



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 221 212**

51 Int. Cl.:
A61K 38/19 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

- 96 Número de solicitud europea: **98951483 .1**
96 Fecha de presentación : **01.10.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **1019082**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.07.2000**

54 Título: **Métodos para la modulación de la neovascularización y/o el crecimiento de arterias colaterales y/o de otras arterias a partir de conexiones arteriolares preexistentes.**

30 Prioridad: **02.10.1997 EP 97117155**

73 Titular/es: **MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN e.V.**
14195 Berlin, DE

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.12.2004**

72 Inventor/es: **Buschmann, Ivo, R. y Schaper, Wolfgang**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **01.12.2008**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **01.12.2008**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 221 212 T5

DESCRIPCIÓN

Métodos para la modulación de la neovascularización y/o el crecimiento de arterias colaterales y/o de otras arterias a partir de conexiones arteriolares preexistentes.

5

La presente invención se refiere generalmente a la modulación de la neovascularización y/o al crecimiento de arterias colaterales u otras arterias a partir de conexiones arteriolares preexistentes. En particular, la presente invención prevé un método para mejorar la neovascularización y/o el crecimiento de arterias colaterales y/o de otras arterias a partir de conexiones arteriolares preexistentes, que comprende poner en contacto un órgano, tejido o células con un factor estimulante de colonias (CSF) o una molécula de ácido nucleico que codifique para dicho CSF. La presente invención también se refiere al uso de un CSF o una molécula de ácido nucleico que codifique para dicho CSF para la preparación de composiciones farmacéuticas para mejorar la neovascularización y/o el crecimiento colateral de arterias colaterales y/o de otras arterias a partir de conexiones arteriolares preexistentes.

10

15

En el tratamiento de sujetos con enfermedades oclusivas arteriales, la mayoría de las estrategias de tratamiento actuales se dirigen a mejorar sus efectos. Los únicos enfoques curativos incluyen la angioplastia (dilatación por balón) o la cirugía de bypass (derivación). La primera conlleva un alto riesgo de reestenosis y sólo puede realizarse en ciertas enfermedades oclusivas arteriales, como la enfermedad cardíaca isquémica. La segunda es invasiva y también está restringida a ciertos tipos de enfermedades oclusivas arteriales. No hay tratamiento establecido para la mejora de la neovascularización y/o el crecimiento colateral.

20

El crecimiento vascular en los organismos adultos avanza mediante dos mecanismos distintos, el desarrollo de capilares (angiogénesis) y el aumento *in situ* de las conexiones arteriolares preexistentes dando lugar a auténticas arterias colaterales (Schaper, J., Collateral Circulation - Heart, Brain, Kidney, Limbs. Boston, Dordrecht, Londres: Kluwer Academic Publishers; 1993). Estudios recientes han descrito mecanismos que conducen a la angiogénesis con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como componente principal (Tuder, J. Clin. Invest. 95 (1995), 1798-1807; Plate, Nature 359 (1992), 845-848; Ferrara, Endocrine Reviews 13 (1992), 18-42; Klagsbrun, Annu. Rev. Physiol. 53 (1991), 217-239; Leung, Science 246 (1990), 1306-1309). Este mitógeno endotelial específico se regula por incremento por hipoxia y puede estimular el crecimiento de los vasos cuando se infunde en las patas traseras del conejo tras la escisión de la arteria femoral (Takeshita, J. Clin. Invest. 93 (1994), 662-670; Bauters, Am. J. Physiol. 267 (1994), H1263-H1271). Sin embargo, estos estudios no distinguieron entre desarrollo de capilares, un mecanismo denominado angiogénesis y el auténtico crecimiento arterial colateral. Aunque el VEGF sólo es mitógeno para las células endoteliales, el crecimiento arterial colateral requiere la proliferación de las células endoteliales y del músculo liso y que se produzcan marcados procesos de reestructuración (Schaper, J. Collateral Circulation - Heart, Brain, Kidney, Limbs. Boston, Dordrecht, Londres: Kluwer Academic Publishers; 1993; Jakeman, J. Clin. Invest. 89 (1992), 244-253; Peters, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90 (1993), 8915-8919; Millauer, Cell 72 (1993), 835-846; Pasyk, Am. J. Physiol. 242 (1982), H1031-H1037). Además, el desarrollo de capilares principalmente se observa en zonas isquémicas, por ejemplo, en el corazón del cerdo o en tumores que crecen rápidamente (Schaper, J. Collateral Circulation - Heart, Brain, Kidney, Limbs. Boston, Dordrecht, Londres: Kluwer Academic Publishers; 1993; Plate, Nature 359 (1992), 845-848; Bates, Curr. Opin. Genet. Dev. 6 (1996), 12-19; Bates, Curr. Opin. Genet. Dev. 6 (1996), 12-19; Gorge, Basic Res. Cardiol. 84 (1989), 524-535). Sin embargo, el auténtico crecimiento arterial colateral se disocia temporal y espacialmente de la isquemia en la mayoría de los modelos estudiados (Schaper, J. Collateral Circulation - Heart, Brain, Kidney, Limbs. Boston, Dordrecht, Londres: Kluwer Academic Publishers; 1993; Paskins-Huriburt, Circ. Res. 70 (1992), 546-553). Por tanto, son necesarios otros mecanismos, o mecanismos adicionales a los descritos para la angiogénesis, en las zonas isquémicas para explicar el crecimiento arterial colateral. De estudios anteriores se sabe que estas arterias colaterales crecen a partir de conexiones arteriolares preexistentes (Schaper, J. Collateral Circulation - Heart, Brain, Kidney, Limbs. Boston, Dordrecht, Londres: Kluwer Academic Publishers; 1993).

25

30

35

40

45

Sin embargo, aunque agentes tales como el VEGF y otros factores de crecimiento se están empleando en la actualidad para estimular el desarrollo de la angiogénesis tras la oclusión arterial, no se prevé que tales agentes puedan modular el crecimiento de conexiones arteriolares preexistentes dando lugar a auténticas arterias colaterales.

50

Por tanto, el problema técnico de la presente invención es prever composiciones farmacéuticas y métodos para la modulación de la neovascularización y/o el crecimiento de arterias colaterales y/o de otras arterias a partir de conexiones arteriolares preexistentes.

55

La solución a este problema técnico se logra proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

60

En consecuencia, la invención se refiere a Un método *in vitro* para mejorar el crecimiento de arterias colaterales y/o de otras arterias a partir de conexiones arteriolares preexistentes que comprende contactar órganos, tejidos o células con un factor estimulante de colonia (CSF).

65

El término "neovascularización" dentro del significado de la presente invención se refiere a una revisión de Sasayama, Circulation Res. 85 (1992), 1197-1204.

Para el propósito de la presente invención, el crecimiento de arterias a partir de conexiones arteriolares preexistentes también se denomina "arteriogénesis". En particular, la "arteriogénesis" es el crecimiento *in situ* de arterias mediante

la proliferación de células endoteliales y del músculo liso a partir de conexiones arteriolas preexistentes que irrigan el tejido isquémico, el tumor o los sitios de inflamación. Estos vasos crecen en buena parte fuera del tejido afectado pero son mucho más importantes para el aporte de nutrientes a la zona isquémica, el tumor o el sitio de inflamación que los capilares que se desarrollan en el tejido afectado mediante procesos angiogénicos.

En el contexto de la presente invención, el término “factor estimulante de colonias (CSF)” se refiere a proteínas y péptidos que pueden actuar sobre los macrófagos y que pueden estimular el crecimiento arterial colateral mediante la activación, la proliferación y/o la potenciación directas de las funciones efectoras de los macrófagos residentes y recientemente reclutados.

Por tanto, según la presente invención, cualquier CSF u otras sustancias que sean funcionalmente equivalentes a un CSF, concretamente que puedan estimular el crecimiento arterial colateral, pueden usarse para los propósitos de la presente invención. La acción del CSF empleado en la presente invención puede no limitarse a la especificidad anteriormente descrita, sino que también puede actuar sobre, por ejemplo, subpoblaciones de linfocitos y eosinófilos y/o hemocitoblastos (stem cells). Ventajosamente, el CSF es antiaterogénico.

De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) aplicado localmente produjo un aumento significativo en el crecimiento arterial colateral. Estos resultados se basaron en un marcado aumento de las mediciones de conductancia colateral. Las presiones periféricas y los flujos colaterales se midieron en vasodilatación máxima utilizando transductores de presión Statham, microesferas fluorescentes y análisis de FACS (separador de células activado por fluorescencia), que permitieron el cálculo de las conductancias colaterales a partir de las relaciones presión - flujo. Además, los angiogramas de cadáver revelaron un número significativamente mayor de arterias colaterales, en comparación con los animales no tratados. Que los inventores sepan, éste es el primer informe de que los factores antiaterogénicos y los factores estimulantes de colonias ampliamente establecidos en medicina pueden mejorar significativamente la neovascularización y/o el crecimiento arterial colateral y/o el crecimiento de otras arterias a partir de conexiones arteriolas preexistentes *in vivo*. Por tanto, los CSF que pueden emplearse según la presente invención son particularmente adecuados para el tratamiento de la aterosclerosis.

Experimentos realizados dentro del alcance de la presente invención demuestran que la infusión local de GM-CSF aumenta tanto la conductancia colateral como la periférica tras la oclusión de la arteria femoral debido a la mejora del crecimiento de los vasos por sus efectos proliferativos sobre los macrófagos. Por tanto, los CSF o las moléculas de ácidos nucleicos que codifican para los CSF pueden usarse para la activación y la proliferación de los macrófagos que, a su vez, conducen a la neovascularización y/o el crecimiento de las arterias colaterales, así como al crecimiento de arterias a partir de conexiones arteriolas preexistentes, lo cual es necesario para curar diversas enfermedades oclusivas. El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) pertenecen a una familia de factores de crecimiento glucoprotéicos necesarios para la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación de células precursoras hematopoyéticas. Por tanto, esta sustancia se ha utilizado clínicamente para tratar pacientes con trastornos hematológicos y oncológicos. Se pensó que la acción de estas moléculas de CSF estaba restringida a células de origen hematopoyético (Demetri, *Semin. Oncol.* 19 (1992), 362-385; Lieschke, *N. Engl. J. Med.* 327 (1992), 28-35/Comments 99-106). Además, varios estudios han demostrado que estos factores estimulantes de colonias también desempeñan un papel principal en el metabolismo lipídico.

Aunque experimentos recientes han demostrado que GM-CSF puede estimular directamente varias funciones efectoras de macrófagos y granulocitos, incluyendo la supervivencia celular (Selgas, *Kidney International* 50 (1996), 2070-2078; López, *J. Clin. Invest.* 78 (1986), 1220-1228; Eischen, *J. Immunol. Meth.* 147 (1991), 3408-3412; Vincent, *Exp. Hematol.* 20 (1992) 17-23; Mangan, *J. Immunol.* 147 (1991), 3408-3412), la activación, la proliferación (Hoedemakers, *Hepatology* 13 (1994), 666-674; Matsushima, *Japanese Journal of Clinical Hematology* 36 (1995), 406-409); la diferenciación (Munn, *Cancer Immunology, Immunotherapy* 41 (1995), 46-52) y la migración de los macrófagos tisulares locales (Bussolini, *Nature* 337 (1989), 471-473), no se sabía que GM-CSF u otros factores estimulantes de colonias desempeñan un papel en el desarrollo de las arterias colaterales y en la arteriogenesis.

Los CSF que han de emplearse en los métodos y usos de la presente invención pueden obtenerse de diversas fuentes descritas en la técnica anterior; véase, por ejemplo, Gaertner, *Bioconjugate Chemistry* 3 (1992), 262-268; Dexter, *European Journal of Cancer* 30A (1994), 15-9; Rohde, *Developments in Biological Standardization* 83 (1994), 121-127; Lu, *Protein Expression & Purification* 4 (1993), 465-472; Itoh, *Tanpakushitsu Kakusan Koso - Protein, Nucleic Acid, Enzyme* 35, 2920-2631. Existe la posibilidad, en el uso de las técnicas de ADN recombinante, de preparar diversos derivados del factor estimulante de colonias (CSF) que comprendan una parte funcional del mismo o proteínas que son funcionalmente equivalentes a los CSF, tal como se describió anteriormente. En este contexto, tal como se usa a lo largo de esta memoria descriptiva, “equivalente funcional” o “parte funcional” de un CSF significa una proteína que tiene parte o toda la conformación estructural primaria de un CSF que tiene al menos la propiedad biológica de estimular al menos una función efectora de macrófago o granulocito mencionada anteriormente. La parte funcional de dicha proteína o la proteína funcionalmente equivalente puede ser un derivado de un CSF a modo de delección(es), sustitución(es), inserción(es), adición(es) y/o reemplazo(s) aminoacídicos de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio del ADN subyacente. Las técnicas de ADN recombinante son bien conocidas por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (*Molecular cloning; A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989)). Los CSF modificados se describen, por ejemplo, en Yamasaki, *Journal of Biochemistry* 115 (1994), 814-819.

Los CSF o partes funcionales de los mismos o proteínas que son funcionalmente equivalentes a los CSF, pueden producirse mediante síntesis químicas convencionales conocidas o técnicas recombinantes que emplean secuencias de aminoácidos y ADN descritas en la técnica anterior; véase, por ejemplo, el documento EP-A-0.177.568; Han, Source Gene 175 (1996), 101-104; Kothari, Blood Cells, Molecules & Diseases 21 (1995), 192-200; Holloway, European Journal of Cancer 30A (1994), 2-6. Por ejemplo, los CSF pueden producirse cultivando una célula o línea celular adecuada que se ha transformado con una secuencia de ADN que codifica, mediante la expresión bajo el control de secuencias reguladoras, para un CSF o una parte funcional del mismo o una proteína que es funcionalmente equivalente al CSF. Técnicas adecuadas para la producción de proteínas recombinantes se describen, por ejemplo, en Sambrook, mencionado anteriormente. Los expertos en la técnica también conocen métodos para la construcción de CSF y proteínas, tal como se describió anteriormente, útiles en los métodos y usos de la presente invención mediante medios sintéticos químicos.

En otra realización, la invención se refiere al uso de un factor estimulante de colonia (CSF) seleccionado del grupo que consiste en factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), sustancias funcionalmente equivalentes y derivados funcionales de los mismos para la preparación de una composición farmacéutica para mejorar el crecimiento de arterias colaterales y/o de otras arterias a partir de conexiones arteriolares colaterales preexistentes.

La composición farmacéutica comprende al menos un CSF, tal como se definió anteriormente y, opcionalmente, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden tales vehículos pueden formularse mediante métodos convencionales. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto en una dosis adecuada. El régimen de dosificación puede determinarse por el médico que atienda, teniendo en cuenta el estado del paciente, la gravedad de la enfermedad y otros factores clínicos. La administración de las composiciones adecuadas puede llevarse a cabo de diferentes formas, por ejemplo, mediante la administración por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. El régimen de dosificación se determinará por el médico que atienda y por otros factores clínicos. Como es bien conocido en la técnica médica, la dosis para cualquier paciente depende de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, la superficie corporal, la edad, el compuesto particular que ha de administrarse, el sexo, el momento y la vía de administración, el estado de salud general y otros fármacos que se estén administrando simultáneamente. En general, el régimen como administración regular de la composición farmacéutica debe estar en el intervalo de 1 μ g a 10 mg de unidades por día. Si el régimen es una infusión continua, también debe estar en el intervalo de 1 μ g a 10 mg por kilogramo de peso corporal por minuto, respectivamente. El progreso puede monitorizarse mediante la evaluación periódica. Las dosis variarán. Una dosis posible para la administración por vía intravenosa de ADN es desde aproximadamente 10^6 a 10^{12} copias de la molécula de ADN. Las composiciones de la invención pueden administrarse local o generalmente. La administración será generalmente por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa. El ADN también puede administrarse directamente al sitio diana, por ejemplo, mediante administración biolística (sistema de bombardeo de partículas) a un sitio diana interno o externo o mediante catéter a un sitio en una arteria.

En una realización preferida, dicho CSF utilizado en los métodos de la invención se selecciona del grupo que consiste en el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), el factor estimulante de colonias I (CSF-I), sustancias funcionalmente equivalentes o derivados funcionales de los mismos.

En una realización preferida, los usos de la invención pueden emplearse para tratar enfermedades producidas por una enfermedad vascular o un infarto de miocardio o un accidente cerebrovascular o para tratar cualquier enfermedad en la que sea necesario un aumento de la irrigación a través de arterias colaterales, etc.

En una realización particularmente preferida, los usos de la invención se diseñan para aplicarse a un sujeto que padece arteriosclerosis, una arteriopatía coronaria, una enfermedad oclusiva cerebral, una enfermedad oclusiva periférica, una enfermedad oclusiva visceral, una enfermedad oclusiva renal, una insuficiencia arterial mesentérica o una oclusión oftálmica o retiniana o para cualquier enfermedad en la que las placas ateroscleróticas en la pared vascular conduzcan a una obstrucción del diámetro del vaso.

En otra realización preferida, los usos de la invención se diseñan para aplicarse a un sujeto durante o tras la exposición a un tratamiento por agente o radiación o intervención quirúrgica que dañe o destruya las arterias.

En una realización preferida, el CSF utilizado en los métodos y usos de la invención es un CSF recombinante. Las secuencias de ADN que codifican para los CSF que pueden utilizarse en los métodos y usos de la invención se describen en la técnica anterior; véase, por ejemplo, Holloway, European Journal of Cancer 30A (1994), 2-6 o la bibliografía citada anteriormente. Además, secuencias de aminoácidos y ADN de CSF están disponibles en la base de datos de Gene Bank. Tal como se describió anteriormente, los métodos para la producción de proteínas recombinantes son bien conocidos por las personas expertas en la técnica; véase, por ejemplo, Sambrook, mencionado anteriormente.

En otra realización preferida, el método y el uso de la presente invención se diseñan para aplicarse junto con un factor de crecimiento, preferiblemente el factor de crecimiento de fibroblastos o el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Esta realización es particularmente adecuada para mejorar tanto el desarrollo de capilares (angiogé-

ES 2 221 212 T5

nesis) como el aumento *in situ* de las conexiones arteriolas preexistentes dando lugar a auténticas arterias colaterales. Las composiciones farmacéuticas que comprenden, por ejemplo, CSF tal como GM-CSF, y un factor de crecimiento tal como VEGF, pueden usarse para el tratamiento de insuficiencias venosas periféricas o arteriopatías coronarias.

5 El método *in vitro* descrito puede comprender:

(a) obtener células, tejido o un órgano de un sujeto;

10 (b) introducir en dichas células, tejido u órgano, una molécula de ácido nucleico que codifique y pueda expresar el CSF *in vivo*; y

(c) volver a introducir las células, tejido u órgano obtenidos en la etapa (b) en el mismo sujeto o en un sujeto diferente.

15 Se prevé mediante la presente invención que los CSF se administren, o bien solas o en combinación, y opcionalmente junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichas moléculas de ácido nucleico pueden integrarse de manera estable en el genoma de la célula o pueden mantenerse de una forma extracromosómica; véase, por ejemplo, Calos, Trends Genet. 12 (1996), 463-466. Por otra parte, pueden usarse vectores virales descritos en la técnica anterior para transfectar ciertas células, tejidos u órganos.

20 Además, es posible usar una composición farmacéutica que comprenda una molécula de ácido nucleico que codifique para un CSF en tratamiento génico. Sistemas de administración génica adecuados pueden incluir liposomas, sistemas de administración mediados por receptor, ADN desnudo y vectores virales, tales como herpesvirus, retrovirus, adenovirus y virus asociados a adenovirus, entre otros. La administración de moléculas de ácido nucleico a un sitio específico en el organismo para el tratamiento génico también puede llevarse a cabo usando un sistema de administración biolística, tal como el descrito por Williams (Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88 (1991), 2726-2729).

Métodos habituales para transfectar células con moléculas de ácidos nucleicos son bien conocidos por los expertos en la técnica de la biología molecular; véase, por ejemplo, el documento WO 94/29469. El tratamiento génico para evitar o disminuir el desarrollo de las enfermedades descritas en el presente documento puede llevarse a cabo mediante la administración directa de la molécula de ácido nucleico que codifica para un CSF a un paciente o mediante la transfección de células con dicha molécula de ácido nucleico *ex vivo* y la infusión de las células transfectadas en el paciente. Además, la investigación relacionada con la transferencia génica en células de la línea reproductora es uno de los campos que se han desarrollado más rápidamente en la biología reproductora. El tratamiento génico, que se basa en la introducción de genes terapéuticos en las células mediante técnicas *ex vivo* o *in vivo*, es una de las aplicaciones más importantes de la transferencia génica. Vectores y métodos adecuados para el tratamiento génico *in vitro* o *in vivo* se describen en la bibliografía y son conocidos por el experto en la técnica; véase, por ejemplo, Giordano, Nature Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Cir. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1995), 1077-1086; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; los documentos WO94/29469 y WO97/00957, o Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640, y la bibliografía citada en ellos. Las moléculas de ácido nucleico comprendidas en la composición farmacéutica pueden diseñarse para su introducción directa o para su introducción mediante liposomas o vectores virales (por ejemplo, adenovirales, retrovirales) que contienen dicha molécula de ácido nucleico en la célula. Preferiblemente, dicha célula es una célula de la línea reproductora, una célula embrionaria o una célula huevo (óvulo), o derivadas de las mismas.

45 Ha de entenderse que las moléculas de ácido nucleico introducidas que codifican para el CSF expresan dicho CSF tras su introducción en dicha célula y preferiblemente permanecen en este estado durante toda la vida de dicha célula. Por ejemplo, líneas celulares que expresen de manera estable dicho CSF pueden obtenerse por ingeniería genética según métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. En lugar de utilizar vectores de expresión que contengan orígenes virales de replicación, las células huésped pueden transformarse con la molécula de ADN recombinante o el vector de la invención y un marcador de selección, en el mismo vector o en vectores separados. Tras la introducción del ADN exógeno, las células modificadas por ingeniería genética pueden dejarse crecer durante 1 - 2 días en un medio enriquecido y después se cambian a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite la selección de las células que han integrado de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crecen para formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede utilizarse ventajosamente para obtener por ingeniería genética líneas celulares que expresen un CSF. Tales células también pueden administrarse según las composiciones farmacéuticas, los métodos y los usos de la invención.

60 Pueden usarse varios sistemas de selección incluyendo, pero no limitándose a ellos, la timidina cinasa del virus herpes simplex (Wigler, Cell 11 (1977), 223), la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szibalska, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 48 (1962), 2026) y la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy, Cell 22 (1980), 817) en células tk⁻, hgprt⁻ o aprt⁻, respectivamente. Además, la resistencia a un antimetabolito puede usarse como base de la selección para dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77 (1980), 3567; O'Hare, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 78 (1981), 1527), gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 78 (1981), 2072); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Colberre-Garapin, J. Mol. Biol. 150 (1981), 1); higo, que confiere resistencia a higromicina (Santerre, Gene 30 (1984), 147); o puromicina (pat, puromicina N-acetil transferasa). Se han descrito genes de selección adicionales, por ejemplo, trpB, que permite

a las células utilizar indol en lugar de triptófano; hisD, que permite a las células utilizar histidinol en lugar de histidina (Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85 (1988), 8047); y ODC (ornitina descarboxilasa) que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa, la 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, 1987, en: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.).

Por tanto, en una realización preferida, la molécula de ácido nucleico comprendida en la composición farmacéutica anterior se diseña para la expresión del CSF por células *in vivo* mediante, por ejemplo, la introducción directa de dicha molécula de ácido nucleico o la introducción de un plásmido, un plásmido en liposomas, o un vector viral (por ejemplo, adenoviral, retroviral) que contenga dicha molécula de ácido nucleico.

En una realización preferida del método y los usos de la presente invención, el derivado de CSF o sustancia equivalente funcional es un anticuerpo, (poli) péptido, ácido nucleico, pequeño compuesto orgánico, ligando, hormona, PNA o peptidomimético.

En este contexto, se entiende que los CSF que han de emplearse según la presente invención pueden modificarse, por ejemplo, mediante métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, es posible utilizar fragmentos que mantienen la actividad biológica de los CSF, tal como se describió anteriormente, concretamente la capacidad de estimular el crecimiento arterial colateral. Esto permite además la construcción de proteínas y péptidos quiméricos, en los que otras secuencias de aminoácidos funcionales pueden, o bien unirse físicamente al CSF mediante, por ejemplo, medios químicos, o bien pueden fusionarse mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Además, pueden realizarse simulaciones de plegamiento y rediseño por ordenador de los motivos estructurales de los CSF o de sus receptores, utilizando programas informáticos apropiados (Olszewski, Proteins 25 (1996), 286-299; Hoffman, Comput. Appl. Biosci. 11 (1995), 675-679). El modelado por ordenador del plegamiento de las proteínas puede utilizarse para el análisis conformacional y energético de modelos detallados de receptor y proteína (Monge, J. Mol. Biol. 247 (1995), 995-1012; Renouf, Adv. Exp. Med. Biol. 376 (1995), 37-45). En particular, pueden utilizarse programas apropiados para la identificación de sitios interactivos del CSF y su receptor mediante búsquedas asistidas por ordenador para secuencias peptídicas complementarias (Fassina, Immunomethods 5 (1994), 114-120). Otros sistemas informáticos apropiados para el diseño de proteínas y péptidos se describen en la técnica anterior, por ejemplo, en Berry, Biochem. Soc. Trans. 22 (1994), 1033-1036; Wodak, Ann. N. Y. Acad. Sci. 501 (1987), 1-13; Pabo, Biochemistry 25 (1986), 5987-5991. Los resultados obtenidos a partir del análisis por ordenador descrito anteriormente pueden usarse para, por ejemplo, la preparación de peptidomiméticos de CSF o fragmentos de los mismos. Tales análogos pseudopeptídicos de la secuencia de aminoácidos naturales de la proteína pueden imitar muy eficazmente la proteína o el péptido originales (Benkirane, J. Biol. Chem. 271 (1996), 33218-33224). Por ejemplo, la incorporación de residuos de Ω -aminoácidos acirales fácilmente disponibles en una proteína CSF o en un fragmento de la misma, da como resultado la sustitución de los enlaces amida por unidades de polimetileno de una cadena alifática, proporcionando así una estrategia conveniente para construir un peptidomimético (Banerjee, Biopolymers 39 (1996), 769-777). Peptidomiméticos superactivos análogos de pequeñas hormonas peptídicas en otros sistemas se describen en la técnica anterior (Zhang, Biochem. Biophys. Res. Commun. 224 (1996), 327-331). Peptidomiméticos de CSF apropiados también pueden identificarse mediante la síntesis de librerías combinatorias de peptidomiméticos mediante alquilación de amida sucesiva y las pruebas de los compuestos resultantes, por ejemplo, según los métodos descritos en la técnica anterior. Métodos para la generación y el uso de librerías combinatorias de peptidomiméticos se describen en la técnica anterior, por ejemplo, en Ostresh, Methods in Enzymology 267 (1996), 220-234 y Dorner, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 709-715. Además, pueden emplearse anticuerpos o fragmentos de los mismos que, por ejemplo, al unirse a un receptor de CSF, imitan la actividad biológica de un CSF.

Además, puede usarse una estructura tridimensional y/o cristalográfica del CSF o de su receptor para el diseño de inhibidores peptidomiméticos de la actividad biológica de un CSF (Rose, Biochemistry 35 (1996), 12933-12944; Rutenber, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 1545-1558).

Tal como se trató anteriormente, la neovascularización y el crecimiento de arterias a partir de conexiones arteriales preexistentes es esencial para el aporte de nutrientes a los tumores. Por tanto, si se suprimiera el crecimiento de dichos vasos al tumor, habría de esperarse la supresión y/o la inhibición del crecimiento tumoral.

Los macrófagos tumorales requieren factores de crecimiento específicos, por ejemplo, M-CSF/CSF-1, para su proliferación durante toda la fase G1 del ciclo celular. Una vez que las células entran en la fase S, los macrófagos completan la mitosis en ausencia de M-CSF/CSF-1. Durante la fase G1, la ciclina D (un regulador del ciclo celular que, junto con la cinasa dependiente de ciclina (cdk 4), estimula la entrada de la célula en la fase M (Alberts, Biology of the Cell (1989), Segunda Edición) es inducida por la estimulación de M-CSF/CSF-1. La actividad enzimática de la ciclina D podría regularse negativamente por proteínas inhibitoras recientemente notificadas para determinar el momento de la entrada en la fase S en los macrófagos (Matsushime, Japanese Journal of Clinical Hematology 36 (1995), 406-409).

Pudo demostrarse que, entre los macrófagos dependientes de CSF, especialmente los monocitos, así como los macrófagos específicos de tejido (en el aparato reproductor femenino) parecen ser dependientes del CSF-1 para su diferenciación adicional (Maito, Mol. Reprod. Dev. 46 (1997), 85-91). Aparte de éste, GM-CSF/M-CSF son esenciales para la supervivencia de los macrófagos. Por tanto, dado que pudo demostrarse, según la presente invención, que los CSF estimulan la neovascularización y el crecimiento arterial colateral, la retirada de estos factores daría como resultado la inhibición o la disminución de la neovascularización y/o el crecimiento arterial colateral y, por tanto, la su-

ES 2 221 212 T5

presión del crecimiento tumoral. Agentes que suprimen la neovascularización y/o el crecimiento de arterias colaterales y/o de otras arterias a partir de conexiones arteriolares preexistentes, pueden ser péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, pequeños compuestos orgánicos, hormonas, neurotransmisores, peptidomiméticos o PNA (Milner Nature Medicine 1 (1995), 879-880; Hupp, Cell 83 (1995), 237-245; Gibbs, Cell 79 (1994), 193-198). Para la preparación y la aplicación de tales compuestos, el experto en la técnica puede utilizar los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los mencionados anteriormente.

En una realización preferida, el agente utilizado en los métodos y usos de la invención, tal como se describió anteriormente, inhibe la actividad biológica de un CSF y/o inhibe una señal intracelular o una cascada de señales que comprende MARK y/o JNK/SAPK desencadenada en los macrófagos mediante el receptor del CSF. Varios receptores de CSF se describen en la técnica anterior, por ejemplo en Chemokine Receptors, Immunology Today (1996), Suppl S: 26-27; Bendel, Leukemia & Lymphoma 25 (1997), 257-270; Perentesis, Leukemia & Lymphoma 25 (1997), 247-256; Bishay, Scandinavian Journal of Immunology 43 (1996), 531-536; Kluck, Annals of Hematology 66 (1993), 15-20; Raivich, Journal of Neuroscience Research 30 (1991), 682-686 o en Wong, Cellular Immunology 123 (1989), 445-455.

En otra realización preferida, dicho receptor es un receptor de CSF. Dicho receptor o dominios específicos del mismo, que es responsable de desencadenar una señal que conduce al crecimiento arterial colateral, puede bloquearse o modularse mediante métodos descritos en el presente documento.

En una realización preferida, el agente utilizado en los métodos y usos de la invención es un anticuerpo, (poli) péptido, ácido nucleico, pequeño compuesto orgánico, ligando, hormona, PNA o peptidomimético.

Pueden usarse moléculas de ácidos nucleicos que hibridan específicamente con CSF que codifican para genes y/o sus secuencias reguladoras para la represión de la expresión de dicho gen, por ejemplo, debido a un efecto antisentido o de triple hélice, o pueden usarse para la construcción de ribozimas apropiadas (véanse, por ejemplo, los documentos EP-B1 0 291 533, EP-A1 0 321 201, EP-A2 0 360 257) que escinden específicamente el (pre)-ARNm de un gen que codifica para un CSF. Las secuencias nucleicas y aminoacídicas que codifican para los CSF son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Han, Source Gene 175 (1996), 101-104; Kothari, Blood Cell, Molecules & Diseases 21 (1995), 192-200 o en Holloway, European Journal of Cancer 30A (1994), 2-6. La selección de los sitios diana apropiados y de las ribozimas correspondientes puede realizarse tal como se describe, por ejemplo, en Steinecke, Ribozymes. Methods in Cell Biology, 50, Galbraith *et al.*, Eds. Academic Press, Inc. (1995), 440-460.

Los ácidos nucleicos comprenden ADN o ARN o híbridos de los mismos. Además, dicho ácido nucleico puede contener, por ejemplo, enlaces tioéster y/o análogos de nucleótidos, comúnmente usados en enfoques antisentido de oligonucleótidos. Dichas modificaciones pueden ser útiles para la estabilización de la molécula de ácido nucleico frente a las endo y/o exonucleasas en la célula. Además, la técnica denominada de "ácido nucleico peptídico" (PNA) puede usarse para la inhibición de la expresión de un gen que codifique para un CSF. Por ejemplo, la unión de los PNA a moléculas de ácidos nucleicos de ARN y ADN complementarias, así como a diversas moléculas de cadena simple, puede investigarse sistemáticamente utilizando, por ejemplo, técnicas de desnaturalización térmica e interacción de superficie BIAcore (Jensen, Biochemistry 36 (1997), 5072-5077). La síntesis de PNA puede llevarse a cabo según métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en Koch, J. Pept. Res. 49 (1997), 80-88; Finn, Nucleic Acids Research 24 (1996), 3357-3363. Además, pueden realizarse simulaciones de plegamiento y rediseños por ordenador de los motivos estructurales de los CSF y de sus receptores, tal como se describió anteriormente, para diseñar fármacos que pueden inhibir la actividad biológica de los CSF.

Además, pueden emplearse anticuerpos que reconozcan específicamente CSF o sus receptores o partes, es decir, fragmentos específicos o epítomos, de tales CSF y receptores, inactivando así al CSF o al receptor del CSF. Estos anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales o anticuerpos sintéticos, así como fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos Fab, Fv o scFv, etc. Los anticuerpos o los fragmentos de los mismos pueden obtenerse usando métodos que se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988 o en el documento EP-B1 0 451 216 y en la bibliografía citada en ellos. Por ejemplo, puede emplearse resonancia de plasmón superficial en el sistema BIAcore para aumentar la eficacia de anticuerpos de fago que se unen a un epítipo del CSF o a su receptor (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13).

Supuestos inhibidores que pueden usarse según la presente invención, incluyendo péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, pequeños compuestos orgánicos, ligandos, hormonas, peptidomiméticos, PNA y similares, que pueden inhibir la actividad biológica de un CSF o de su receptor, pueden identificarse según los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en el documento EP-A-O 403 506 o en los ejemplos adjuntos.

En una realización preferida, el agente que bloquea la interacción del CSF y su receptor se selecciona del grupo que consiste en

- (i) un anticuerpo anti-CSF y un anticuerpo anti-receptor de CSF; y/o
- (ii) una forma no estimulante de una proteína CSF y una forma soluble de un receptor de CSF.

Tales anticuerpos, así como las formas inactivas y solubles de los CSF y sus receptores, respectivamente, se describen, por ejemplo, en Kogut, *Inflammation* 21 (1997) o en Shimamura, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 38 (1990), 283-286 y pueden obtenerse según los métodos conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, anteriormente.

5 En una realización preferida, la composición farmacéutica en el uso de la invención se diseña para su administración mediante catéter por vía intraarterial, intravenosa, intraperitoneal o subcutánea. En los ejemplos de la presente invención, la proteína CSF se administró localmente mediante minibomba osmótica.

10 Éstas y otras realizaciones se describen o son obvias a partir de la descripción y los ejemplos de la presente invención, y están englobados en ellos. Bibliografía adicional con respecto a cualquiera de los métodos, usos y compuestos que han de emplearse según la presente invención pueden recuperarse de bibliotecas públicas usando, por ejemplo, dispositivos electrónicos. Por ejemplo, puede utilizarse la base de datos pública "Medline", que está disponible en Internet, por ejemplo, en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. Bases de datos y direcciones adicionales, tales como <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.infobiogen.fr/>, http://www.fmi.ch/biology/research_tools.html, <http://www.tirg.org/>, son conocidas por el experto en la técnica y también pueden obtenerse utilizando, por ejemplo, <http://www.lycos.com>. Un resumen de la información de patentes en biotecnología y un estudio de las fuentes pertinentes de información sobre patentes, útil para la investigación retrospectiva y para el conocimiento actual, se facilita en Berks, *TIBTECH* 12 (1994), 352-364.

20 El uso y los métodos de la invención pueden utilizarse para el tratamiento de todas las clases de enfermedades que hasta ahora se desconocía que estaban relacionadas o que dependen de la modulación de la neovascularización y/o el crecimiento de arterias colaterales y/o de otras arterias a partir de conexiones arteriolas preexistentes. Los métodos y usos de la presente invención pueden emplearse deseablemente en humanos, aunque también se incluye el tratamiento animal mediante los métodos y usos descritos en el presente documento.

25 Las figuras muestran:

Figura 1: Angiografía de la pata derecha completa de un animal tratado con GM-CSF.

30 Figura 2: Angiografía de la pata derecha completa (A) y de la circulación colateral (B) (sin fémur) de un animal tratado con GM-CSF.

Figura 3: Angiografía de la circulación colateral (sin fémur) de un animal tratado con GM-CSF.

35 Figura 4: Angiografía de la pata derecha completa de un animal tratado con PBS.

Figura 5: Angiografía de la circulación colateral (sin fémur) de un animal tratado con PBS).

40 Los ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

Oclusión de la arteria femoral de animales y administración local de agentes

45 El presente estudio se llevó a cabo con el permiso del Estado de Hessen, Regierungspräsidium Darmstadt, según la sección 8 de la *Ley Alemana para la Protección de los Animales*. Es conforme a la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Guía para el cuidado y el uso de los animales de laboratorio)* publicada por el *US National Institute of Health* (Instituto Nacional de la Salud de los EE.UU.) (Publicación del NIH número 85-34, revisada en 1985). Se sometió a 6 conejos a 7 días de oclusión de la arteria femoral derecha. Se asignaron aleatoriamente a recibir, o bien GM-CSF (Novartis, Nuremberg, Alemania) (2ML-2, Alza Corp; 3 µg en 2 mL de PBS (solución salina tamponada con fosfato) a una tasa de 10 µL/h), o PBS localmente mediante una minibomba osmótica. Para la implantación inicial de las minibombas osmóticas, se anestesió a los animales con una inyección intramuscular de clorhidrato de ketamina (de 40 a 80 mg/kg peso corporal) y xilazina (de 8 a 9 mg/kg peso corporal). Se administraron dosis complementarias de anestésico (del 10% al 20% de la dosis inicial) por vía intravenosa, según fue necesario.

50 La intervención quirúrgica se realizó en condiciones estériles. Las arterias femorales se expusieron y se canularon con un catéter estéril de polietileno (diámetro interno: 1 mm, diámetro externo: 1,5 mm) que apuntaba hacia arriba, colocándose la punta del catéter en posición distal con respecto a la ramificación de la arteria circunfleja femoral. El propio catéter se conectó a la minibomba osmótica (2ML-2, Alza Corp), que se implantó bajo la piel de la parte inferior derecha del abdomen. Después de esto, los animales se vistieron con un traje diseñado especialmente que les permitía moverse libremente, pero evitando la automutilación. Los conejos se alojaron individualmente con libre acceso al agua y a la comida para asegurar la movilidad. Los pesos corporales y la temperatura corporal en los conejos tratados con GM-CSF no difirieron significativamente de los de los conejos control. Los valores séricos de proteína total, albúmina, transaminasa glutámica oxaloacética y transaminasa glutámica pirúvica no cambiaron significativamente por el tratamiento de GM-CSF.

65 Siete días tras la implantación, se anestesió de nuevo a los animales con una inyección intramuscular de clorhidrato de ketamina y xilazina para practicar una traqueotomía y ventilación artificial. La anestesia se aumentó con pentobar-

ES 2 221 212 T5

bital (12 mg/kg peso corporal por hora). La arteria carótida se canuló para monitorizar continuamente la presión. La arteria safena magna (arteria tibial anterior en humanos y la principal irrigación arterial a las extremidades inferiores y a los pies en el conejo) se expuso justo por encima del tobillo y se canuló con tubos heparinizados estériles de polietileno (diámetro interno de 0,58 mm; diámetro externo de 0,96 mm). Se conectaron a un transductor de presión Statham P23DC (Statham, Spectramed) para medir las presiones periféricas (PP). Tras la heparinización con 5000 unidades de heparina, se expuso la arteria femoral izquierda y se canuló con un catéter estéril de polietileno (diámetro interno: 1 mm; diámetro externo: 1,5 mm) para la muestra de referencia de microesferas. Tras la canulación de la aorta abdominal se instaló una derivación para garantizar el flujo de sangre oxigenada desde la arteria carótida a través de la cánula en la aorta abdominal hasta las patas derecha e izquierda. Se instaló una sonda de flujo para medir el flujo total a ambas patas traseras.

Ejemplo 2

Relaciones ex vivo de presión - flujo

Se logró la vasodilatación máxima inyectando 20 mg de papaverina (Sigma) a la derivación a una velocidad de flujo de 20 ml/min. Tras la estabilización de las presiones centrales y periféricas, ambas patas se perfundieron mediante cuatro presiones diferentes. Cada gradiente de presión se combinó con un bolo de microesferas.

Se generaron cinco presiones de perfusión diferentes (30, 40, 50, 60, 80 mm Hg) *in vivo* con una bomba de rodillos instalada en la derivación anteriormente mencionada, entre la arteria carótida y la aorta abdominal. Se midieron las presiones periféricas y los flujos colaterales en vasodilatación máxima (papaverina) usando transductores de presión Statham.

Para cada nivel de presión se inyectaron microesferas con un color fluorescente diferente (carmesí, escarlata, verde azulado, rojo o azul) en la cámara de mezclado, que se instaló en la derivación aórtica abdominal - carótida.

Los siguientes músculos se diseccionaron de la pata: cuádriceps, aductor largo, aductor mayor, gemelos, sóleo y los músculos peroneos. Cada músculo se dividió en 3 muestras consecutivas desde el extremo proximal al distal. El músculo entero y después cada muestra se pesaron y se cortaron en trozos pequeños. Las muestras de músculo se colocaron entonces sueltas en tubos de poliestireno de 12 mm x 75 mm (Becton Dickinson & Co, Lincoln Park, NJ) y se añadieron 3 ml de una disolución de SDS (dodecil sulfato sódico) [disolución de SDS (Boehringer Mannheim Corp.): SDS al 1% (Boehringer Mannheim Corp.), azida sódica al 0,5% (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) y Tween-80 al 0,8% (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ) en tampón tris 50 milimolar a pH 8 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)], 30 μ l de disolución de proteinasa K (Boehringer Mannheim Corp.) y 1 ml de microesferas como patrón interno (13,7 μ m, kit de fluoresceína, Flow Cytometry Standards, Corp., San Juan, P.R.). Cada tubo se tapó y se aseguró en un baño de agua con agitación durante 24 - 48 horas. Las muestras se centrifugaron posteriormente entonces a 1000 g durante 45 minutos, el sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 1 ml de PBS (pH 7,4). Antes del análisis de FACS, las sondas se agitaron rigurosamente. Las microesferas se contabilizaron usando un citómetro de flujo (FACS-Calibur) equipado con un segundo láser y un detector para una cuarta fluorescencia. Se calcularon los flujos para cada muestra a partir del número de microesferas en la muestra (m^s), el recuento de microesferas respectivo en la muestra de referencia (m^{rs}), el patrón interno en la muestra (IS^s), el patrón interno en la muestra de referencia (IS^{rs}), el peso de la muestra de referencia (W) y el tiempo durante el que se retiró la muestra de referencia, usando la siguiente ecuación:

$$\text{flujo [mg / ml]} = \frac{m^s \cdot IS^{rs} \cdot W}{IS^s \cdot m^{rs} \cdot t}$$

- m^s = microesferas en la muestra
 IS^{rs} = patrón interno en la muestra de referencia
 IS^s = patrón interno en la muestra
 m^{rs} = microesferas en la muestra de referencia
W = peso
t = tiempo.

En el presente modelo, las arterias colaterales que se desarrollan tras la oclusión de la arteria femoral en la formación en sacacorchos habitual, irrigan a la región del aductor distal y a la parte inferior de la pata. Se midieron la presión sistémica [SP] y la presión periférica [PP].

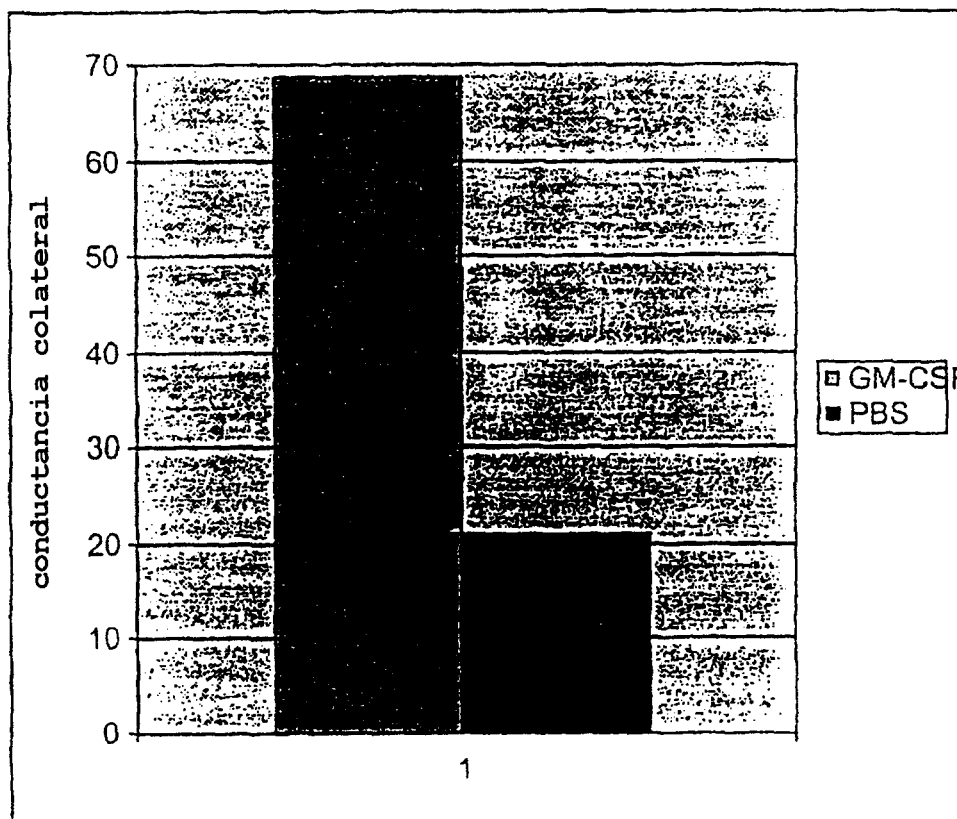
La presión venosa fue igual a la presión atmosférica [AP] (cero en el presente caso). Puesto que las resistencias arteriales son mucho menores que las resistencias colaterales y periféricas, pueden omitirse. SP representa la presión

en la región precursora de las arterias colaterales. PP es la presión en la región de reentrada y es idéntica a la altura piezométrica de la circulación en la parte inferior de la pata; AP, la presión en el extremo venoso de la circulación periférica. El flujo colateral es igual a la suma del flujo al tejido del aductor distal más el flujo al tejido de la parte inferior de la pata. La resistencia colateral se definió como la diferencia de presión entre SP y PP dividida por el flujo que va al aductor distal en la parte inferior de la pata. La resistencia periférica se definió como PP dividida por el flujo a la parte inferior de la pata y la conductancia en el medio se definió como SP dividida por el flujo global registrado con la sonda de flujo ultrasónica. Los valores recíprocos de estas resistencias representan la conductancia colateral, periférica y en el medio. Dado que se observa una ordenada en el origen de presión positiva incluso en vasodilatación máxima, todas las conductancias se calcularon a partir de la pendiente de las relaciones presión - flujo. Los datos se describen como media \pm DE. Las diferencias entre los datos se evaluaron usando la prueba de la t de Student para datos independientes para comparaciones entre grupos y la prueba de suma de órdenes de Mann-Whitney para las varianzas desiguales. Se requirieron valores de $p \leq 0,05$ para suponer significación estadística. La conductancia colateral fue significativamente superior tras 1 semana de oclusión en los animales tratados con GM-CSF, en comparación con los animales sin este tratamiento.

TABLA 1

Conductancia colateral [ml/min/100 mm Hg]

	GM-CSF	PBS	P
media	68,685	21,101	0,001



Ejemplo 3

Angiografía cadavérica

Se perfundieron las patas con solución salina tamponada de Krebs-Henseleit en un baño de agua calentada a 37°C durante 1 minuto a una presión de 80 mm Hg, seguido por perfusión con medio de contraste (de 8 a 10 minutos a 80 mm Hg) basado en bismuto y gelatina, según una fórmula desarrollada por Fulton (Fulton: The Coronary Arteries, Thomas Books, 1965). Posteriormente, se permitió que el medio de contraste gelificara colocando las extremidades sobre hielo picado durante 45 minutos. Se tomaron los angiogramas en dos ángulos diferentes en un aparato de radiografía Balteau (Machlett Laboratories) usando una película con una única envuelta Structurix D7DW (AGFA). Las fotografías estereoscópicas resultantes permitieron el análisis tridimensional del crecimiento colateral.

ES 2 221 212 T5

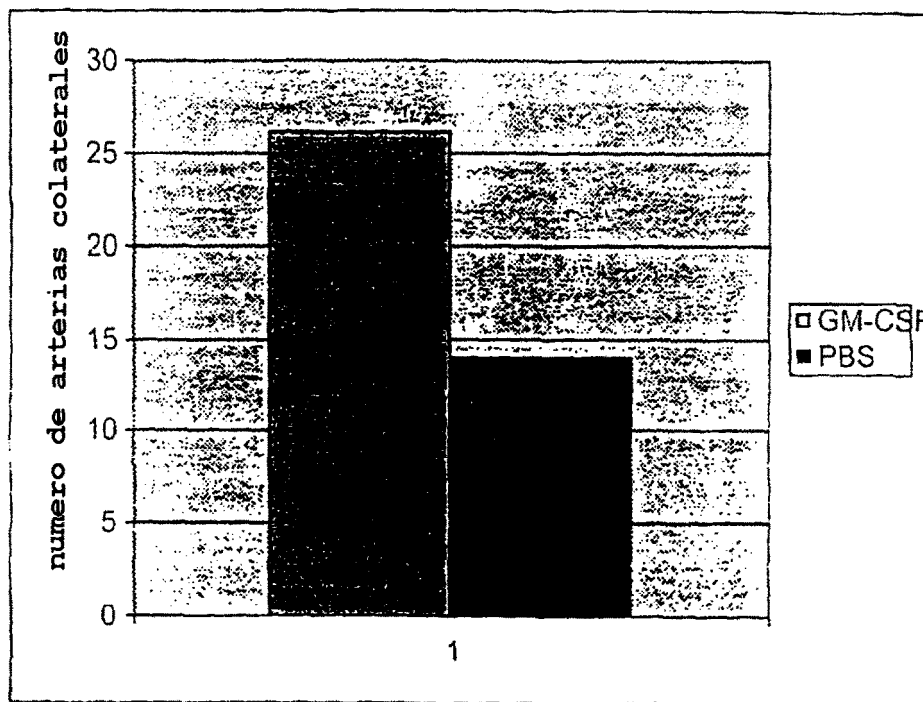
Para diferenciar entre los vasos colaterales y los vasos musculares para la cuantificación adicional, se utilizó la definición de Longland de las arterias colaterales (Longland *et al.*, 1954 "Description of collateral arteries" Verlag: Thomas). Se identificó la zona precursora, la media y la reentrada mediante observación estereoscópica utilizando una ampliación, tres veces, de los angiogramas. Las arterias colaterales se dividieron en dos grupos: el grupo uno consistió en vasos cuya zona precursora se ramificaba desde la arteria circunfleja femoral lateral. El grupo dos consistió en las arterias originadas a partir de la arteria femoral profunda. La longitud de la zona media en cada grupo fue casi la misma, por lo que su medición no proporcionó ninguna información adicional. La reentrada de las arterias colaterales desde el primer grupo disminuyó normalmente en la arteria anastomótica magna, el segundo grupo en la arteria femoral caudal. Sólo aproximadamente el 10% de las arterias colaterales se originan a partir de otros vasos, por ejemplo, a partir de la arteria iliaca externa o a partir de la arteria iliaca interna.

Los vasos colaterales se marcaron tras el recuento para asegurarse de que ningún vaso se contaba dos veces. Se utilizó otra ampliación de tres veces para medir el diámetro del vaso con una exactitud de 0,1 mm. Los angiogramas cadavéricos mostraron sacacorchos colaterales principalmente en el músculo aductor largo, el aductor mayor y el crural que conectan el lecho de perfusión de la arterial femoral profunda con el de la arteria safena externa en los músculos aductores y el lecho de perfusión de la arteria circunfleja femoral lateral al de las arterias de la rodilla en el músculo cuádriceps. Los angiogramas tomados de las patas traseras de los animales tratados con GM-CSF, muestran un aumento notable del diámetro y la densidad de estos vasos colaterales (tabla 2, figuras 1 a 5).

TABLA 2

Arterias colaterales

	GM-CSF	PBS	p
Media	26	14	0,02



Los resultados de los experimentos realizados según la presente invención, indican que los CSF pueden mediar la neovascularización y/o el crecimiento arterial colateral y/o el crecimiento de arterias a partir de conexiones arteriolas preexistentes debido al reclutamiento de macrófagos que podría estar mediado por un efecto directo de los CSF sobre la activación, proliferación, movilidad y supervivencia de los macrófagos y, de manera secundaria, por moléculas quimiotácticas relacionadas en respuesta a los CSF administrados localmente. Por tanto, la presente invención proporciona medios y métodos novedosos para el tratamiento de enfermedades que dependen de la neovascularización y/o del crecimiento arterial colateral.

La presente invención no ha de limitarse en alcance por sus realizaciones específicas descritas que están destinadas a simples ilustraciones de aspectos individuales de la invención, y cualquier proteína, molécula de ácido nucleico o compuesto que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance de la invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y de los dibujos adjuntos.

ES 2 221 212 T5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un factor estimulante de colonias (CSF)seleccionado del grupo que consiste en factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos(GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor
estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), sustancias funcionalmente equivalentes y derivados funcionales de
los mismos para la preparación de una composición farmacéutica para mejorar el crecimiento colateral de arterias
colaterales y/o de otras arterias a partir de conexiones arteriolares preexistentes.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, donde dicha composición farmacéutica comprende dicho CSF ya sea solo o en
combinación, y opcionalmente junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 3. Método *in vitro* para mejorar el crecimiento de arterias colaterales y/o de otras arterias a partir de conexiones
arteriolares preexistentes, que comprende poner en contacto órganos, tejidos o células con un factor estimulante de
colonias (CSF).
- 20 4. Método o uso según las reivindicaciones 1 a 3, en los que CSF es GM-CSF.
- 5 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, o 4, en el cual dicha composición farmacéutica está diseñada
para ser aplicada a un sujeto que padece enfermedad vascular o infarto de miocardio o accidente cerebrovascular.
- 25 6. Uso según la reivindicación 5, en el cual la enfermedad cardiovascular es la arteriosclerosis y/o un estado
hiperlipidémico, una arteriopatía coronaria, una enfermedad oclusiva cerebral, una enfermedad oclusiva periférica,
una enfermedad oclusiva visceral, una enfermedad de la arteria renal, una insuficiencia arterial mesentérica o una
oclusión oftálmica o retiniana.
- 30 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, o 4, en el cual dicha composición farmacéutica está diseñada
para ser aplicada a un sujeto durante o después de su exposición a un tratamiento por agente o radiación o intervención
quirúrgica que dañe o destruya las arterias.
- 35 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, o uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 4 a 7,
en el que el CSF es un CSF recombinante.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, que comprende además poner en contacto el órgano,
tejido o célula con un factor de crecimiento.
- 40 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 4 a 8, en el que la composición farmacéutica está diseñada
para la administración en combinación con un factor de crecimiento.
- 45 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9 o uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 8
o 10, en los que el derivado de CSF o la sustancia funcionalmente equivalente es un anticuerpo, (poli) péptido, pequeño
compuesto orgánico, ligando, hormona, o peptidomimético.
- 50
- 55
- 60
- 65



Figura 1

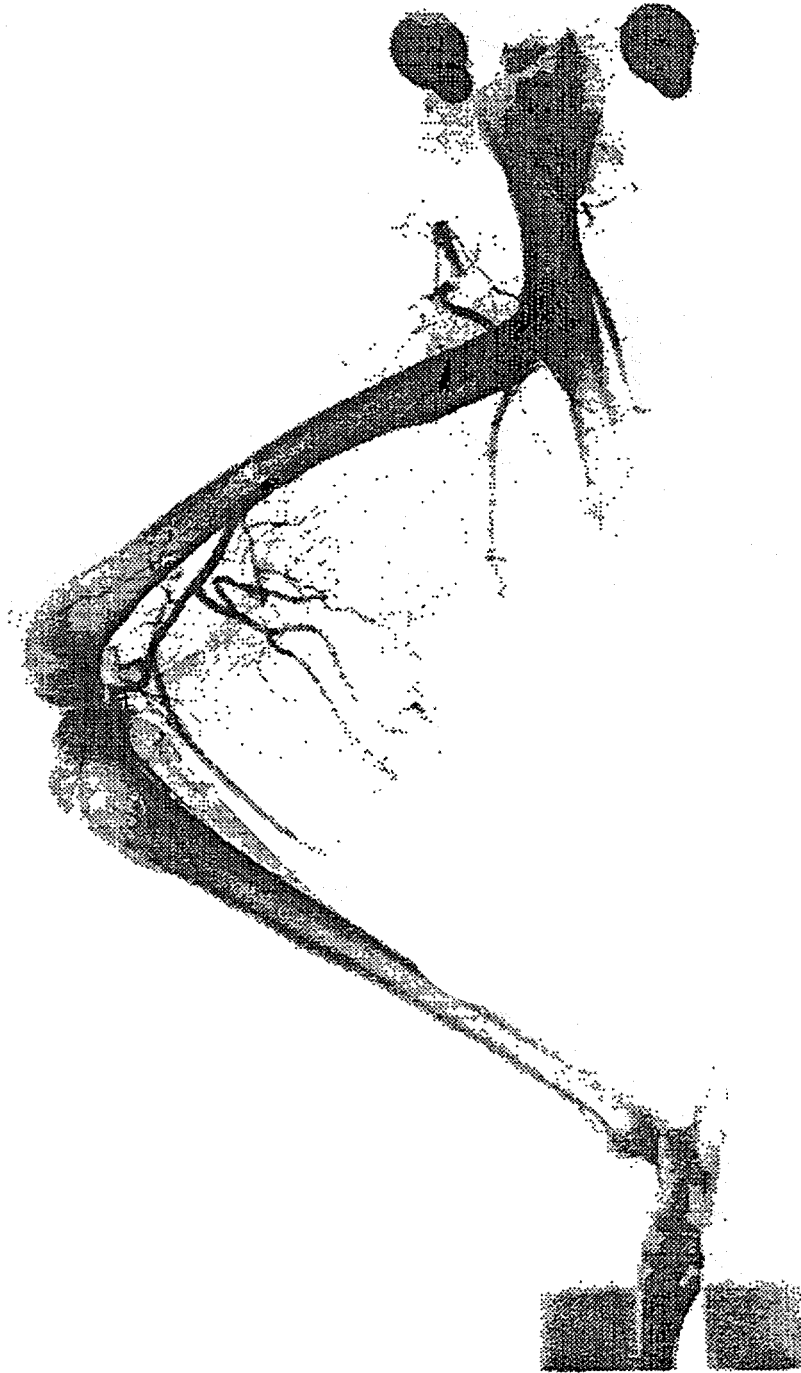


Figura 2A

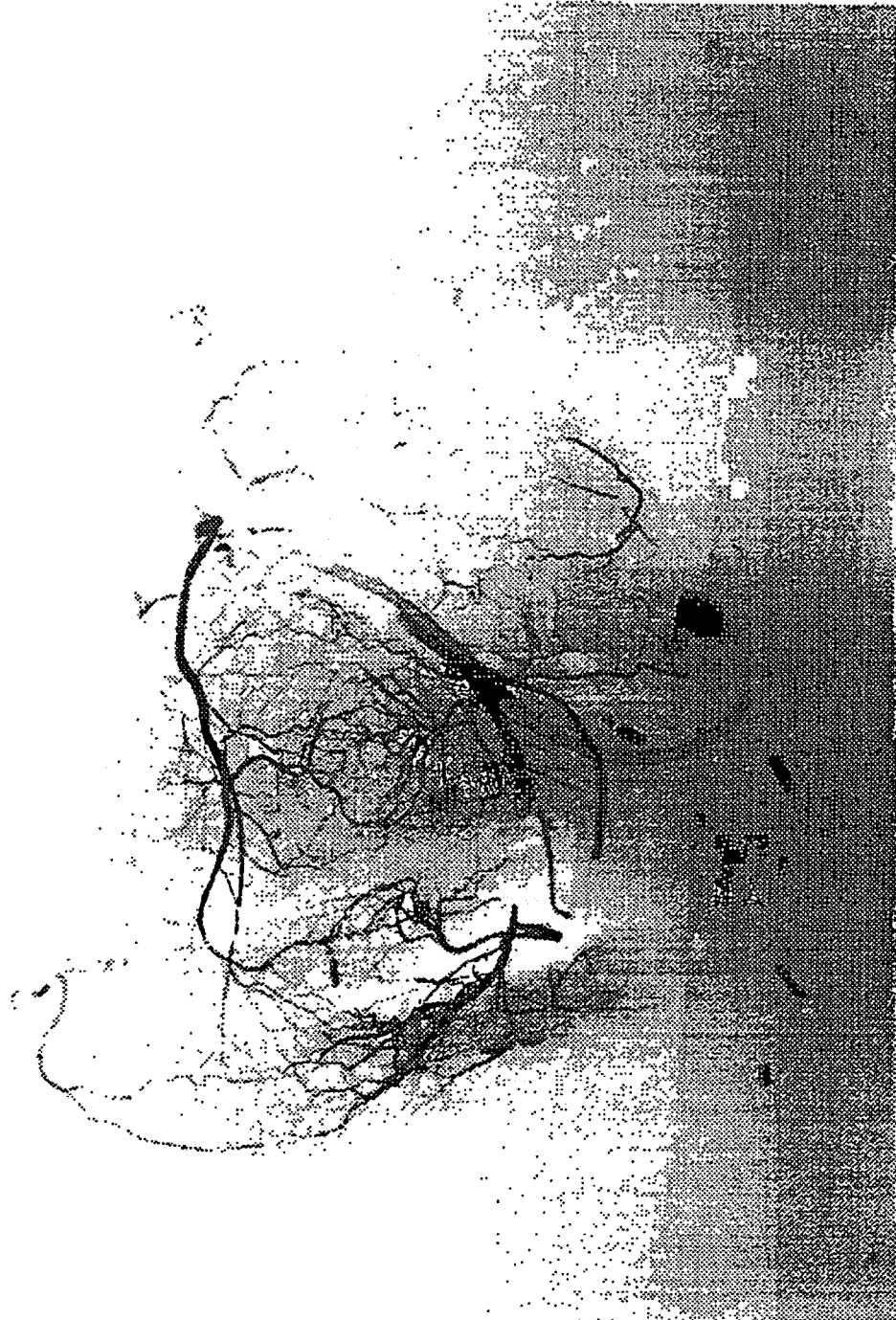


Figura 2B



Figura 3



Figura 4



Figura 5