfáticos en la dermis en un área a una distancia de 200 µm de la unión epidermis-dermis. Se usó la prueba t de Student para datos independientes para analizar diferencias en densidad y tamaño de microvasos. Además, se realizaron tinciones rutinarias de hematoxilina-eosina como se ha descrito previamente (Prophet, Arrington y Sobin (1992) *Laboratory Methods in Histotechnology*).

#### **Ejemplo 1. La irradiación crónica con UVB produce agrandamiento de los vasos linfáticos cutáneos**

Para investigar el efecto de la irradiación UVB en la vasculatura linfática, primero se realizó irradiación crónica con UVB de ratones sin pelo Skh1 (Kligman (1996) Clin. Dermatol. 14:183-95) con una dosis acumulada de 5,46 J/cm<sup>2</sup> durante un periodo de 10 semanas. La irradiación crónica con UVB produjo formación pronunciada de arrugas como se ha descrito previamente (Yano et al. (2002) J. Invest. Dermatol. 118:800-5), mientras que no se detectaron tales cambios en ratones con irradiación de referencia. El examen histológico reveló los signos típicos de daño por UVB, incluyendo hiperplasia epidérmica, infiltración de células inflamatorias y formación de edema (figura 1A y B). Las tinciones de doble inmunofluorescencia para el marcador panvascular CD31 y para el receptor de ácido hialurónico linfático específico LYVE-1 revelaron agrandamiento moderado de vasos sanguíneos CD31+/LYVE-1- (figura 1C y D), de acuerdo con estudios previos (Yano et al. (2005) Br. J. Dermatol. 152:115-21). Sorprendentemente, los vasos linfáticos cutáneos positivos

para LYVE-1 aumentaron drásticamente de tamaño, con formas irregulares y algunas veces recubrimiento de células endoteliales incompleto de las paredes de los vasos, mientras que solo se encontraron vasos linfáticos normales, colapsados en ratones irradiados de referencia (figura 1C y D). Los análisis morfológicos ayudados por ordenador confirmaron que el área dérmica media ocupada por vasos linfáticos (aumento de 2,5 veces sobre los ratones irradiados de referencia;  $P < 0,01$ ) y el tamaño medio de los vasos linfáticos dérmicos (aumento de 2,1 veces;  $P < 0,01$ ) estaban significativamente aumentados en piel irradiada con UVB comparados con ratones irradiados de referencia (figura 1E y F). Por el contrario, la densidad de vasos linfáticos era comparable en ambos grupos (figura 1G).

15 **Ejemplo 2. Función deteriorada y aumento de fuga de vasos linfáticos después de irradiación crónica con UVB**

Para investigar más los efectos de irradiación crónica con UVB sobre la función de los vasos linfáticos cutáneos, se inyectó colorante azul de Evans por vía intradérmica en el borde de orejas de ratón. 1 y 3 minutos después de la inyección, se visualizaron vasos linfáticos marcadamente dilatados en piel de ratón crónicamente irradiada con UVB, comparado con ratones irradiados de referencia (figuras 2A, B, D, E). Después de 5 minutos, el colorante azul de Evans se había extravasado de vasos linfáticos en piel irradiada crónicamente con UVB, mientras que no se observó tal fuga en ratones irradiados de referencia (figuras 2C y F). Estos descubrimientos indican que los vasos linfáticos agrandados después de la irradiación con UV son permeables y están funcionalmente deteriorados.

30

**Ejemplo 3. La irradiación crónica con UVB produce aumento de la expresión de VEGF-A, pero no de VEGF-C o -D**

Para investigar si la irradiación crónica con UVB producía aumento de alguno de los factores linfangiogénicos conocidos, VEGF-A (Nagy et al. (2002) J. Exp. Med. 196:1497-506), VEGF-C o VEGF-D (Jussila et al. (2002) Physiol. Rev. 82:673-700) por

35

queratinocitos epidérmicos, a continuación se aislaron los ARN totales de la epidermis de la piel de oreja, seguido por análisis cuantitativo por RT-PCR con TAQMAN™ a tiempo real de la expresión de ARNm. Se encontró un aumento de 2,2 veces de la expresión del ARNm de VEGF-A en epidermis irradiada con UVB comparado con controles irradiados de referencia ( $P < 0,01$ ; figura 3A). Por el contrario, los niveles de expresión de los ARNm de VEGF-C y VEGF-D eran comparables en ambos grupos (figura 3B y C). Se obtuvieron resultados comparables cuando se examinó el ARN total aislado de lisados de piel completa, incluyendo tanto epidermis como dermis.

**Ejemplo 4. La irradiación aguda de UVB induce agrandamiento e hiperpermeabilidad de vasos linfáticos cutáneos**

A continuación se investigó si una dosis única de irradiación aguda con UVB podría ser suficiente para dañar la función de vasos linfáticos. Dos días después de una dosis única de irradiación con UVB de  $40 \text{ mJ/cm}^2$  (0,5 dosis mínima de eritema; MED), la visualización de los vasos linfáticos cutáneos mediante inyección intradérmica de colorante azul de Evans reveló que los vasos linfáticos eran indistinguibles de aquellos en piel no irradiada y que no eran hiperpermeables (figuras 4A-F). Por el contrario, la irradiación con una dosis de  $80 \text{ mJ/cm}^2$  de UVB (1 MED) produjo agrandamiento de vasos linfáticos cutáneos (figuras 4G-H) y se observó permeabilidad pronunciada (figura 4I). Análisis diferenciales de inmunofluorescencia de secciones de piel revelaron un agrandamiento dramático de vasos linfáticos LYVE-1+, pero solo aumento moderado de vasos sanguíneos CD31+/LYVE-1- después de irradiación de UVB con  $80 \text{ mJ/cm}^2$  (figura 4L). Sin embargo, no se observaron tales cambios en piel no irradiada o en piel irradiada con una dosis de UVB de  $40 \text{ mJ/cm}^2$  (figuras 4J, K).

**Ejemplo 5. Agrandamiento aumentado de vasos linfáticos en ratones transgénicos para VEGF-A irradiados con UVB**

Puesto que se encontró que la expresión del ARNm de VEGF-A estaba aumentada en queratonocitos epidérmicos después de irradiación con UVB, a continuación se investigó si VEGF-A derivado de epidermis podría fomentar directamente el agrandamiento y permeabilidad de vasos linfáticos inducido por UVB. Por tanto, se expusieron ratones FVB transgénicos que sobreexpresan VEGF164 murino bajo el control del promotor de queratina 14 (Detmar et al. (1998) J. Invest. Dermatol. 111:1-6) y ratones FVB de tipo salvaje a una dosis única de 40 mJ/cm<sup>2</sup> de irradiación con UVB o se irradiaron de referencia. Los análisis diferenciales de inmunofluorescencia de secciones de oreja 2 días después de la irradiación con UVB revelaron números y tamaños comparables de vasos sanguíneos CD31+/LYVE-1- y vasos linfáticos LYVE-1+ en ratones de tipo salvaje irradiados de referencia e irradiados con UVB (figuras 5A y C). Los ratones transgénicos para VEGF irradiados de referencia ya mostraron un ligero aumento en el tamaño de vasos linfáticos, comparados con los ratones de tipo salvaje (figura 5B). De forma importante, los vasos linfáticos aumentaron drásticamente después de la irradiación con UVB de ratones transgénicos para VEGF (figura 5D), asociado con el aumento del espesor de la oreja y formación de edema. Los análisis morfométricos ayudados por ordenador confirmaron un aumento de 1,3 veces del tamaño de los vasos linfáticos en ratones transgénicos para VEGF irradiados de referencia comparados con los ratones de tipo salvaje (p<0,05) y un aumento adicional, significativo de 1,9 veces después de irradiación con UVB (p<0,01; figura 5E). La densidad de vasos linfáticos era comparable en todos los grupos (figura 5F).

**Ejemplo 6. El bloqueo sistemático de VEGF-A inhibe el agrandamiento de vasos linfáticos inducido por UVB**

A continuación se investigó si el bloqueo sistémico de VEGF-A podría prevenir el agrandamiento de vasos linfáticos inducido por UVB. Se expusieron ratones FVB de tipo salvaje a una única dosis de 54 mJ/cm<sup>2</sup> de irradiación con UVB un día después de la inyección intraperitoneal de un anticuerpo

bloqueante contra VEGF-A o una cantidad igual de IgG control. Los tinciones de doble inmunofluorescencia para CD31 y LYVE-1 dos días después de la irradiación con UVB demostraron un agrandamiento pronunciado de los vasos linfáticos positivos para LYVE-1, así como dilatación moderada de vasos sanguíneos CD31+/LYVE-1- en ratones tratados con IgG control (figuras 6A y C). Por el contrario, el tratamiento sistémico con un anticuerpo bloqueante de VEGF-A previno completamente el aumento de vasos linfáticos y sanguíneos (figuras 6B y D).

10

**OTRAS FORMAS DE REALIZACIÓN**

Se han descrito un número de formas de realización. Sin embargo, se entenderá que se pueden hacer varias modificaciones sin separarse del ámbito de la invención que se define mediante las siguientes reivindicaciones.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de
- (a) un agente que disminuye la expresión, actividad o nivel  
5 de VEGF-A, el agente seleccionado de
- (i) un anticuerpo que se une a VEGF-A o VEGFR-2 y  
disminuye la señalización de VEGF-A,
- (ii) VEGF-A inactivo, mutado que se une a VEGFR-2 e  
interrumpe la señalización de VEGF-A,
- 10 (iii) VEGFR-2 o un fragmento del mismo que se une a  
VEGF-A e interrumpe la señalización de VEGF-A,
- (iv) un ácido nucleico de VEGF-A o VEGFR-2 que se puede  
unir a una secuencia celular de ácido nucleico de VEGF-A  
o VEGFR-2 y puede inhibir la expresión de VEGF-A o  
15 VEGFR-2, por ejemplo, un antisentido, ARNip o ribozimas,  
o
- (v) inhibidores de la tirosina quinasa del receptor de  
VEGF,
- para la preparación de un medicamento para reducir el daño  
20 en la piel inducido por UVB crónica o aguda, en donde el  
medicamento comprende además
- (b) un agente que aumenta la expresión, actividad o nivel de  
un factor linfangiogénico, en donde el factor  
linfangiogénico es VEGF-C, VEGF-D o VEGFR-3, el agente  
25 seleccionado de:
- (i) polipéptido VEGF-C o -D, o un fragmento  
biológicamente activo del mismo,
- (ii) un ácido nucleico que codifica un polipéptido VEGF-  
C o -D, o un fragmento biológicamente activo del mismo,  
30 o
- (iii) un ácido nucleico de VEGFR-3.
2. El uso según la reivindicación 1, para la preparación del  
medicamento para reducir el daño en la piel inducido por UVB  
35 crónica o aguda fomentando la función linfática.

3. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en donde el agente que disminuye la expresión, actividad o nivel de VEGF-A es un antagonista del receptor de VEGF.
  
- 5 4. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en donde el agente que disminuye la expresión, actividad o nivel de VEGF-A es un inhibidor de la actividad tirosina quinasa del receptor de VEGF.
  
- 10 5. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en donde el agente que disminuye la expresión, actividad o nivel de VEGF-A es un anticuerpo anti-VEGF.
  
- 15 6. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en donde el agente que aumenta la expresión, actividad o nivel de un factor linfangiogénico es un polipéptido VEGF-C o -D, o un fragmento biológicamente activo del mismo.

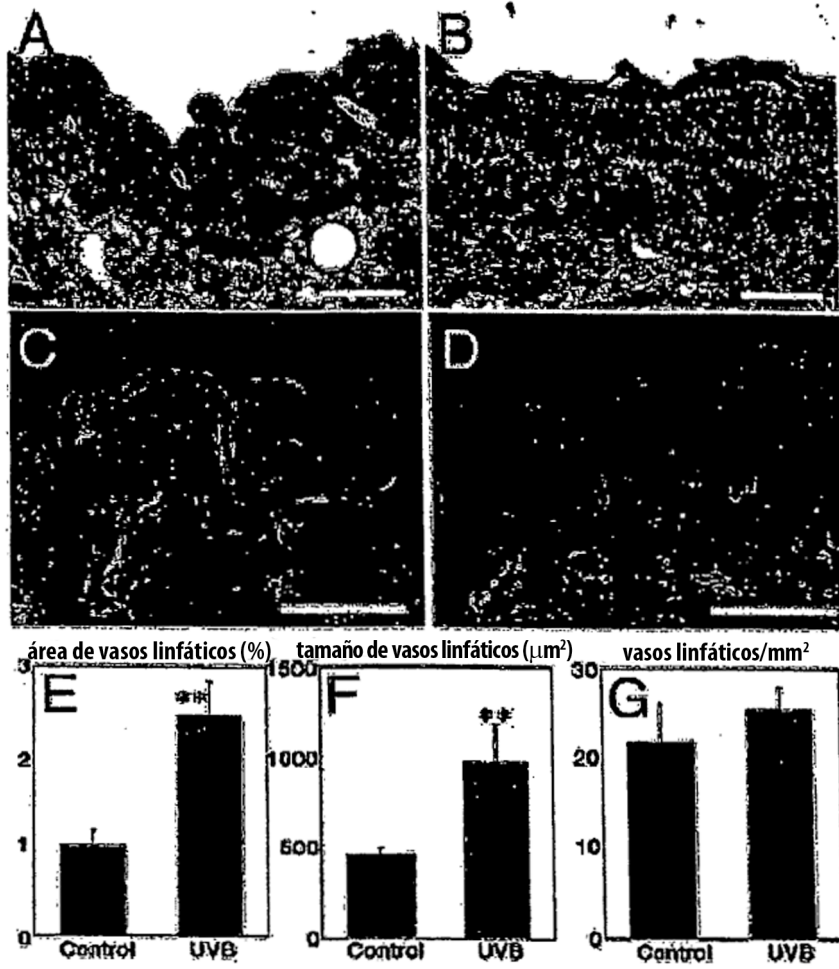


FIG. 1

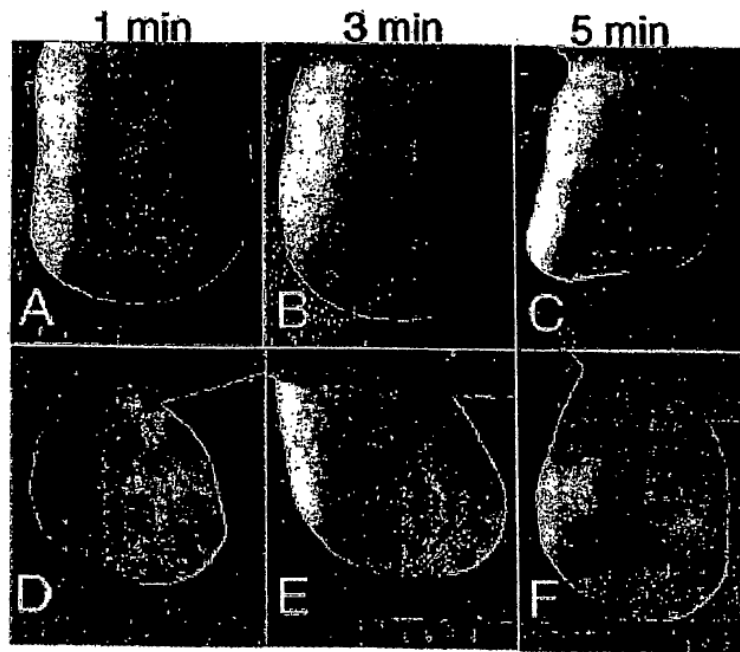


FIG. 2

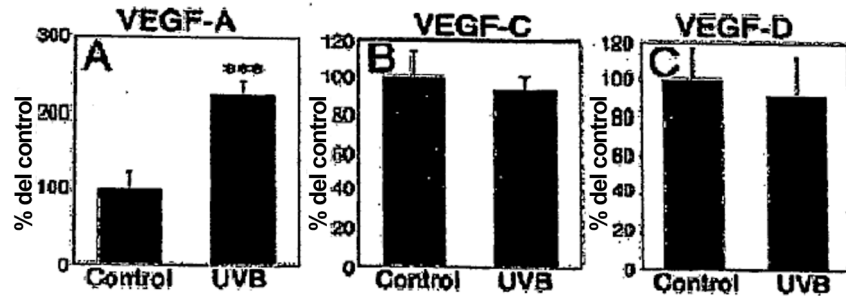


FIG. 3

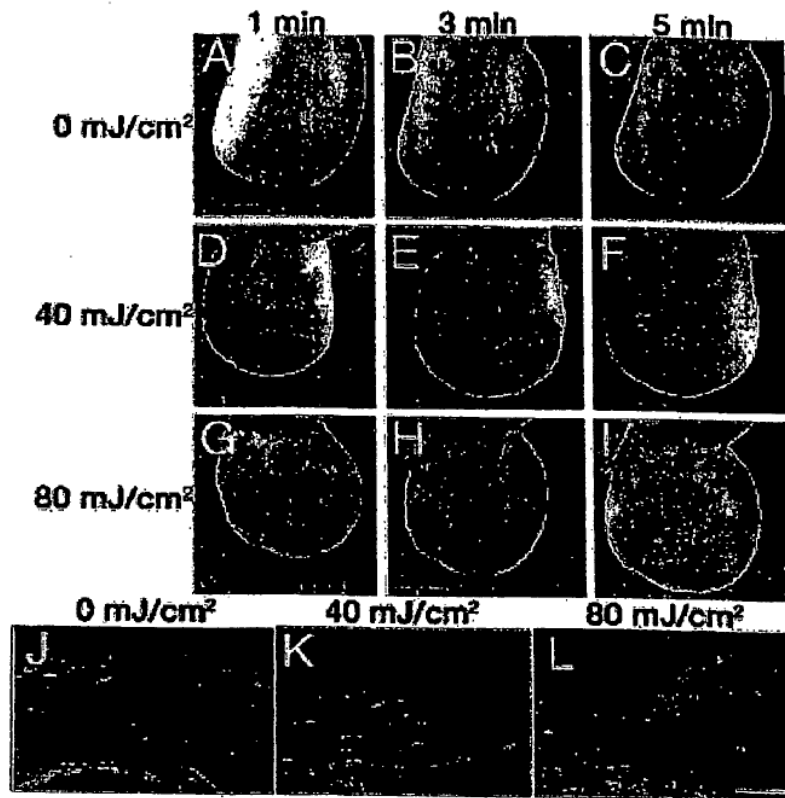


FIG. 4

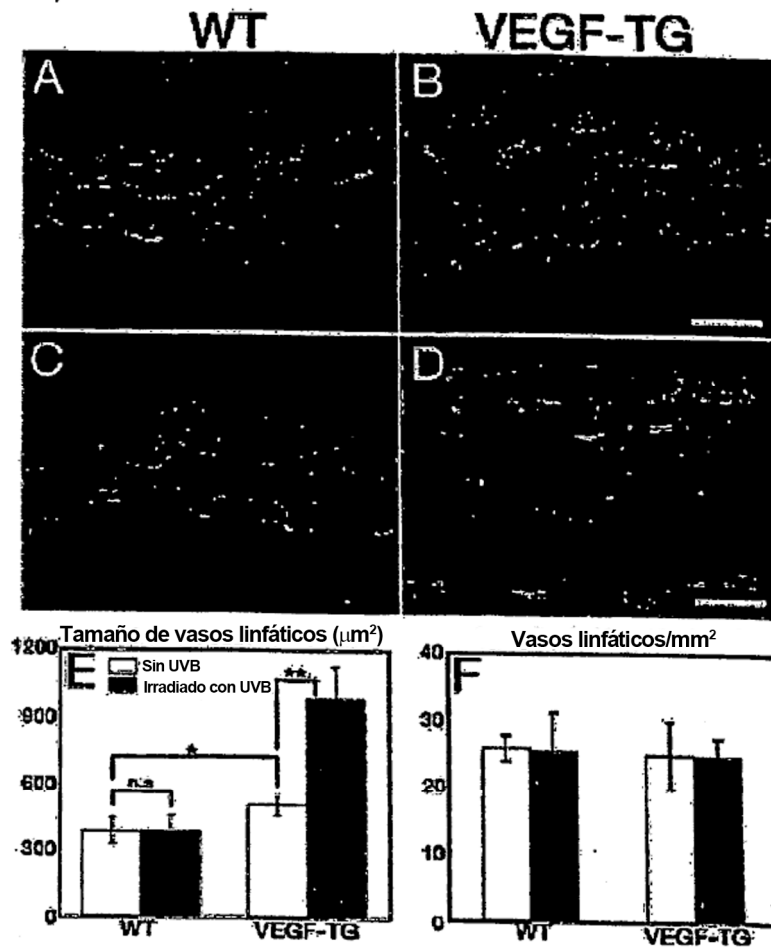


FIG. 5

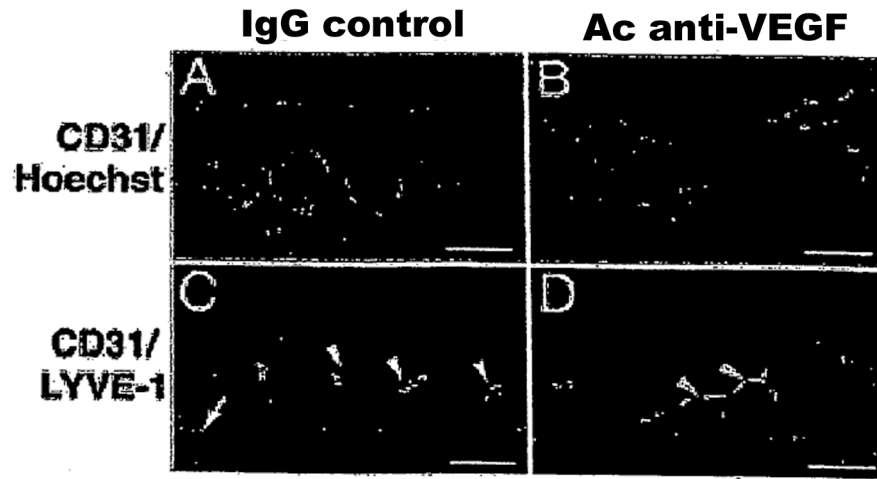


FIG. 6