



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 437**

51 Int. Cl.:
A61K 38/16 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01914469 .0**
96 Fecha de presentación : **22.02.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1265627**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.12.2002**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas para inhibir la angiogénesis mediante fragmentos de PEDF.**

30 Prioridad: **23.02.2000 US 511683**
23.06.2000 US 603478

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **Northwestern University**
1880 Oak Street, Suite 100
Evanston, Illinois 60201, US

72 Inventor/es: **Bouck, Noel, P.;**
Dawson, David, W.;
Gillis, Paul, R.;
Crawford, Susan, E.;
Stellmach, Veronica, M. y
Volpert, Olga

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

ES 2 316 437 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas para inhibir la angiogénesis mediante fragmentos de PEDF.

5 Antecedentes de la invención

La angiogénesis es el proceso fundamental por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos. El proceso implica la migración de células endoteliales vasculares al tejido que continúa con la condensación de dichas células endoteliales en vasos. La angiogénesis puede ser inducida por un agente angiogénico exógeno o puede ser el resultado de una condición natural. El proceso es esencial para una variedad de actividades normales del cuerpo, tales como la reproducción, el desarrollo y la curación de heridas. Aunque el proceso no se entiende completamente, implica una compleja interacción de moléculas que estimulan y moléculas que inhiben el crecimiento y la migración de células endoteliales, las células primarias de los vasos sanguíneos capilares. En condiciones normales, estas moléculas parecen mantener la microvasculatura en un estado quiescente (es decir, sin crecimiento capilar) durante periodos prolongados de tiempo que pueden durar varios años o incluso décadas. El tiempo de recambio para una célula endotelial es aproximadamente de mil días. Sin embargo, bajo condiciones apropiadas (por ejemplo, durante la curación de heridas), estas mismas células pueden experimentar una rápida proliferación y un recambio en un periodo de tiempo mucho más corto y una velocidad de recambio de cinco días es habitual bajo estas circunstancias (Folkman y Shing, 1989, J. Biol. Chem. 267 (16): 10931-10934; Folkman y Klagsbrun, 1987, Science 235: 442-447).

Aunque la angiogénesis es un proceso muy regulado bajo condiciones normales, muchas enfermedades (caracterizadas como "enfermedades angiogénicas") están impulsadas por una angiogénesis persistente no regulada. En dichos estados patológicos la angiogénesis no regulada puede provocar una enfermedad específica directamente o puede exacerbar un estado patológico existente. Por ejemplo, se ha implicado la neovascularización ocular como la causa más común de ceguera y subyace en la patología de aproximadamente veinte enfermedades del ojo. En ciertos estados previamente existentes, tales como artritis, los vasos sanguíneos capilares recién formados invaden las articulaciones y destruyen los cartílagos. En la diabetes, los nuevos capilares formados en la retina invaden el humor vítreo y sangran, causando la ceguera.

Tanto el crecimiento como la metástasis de tumores sólidos son también dependientes de la angiogénesis (Folkman, 1986, J. Cancer Res. 46: 467-473; Folkman, 1989, J. Nat. Cancer Inst. 82: 4-6; Folkman y otros, 1995, "Tumor Angiogenesis" (Angiogénesis en tumores), Capítulo 10, pág. 206-32, en The Molecular Basis of Cancer (Las bases moleculares del cáncer), Mendelsohn y otros, eds. (W. B. Saunders). Se ha observado, por ejemplo, que los tumores que se incrementan hasta más de, aproximadamente, 2 mm de diámetro deben obtener su propio suministro de sangre y lo hacen induciendo el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos capilares. Después de incorporarse estos nuevos vasos sanguíneos al tumor, éstos proporcionan nutrientes y factores de crecimiento esenciales para el crecimiento del tumor, así como medios para que las células tumorales entren en la circulación y se metastaticen a sitios distantes, tales como el hígado, pulmón o huesos (Weidner 1991, New Eng. J. Med. 324(1): 1-8). Cuando se utilizan como fármacos en animales portadores de tumores, los inhibidores naturales de angiogénesis pueden evitar el crecimiento de tumores pequeños (O'Reilly y otros, 1994, Cell 79: 315-328). De hecho, en algunos protocolos, la aplicación de dichos inhibidores conduce a la regresión del tumor e inactividad incluso después del cese del tratamiento (O'Reilly y otros, 1997, Cell 88: 277-285). Además, el suministro de inhibidores de la angiogénesis a ciertos tumores puede potenciar su respuesta a otras pautas terapéuticas (por ejemplo, quimioterapia) (véase, por ejemplo, Teischer y otros, 1994, Int. J. Cancer 57: 920-925).

Aunque actualmente existen varios inhibidores de la angiogénesis en desarrollo para su uso en el tratamiento de enfermedades angiogénicas (Gasparini, 1996, Eur. J. Cancer 32A(14): 2379-2385), existen desventajas asociadas con estos compuestos inhibidores propuestos. Por ejemplo, la suramina es un potente inhibidor de la angiogénesis, pero, en dosis requeridas para alcanzar la actividad antitumoral, provoca una toxicidad sistémica aguda en humanos. Otros compuestos, tales como retinoides, interferones y antiestrógenos parecen seguros para el uso humano, pero tienen sólo un efecto anti-angiogénico débil. Otros compuestos pueden ser difíciles o costosos de fabricar. Además, la administración simultánea de diversos inhibidores de la angiogénesis diferentes puede ser necesaria para que el tratamiento sea realmente efectivo.

Existe por tanto una gran necesidad por el desarrollo de nuevos métodos y composiciones para inhibir la angiogénesis. La presente invención satisface estas necesidades.

Breve resumen de la invención

Se describe un método para inducir la diferenciación de una célula neuroblastoma. El método comprende la administración del PEDF a la célula, induciendo de este modo la diferenciación de la célula.

También se describe un método para ralentizar el crecimiento de una célula neuroblastoma. Este método también comprende la administración del PEDF a la célula, ralentizando de este modo el crecimiento de la célula.

Además, se describe un método para tratar la retinopatía isquémica en un mamífero. El método comprende el suministro del PEDF exógeno a células endoteliales asociadas con el ojo del mamífero en condiciones suficientes para que el PEDF inhiba la angiogénesis en el ojo, tratando de este modo la retinopatía isquémica.

Además, se describe un método para inhibir la angiogénesis en un tejido de mamífero, comprendiendo el método el suministro sistemático del PEDF exógeno al mamífero, en condiciones suficientes para que el PEDF inhiba la angiogénesis en el tejido. En un aspecto, el tejido se selecciona del grupo que consiste en tejido ocular, tejido de la piel, un tumor, tejido en una articulación, médula espinal, epitelio nasal, próstata, ovario y tejido endometrial. En una realización preferente, el tejido es tejido ocular. En una realización adicional, el mamífero se selecciona del grupo que consiste en un mamífero que tiene retinopatía isquémica, un mamífero que tiene el riesgo de desarrollar retinopatía isquémica, un mamífero que tiene degeneración macular y un mamífero que tiene el riesgo de desarrollar degeneración macular.

También se describe un método para regular por incremento la expresión del PEDF en una célula de un tejido, comprendiendo el método la inducción de hiperoxia en el tejido, regulando por incremento de este modo la expresión del PEDF en la célula.

Además, se describe un método para el tratamiento de degeneración macular en un mamífero, comprendiendo el método el suministro del PEDF exógeno a células endoteliales asociadas con el ojo del mamífero en condiciones suficientes para que el PEDF inhiba la angiogénesis en el ojo, tratando de este modo la degeneración macular.

También se describe un método para el tratamiento de una neoplasia benigna en un mamífero, comprendiendo el método la administración del PEDF al mamífero, tratando de este modo la neoplasia benigna. En un aspecto, la neoplasia benigna es un pólipo nasal. En otro aspecto, el mamífero es un humano que tiene fibrosis quística. En otro aspecto adicional, la neoplasia benigna está en la glándula de la próstata.

Además, se describe un método para inhibir la angiogénesis en un tejido. El método comprende el suministro del PEDF exógeno a células endoteliales asociadas con el tejido conjuntamente con, como mínimo, otro tratamiento seleccionado del grupo que consiste en radiación, quimioterapia, el uso de, como mínimo, un modificador de la respuesta biológica, y tratamiento con láser, en condiciones suficientes para que el PEDF inhiba la angiogénesis en el tejido.

En cada uno de los métodos citados en la presente invención en los que el PEDF se suministra o administra a las células, el PEDF se suministra o administra a las células mediante la exposición de una composición que comprende el polipéptido de PEDF a las células.

De manera alternativa, en cada uno de los métodos citados en la presente invención en los que el PEDF se suministra o administra a las células, el PEDF se suministra o administra a las células mediante la transferencia de un vector a las células, comprendiendo el vector un ácido nucleico aislado que codifica PEDF, donde el PEDF se expresa en las células y se secreta de las mismas.

En un aspecto, el ácido nucleico aislado que codifica PEDF comprende la SEC ID No. 2. En otro aspecto, el ácido nucleico aislado que codifica PEDF codifica un fragmento biológicamente activo del PEDF. En ciertas realizaciones, el fragmento biológicamente activo del PEDF está contenido en la secuencia de aminoácidos de SEC ID No. 1. En otras realizaciones, el fragmento biológicamente activo del PEDF comprende desde el aminoácido 44 y el aminoácido 121 de la SEC ID No. 1, o los aminoácidos 44-77 de la SEC ID No. 1. En otras realizaciones, el PEDF comprende la SEC ID No. 1.

En otro aspecto, el PEDF se suministra o se administra a las células endoteliales mediante la transfección de un vector a una población de otras células, comprendiendo el vector un ácido nucleico aislado que codifica PEDF, en el que el PEDF se expresa en las otras células y se secreta de las mismas, y transfiriendo las otras células transfectadas de este modo a un sitio en el que el PEDF secretado de este modo es capaz de contactar con las células endoteliales.

En una realización, el ácido nucleico aislado es SEC ID No. 2. En otra realización, el ácido nucleico aislado codifica un fragmento biológicamente activo del PEDF, que en una realización preferente, está codificado por un fragmento de la SEC ID No. 2.

En otro aspecto, la transfección del ácido nucleico aislado en la población de otras células da lugar a la expresión del PEDF de ADN no integrado o integrado de manera estable en las otras células.

En otro aspecto, el PEDF se suministra a las células a través de la circulación sistémica, mediante administración tópica.

Tal como se indica en la presente invención, el PEDF suministrado de manera exógena incluye un fragmento biológicamente activo del polipéptido de PEDF, que en una realización, está contenido en la secuencia de aminoácidos de SEC ID No. 1. Preferentemente, el fragmento biológicamente activo del PEDF comprende desde el aminoácido 44 y el aminoácido 121 de la SEC ID No. 1. También, preferentemente, el fragmento biológicamente activo del PEDF comprende los aminoácidos 44-77 de la SEC ID No. 1.

También se describe un método para determinar la gravedad del tumor mediante el ensayo de la presencia del PEDF en el tumor, en el que la ausencia del PEDF en el tumor indica un estado avanzado y la presencia del PEDF en el tumor indica un estado temprano del tumor.

ES 2 316 437 T3

En cada uno de los métodos descritos en la presente invención en los que el PEDF se administra o suministra a las células, el método comprende además el suministro de otro factor angiogénico a dichas células conjuntamente con PEDF.

La presente invención da a conocer una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de residuos 44-77 de SEC ID No. 1, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica dicho polipéptido, o una población de células que comprende un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico aislada.

La presente invención da a conocer el polipéptido, la molécula de ácido nucleico, o la población de células, tal como se ha definido anteriormente, para el tratamiento de neuroblastoma, o para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad caracterizada por neovascularización patológica.

La presente invención da a conocer el uso del polipéptido, la molécula de ácido nucleico, o la población de células, tal como se ha definido anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de neuroblastoma o para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad caracterizada por neovascularización patológica mediante la inhibición de la angiogénesis en un tejido de un mamífero.

En una realización, el tejido se selecciona del grupo que consiste en tejido ocular, tejido de la piel, un tumor, tejido en una articulación, médula espinal, epitelio nasal, próstata, ovario y tejido endometrial. En una realización específica, el tejido es tejido ocular.

En ciertas realizaciones, el mamífero se selecciona del grupo que consiste en un mamífero que tiene degeneración macular y un mamífero que tiene el riesgo de desarrollar degeneración macular.

En una realización, la enfermedad es degeneración macular.

La presente invención da a conocer el uso del polipéptido, la molécula de ácido nucleico, o la población de células, tal como se ha definido anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una neoplasia benigna en un mamífero.

En una realización, la neoplasia benigna es un pólipo nasal. En otra realización, la neoplasia benigna se encuentra en la glándula de la próstata. En otra realización, el mamífero es un ser humano que tiene fibrosis quística.

En ciertas realizaciones, el medicamento se prepara para la administración sistémica. En otras realizaciones, el medicamento se prepara para la administración tópica. En ciertas realizaciones, el medicamento es adecuado para suministrarse a células endoteliales asociadas con dicho tejido.

En ciertas realizaciones, el medicamento comprende además otro factor antiangiogénico. En otras realizaciones, el medicamento es para su uso conjuntamente con, como mínimo, uno de los tratamientos seleccionados del grupo que consiste en radiación, quimioterapia, el uso de, como mínimo, un modificador de la respuesta biológica, y tratamiento con láser.

La presente invención da a conocer un método *in vitro* para inducir la diferenciación de una célula neuroblastoma, que comprende la etapa de administrar el polipéptido o el ácido nucleico, tal como se ha definido anteriormente, a dicha célula.

La presente invención da a conocer un método *in vitro* para ralentizar el crecimiento de una célula neuroblastoma, que comprende la etapa de administrar el polipéptido o el ácido nucleico, tal como se ha definido anteriormente, a dicha célula.

La presente invención da a conocer además un método *in vitro* para inhibir la angiogénesis en un tejido, que comprende la etapa de administrar el polipéptido o el ácido nucleico, tal como se ha definido anteriormente, a células endoteliales asociadas con dicho tejido.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra de manera gráfica la capacidad del PEDF para inhibir la migración de células endoteliales derivadas de vasos grandes y pequeños y especies humana y bovina.

La figura 2, que comprende las figuras 2A-2D, muestra la especificidad del PEDF para el endotelio vascular mediante la representación gráfica de la incapacidad de varias dosis del PEDF para inhibir la migración de células diferentes de células endoteliales vasculares. La figura 2A representa los datos referentes a células WI-38 de epitelio humano. La figura 2B representa los datos referentes a fibroblastos de prepucio humano. La figura 2C representa los datos referentes a células del músculo liso vascular humano. La figura 2D representa los datos referentes a neutrófilos humanos.

La figura 3 es un gráfico que demuestra la capacidad del PEDF para evitar la migración de células endoteliales capilares hacia una variedad de diferentes inductores de la angiogénesis incluyendo el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF), interleuquina-8 (IL-8) y factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF).

La figura 4 es un gráfico de una curva de dosis-respuesta que representa la actividad angiogénica del PEDF de longitud completa (*cuadrados* [círculos negros]) que muestra que es activo a concentraciones subnanomolares en la inhibición de la migración de células endoteliales capilares hacia bFGF y más activo que otro inhibidor de la angiogénesis, la angiostatina (círculos [blancos]).

La figura 5 es una curva dosis-respuesta que representa la actividad antiangiogénica de un polipéptido de PEDF truncado que carece de 5 kDa desde el extremo C-terminal, indicando que los fragmentos del PEDF mantienen toda la actividad.

La figura 6, que comprende las figuras 6A y 6B, es la secuencia de aminoácidos del PEDF de longitud completa (SEC ID No. 1) y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el PEDF de longitud completa (SEC ID No. 2). Debido a los polimorfismos naturales, a nivel de aminoácido, los residuos de aminoácidos 97 y 98 pueden ser EQ o DE, y a nivel de ADN, los correspondientes nucleótidos que codifican estos aminoácidos pueden ser, por tanto, GAG CAG o GAC GAC.

La figura 7, que comprende las figuras 7A y 7B, son dos gráficos que representan el efecto de varios péptidos truncados derivados del PEDF en la angiogénesis.

La figura 8, que comprende las figuras 8A, 8B y 8C, es una serie de imágenes de fotomicrografías de secciones de piel obtenidas de animales tratados con PEDF, en las que se representan los folículos pilosos. Se inyectaron tumores de neuroblastoma humano *SK-N-BE(2)* que crecen subcutáneamente en ratones desnudos en 2-3 sitios/tumor durante cuatro días consecutivos con 2 g de PEF purificado. En el quinto día, se observó pelo creciendo sobre los tumores tratados. Las secciones histológicas (véase PEDF tratado, figuras 8B y 8C) mostraron un aumento de tres veces en la densidad de los folículos pilosos en comparación con la piel que recubría los tumores tratada con sólo vehículo (tratada con PBS, figura 8A). Se han observado aumentos similares en la densidad de folículos pilosos en ausencia de tumores después de la inyección del PEDF purificado.

La figura 9, que comprende las figuras 9A y 9B, es una serie de gráficos que representan la diferenciación aumentada de células de neuroblastoma humanas cultivadas (*SK-N-BE* en la figura 9A y *SK-N-SH* en la figura 9B) cuando las células se trataron durante veinticuatro horas con la concentración indicada del PEDF purificado. Las flechas descendentes indican la dosis que inducía una diferenciación del 50% en las células tratadas.

La figura 10, que comprende las figuras 10A-10C, es una serie de fotomicrografías de células de neuroblastoma *SK-N-BE(2)* humanas cultivadas que han sido tratadas *in vitro* con tampón (control, figura 10A), con PEDF (figura 10B), o con PEDF en presencia de anticuerpos anti-PEDF neutralizantes (figura 10C). Sólo en la figura 10B se observa una frecuencia elevada de crecimiento hacia el exterior de neuritas indicando la diferenciación.

La figura 11, que comprende las figuras 11A-11E, es una serie de microfotografías tomadas de tumores de neuroblastoma *SK-N-BE(2)* humanos que crecen en ratones desnudos que han sido inyectados con el vehículo de solución salina tamponada con fosfato (PBS; figuras 11A y 11B) o que han sido inyectados con PEDF humano (figuras 11C, 11D y 11E). Los neuroblastomas se fijaron y tiñeron para la proteína de neurofilamento, un indicador de la diferenciación. En los tumores tratados se puede observar un aumento espectacular de la tinción y, por tanto, la diferenciación. En la figura 11C, la diferenciación está claramente presente a lo largo del recorrido de la aguja (rectángulo en blanco en la parte superior del centro) donde se inyectó el PEDF.

La figura 12, que comprende las figuras 12A-12C, es una serie de gráficos que representan la actividad inhibidora del PEDF purificado en la migración de células endoteliales cultivadas y la necesidad del PEDF de una actividad antiangiogénica de fluido vítreo humano y extractos córneos. Figura 12A: el PEDF (0,1 g/ml) purificado de medio WERI-Rb-27R (Xu, y otros, 1991, Cancer Res. 51: 4881) se ensayó solo o en combinación con un anticuerpo contra el PEDF recombinante (anti-EPC-1; 20 g/ml) o contra el péptido PEDF (anti-PEDF; 1 g/ml) por su capacidad de inhibir la migración de células endoteliales capilares bovinas hacia bFGF antiangiogénico (10 ng/ml). El anticuerpo antipéptido PEDF (anti-PEDF) se desarrolló en conejos contra un péptido que contiene los aminoácidos 327 a 343 del PEDF, conjugado con la hemocianina de lapa californiana, y se purificó por afinidad en una columna de péptido. En DiPaolo y otros (1995, Exp. Cell Res. 220: 178) se describe antisuero policlonal contra PEDF/EPC-1 (anti-EPC-1) recombinante bacteriano y en O'Reilly y otros (1994, Cell 79:315) se describe una proteína antiangiogénica, angiostatina. Los reactivos adquiridos incluían anti-VEGF neutralizantes (Genzyme, Cambridge, MA), batería de anticuerpos para TGF, y todos los inductores angiogénicos (R & D Systems, Minneapolis, MN) excepto ácido lisofosfatídico (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO). Todas las proteínas y anticuerpos se dializaron ampliamente contra PBS antes de su uso en ensayos biológicos. Los ensayos de migración se realizaron por cuadruplicado para cada muestra con células endoteliales capilares adrenales bovinas o células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (Clonetics, San Diego, CA) tal como se ha descrito (Polverini y otros, 1991, Methods Enzymol. 194: 440). Para combinar múltiples experimentos, se restó en primer lugar la migración base (Base) hacia el vehículo (albúmina de suero bovino al 0,1%) y, a continuación, se normalizaron los datos estableciendo la migración máxima hacia el inductor solo al 100%. Todos

los experimentos se repitieron de dos a cinco veces. Se realizaron estadísticas sobre los datos antes de la normalización con el test de t de Student. Los errores estándar se convirtieron en porcentajes. Figura 12B: Concentraciones crecientes de angiostatina [círculos (O)] o PEDF recombinante (cuadrados []) se ensayaron como en la figura 12A. Se diseñó ADN del PEDF humano mediante la reacción en cadena de la polimerasa para codificar una etiqueta de hexahistidina con COOH terminal, se clonó en pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transfectó en células de riñón embrionario humano. El PEDF recombinante se purificó del medio acondicionado con el Sistema de Purificación de Proteínas Xpress (Invitrogen, Carlsbad, CA). Figuras 12C: Se ensayaron fluido vítreo humano diluido tal como se indica y un extracto de estroma córneo humano (utilizado a 10 g de proteína por mililitro) en presencia del VEGF inductor (0,1 ng/ml) o anti-PEDF (1 g /ml) (o en presencia de tanto VEGF como anti-PEDF). El fluido vítreo humano se extrajo de tres ojos cadavéricos (refrigerados de 1,4 a 4,5 horas después de la muerte) obtenidos de individuos sin enfermedad ocular. EL fluido se congeló hasta su uso. El fluido vítreo reciente se obtuvo de ojos bovinos y de ratón. Para la preparación del extracto estromal, se liberaron las córneas de epitelio asociado y de tanto epitelio como fuera posible, se lavaron ampliamente en solución salina tamponada con fosfato enfriada en hielo (PBS, pH 7,4) y se desmenuzaron en pequeños fragmentos que fueron incubados durante 24 horas en PBS que contenía 0,5 mM de fluoruro de fenilmetanosulfonilo. El extracto se esterilizó por filtración, se almacenó a -80°C, y se analizó en ensayos de migración a una concentración final de 10 g de proteína por mililitro. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) de cinco experimentos separados (Figura 12A). En el caso de las figuras 12B y 12C, los datos de un experimento representativo se muestran con errores estándar.

La figura 13, que comprende las figuras 13A y 13B-1 hasta 13B-8, es una tabla y una serie de imágenes de fotomicrografías que representan la inhibición de la neovascularización mediante PEDF purificado y mediante PEDF presente de forma natural en fluido vítreo y córnea humana normales. Figura 13A: Se incorporó PEDF (8 nM) recombinante (rPEDF) o purificado (pPEDF), péptido PEDF 327 a 343 (200 g/ml), fluido vítreo no diluido o extracto córneo (utilizado a 200 g de proteína por mililitro), con vehículo (PBS) y también se incorporaron las adiciones indicadas en gránulo Hydron que se implantaron en la córnea de rata avascular. El crecimiento vigoroso hacia el interior de los vasos sanguíneos del limbo hacia el gránulo en menos de 7 días se registró como respuesta positiva (Polverini y otros, 1991, Methods Enzymol 198: 440. Cuando se indicó, se utilizó anti-PEDF unido a las partículas de proteína A para extraer el PEDF del fluido vítreo y el extracto córneo. Figuras 13B: Fotos representativas de respuestas córneas de la figura 13A mostradas a 13 aumentos. El anticuerpo antipéptido PEDF (anti-PEDF) se desarrolló en conejos contra un péptido que contenía los aminoácidos 327 a 343 del PEDF, conjugado con la hemocianina de lapa californiana, y se purificó por afinidad en una columna de péptido. En DiPaolo y otros (1995, Exp. Cell Res. 220: 178) se describe antisero policlonal contra PEDF/EPC-1 (anti-EPC-1) recombinante bacteriano y en O'Reilly y otros (1994, Cell 79:315) se describe la proteína antiangiogénica, angiostatina. Los reactivos adquiridos incluían anti-VEGF neutralizantes (Genzyme, Cambridge, MA), batería de anticuerpos para TGF, y todos los inductores angiogénicos (R & D Systems, Minneapolis, MN) excepto ácido lisofosfatídico (Sigma). Todas las proteínas y anticuerpos se dializaron ampliamente contra PBS antes de su uso en ensayos biológicos.

La figura 14, que comprende las figuras 14A-14F, es una serie de imágenes de fotomicrografías que representan la inducción de la expresión de proteína PEDF en el ratón neonatal. Las retinas se recogieron en el día 12 después del nacimiento (P12) (figuras 14A y 14B), P18 (c) o P21 (figura 14D) de ratones C57BL/6 que se habían mantenido a oxígeno ambiente (figuras 14A, 14C y 14D) o expuestos a oxígeno al 75% de P7 a P12 (figura 14B) y se tiñeron para PEDF. Cabe indicar la acumulación del PEDF (puntas de las flechas) indicadas con un color marrón rojizo. Las secciones de control adyacentes directamente a la figura 14D se tiñeron con anticuerpo primario (figura 14E) o después de la preincubación de anticuerpo primario con péptido PEDF 327 a 343 (figura 14F). Las capas de retina indicadas en la figura 14A incluyen epitelio de pigmento de retina (RPE), capa nuclear externa (ONL), capa nuclear interna (INL) y capa de células de ganglios (GCL). Los ojos de los ratones se fijaron en formalina de 1 a 5 minutos después de la recogida. Para la inmunotinción, las secciones insertadas en parafina se incubaron con anti-PEDF y se visualizaron con métodos ABC (Vectastain Elite; Vector Labs, Burlingame, California). Escala de la barra, 25 µm. El anticuerpo antipéptido PEDF (anti-PEDF) se desarrolló en conejos contra dos polipéptidos que contenían los aminoácidos 327 a 343 y los aminoácidos 55 a 71 del PEDF conjugados con la hemocianina de lapa californiana. Se purificó por afinidad en una columna que contenía el péptido con los aminoácidos 327-343. Todas las proteínas y anticuerpos se dializaron ampliamente contra PBS antes de su uso en ensayos biológicos.

La figura 15, que comprende las figuras 15A-15C, es una serie de imágenes de inmunotransferencias y un gráfico que representa la regulación a la baja inducida por hipoxia de la proteína PEDF en células de retinoblastoma cultivadas. Figura 15A: Análisis por inmunotransferencia del PEDF presente en el medio de los cultivos de tres líneas de células Rb negativas (WERI-Rb-27, Y79 y WERI-Rb-1; todas de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland) y de una línea Rb positiva (WERI-Rb-27R) (Xu y otros, 1991, Cancer Res. 51: 4481). Las células se mantuvieron en normoxia (N; 21% de O₂), hipoxia (H; 5% de O₂) o CoCl₂ (Co; 100 µM) y medio libre de suero y se recogieron durante un periodo de 48 horas de cantidades equivalentes de células. La mancha que contenía 5 g de proteína por banda se sondó con anti-PEDF y se reveló con ECL (Amersham, Arlington Heights, Illinois). Figura 15B: Transferencia Northern del ARN celular total (10 g por banda) aislado de WERI-Rb-27 después de la exposición a hipoxia durante 24 a 48 horas. Las manchas se sondaron con ADNc del PEDF de longitud completa de 1,5 kb o una sonda de actina de 819 pares de bases para controlar la carga. Los números indican la proporción del PEDF con respecto a los niveles de ARNm de actina determinada mediante densitometría. Figura 15C: Se ensayó el medio (utilizado a 2 g de proteína total por mililitro) de células WERI-Rb-1 normóxicas o hipóxicas por la capacidad de inducir la migración de células endoteliales microvasculares dérmicas humanas. Los ensayos de migración se realizaron por cuadruplicado para cada muestra con células endoteliales capilares adrenales bovinas o células endoteliales microvasculares dérmicas humanas

(Clonetics, San Diego, CA), tal como se ha descrito (Polverini y otros, 1991, Methods Enzymol 194:440). Para combinar múltiples experimentos, se restó en primer lugar la migración base (Base) hacia el vehículo (albúmina de suero bovino al 0,1%) y, a continuación, se normalizaron los datos estableciendo la migración máxima hacia el inductor solo al 100%. Todos los experimentos se repitieron de dos a cinco veces. Se realizaron estadísticas sobre los datos antes de la normalización con el test de t de Student. Los errores estándar se convirtieron en porcentajes. Los ensayos contenían medio solo o medio más anti-PEDF neutralizante (1 g/ml) o anti-VEGF (20 g/ml). La migración inducida por VEGF fue anulada completamente por anti-VEGF y no se vio afectada por anti-PEDF. El anticuerpo antipéptido PEDF (anti-PEDF) se desarrolló en conejos contra un péptido que contenía los aminoácidos 327 a 343 del PEDF, conjugado con la hemocianina de lapa californiana, y se purificó por afinidad en una columna de péptido. La migración inducida por VEGF fue anulada completamente por anti-VEGF y no se vio afectada por anti-PEDF. Ninguno de los anticuerpos afectaron a la migración cuando se ensataron solos. Un cien por cien era igual a 67 células migradas en 10 campos de alta potencia.

La figura 16, que comprende las figuras 16A-16D, es una serie de imágenes de fotomicrografías que representan el efecto del PEDF sobre el *crecimiento de vasos sanguíneos en retinopatía inducida por hipoxia* en ratones C57/BL6. Las figuras 16A y 16B se tratan con vehículo PBS. Las figuras 16C, 16D se tratan con PEDF.

La figura 17 es un gráfico que representa una relación de dosis-respuesta entre la retinopatía y el tratamiento con PEDF en ratones.

Descripción detallada de la invención

Se describe el uso del factor de crecimiento derivado del epitelio de pigmento de longitud completa (PEDF; Steele y otros, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(4): 1526-1530) y de cualquier derivado antiangiogénico del PEDF para inhibir la angiogénesis. También se describe el uso de ácido nucleico que codifica el PEDF de longitud completa y cualquier derivado antiangiogénico del PEDF para inhibir la angiogénesis.

En el contexto del método descrito, el PEDF es una proteína que tiene propiedades antiangiogénicas potentes e incluye cualquier derivado antiangiogénico del PEDF, tales como los descritos en la presente invención. Una forma de polipéptido de PEDF (PEDF de longitud completa) se muestra en la figura 6A (SEC ID No. 1); sin embargo, los métodos descritos en la presente invención no se limitan al uso de esta secuencia ejemplar. De hecho, se conocen en la técnica otras secuencias del PEDF (véase, por ejemplo, las solicitudes de patente internacional publicadas WO 95/33480 y WO 93/24529). Además, es bien conocido que las secuencias genéticas pueden variar entre especies e individuos diferentes. Este ámbito natural de la variación alélica se incluye en el alcance de la presente descripción. De manera adicional y alternativa, un polipéptido de PEDF puede incluir una o más mutaciones puntuales de la secuencia de ejemplo u otro polipéptido de PEDF natural. De este modo, un polipéptido de PEDF tiene habitualmente, como mínimo, aproximadamente, 75% de homología con toda o parte de la SEC ID No. 1 y preferentemente tiene, como mínimo, aproximadamente, 80% de homología con toda o parte de la SEC ID No. 1 (por ejemplo, como mínimo, aproximadamente, 85% de homología con toda o parte de la SEC ID No. 1); más preferentemente, el polipéptido de PEDF tiene, como mínimo, aproximadamente, 90% de homología con toda o parte de la SEC ID No. 1 (tal como, como mínimo, aproximadamente, 95% de homología con toda o parte de la SEC ID No. 1), u aún más preferentemente, el polipéptido de PEDF tiene, como mínimo, aproximadamente, 97% de homología con toda o parte de la SEC ID No. 1. De hecho, el polipéptido de PEDF también puede incluir otros dominios, tales como etiquetas epítipo y etiquetas de His (por ejemplo, la proteína puede ser una proteína de fusión).

En el contexto de la presente descripción, un polipéptido de PEDF puede ser o puede comprender mutantes por inserción, eliminación o sustitución de una secuencia del PEDF conocida o derivada de la misma. Preferentemente, cualquier sustitución es conservativa por el hecho de que destruye mínimamente las propiedades bioquímicas del polipéptido de PEDF. De este modo, cuando se introducen mutaciones para sustituir residuos de aminoácidos, se sustituyen residuos cargados positivamente (H, K, y R) preferiblemente por residuos cargados positivamente; se sustituyen residuos cargados negativamente (D y E) preferiblemente por residuos cargados negativamente; se sustituyen residuos polares neutros (C, G, N, Q, S, T e Y) preferiblemente por residuos polares neutros; y se sustituyen residuos no polares neutros (A, F, I, L, M, P, V y W) preferiblemente por residuos no polares neutros. Además, el polipéptido de PEDF puede ser un fragmento activo o una proteína PEDF conocida o fragmento de la misma. De hecho, se ha observado que los fragmentos truncados derivados de la SEC ID No. 1 son polipéptidos de PEDF activos. Por ejemplo, se cree que los residuos 1 a 20 de SEC ID No. 1 se dividen durante la secreción y, por tanto, son prescindibles para la actividad del PEDF. Además, otros polipéptidos natural y sintéticos del PEDF activos comprenden secuencias derivadas de los residuos 21 a 382 de la SEC ID No. 1, tales como los residuos 44 a 157 de la SEC ID No. 1 (por ejemplo, los residuos 44-121 y 44-77 de la SEC ID No. 1). Naturalmente, aunque las mutaciones por inserción, eliminación o sustitución pueden afectar a la glicosilación de la proteína, un polipéptido de PEDF no necesita glicosilarse para poseer las propiedades antiangiogénicas requeridas para su uso en el método descrito. Por ejemplo, véanse los datos presentados en la figura 7, en la que el fragmento del PEDF activo de 34 aminoácidos no está glicosilado.

La descripción debería interpretarse además que incluye el uso de un polipéptido de PEDF que puede contener una o más formas de D-isómero de los aminoácidos del PEDF. La producción de un péptido de PEDF de D-aminoácidos retro-inverso, en el que el péptido está formado de los mismos aminoácidos que se describen, pero, como mínimo, un aminoácido, y quizás todos los aminoácidos son D-aminoácidos, es una cuestión simple una vez tenida en cuenta la presente descripción. Cuando todos los aminoácidos en el péptido son D-aminoácidos y se invierten los extremos N y

C terminales, el resultado es una molécula que tiene los mismos grupos estructurales en las mismas posiciones que la forma de L-aminoácido de la molécula. Sin embargo, la molécula es más estable a la degradación proteolítica y, por tanto, es útil en muchas de las aplicaciones mencionadas en la presente invención.

El método descrito en la presente invención también debería interpretarse que incluye el uso del PEDF en forma de ácido nucleico que codifica el PEDF biológicamente activo, tal como se ejemplifica en la figura 6B (SEC ID No. 2) o cualquier fragmento del mismo que tiene actividad biológica del PEDF, tal como se define en la presente invención. De este modo, la descripción debería interpretarse que incluye el uso de ácido nucleico que codifica los fragmentos mencionados anteriormente del PEDF y cualquier derivado del mismo y ácido nucleico que es sustancialmente homólogo a SEC ID No. 2 o un fragmento del mismo que codifica el PEDF biológicamente activo.

Por el término “PEDF biológicamente activo”, tal como se utiliza en la presente invención, se entiende cualquier polipéptido PED, fragmentos o derivado que es capaz de inhibir la angiogénesis en cualquiera de los ensayos presentados en la sección de detalles experimentales/ejemplos contenidos en la presente invención.

Un fragmento biológicamente activo del PEDF se ejemplifica en la presente invención en la sección de ejemplos como un fragmento del PEDF de 34 aminoácidos (34 unidades). Los procedimientos para el aislamiento y la caracterización de este fragmento se disponen con detalle en la presente invención a la vista del estado de la técnica. De este modo, es una cuestión sencilla, siguiendo las instrucciones proporcionadas en la presente invención, identificar los fragmentos biológicamente activos del PEDF útiles en la presente descripción y ésta, por tanto, debe interpretarse que incluye cualquiera y todos estos fragmentos y cualquier modificación y derivado de los mismos, tal como se describe en la presente invención. Además, la descripción debería interpretarse que incluye cualquiera y todos los ácidos nucleicos que codifican fragmentos biológicamente activos del PEDF tal como se define este término en la presente invención. El término “PEDF” utilizado en las reivindicaciones adjuntas debería interpretarse que incluye todas las formas del PEDF biológicamente activas tal como se define en la presente invención.

Por el término “exógeno”, tal como se utiliza en la presente invención al referirse a PEDF, debería interpretarse que incluye cualquiera y todos los PEDF que no se expresan de forma natural en una célula. Por ejemplo, “PEDF exógeno” debería interpretarse que incluye el PEDF expresado a partir de un ácido nucleico que se ha introducido en una célula utilizando tecnología recombinante, PEDF que se añade a la célula y cualquiera y todas las combinaciones de los mismos. Por lo tanto, el término no debería interpretarse que está limitado únicamente a la adición del PEDF a una célula *per se*, sino que debería ampliarse para incluir la expresión del PEDF en una célula cuando el PEDF se expresa a partir de un ácido nucleico que se ha introducido en la célula.

Los polipéptidos de PEDF inhiben la angiogénesis, en parte, mediante la atenuación de la migración y la supervivencia de células endoteliales activadas, reduciendo, de este modo, la capacidad del endotelio para expandirse en el tejido. Por tanto, se describe un método de inhibición de la migración de células endoteliales mediante el suministro del PEDF exógeno a dichas células. A parte de la atenuación de la angiogénesis, el método es útil para el tratamiento de trastornos asociados con la estimulación de la migración de células endoteliales, tales como adhesiones intestinales, enfermedad de Crohn, aterosclerosis, escleroderma y cicatrices hipertróficas (por ejemplo, queloides).

Según el método descrito, se suministra el PEDF a las células endoteliales asociadas con el tejido de interés. Dichas células pueden ser células que comprenden el tejido de interés, células exógenas introducidas en el tejido, o células vecinas que no están en el tejido. Por lo tanto, por ejemplo, las células pueden ser células del tejido, y PEDF se suministra a las mismas *in situ*, de manera que el PEDF se pone en contacto con las células. De modo alternativo, las células pueden ser células introducidas en el tejido, en cuyo caso el PEDF se puede transferir a las células antes de ser introducidas en el tejido (por ejemplo, *in vitro*), así como transferirse *in situ* después de la introducción en el tejido.

Cuando el PEDF se introduce en las células que a continuación se transfirieron al mamífero, la descripción no debería interpretarse como limitada por la manera en la que el PEDF se introduce en las células. Ni debería interpretarse como limitada a la manera en la que las células se introducen en el mamífero. Tal como se describe con más detalle a continuación, los métodos de introducción de ADN en las células son bien conocidos, ya que son métodos de liberación de dichas células a un tejido en un mamífero.

El tejido con el que las células endoteliales están asociadas es cualquier tejido en el que se desea inhibir la migración o expansión del endotelio (por ejemplo, para inhibir la angiogénesis). En una aplicación, el tejido puede ser tejido ocular, en cuyo caso la presencia del PEDF exógeno inhibirá la nueva angiogénesis asociada con una variedad de trastornos del ojo. Por ejemplo, el método de la invención es útil para el tratamiento de lesiones en el ojo, hipoxia, infección, cirugía, cirugía láser, diabetes, retinoblastoma, degeneración macular, retinopatía isquémica, u otras enfermedades o trastornos del ojo. En este aspecto, el método es útil para evitar la ceguera o retrasar la pérdida de visión asociada con una serie de enfermedades del ojo. La gran mayoría de los pacientes diabéticos sufren finalmente una alteración de la visión debido al sobrecrecimiento de vasos sanguíneos en la retina en respuesta a la isquemia causada por la enfermedad. De manera similar, los infantes prematuros expuestos a niveles elevados de oxígeno desarrollan retinopatía como resultado como oclusión de la vena retinal u otras anomalías vasculares o isquémicas. Tal como se describe en la presente invención, las retinopatías inducidas por isquemia se pueden evitar y o tratar mediante la administración sistémica o local del PEDF. En el caso de cirugía láser, con respecto al ojo, se puede utilizar el PEDF para evitar el recrecimiento de vasos sanguíneos después del tratamiento. Los láseres se utilizan para destruir los va-

sos sanguíneos en exceso, pero también crean una herida en la retina que induce cierta angiogénesis. El tratamiento sistémico o local con PEDF debería servir para evitar dicho recrecimiento.

Por el término “retinopatía”, tal como se utiliza en la presente invención, se entiende el desarrollo anormal de vasos sanguíneos en la retina o alrededor de la misma que pueden entrar o no en el fluido vítreo. Lesiones, enfermedades, episodios isquémicos, láser u otros tratamientos iatrogénicos pueden inducir retinopatía.

En otra aplicación, el tejido es tejido de piel, en cuyo caso la presencia del PEDF exógeno evita la neovascularización asociada con varias enfermedades de la piel. Por ejemplo, el método descrito es útil para el tratamiento de enfermedades y trastornos, tales como la psoriasis, escleroderma, tumores de la piel, neovascularización como consecuencia de infección (por ejemplo, enfermedad por arañazo de gato, ulceración bacteriana, etc.) u otras enfermedades de la piel. Cuando se suministra PEDF a la piel, se puede suministrar a la superficie de la piel o al tejido de piel bajo la superficie de la piel, o incluso sistemáticamente. Además, la transferencia del PEDF a la piel de un mamífero también puede estimular el crecimiento de pelo en la piel. Sin unirse a ninguna teoría, se cree que el PEDF afecta al crecimiento de la piel mediante la mediación de la angiogénesis en el folículo piloso y/o mediante la influencia de la diferenciación del tejido neuronal próximo.

En otras realizaciones, el tejido es un tumor (por ejemplo, un crecimiento benigno o canceroso), en cuyo caso el método descrito inhibirá el crecimiento de vasos sanguíneos en el tumor y hacia el mismo, y en algunos casos, inducirá que las células tumorales se diferencien y, por tanto, se separen lentamente. La inhibición del crecimiento de vasos sanguíneos en tumores evita que se suministren suficientes nutrientes y oxígeno al tumor para sostener el crecimiento más allá de un tamaño determinado. Por tanto, el método descrito puede evitar la nucleación de tumores de células cancerosas ya presentes debido a la predisposición genética (por ejemplo, portadores de la mutación BRCA-1, pacientes de Li Fraumeni con mutaciones p53, etc.) o la presencia de carcinógenos externos (por ejemplo, tabaco, alcohol, disolventes industriales, etc.). A parte de evitar la tumorigénesis, el método descrito puede retrasar el crecimiento de tumores existentes, haciendo, de este modo, que se contengan y se dividan más fácilmente y se pueda causar la regresión. Esta aplicación es muy ventajosa para tratar tumores que son difíciles de operar (por ejemplo, tumores cerebrales o de próstata). Además, el método es útil para el tratamiento de tumores en la infancia, incluyendo, pero sin ser limitantes, el neuroblastoma. Además, minimizando el número de vasos sanguíneos en tumores existentes se disminuye la probabilidad de que se produzca la metástasis del tumor. En los tumores en tratamiento, el método se puede utilizar solo o conjuntamente con otros tratamientos para controlar el crecimiento de tumores. De hecho, la utilización del método descrito puede potenciar la respuesta de algunos tumores a otras terapias. Por ejemplo, el método descrito se puede utilizar opcionalmente como pretratamiento para (por ejemplo, durante aproximadamente una semana por delante), y continuado durante, un régimen quimioterapéutico o de radiación. El método descrito en la presente invención también se puede utilizar conjuntamente con el uso de modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, interferón, u otros agentes antiangiogénicos y también es útil conjuntamente con el uso de agentes que inducen la producción de agentes antiangiogénicos *in vivo*. Además, el método descrito en la presente invención se puede utilizar conjuntamente con agentes que inducen la diferenciación de las células, particularmente, pero sin ser limitantes, agentes que inducen la diferenciación de células tumorales cerebrales.

Cuando el método descrito se aplica a otros tejidos, la prevención de la neovascularización trata de manera eficaz una gran cantidad de trastornos. Por lo tanto, por ejemplo, el método descrito se puede utilizar como parte de un tratamiento para trastornos de vasos sanguíneos (por ejemplo, hemangiomas y proliferación de capilares en placas ateroscleróticas), enfermedades musculares (por ejemplo, angiogénesis miocárdica o angiogénesis en músculos lisos), articulaciones (por ejemplo, artritis, articulaciones hemofílicas, etc.) y otros trastornos asociados con la angiogénesis (por ejemplo, Síndrome de Osler-Webber, neovascularización de placa, telangiectasia, angiofibroma, granularización de heridas, etc.). Además, el método descrito es útil para el tratamiento de pólipos nasales, especialmente en pacientes con fibrosis quística, leucemia que proviene del crecimiento anormal de células de la médula espinal y cáncer de próstata. La descripción se puede interpretar, en general, que es útil para el tratamiento de neoplasias benignas que incluyen a las de próstata.

A parte del tratamiento de trastornos y síntomas asociados con la neovascularización, la inhibición de la angiogénesis se puede utilizar para modular o prevenir la aparición de condiciones fisiológicas normales asociadas con la neovascularización. Con el método descrito, la presencia del PEDF en los ovarios o el endometrio, por tanto, por ejemplo el método se puede utilizar como control del nacimiento. Por tanto, se puede atenuar la neovascularización con la ovulación, implantación de un embrión, formación de la placenta, etc.

El método descrito también es útil como medio de prevención de la aparición de una enfermedad o trastorno asociado con la angiogénesis, es decir, los métodos son útiles como métodos profilácticos para la prevención de la enfermedad en pacientes con riesgo de padecer la enfermedad. Por ejemplo, y sin ser limitante, se puede utilizar el PEDF para evitar la aparición de la retinopatía diabética en un paciente que tiene diabetes, para evitar la aparición de cáncer en personas que se sabe que tienen riesgo de padecer ciertos cánceres, y similares. Por tanto, los métodos de la presente invención no deberían interpretarse como limitados al tratamiento de enfermedades manifiestas, sino que deberían interpretarse como útiles para la prevención de enfermedad en pacientes que están en riesgo.

La descripción también debería interpretarse que incluye el tratamiento de lesiones precancerosas, por ejemplo, pero sin ser limitantes, pólipos nasales, particularmente en pacientes que tienen fibrosis quística. Los pólipos nasales en estos pacientes son angiogénicos y, además, el fluido espinal cerebral de los pacientes con fibrosis quística con-

tiene un exceso del factor angiogénico VEGF. El alivio de estos estados patológicos, especialmente en pacientes con fibrosis quística, en los que el alivio comprende la administración del PEDF, está, por lo tanto, incluido en la presente descripción.

5 En el contexto del método descrito, el PEDF se puede administrar solo o conjuntamente con otros factores angiogénicos. Por ejemplo, el PEDF se puede utilizar conjuntamente con anticuerpos y péptidos que bloquean el acoplamiento a integrinas, las proteínas y pequeñas moléculas que inhiben metaloproteinasas (por ejemplo, marmistato), agentes que bloquean las cascadas de fosforilación en células endoteliales (por ejemplo, herbamicina), receptores dominantes negativos para inductores de angiogénesis conocidos, anticuerpos contra inductores de angiogénesis u otros compuestos
10 que bloquean su actividad (por ejemplo, suramina) u otros compuestos (por ejemplo, retinoides, IL-4, interferones, etc.) que actúan por otros medios. De hecho, como dichos factores modulan la angiogénesis mediante diferentes mecanismos, la utilización del PEDF en combinación con otros agentes angiogénicos puede potenciar una inhibición más potente (y potencialmente sinérgica) de la angiogénesis en el tejido deseado. El PEDF se puede utilizar con uno o más factores angiogénicos. Preferentemente, como mínimo, dos factores angiogénicos se pueden utilizar conjuntamente
15 con PEDF.

Tal como se ha descrito en la presente invención, el PEDF es factor proteináceo. Por lo tanto, en un protocolo, el método implica suministrar PEDF mediante la administración de un polipéptido de PEDF a las células (por ejemplo, en una composición adecuada). Se puede utilizar cualquier método adecuado para obtener un polipéptido de PEDF
20 para su uso en los métodos descritos en la presente invención. Muchos polipéptidos de PEDF adecuados se pueden purificar de tejidos que de forma natural producen PEDF o de medios acondicionados por una serie de células productoras del PEDF (por ejemplo, línea celular de retinoblastoma WER127). Por ejemplo, se sabe que el PEDF es producido por todo tipo de músculo, megacariocitos del bazo, fibroblastos, túbulos de los riñones, células de Purkinje cerebelares, glándulas pilosebáceas de folículos pilosos, y células retinales. Una fuente particularmente buena del
25 PEDF natural son los humores vítreo y acuoso extraídos del ojo. Un protocolo para purificar el PEDF de extractos de proteínas de estas (u otras fuentes) es mediante concentración/diálisis utilizando una membrana de ultrafiltración de 30 kDa seguida de precipitación de proteína en un intervalo de 65 a aproximadamente 95% de sulfato de amonio, seguido de una columna de sefrosa con lectinas de lenteja a 0,5 M de metil- α -D-manopiranosido, seguido de elución en gradiente/isocrático a 0,5 M de NaCl de una columna de heparina de PHARMACIA HiTrap. Otros protocolos
30 para purificar los polipéptidos de PEDF son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, las solicitudes de patentes internacionales publicadas WO 95/33480 y WO 93/24529). El polipéptido de PEDF nativo representado por la SEC ID No. 1 se identifica mediante SDS-PAGE como una proteína de aproximadamente 45 a 50 kDa. Otros polipéptidos de PEDF se pueden sintetizar utilizando técnicas estándar de síntesis directa de péptidos (por ejemplo, tal como se resume en Bodansky, 1984, Principles of Peptide Synthesis (Springer-Verlag, Heidelberg), tal como mediante síntesis
35 en fase sólida (véase, por ejemplo, Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154; Barany y otros, 1987, Int. J. Peptide Protein Res. 30: 705-739, y la Patente de Estados Unidos 5.424.398). Naturalmente, como los genes para los polipéptidos de PEDF son conocidos (véase, por ejemplo, las solicitudes de patentes internacionales publicadas WO 95/33480 y WO 93/24529); véase también el Banco de Genes no. de acceso U29953) o se pueden deducir de las secuencias de polipéptido descritas en la presente invención, un polipéptido de PEDF se puede producir mediante
40 métodos estándar de ADN recombinante.

En otros protocolos, el polipéptido de PEDF se puede suministrar al tejido de interés mediante la transferencia de un vector de expresión que incluye un ácido nucleico que codifica el PEDF a células asociadas con el tejido de interés. Las células producen y secretan el polipéptido de PEDF, de manera que se suministra de manera adecuada a
45 células endoteliales en el tejido para inhibir su migración y, por tanto, atenuar la angiogénesis en el tejido de interés o sistemáticamente. Las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de PEDF son conocidas (véase, por ejemplo, las solicitudes de patentes internacionales publicadas WO 95/33480 y WO 93/24529); véase también el Banco de Genes no. de acceso U29953) y las otras se pueden deducir de las secuencias de polipéptido descritas en la presente invención. Por lo tanto, los vectores de expresión del PEDF incluyen habitualmente secuencias de ácido
50 nucleico aisladas que son homólogas a secuencias del PEDF conocidas, por ejemplo, se hibridarán a, como mínimo, un fragmento de las secuencias conocidas en, como mínimo, condiciones de astringencia suave, más preferentemente bajo condiciones de astringencia moderadas, lo más preferente bajo condiciones de astringencia elevadas (utilizando las definiciones de astringencia suave, moderada y elevada tal como se establecen en Sambrook y otros, 1989, Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2ª Edición, Cold Spring Harbor Press).

55 Además del ácido nucleico que codifica el PEDF, un vector de expresión incluye un promotor y, en el contexto de la presente descripción, el promotor debe ser capaz de conducir la expresión del gen del PEDF en las células. Muchos promotores virales son apropiados para su uso en dicho cassette de expresión (por ejemplo, ITR retrovirales, LTR, promotores virales tempranos inmediatos (IEp) (tales como IEp del virus del herpes (por ejemplo, ICP4-IEp e ICP0-IEp) e IEp de citomegalovirus (CMV)), y otros promotores virales (por ejemplo, promotores virales tardíos, promotores activos en latencia (LAP), promotores del Virus del Sarcoma de Rous (RSV), y promotores del Virus de la Leucemia Murina (MLV)). Otros promotores adecuados son promotores eucariotas que contienen secuencias potenciadoras (por ejemplo, los elementos reguladores de β -globina de conejo), promotores constitutivamente activos (por ejemplo, el promotor de β -actina, etc.), promotores específicos de señal y/o tejido (por ejemplo, promotores
65 inducibles y/o represibles, tales como un promotor sensible a TNF o RU486, el promotor de metalotionina, etc.), y promotores específicos de tumores.

En el vector de expresión, el gen del PEDF y el promotor están unidos operativamente, de manera que el promotor es capaz de dirigir la expresión del gen del PEDF. Mientras se mantenga esta unión operativa, el vector de expresión puede incluir más de un gen, tal como múltiples genes separados por sitios internos de entrada de ribosomas (IRES). Además, el vector de expresión puede incluir opcionalmente otros elementos, tales como sitios de corte y empalme ("splice"), secuencias de poliadenilación, elementos reguladores de la transcripción (por ejemplo, potenciadores, silenciadores, etc.) u otras secuencias.

El vector de expresión se debe introducir en las células de una manera tal que es capaz de expresar el ácido nucleico aislado que codifica el PEDF contenido en las mismas. Se puede utilizar cualquier vector adecuado, muchos de los cuales son conocidos en la técnica. Entre los ejemplos de dichos vectores se incluyen vectores de ADN desnudo (tales como oligonucleótidos o plásmidos), vectores virales tales como vectores virales adenoasociados (Bems y otros, 1995, Ann. N. Y. Acad. Sci. 772: 95-104), vectores adenovirales (Bain y otros, 1994, Gene Therapy 1: S68), vectores del virus herpes (Fink y otros, 1996, Ann. Rev. Neurosci. 19: 265-287), amplicones empaquetados (Federoff y otros, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1636-1640), vectores del virus del papiloma, vectores de pirconavirus, vectores del virus de polio, vectores retrovirales, vectores virales SV40, vectores del virus vaccinia, y otros vectores. Además del vector de expresión de interés, el vector también puede incluir otros elementos genéticos, tales como, por ejemplo, genes que codifican un marcador seleccionable (por ejemplo, β -gal o un marcador que confiere resistencia a una toxina), una proteína farmacológicamente activa, un factor de transcripción u otra sustancia biológicamente activa.

Cualquier vector seleccionado debe ser capaz de ser producido en grandes cantidades en células eucariotas. Además, es necesario que el vector se pueda construir, de manera que sea capaz de ser transferido a las células de interés con o sin la secuencia del PEDF, de manera que el vector que no contiene las secuencias del PEDF sirva como vector de control, y que el vector que incluye las secuencias del PEDF es el vector experimental o terapéutico. Los métodos para manipular el ácido nucleico del vector son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y otros, *supra*) e incluyen la clonación directa, la recombinación específica de sitio utilizando recombinasas, recombinación homóloga y otros métodos adecuados de construcción de un vector recombinante. De esta manera, un vector de expresión se puede construir, de manera que se puede replicar en cualquier célula deseada, expresar en cualquier célula deseada e incluso integrarse en el genoma de cualquier célula deseada.

El vector de expresión del PEDF se introduce en las células mediante cualquier medio apropiado para la transferencia de ADN a las células. Muchos de dichos métodos son bien conocidos en la técnica (Sambrook y otros, *supra*; véase también Watson y otros, 1992, Recombinant DNA, Capítulo 12, 2ª edición, Scientific American Books). Por lo tanto, los plásmidos se transfieren mediante métodos, tales como precipitación fosfato cálcico, electroporación, transfección mediada por liposomas, pistola de genes, microinyección, transferencia mediada por la cápside viral, transferencia mediada por polibreno, fusión de protoplastos, etc. Los vectores virales se transfieren mejor en células mediante la infección directa de las células. Sin embargo, el modo de infección puede variar dependiendo de la naturaleza exacta del virus y la célula.

Las células en las que se ha transferido el gen del PEDF bajo el control de un promotor inducible se pueden utilizar, si es necesario, en el método como transformantes transitorios. A continuación, dichas células se pueden transferir en un mamífero para el beneficio terapéutico en las mismas. Habitualmente, las células se transfieren a un sitio en el mamífero, de manera que el PEDF expresado en las mismas y secretada a partir de las mismas contacta con las células endoteliales deseadas a efectos de inhibir la angiogénesis. De manera alternativa, particularmente en el caso de células a las que se ha añadido el vector *in vitro*, las células se pueden someter en primer lugar a varios ciclos de selección clonal (normalmente facilitada mediante el uso de una secuencia de marcador seleccionable en el vector) para seleccionar transformantes estables. A continuación, dichos transformantes estables se transfieren a un mamífero para el beneficio terapéutico del mismo.

El PEDF también se puede suministrar a las células endoteliales mediante la transfección en una población de otras células de un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica PEDF, mediante lo cual el PEDF se expresa en otras células y se secreta de las mismas. La población de otras células transfectadas de este modo se transfieren a continuación a un sitio en el mamífero donde el PEDF secretado contacta con las células endoteliales e inhibe la angiogénesis. La expresión y secreción del PEDF de otras células tiene a continuación ventajas sobre las células endoteliales. No es necesario que el ADN que codifica el PEDF se integre de manera estable en las células. El PEDF se puede expresar y secretar de ADN integrado y no integrado en la célula.

En las células, el gen del PEDF se expresa, de manera que las células expresan y secretan el polipéptido de PEDF. La expresión satisfactoria del gen se puede evaluar utilizando técnicas estándar de biología molecular (por ejemplo, hibridación Northern, transferencia Western, inmunoprecipitación, inmunoensayo con enzimas, etc.). Los reactivos para detectar la expresión de los genes del PEDF y la secreción del PEDF de las células transfectadas son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las solicitudes de patente internacional publicadas WO 95/33480 y WO 93/24529; Steele y otros, *supra*).

Dependiendo de la localización del tejido de interés, el PEDF se puede suministrar de cualquier manera adecuada para la administración del PEDF a células endoteliales en el tejido de interés. Por lo tanto, por ejemplo, una composición que contiene una fuente del PEDF (es decir, un polipéptido de PEDF o un vector de expresión del PEDF o células que expresan PEDF, tal como se describe en la presente invención) se puede introducir en la circulación sistémica, que distribuirá la fuente del PEDF al tejido de interés. De manera alternativa, una composición que contiene una fuente del

PEDF se puede aplicar de manera tópica al tejido de interés (por ejemplo, inyectado o bombeado como una infusión continua o como un bolo en un tumor o un sitio intercutáneo o subcutáneo, aplicado a toda o parte de la superficie de la piel, en gotas sobre la superficie del ojo, etc.).

- 5 Cuando la fuente del PEDF es un polipéptido de PEDF (por ejemplo, en una composición adecuada), se dispone en una concentración y durante un tiempo suficiente para inhibir la angiogénesis en el tejido.

10 La inhibición de la angiogénesis se considera generalmente que es la detención del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, si se desarrollan por crecimiento rápido o mediante la llegada y posterior diferenciación en células endoteliales de células madre circulantes. Sin embargo, dado que el PEDF puede inducir la apoptosis de células endoteliales activadas, la inhibición de la angiogénesis en el contexto de la presente descripción debería interpretarse que incluye la muerte de células por PEDF, particularmente células en vasos sanguíneos existentes próximos o en el tumor cuando se activa por factores de angiogénesis de tumor. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, la inhibición de la angiogénesis debería interpretarse que incluye la inhibición del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, cuya
15 inhibición puede estar o no acompañada por la destrucción de vasos sanguíneos existentes próximos.

20 Cuando el PEDF se produce de manera natural, puede estar presente en concentraciones tan elevadas como aproximadamente 250 nM. Dado que el PEDF es no tóxico, se puede suministrar a tejidos en una forma mucho más concentrada. Sin embargo, dada la potencia del PEDF, se puede utilizar en el método descrito a concentraciones muy reducidas, tales como aproximadamente 10 nM o inferior (por ejemplo, tan pequeña como 0,01 nM). De hecho, en algunos protocolos, aproximadamente 2 nM o inferior del PEDF inhibe de manera eficaz la angiogénesis y la migración de células endoteliales. Dependiendo de la formulación de una composición que comprende la proteína, se suministra durante un tiempo suficiente para retrasar la angiogénesis en el tejido deseado. En algunos protocolos (por ejemplo, cuando el PEDF se suministra a la superficie de la piel o al ojo), la aplicación repetida potencia el efecto
25 angiogénico y puede ser necesaria en algunas aplicaciones. Cuando la fuente del PEDF es un vector de expresión del PEDF, las células que expresan PEDF producen una cantidad eficaz de la proteína (es decir, suficiente para inhibir la angiogénesis en el tejido).

30 Para facilitar el método descrito, la descripción da a conocer una composición farmacológica que comprende una fuente del PEDF y un diluyente adecuado. Además de la fuente del PEDF, la composición incluye un diluyente, que incluye uno o más portadores farmacológicamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas para su uso según la presente descripción se pueden formular de una manera convencional utilizando uno o más portadores farmacológica o fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes, así como auxiliares opcionales que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparados que se pueden utilizar farmacéuticamente. La formulación correcta depende de la vía de administración escogida. Por lo tanto, para la inyección sistémica, la fuente del PEDF se puede formular
35 en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles que pueden contener, si es necesario, estabilizadores, tales como polietilenglicol. Para la administración por transmucosa, en la formulación se utilizan penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica. Para la administración oral, la fuente del PEDF se puede combinar con portadores adecuados para la inclusión en comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, emulsiones, liposomas, suspensiones y similares. Para la administración por inhalación, la fuente del PEDF se libera de manera conveniente en forma de una presentación de pulverizador de aerosol en envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado. La fuente del PEDF se puede formular para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección de bolo o infusión continua. Dichas composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emul-
45 siones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o dispersantes. Para aplicaciones en la piel, la fuente del PEDF se puede formular en un gel, magma, crema, pomada u otro portador adecuados. Para aplicaciones en los ojos, la fuente del PEDF se puede formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente aceptables. La fuente del PEDF también se puede formular en otras composiciones farmacéuticas, tales como aquellas conocidas en la técnica. Una discusión detallada de composiciones farmacéuticas y formulaciones se da a conocer en otros puntos de la presente invención.
50

Dado que se sabe que el PEDF se encuentra reducido o ausente en algunos tumores, también se describe un método de evaluación del pronóstico de un tumor mediante el ensayo de la presencia del PEDF en el tumor. El método implica la obtención de tejido o fluido del tumor y la detección de la presencia o ausencia del PEDF en el tejido o fluido.
55 El tejido o fluido pueden ser, por ejemplo, orina, plasma, suero, o humor vítreo o acuoso. La mayor concentración del PEDF en el tumor se correlaciona con una menor probabilidad de que el tumor experimente angiogénesis. Por lo tanto, una concentración del PEDF más elevada en el tumor es indicativa de una etapa relativamente temprana de tumorigénesis y es, por tanto, una indicación optimista. En cambio, la ausencia del PEDF en un tumor determinado, o la presencia de un nivel bajo del PEDF, es indicativo de una etapa más avanzada de tumorigénesis. Niveles superiores o inferiores del PEDF a los que se hace referencia en la presente invención, se miden en comparación con los niveles del PEDF en un tejido idéntico obtenido de individuos sanos normales que no padecen la enfermedad en cuestión.
60

La evaluación de los niveles del PEDF se puede realizar utilizando ensayos que evalúan los niveles de expresión de genes del PEDF (por ejemplo, a través de la PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR), hibridación Northern, hibridación *in situ*, etc.). De modo alternativo, la presencia del PEDF secretado se puede medir en ensayos inmunológicos, ensayos de purificación del PEDF o análisis PAGE, etc.). Los reactivos para detectar la presencia del PEDF en dichos tumores son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, las solicitudes de patente internacional publicadas WO 95/33480 y WO 93/24529).
65

También se describe un equipo que comprende la composición de péptido de la descripción y un material para instrucciones que describe la administración en la adventicia de la composición a una célula o un tejido de un mamífero. En otra realización, este equipo comprende un disolvente (preferentemente estéril) adecuado para disolver o suspender la composición de la presente invención antes de la administración del compuesto al mamífero.

Además de todo lo anterior, la descripción debería interpretarse que incluye también métodos de regulación de la expresión del PEDF endógeno en la célula. Por ejemplo, es posible regular al alza la producción del PEDF en una célula mediante la inducción de hiperoxia transitoria en la célula. Dicho tratamiento tiene la ventaja añadida de regular a la baja los inductores de la angiogénesis. La descripción debería interpretarse que incluye la aplicación de este método a cada una de las modalidades de tratamiento descritas en la presente invención.

Definiciones

Tal como se utiliza en la presente invención, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con el mismo en esta sección.

Los artículos “un” y “una” se utilizan en la presente invención para referirse a uno o más de uno (es decir, a, como mínimo, uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “adyacente” se utiliza para referirse a secuencias de nucleótidos que están unidas directamente entre sí, sin nucleótidos intermedios. A modo de ejemplo, el pentanucleótido 5'-AAAAA-3' es adyacente al trinucleótido 5'-TTT-3' cuando los dos están conectados de modo: 5'-AAAAATTT-3' ó 5'-TTTAAAAA-3', pero no cuando los dos están conectados de modo: 5'-AAAAACTTT-3'.

Tal como se utiliza en la presente invención, “aliviar un síntoma” significa reducir la gravedad del síntoma.

Tal como se utiliza en la presente invención, los aminoácidos se representan mediante el nombre completo del mismo, mediante el código de tres letras correspondiente al mismo, o mediante el código de una letra correspondiente al mismo, tal como se indica en la siguiente tabla:

<u>Nombre completo</u>	<u>Código de tres letras</u>	<u>Código de una letra</u>
ácido aspártico	Asp	D
ácido glutámico	Glu	E
lisina	Lys	K
arginina	Arg	R
histidina	His	H
tirosina	Tyr	Y
cisteína	Cys	C
asparagina	Asn	N
glutamina	Gln	Q
serina	Ser	S
treonina	Thr	T
glicina	Gly	G
alanina	Ala	A
valina	Val	V
leucina	Leu	L
isoleucina	Ile	I
metionina	Met	M
prolina	Pro	P
fenilalanina	Phe	F
triptófano	Trp	W

Una “región codificante” de un gen consiste en los residuos de nucleótidos de la cadena codificante del gen y los nucleótidos de la cadena no codificante del gen que son homólogos con o complementarios a, respectivamente, la región codificante de una molécula de ARNm que se produce mediante la transcripción del gen.

Una “región codificante de ARNm” de un gen consiste en los residuos de nucleótidos de la cadena codificante de gen y los residuos de nucleótidos de la cadena no codificante del gen que son homólogos o complementarios con respecto a una molécula de ARNm que se produce mediante la transcripción del gen. Se entiende que, debido al procesamiento del ARNm que tiene lugar en ciertos casos en células eucariotas, la región codificante de ARNm de un gen puede comprender una región única o un conjunto de regiones separadas entre sí en el gen tal como sucede en el genoma. Cuando la región codificante de ARNm de un gen comprende regiones separadas en el genoma, la “región codificante de ARNm” se refiere tanto individual como colectivamente a cada una de estas regiones.

“Complementario/a”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere al concepto amplio de complementariedad de la subunidad de secuencia entre dos ácidos nucleicos, por ejemplo, dos moléculas de ADN. Cuando la posición de un nucleótido en ambas moléculas está ocupada por nucleótidos normalmente capaces de emparejar las bases entre sí, entonces se considera que los ácidos nucleicos son complementarios entre sí en esta posición. Por lo tanto, dos ácidos nucleicos son complementarios entre sí cuando una cantidad sustancial (como mínimo 50%) de las correspondientes posiciones en cada una de las moléculas están ocupadas por nucleótidos que normalmente emparejan las bases entre sí (por ejemplo, las parejas de nucleótidos A:T y G:C).

Una “enfermedad” es un estado de salud de un animal en el que el animal no puede mantener la homeostasis, y en el que si la enfermedad no mejora, entonces la salud del animal continúa deteriorándose. Una enfermedad se “alivia” si se reduce la gravedad de un síntoma de la enfermedad, la frecuencia con la que se experimenta dicho síntoma por un paciente, o ambos.

“Codificante” se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc, o un ARNm, para servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia de nucleótidos definida (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de las mismas. Por lo tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y traducción del ARNm correspondiente a ese gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, la secuencia de nucleótidos que es idéntica a la secuencia de ARNm y está dispuesta normalmente en los listados de secuencias, como la cadena no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, se les puede hacer referencia como que codifican la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.

A menos que se especifique lo contrario, una “secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos” incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas de cada una y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

“Homóloga”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a la similitud en la subunidad de secuencia entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, dos moléculas de ARN o dos moléculas de ADN, o entre dos moléculas de polipéptido. Cuando la posición de una subunidad en ambas moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica, por ejemplo, si una posición de cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de emparejamientos o posiciones homólogas, por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias de un compuesto son homólogas, entonces las dos secuencias son homólogas en un 50%, si el 90% de las posiciones, por ejemplo, 9 de 10, están emparejadas o son homólogas, las dos secuencias comparten un 90% de homología. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN 3' ATTGCC5' y 3' TATGGC comparten un 50% de homología.

Tal como se utiliza en la presente invención, “homología” se utiliza como sinónimo de “identidad”.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se puede realizar utilizando un algoritmo matemático. Por ejemplo, un algoritmo matemático útil para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268), modificado como en Karlin y Altschul (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877). Este algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y otros (1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410) y se puede acceder, por ejemplo, en la página web del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI) que tiene el localizador universal de recursos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST (denominado “blastn” en la página web de NCBI), utilizando los siguientes parámetros: penalización por espacio = 5; penalización por extensión del espacio = 2; penalización por desapareamiento = 3; recompensa por apareamiento = 1; valor de expectación 10,0; y tamaño de palabra = 11, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas con un ácido nucleico descrito en la presente invención. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST (denominado “blastp” en la página web de NCBI), o el programa “blastp” de NCBI, utilizando los siguientes parámetros: valor de expectación 10,0, matriz de puntuación BLOSUM62 para obtener las secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína descrita en la presente invención. Para obtener alineaciones espaciadas con fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST tal como se describe en Altschul y otros (1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). De manera alternativa, se pueden utilizar PSI-Blast o PHI-Blast

para realizar una búsqueda iterativa que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.) y relaciones entre moléculas que comparten un patrón único. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, PSI-Blast y PHI-Blast, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

El porcentaje de identidad entre las dos secuencias se puede determinar utilizando técnicas similares a las descritas anteriormente, con o sin la permisión de espacios. Al calcular el porcentaje de identidad, se cuentan habitualmente los emparejamientos exactos.

Tal como se utiliza en la presente invención, “un material de instrucciones” incluye una publicación, un registro, un diagrama, o cualquier otro medio de expresión que se pueda utilizar para comunicar la utilidad de la composición de la presente invención para su uso designado. El material para instrucciones del equipo de la presente invención puede fijarse, por ejemplo, a un recipiente que contiene la composición o transportarse con un recipiente que contiene la composición. De manera alternativa, el material para instrucciones puede transportarse separado del recipiente con la intención de que el material para instrucciones y la composición se utilicen de manera conjunta por el receptor.

Un “ácido nucleico aislado” se refiere a un segmento o fragmento de ácido nucleico que ha sido separado de las secuencias que lo delimitan en estado natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que ha sido eliminado de las secuencias que normalmente están adyacentes al fragmento, por ejemplo, las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma que existe de forma natural. El término también se aplica a ácido nucleicos que han sido sustancialmente purificados de otros componentes que acompañan de forma natural al ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ADN o proteínas, que lo acompañan de forma natural en la célula. Por lo tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus replicante de manera autónoma, o en el ADN genómico de una procariota o eucariota, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, como ADNc o un fragmento genómico o de ADNc producido por PCR o digestión con enzimas de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica secuencias de polipéptidos adicionales.

Al describir los dos polinucleótidos como “unidos operativamente” se entiende que un grupo ácido nucleico de cadena única o doble cadena comprende los dos polinucleótidos dispuestos en el grupo ácido nucleico, de manera que, como mínimo, uno de los dos polinucleótidos es capaz de ejercer un efecto fisiológico por el que se caracteriza sobre el otro. A modo de ejemplo, un promotor unido operativamente a la región codificante de un gen es capaz de inducir la transcripción de la región codificante.

Un “polinucleótido” significa una cadena única o cadenas paralelas y antiparalelas de un ácido nucleico. Por lo tanto, un polinucleótido puede ser un ácido nucleico de cadena única o doble cadena.

El término “ácido nucleico” se refiere habitualmente a polinucleótidos grandes.

El término “oligonucleótido” se refiere habitualmente a polinucleótidos cortos, generalmente no más grandes de, aproximadamente, 50 nucleótidos. Se entenderá que cuando una secuencia de nucleótidos está representada por una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), ésta también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C), en que “U” sustituye a “T”.

En la presente invención se utiliza la notación convencional para describir secuencias de polinucleótidos: el extremo de la mano izquierda de una secuencia de polinucleótido de cadena única es el extremo 5'; la dirección de la mano izquierda de una secuencia de polinucleótido de doble cadena se refiere como la dirección 5'.

A la dirección de adición de nucleótidos 5' a 3' a transcritos de ARN nacientes se hace referencia como dirección de la transcripción. La cadena de ADN que tiene la misma secuencia que ARNm es designada como la “cadena codificante”; a las secuencias en la cadena de ADN que se localizan en 5' con respecto a un punto de referencia en el ADN se hace referencia como “secuencias en dirección 5' (“upstream”)”; a las secuencias en la cadena de ADN que se localizan en 3' con respecto a un punto de referencia en el ADN se hace referencia como “secuencias en dirección 3' (“downstream”)”.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “secuencia promotora/reguladora” significa una secuencia de ácido nucleico que es necesaria para la expresión de un producto génico unido operativamente a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y, en otros casos, esta secuencia puede incluir también una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que son necesarios para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede ser, por ejemplo, una que exprese el producto génico de una manera específica de tejido.

Un promotor “constitutivo” es un promotor que dirige de manera constante la expresión a un gen al que está unido operativamente en una célula. A modo de ejemplo, los promotores que dirigen la expresión de genes “housekeeping” celulares se considera que son promotores constitutivos.

Un promotor “inducible” es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unido operativamente a un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, provoca que el producto génico se produzca en una célula viva sustancialmente sólo cuando un inductor que corresponde al promotor está presente en la célula.

- 5 Un promotor “específico de tejido” es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unido operativamente a un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, provoca que el producto génico se produzca en una célula viva sustancialmente sólo si la célula es una célula del tipo de tejido correspondiente al promotor.

- 10 Un primer oligonucleótido se hibrida a un segundo oligonucleótido “con astringencia elevada” si los dos oligonucleótidos se hibridan en condiciones en las que sólo los oligonucleótidos que son complementarios, como mínimo, aproximadamente, un 75% y, preferentemente, como mínimo, aproximadamente, un 90% o, como mínimo, aproximadamente, un 95%, se hibridan entre sí. La astringencia de las condiciones utilizadas para hibridar dos oligonucleótidos es función de, entre otros factores, la temperatura, la fuerza iónica del medio de hibridación, el periodo de incubación, la longitud de los oligonucleótidos, el contenido de G-C de los oligonucleótidos, y el grado esperado de no homología
15 entre los dos oligonucleótidos, si se conoce. Se conocen métodos de ajuste de la astringencia de las condiciones de hibridación (véase, por ejemplo, Sambrook y otros, 1989, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York).

- 20 El término “sustancialmente puro” describe un compuesto, por ejemplo, una proteína o polipéptido que ha sido separado de componentes que lo acompañan de forma natural. Habitualmente, un compuesto es sustancialmente puro cuando, como mínimo, un 10%, más preferentemente, como mínimo, un 20%, más preferentemente, como mínimo, un 50%, más preferentemente, como mínimo, un 60%, más preferentemente, como mínimo, un 75%, más preferentemente, como mínimo, un 90%, y lo más preferente, como mínimo, un 99% del material total (en volumen, en peso en mojado o en seco, o en porcentaje molar o fracción molar) en una muestra es el compuesto de interés. La pureza se
25 puede medir mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, en el caso de polipéptidos mediante cromatografía en columna, electroforesis en gel o análisis HPLC. Un compuesto, por ejemplo, una proteína también está sustancialmente purificada cuando está esencialmente libre de componentes asociados de forma natural o cuando está separada de los contaminantes nativos que lo acompañan en su estado natural.

- 30 Un “ácido nucleico sustancialmente puro”, tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una secuencia, segmento o fragmento de ácido nucleico que ha sido purificado de las secuencias que la delimitan en estado natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que ha sido eliminado de las secuencias que normalmente están adyacentes al fragmento, por ejemplo, las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma que existe de forma natural. El término también se aplica a ácido nucleicos que han sido sustancialmente purificados de otros componentes que acompañan
35 de forma natural al ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ADN o proteínas, que lo acompañan de forma natural en la célula.

- Un tratamiento “profiláctico” es un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad o muestra sólo signos tempranos de la enfermedad con el objetivo de disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada con la enfermedad.
40

Un tratamiento “terapéutico” es un tratamiento administrado a un sujeto que muestra signos de patología con el objetivo de disminuir o eliminar estos signos.

- 45 Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un compuesto es la cantidad de compuesto que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al sujeto al que se administra el compuesto. Un “vector” es una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado y que se puede utilizar para liberar el ácido nucleico aislado al interior de la célula. En la técnica se conocen numerosos vectores incluyendo, pero sin ser limitantes, polinucleótidos lineales, polinucleótidos asociados con compuestos iónicos o anfifílicos, plásmidos y virus. Por lo tanto, el término “vector”
50 incluye un plásmido replicante de manera autónoma o un virus. El término debería también interpretarse que incluye compuestos no plasmídicos y compuestos no virales que facilitan la transferencia de ácido nucleico a las células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina, liposomas, y similares. Los ejemplos de vectores virales incluyen, pero sin ser limitantes, vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales, y similares.

- 55 “Vector de expresión” se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende la expresión de secuencias de control unidas operativamente a una secuencia de nucleótido a expresar. Un vector de expresión comprende suficientes elementos en cis para la expresión; otros elementos para la expresión pueden ser suministrados por la célula huésped o en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos los conocidos en la técnica, tales como cósmicos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y
60 virus que incorporan el polinucleótido recombinante.

Modificación y síntesis de péptidos

- La siguiente sección se refiere a la modificación de péptidos y a su síntesis. Naturalmente, se entenderá que los
65 péptidos útiles en los métodos de la presente invención pueden incorporar residuos de aminoácidos que se modifican sin afectar la actividad. Por ejemplo, los extremos terminales se pueden derivar para incluir grupos de bloqueo, es decir sustituyentes químicos adecuados para proteger y/o estabilizar los extremos N y C terminales de una “degradación indeseable”, un término que comprende cualquier tipo de rotura enzimática, química o bioquímica del compuesto en

su extremo terminal que es probable que afecte a la función del compuesto, es decir, la degradación secuencial del compuesto en un extremo terminal del mismo.

Los grupos de bloqueo incluyen grupos protectores utilizados convencionalmente en la técnica de la química de péptidos que no afectarán de manera adversa a las actividades *in vivo* del péptido. Por ejemplo, los grupos de bloqueo del extremo N-terminal adecuados se pueden introducir mediante alquilación o acilación del extremo N-terminal. Los ejemplos de grupos de bloqueo de N-terminal adecuados incluyen grupos alquilo C₁-C₅ ramificados y no ramificados, grupos acilo, tales como grupos formilo y acetilo, así como formas sustituidas de los mismos, tales como el grupo acetamidometilo (Acm). Los análogos de aminoácidos desaminados también son grupos de bloqueo del N-terminal útiles y se pueden acoplar al extremo N-terminal del péptido o utilizar en lugar del residuo N-terminal. Los grupos de bloqueo del extremo C-terminal adecuados, en los que el grupo carboxilo del extremo C-terminal se incorpora o no, incluyen ésteres, cetonas o amidas. Los grupos alquilo que forma ésteres o cetonas, particularmente grupos alquilo inferiores, tales como metilo, etilo y propilo, y grupos amino formadores de amida, tales como aminas primarias (-NH₂), y grupos mono y dialquilamino, tales como metilamino, etilamino, dimetilamino, dietilamino, metiletilamino, y similares son ejemplos de grupos de bloqueo del extremo C-terminal. Los análogos de aminoácidos descarboxilados, tales como agmatina, son también grupos de bloqueo del extremo C-terminal útiles y se pueden acoplar al residuo C-terminal del péptido o utilizar en su lugar. Además, se entenderá que los grupos amino y carboxilo libres en los extremos terminales se pueden eliminar juntos del péptido para producir formas desaminadas y descarboxiladas de los mismos sin afectar a la actividad del péptido.

Otras modificaciones también se pueden incorporar sin afectar de manera adversa a la actividad biológica del péptido y éstas incluyen, pero sin ser limitantes, la sustitución de uno o más de los aminoácidos en la forma L-isomérica natural por aminoácidos en la forma D-isomérica. Por lo tanto, el péptido puede incluir uno o más residuos de aminoácidos, o puede comprender aminoácidos que están todos en forma D. También se contemplan las formas retro-inverso de péptidos según la presente invención, por ejemplo, péptidos invertidos en los que todos los aminoácidos están sustituidos por formas de aminoácidos D.

Las sales por adición de ácido de la presente invención también se contemplan como equivalentes funcionales. Por lo tanto, un péptido según la presente invención tratado con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, y similares, o un ácido orgánico tal como, acético, propiónico, glicólico, pirúvico, oxálico, málico, malónico, succínico, maleico, fumárico, tartárico, cítrico, benzoico, cinámico, mandélico, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluenosulfónico, salicílico y similares, para proporcionar una sal del péptido soluble en agua es adecuado para su uso en los métodos de la presente invención.

La presente invención da a conocer también análogos de proteínas o péptidos codificados por el ácido nucleico descrito en la presente invención. Los análogos pueden diferir de las proteínas o péptidos naturales en diferencias en las secuencias de aminoácidos conservativos o en modificaciones que no afectan a la secuencia, o en ambas.

Por ejemplo, se pueden realizar cambios en los aminoácidos conservativos, que aunque alteran la secuencia primaria de la proteína o el péptido, no alteran normalmente su función. Las sustituciones de aminoácidos conservativos incluyen habitualmente sustituciones en los siguientes grupos:

glicina, alanina;

valina, isoleucina, leucina;

ácido aspártico, ácido glutámico;

asparagina, glutamina;

serina, treonina;

lisina, arginina;

fenilalanina, tirosina.

Tal como se ha indicado anteriormente, las modificaciones (que normalmente no alteran la secuencia primaria) incluyen la derivatización química *in vivo* o *in vitro* de polipéptidos, por ejemplo, acetilación o carboxilación. También se incluyen modificaciones de la glicosilación, por ejemplo, aquellas realizadas mediante la modificación de los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesado en etapas de procesamiento posteriores; por ejemplo, mediante la exposición del polipéptido a enzimas que afectan a la glicosilación, por ejemplo, enzimas de glicosilación o deglicosilación de mamíferos. También se comprenden secuencias que tienen residuos de aminoácidos fosforilados por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

También se incluyen polipéptidos que han sido modificados utilizando técnicas normales de biología molecular para mejorar su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad o para hacerlos más adecuados como agente terapéutico. Los análogos de dichos polipéptidos incluyen aquellos que contienen residuos diferentes de L-aminoácidos naturales, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos no naturales.

Los péptidos de la presente invención no se limitan a productos de cualquiera de los procesos de ejemplo específicos indicados en la presente invención.

Los péptidos de la presente invención se pueden preparar fácilmente mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) estándar bien establecida tal como se ha descrito por Stewart y otros en *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª Edición, 1984, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois; y tal como se ha descrito por Bodanszky y Bodanszky en *The Practice of Peptide Synthesis*, 1984, Springer-Verlag, Nueva York. Al principio, se une un residuo de aminoácido protegido de manera adecuada a través de su grupo carboxilo a un soporte polimérico insoluble derivado, tal como una resina de poliestireno o poliamida reticulada. "Protegido de manera adecuada" se refiere a la presencia de grupos protectores tanto en el grupo α -amino del aminoácido como en cualquier grupo funcional de la cadena lateral. Los grupos protectores de la cadena lateral son generalmente estables a los disolventes, reactivos y condiciones de reacción utilizadas a lo largo de la síntesis, y son extraíbles en condiciones que no afectarán al producto peptídico final. La síntesis por etapas del oligopéptido se lleva a cabo mediante la extracción del grupo N-protector del aminoácido inicial y el acoplamiento al mismo del extremo carboxilo del siguiente aminoácido en la secuencia del péptido deseado. Este aminoácido también está protegido de manera adecuada. El carboxilo del aminoácido entrante se puede activar para reaccionar con el extremo N-terminal del aminoácido unido al soporte mediante la formación de un grupo reactivo, tal como la formación de una carbodiimida, un anhídrido de ácido simétrico o un grupo "éster activo", tal como ésteres de hidroxibenzotriazol o pentafluorfenilo.

Los ejemplos de métodos de síntesis de péptidos en fase sólida incluyen el método BOC que utilizaba *tert*-butiloxicarbonilo como grupo protector de α -amino, y el método FMOC que utiliza 9-fluorenilmetiloxicarbonilo para proteger el α -amino de los residuos de aminoácidos, ambos métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

La incorporación de grupos de bloqueo de los extremos N y/o C terminales también se puede conseguir utilizando protocolos convencionales para los métodos de síntesis de péptidos en fase sólida. Para la incorporación de grupos de bloqueo del extremo C-terminal, por ejemplo, la síntesis del péptido deseado se realiza habitualmente utilizando, como fase sólida, una resina de soporte que ha sido modificada químicamente, de manera que la división de la resina da lugar a un péptido que tiene el grupo de bloqueo del extremo C-terminal. Para proporcionar péptidos en los que el extremo C-terminal porta un grupo de bloqueo de amina primaria, por ejemplo, la síntesis se realiza utilizando una resina de metilbencihidrilamina (MBHA), de manera que, cuando se completa la síntesis del péptido, el tratamiento con ácido fluorhídrico libera el péptido deseado amidado en el extremo C-terminal. De manera similar, la incorporación de un grupo de bloqueo N-metilamina en el extremo C-terminal se consigue utilizando una resina DVB derivada con N-metilaminoetilo, que tras el tratamiento con HF libera un péptido que porta un extremo C-terminal N-metilamidado. El bloqueo del extremo C-terminal por esterificación también se puede conseguir utilizando procedimientos convencionales. Esto conlleva el uso de la combinación resina/grupo de bloqueo que permite la liberación del péptido de la cadena lateral de la resina, para permitir la posterior reacción con el alcohol deseado para formar la función éster. El grupo protector FMOC, en combinación con la resina DVB derivada con alcohol metoxialcoxibencílico o enlazador equivalente, se puede utilizar para este objetivo, realizándose la división del soporte mediante TFA en diclorometano. La esterificación de la función carboxilo activada de manera adecuada, por ejemplo con DCC, puede entonces continuar mediante la adición del alcohol deseado, seguido de la desprotección y aislamiento del producto peptídico esterificado.

La incorporación de grupos de bloqueo del extremo N-terminal se puede conseguir mientras el péptido sintetizado aún está unido a la resina, por ejemplo, mediante el tratamiento con un anhídrido y nitrilo adecuados. Para incorporar un grupo de bloqueo de acetilo en el extremo N-terminal, por ejemplo, el péptido acoplado a la resina se puede tratar con anhídrido acético al 20% en acetonitrilo. El producto peptídico bloqueado en N se puede entonces separar de la resina, desproteger y posteriormente aislar.

Para asegurar que el polipéptido obtenido a partir de técnicas sintéticas químicas o biológicas es el péptido deseado, debería realizarse un análisis de la composición del péptido. Dichos análisis de la composición de aminoácidos se pueden realizar utilizando espectrometría de masas de alta resolución para determinar el peso molecular del péptido. De manera alternativa o adicional, el contenido de aminoácidos del péptido se puede confirmar mediante la hidrólisis del péptido en ácido acuoso y la separación, identificación y cuantificación de los componentes de la mezcla utilizando HPLC o un analizador de aminoácidos. Los secuenciadores de proteínas, que degradan secuencialmente el péptido e identifican los aminoácidos en orden, también se pueden utilizar para determinar definitivamente la secuencia del péptido.

Antes de su uso en los métodos de la presente invención, el péptido se purifica para eliminar los contaminantes. En este aspecto, se entenderá que el péptido se purificará para cumplir con los estándares establecidos por las propias agencias reguladoras apropiadas. Se puede utilizar cualquiera de una serie de procedimientos de purificación convencionales para conseguir el nivel requerido de pureza incluyendo, por ejemplo, cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (HPLC) utilizando una columna de sílice alquilada, tal como sílice C₄, C₈ o C₁₈. En general, se utiliza una fase móvil en gradiente de contenido orgánico creciente para conseguir la purificación, por ejemplo, acetonitrilo en un tampón acuoso, conteniendo normalmente una pequeña cantidad de ácido trifluoroacético. También se puede utilizar cromatografía de intercambio iónico para separar péptidos en base a su carga.

Composiciones farmacéuticas

A continuación se describen los compuestos que se identifican utilizando cualquiera de los métodos descritos en la presente invención se pueden formular y administrar a un mamífero para el tratamiento de las enfermedades descritas en la presente invención.

La presente invención comprende la preparación y el uso de composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto útil en los métodos de la presente invención como principio activo. Dicha composición farmacéutica puede consistir en el principio activo solo, en una forma adecuada para la administración a un sujeto, o la composición farmacéutica puede comprender el principio activo y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, uno o más principios activos, o alguna combinación de los mismos. El principio activo puede estar presente en la composición farmacéutica en forma de un éster o sal fisiológicamente aceptable, tal como en combinación con un catión o anión farmacéuticamente aceptable, tal como es bien conocido en la técnica.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “portador farmacéuticamente aceptable” significa una composición química con la que se puede combinar el principio activo y que, después de la combinación, se puede utilizar para administrar el principio activo a un sujeto.

Tal como se utiliza en la presente invención, éster o sal “fisiológicamente aceptable” significa una forma de éster o sal del principio activo que es compatible con cualquier otro ingrediente de la composición farmacéutica, el cual no es perjudicial para el sujeto al que se debe administrar la composición.

Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención se pueden preparar mediante cualquier método conocido o desarrollado posteriormente en el sector de la farmacología. En general, dichos métodos preparatorios incluyen la etapa de asociar el principio activo con un portador o uno o más ingredientes auxiliares y, a continuación, si es necesario o deseable, conformar o envasar el producto en una unidad deseada de dosis única o múltiples dosis.

Aunque las descripciones de composiciones farmacéuticas dadas a conocer en la presente invención están dirigidas principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración ética a humanos, un experto en la materia entenderá que dichas composiciones son generalmente adecuadas para la administración a animales de todo tipo. Se conoce la modificación de las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a humanos a efectos de hacer que las composiciones sean adecuadas para la administración a varios animales y el farmacólogo veterinario experto puede diseñar y realizar dicha modificación utilizando simplemente, si la hay, experimentación habitual. Los sujetos en los que se contempla la administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero sin ser limitantes, humanos y otros primates, mamíferos incluyendo mamíferos comercialmente relevantes, tales como ganado, cerdos, caballos, ovejas, gatos y perros, aves incluyendo aves comercialmente relevantes, tales como pollos, patos, gansos y pavos.

Las composiciones farmacéuticas que son útiles en los métodos de la presente invención se pueden preparar, envasar o vender en formulaciones adecuadas para las vías de administración oral, rectal, vaginal, parenteral, tópica, pulmonar, intranasal, bucal, oftálmica, intratecal u otras vías. Otras formulaciones contempladas incluyen nanopartículas proyectadas, preparaciones liposomales, eritrocitos liberados que contienen el principio activo y formulación de base inmunológica.

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar, envasar o vender a granel, como una única dosis unitaria o como un conjunto de únicas dosis unitarias. Tal como se utiliza en la presente invención, “una dosis unitaria” es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del principio activo. La cantidad del principio activo es generalmente igual a la dosificación del principio activo que se administraría a un sujeto o una fracción conveniente de dicha dosificación, tal como, por ejemplo, una mitad o un tercio de dicha dosificación.

Las cantidades relativas del principio activo, el portador farmacéuticamente aceptable, y cualquier ingrediente adicional en una composición farmacéutica de la presente invención variará dependiendo de la identidad, tamaño y condición del sujeto tratado y dependiendo además de la vía por la que debe administrarse la composición. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre un 0,1% y un 100% (p/p) de principio activo.

Además del principio activo, una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además uno o más agentes adicionales farmacéuticamente activos. Agentes adicionales particularmente contemplados incluyen antieméticos y secuestradores, tales como secuestradores de cianuro y cianato.

Las formulaciones de liberación controlada o sostenida de una composición farmacéutica de la presente invención se pueden realizar utilizando tecnología convencional.

Una formulación de una composición farmacéutica de la presente invención adecuada para la administración oral se puede preparar, envasar o vender en forma de una dosis unitaria sólida discreta que incluyen, pero sin ser limitantes, un comprimido, una cápsula dura o blanda, un “cachet”, una pastilla, una píldora, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo. Otras formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen, pero sin ser

limitantes, una formulación en polvo o granular, una suspensión acuosa u oleosa, una solución acuosa u oleosa, o una emulsión.

Tal como se utiliza en la presente invención, un líquido “oleoso” es aquel que comprende una molécula líquida que contiene carbono y que muestra un carácter menos polar que el agua.

Un comprimido que comprende el principio activo se puede fabricar, por ejemplo, mediante el prensado o el moldeo del principio activo, opcionalmente con uno o más ingredientes adicionales. El comprimido se puede preparar mediante la compresión, en un dispositivo adecuado, del principio activo en una forma no fluida, tal como una preparación en polvo o granular, opcionalmente mezclada con uno o más entre un aglutinante, un lubricante, un excipiente, un agente activo de superficie y un agente dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden fabricar mediante el moldeo, en un dispositivo adecuado, de una mezcla del principio activo, un portador farmacéuticamente aceptable y, como mínimo, suficiente líquido para humedecer la mezcla. Los excipientes farmacéuticamente aceptables utilizados en la fabricación de comprimidos incluyen, pero sin ser limitantes, diluyentes inertes, agentes de granulación y desintegrantes, agentes aglutinantes, y agentes lubricantes. Los agentes dispersantes conocidos incluyen, pero sin ser limitantes, almidón de patata y glicolato de almidón sódico. Los agentes activos de superficie conocidos incluyen, pero sin ser limitantes, laurilsulfato sódico. Los diluyentes conocidos incluyen, pero sin ser limitantes, carbonato cálcico, carbonato sódico, lactosa, celulosa microcristalina, fosfato cálcico, hidrogenofosfato cálcico, y fosfato cálcico. Los agentes de granulación y desintegrantes conocidos incluyen, pero sin ser limitantes, almidón de maíz y ácido algínico. Los agentes aglutinantes conocidos incluyen, pero sin ser limitantes, gelatina, acacia, almidón de maíz pregelatinado, polivinilpirrolidona e hidroxipropil metilcelulosa. Los agentes lubricantes conocidos incluyen, pero sin ser limitantes, estearato de magnesio, ácido esteárico, sílica y talco.

Los comprimidos pueden estar no recubiertos o se pueden recubrir utilizando métodos conocidos para conseguir una desintegración retardada en el tracto gastrointestinal, proporcionando de este modo una liberación sostenida y absorción del principio activo. A modo de ejemplo, se puede utilizar un material, tal como gliceril monoestearato o gliceril diestearato para recubrir los comprimidos. A modo de ejemplo adicional, los comprimidos se pueden recubrir utilizando los métodos descritos en las Patentes de Estados Unidos nos. 4.256.108; 4.160.452; y 4.265.874 para formar comprimidos de liberación controlada de manera osmótica. Los comprimidos pueden comprender además un agente edulcorante, un agente aromatizante, un agente colorante, un conservante, o alguna combinación de éstos a efectos de proporcionar un preparado farmacéuticamente elegante y agradable.

Las cápsulas duras que comprenden el principio activo se pueden fabricar utilizando una composición fisiológicamente degradable, tal como gelatina. Dichas cápsulas duras comprenden el principio activo y pueden comprender además ingredientes adicionales que incluyen, por ejemplo un diluyente sólido inerte, tal como carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín.

Las cápsulas de gelatina blanda que comprenden el principio activo se pueden fabricar utilizando una composición fisiológicamente degradable, tal como gelatina. Dichas cápsulas blandas comprenden el principio activo, que se puede mezclar con agua o un medio oleoso, tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las formulaciones líquidas de una composición farmacéutica de la presente invención que son adecuadas para la administración oral se pueden preparar, envasar y vender en forma líquida o en forma de un producto seco previsto para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso.

Las suspensiones líquidas se pueden preparar utilizando métodos convencionales para conseguir la suspensión del principio activo en un vehículo acuoso u oleoso. Los vehículos acuosos incluyen, por ejemplo, agua y solución salina isotónica. Los vehículos oleosos incluyen, por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico, aceites vegetales, tales como cacahuete, oliva, sésamo, aceite de coco, aceites vegetales fraccionados y aceites minerales, tales como parafina líquida. Las suspensiones líquidas pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales incluyendo, pero sin ser limitantes, agentes de suspensión, agentes dispersantes o humectantes, agentes emulsionantes, demulcentes, conservantes, tampones, sales, aromatizantes, agentes colorantes y agentes edulcorantes. Las suspensiones oleosas pueden comprender además un agente espesante. Los agentes de suspensión conocidos incluyen, pero sin ser limitantes, jarabe de sorbitol, grasas hidrogenadas comestibles, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma tragacanto, goma acacia y derivados de celulosa, tales como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa. Los agentes dispersantes o humectantes incluyen, pero sin ser limitantes, fosfátidos naturales, tales como lecitina, productos de condensación de un óxido de alquileño con un ácido graso, con un alcohol alifático de cadena larga, con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol, o con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, estearato de polioxietileno, heptadecaetilenocetanol, monooleato de polioxietileno sorbitol, y monooleato de polioxietileno sorbitano, respectivamente). Los agentes emulsionantes conocidos incluyen, pero sin ser limitantes, lecitina y acacia. Los conservantes conocidos incluyen, pero sin ser limitantes, metil-, etil- o n-propil-para-hidroxibenzoatos, ácido ascórbico y ácido sórbico. Los agentes edulcorantes conocidos incluyen, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol, sacarosa y sacarina. Los agentes espesantes conocidos para suspensiones oleosas incluyen, pero sin ser limitantes, cera de abeja, parafina dura y alcohol cetílico.

Las soluciones líquidas del principio activo en disolventes acuosos u oleosos se pueden preparar en sustancialmente la misma manera que las suspensiones líquidas, siendo la diferencia principal que el principio activo se disuelve, en lugar de suspenderse en el disolvente. Las soluciones líquidas de la composición farmacéutica de la presente invención

pueden comprender cada uno de los componentes descritos con respecto a suspensiones líquidas, entendiéndose que los agentes de suspensión no ayudarán necesariamente a la disolución del principio activo en el disolvente. Los disolventes acuosos incluyen, por ejemplo, agua y solución salina isotónica. Los disolventes oleosos incluyen, por ejemplo aceite de almendra, ésteres oleosos, alcohol etílico, aceites vegetales, tales como aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, aceites vegetales fraccionados, y aceites minerales, tales como parafina líquida.

Las formulaciones en polvo o granulares de una preparación farmacéutica de la presente invención se pueden preparar utilizando métodos conocidos. Dichas formulaciones se pueden administrar directamente a un sujeto, se pueden utilizar, por ejemplo, para formar comprimidos, para rellenar cápsulas, para preparar una suspensión o solución acuosa o aceitosa mediante la adición a la misma de un vehículo acuoso u oleoso. Cada una de estas formulaciones puede comprender además uno o más de un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y un conservante. En estas formulaciones también se pueden incluir excipientes adicionales, tales como sustancias de carga y agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

Una composición farmacéutica de la presente invención también se puede preparar, envasar o vender en forma de una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, tal como aceite de oliva o de cacahuete, un aceite mineral, tal como parafina líquida, o una combinación de los mismos. Dichas composiciones pueden comprender además uno o más agentes emulsionantes, tales como gomas naturales, tales como goma acacia o goma tragacanto, fosfátidos naturales, tales como fosfátido de soja o lecitina, ésteres o ésteres parciales derivados de combinaciones de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, tales como monooleato de sorbitan y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, tales como monooleato de polioxietilen sorbitan. Estas emulsiones pueden contener también ingredientes adicionales que incluyen, por ejemplo, agentes edulcorantes o aromatizantes.

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar, envasar o vender en una formulación adecuada para la administración rectal. Dicha composición puede estar en forma de, por ejemplo, un supositorio, un preparado de enema de retención y una solución para la irrigación rectal o colónica.

Las formulaciones de supositorios se pueden fabricar mediante la combinación del principio activo con un excipiente farmacéuticamente aceptable no irritante que es sólido a temperatura ambiente ordinaria (es decir, aproximadamente, 20°C) y que es líquido a la temperatura rectal del sujeto (es decir, aproximadamente, 37°C en un ser humano sano). Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero sin ser limitantes, manteca de cacao, polietilenglicoles, y diversos glicéridos. Las formulaciones de supositorio pueden comprender además varios ingredientes adicionales que incluyen, pero sin ser limitantes, antioxidantes y conservantes.

Los preparados o soluciones de enema de retención para la irrigación rectal o colónica se pueden realizar mediante la combinación del principio activo con un portador líquido farmacéuticamente aceptable. Tal como se conoce en la técnica, los preparados de enema se pueden administrar o envasar en un dispositivo de liberación adaptado a la anatomía rectal del sujeto. Los preparados de enema pueden comprender además varios ingredientes adicionales que incluyen, pero sin ser limitantes, antioxidantes y conservantes.

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar, envasar o vender en una formulación adecuada para la administración vaginal. Dicha composición puede adoptar, por ejemplo, forma de supositorio, un material insertable en la vagina impregnado o recubierto, tal como un tampón, un preparado para ducha vaginal, o un gel o una crema o una solución para la irrigación vaginal.

Los métodos para la impregnación o recubrimiento de un material con una composición química son conocidos en la técnica e incluyen, pero sin ser limitantes, métodos de deposición o unión de una composición química en una superficie, métodos de incorporación de una composición química en la estructura de un material durante la síntesis del material (es decir, tal como con un material fisiológicamente degradable) y métodos de absorción de una solución o suspensión acuosa u oleosa en un material absorbente, con o sin el posterior secado.

Los preparados o soluciones de ducha vaginal para la irrigación vaginal se pueden fabricar mediante la combinación del principio activo con un portador líquido farmacéuticamente aceptable. Tal como se conoce en la técnica, los preparados para ducha se pueden administrar y envasar en un dispositivo de liberación adaptada a la anatomía vaginal del sujeto. Los preparados para ducha pueden comprender además varios ingredientes adicionales que incluyen, pero sin ser limitantes, antioxidantes, antibióticos, agentes antifúngicos y conservantes.

Tal como se utiliza en la presente invención, la “administración parenteral” de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por la abertura física del tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través de la abertura en el tejido. La administración parenteral incluye, por tanto, pero sin ser limitantes, la administración de una composición farmacéutica mediante inyección de la composición, mediante la aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante la aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica penetrantes del tejido y similares. En particular, se contempla que la administración parenteral incluye, pero sin ser limitantes, inyección subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal, y técnicas de infusión dialítica de riñón.

Las formulaciones de una composición farmacéutica adecuadas para la administración parenteral comprenden el principio activo con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o solución salina isotónica estéril. Dichas formulaciones se pueden preparar, envasar o vender en una forma adecuada para la administración de bolo o para la administración continua. Las formulaciones inyectables se pueden preparar, envasar o vender en forma de una dosis unitaria, tal como en ampollas o en recipientes multidosis que contiene un conservante. Las formulaciones para la administración parenteral incluyen, pero sin ser limitantes, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas y formulaciones de liberación sostenida o biodegradables implantables. Dichas formulaciones pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales que incluyen, pero sin ser limitantes, agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes. En una realización de una formulación para la administración parenteral, el principio activo se dispone en forma seca (es decir, polvo o granular) para la reconstitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril sin pirógeno) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar, envasar o vender en forma de una suspensión o solución acuosa u oleosa inyectable estéril. Esta suspensión o solución se puede formular según la técnica conocida y puede comprender, además del principio activo, ingredientes adicionales, tales como agentes dispersantes, agentes humectantes o agentes de suspensión descritos en la presente invención. Dichas formulaciones inyectables estériles se pueden preparar utilizando un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable, tal como agua o 1,3-butanodiol, por ejemplo. Otros diluyentes aceptables y disolventes incluyen, pero sin ser limitantes, solución de Ringer, solución isotónica de cloruro sódico y aceites fijados, tales como monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Otras formulaciones parenteralmente administrables que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina, en una preparación liposomal, o como componente de un sistema de polímeros biodegradables. Las composiciones para una liberación sostenida o implantación pueden comprender materiales poliméricos o hidrofóbicos farmacéuticamente aceptables, tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero poco soluble o una sal poco soluble.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen, pero sin ser limitantes, preparaciones líquidas o semilíquidas, tales como linimentos, lociones, emulsiones de aceite en agua o agua en aceite, tales como cremas, pomadas o pastas, y soluciones o suspensiones. Las formulaciones administrables de manera tópica pueden comprender, por ejemplo, desde, aproximadamente un 1% hasta aproximadamente un 10% (p/p) de principio activo, aunque la concentración del principio activo puede ser tan elevada como el límite de solubilidad del principio activo en el disolvente. Las formulaciones para la administración tópica pueden comprender además uno o más de los ingredientes adicionales descritos en la presente invención.

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar, envasar o vender en una formulación adecuada para la administración pulmonar a través de la cavidad bucal. Dicha formulación puede comprender partículas secas que comprenden el principio activo y que tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 7 nanómetros y, preferentemente desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 6 nanómetros. Dichas composiciones están convenientemente en forma de polvos secos para la administración utilizando un dispositivo que comprende un depósito de polvo seco al que se puede dirigir una corriente de propelente para dispersar el polvo o utilizando un recipiente que dispensa disolvente/polvo autopropelente, tal como un dispositivo que comprende el principio activo disuelto o suspendido en un propelente de punto de ebullición bajo en un recipiente cerrado herméticamente. Preferentemente, dichos polvos comprenden partículas en las que, como mínimo, el 98% de las partículas en peso tienen un diámetro superior a 0,5 nanómetros y, como mínimo, el 95% de las partículas en número tienen un diámetro inferior a 7 nanómetros. Más preferentemente, como mínimo, el 95% de las partículas en peso tienen un diámetro superior a 1 nanómetro y, como mínimo, un 90% de las partículas en número tienen un diámetro inferior a 6 nanómetros. Las composiciones de polvo seco incluyen preferentemente un diluyente en polvo fino sólido, tal como azúcar, y se disponen de manera conveniente en una forma de dosis unitaria.

Los propelentes de punto de ebullición bajo incluyen generalmente propelentes líquidos que tiene un punto de ebullición por debajo de 65°F a presión atmosférica. En general, el propelente puede constituir de 50 a 99,9% (p/p) de la composición y el principio activo puede constituir de 0,1 a 20% (p/p) de la composición. El propelente puede comprender además ingredientes adicionales, tales como un tensioactivo no iónico líquido o un tensioactivo aniónico sólido o un diluyente sólido (preferentemente con un tamaño de partícula del mismo orden que las partículas que comprenden el principio activo).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención formuladas para la liberación pulmonar también pueden disponer del principio activo en forma de gotas de una solución o suspensión. Dichas formulaciones se pueden preparar, envasar o vender como soluciones o suspensiones alcohólicas acuosas o diluidas, opcionalmente estériles, que comprenden el principio activo, y se pueden administrar de manera conveniente utilizando cualquier dispositivo de nebulización o atomización. Dichas formulaciones pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales que incluyen, pero sin ser limitantes, un agente aromatizante, tal como sacarina sódica, un aceite volátil, un agente tamponador, un agente activo de superficie, o un conservante, tal como metilhidroxibenzoato. Las gotas suministradas mediante esta vía de administración tienen preferentemente un diámetro promedio en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 nanómetros.

Las formulaciones descritas en la presente invención al ser útiles para la liberación pulmonar son también útiles para la liberación intranasal de una composición farmacéutica de la presente invención.

Otra formulación adecuada para la administración intranasal es un polvo grueso que comprende el principio activo y tiene un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 0,2 a 500 micrómetros. Dicha formulación se administra de forma que se esnifa, es decir, mediante una inhalación rápida a través de la fosa nasal desde un recipiente con el polvo dispuesto de manera próxima a las fosas nasales,

Las formulaciones adecuadas para la administración nasal pueden comprender, por ejemplo, tan poco como aproximadamente 0,1% (p/p) y como máximo un 100% (p/p) del principio activo y puede comprender además uno o más de los ingredientes adicionales descritos en la presente invención.

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar, envasar o vender en una formulación adecuada para la administración bucal. Dichas formulaciones pueden estar, por ejemplo, en forma de comprimidos o pastillas fabricadas mediante métodos convencionales y pueden comprender, por ejemplo, de 0,1 a 20% (p/p) de principio activo, comprendiendo el resto una composición soluble o degradable de manera oral y, opcionalmente, uno o más de los ingredientes adicionales descritos en la presente invención. De manera alternativa, las formulaciones adecuadas para la administración bucal pueden comprender un polvo o una solución o suspensión pulverizada o atomizada que comprende el principio activo. Dichas formulaciones en polvo o atomizadas, cuando se dispersan, tienen preferentemente un tamaño de partícula o gota promedio en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 nanómetros, y pueden comprender además uno o más de los ingredientes adicionales descritos en la presente invención.

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar, envasar o vender en una formulación adecuada para la administración oftálmica. Dichas formulaciones pueden estar, por ejemplo, en forma de gotas para los ojos que incluyen, por ejemplo, una solución o suspensión del 0,1-1,0% (p/p) del principio activo en un portador líquido acuoso u oleoso. Dichas gotas pueden comprender además agentes tamponadores, sales o uno o más de otros ingredientes adicionales descritos en la presente invención. Otras formulaciones administrables de manera oftálmica que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina o en una preparación liposomal.

Tal como se utiliza en la presente invención, “ingredientes adicionales” incluyen, pero sin ser limitantes, uno o más de los siguientes: excipientes; agentes activos de superficie; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes granulantes y desintegrantes; agentes aglutinantes; agentes lubricantes; agentes edulcorantes; agentes aromatizantes; agentes colorantes; conservantes; composiciones fisiológicamente degradables, tales como gelatina; vehículos y disolventes acuosos; vehículos y disolventes oleosos; agentes de suspensión; agentes de dispersión o humectantes; agentes emulsionantes, demulcentes; tampones, sales, agentes espesantes; sustancias de carga; agentes emulsionantes; antioxidantes; antibióticos; agentes antifúngicos; agentes estabilizantes; y materiales poliméricos o hidrofóbicos farmacéuticamente aceptables. En la técnica se conocen otros “ingredientes adicionales” que se pueden incluir en las composiciones farmacéuticas de la presente invención y se describen, por ejemplo, en Genaro ed., 1985, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA, que se incorpora en la presente invención como referencia.

Las composiciones de liberación sostenida que comprenden PEDF pueden ser particularmente útiles. Por ejemplo, las composiciones de liberación sostenida pueden ser útiles en el humor vítreo y también se pueden utilizar detrás del ojo. Tal como se indica en otros puntos de la presente invención, las composiciones de liberación sostenida también pueden ser útiles en vías de liberación sistémicas u otras vías de liberación para la administración del PEDF. Un experto en la materia sabrá las composiciones apropiadas de liberación sostenida que se pueden utilizar para tratar la enfermedad deseada para conseguir el resultado deseado.

Las dosis habituales del compuesto de la presente invención que se pueden administrar a un animal, preferentemente un humano, varían en la cantidad desde 1 μ g hasta aproximadamente 100 g por kilogramo de peso corporal del animal. Aunque la dosis exacta administrada variará dependiendo de un número de factores, que incluyen, pero sin ser limitantes, el tipo de animal y el tipo de estado de la enfermedad en tratamiento, la edad del animal y la vía de administración. Preferentemente, la dosis del compuesto variará desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 10 g por kilogramo de peso corporal del animal. Más preferentemente, la dosis variará desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 1 g por kilogramo de peso corporal del animal.

El compuesto se puede administrar al animal de manera frecuente, tal como varias veces diarias, o se puede administrar de manera menos frecuente, tal como una vez al día, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, o incluso menos frecuentemente, tal como una vez cada varios meses o incluso una vez al año o menos. La frecuencia de la dosis será fácilmente evidente para un técnico en la materia y dependerá de una serie de factores, tales como, pero sin ser limitantes, el tipo y la gravedad de la enfermedad en tratamiento, el tipo y la edad del animal, etc.

Ejemplos

A continuación, se describe la presente invención haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan con el objetivo únicamente de ilustrar y la presente invención no debería interpretarse de ningún modo como limitada a estos ejemplos, sino que más bien debería interpretarse que comprende cualquiera y todas las variaciones que son evidentes como resultado de la enseñanza dada a conocer en la presente invención.

Los procedimientos utilizados en estos ejemplos, tales como el cultivo celular, la manipulación de proteína y ADN, etc. son bien conocidos en la técnica (ver, en general, Sambrook y otros, *supra*). Por consiguiente, con el fin de abreviar, los protocolos experimentales no se describen en detalle.

5 Ejemplo 1

Los datos presentados en la presente invención demuestran que el PEDF evita la migración de células endoteliales.

10 La migración de diferentes tipos de células endoteliales vasculares se determinaron mediante la adición del PEDF a células endoteliales cultivadas, específicamente, células endoteliales aisladas de capilares adrenales bovinos, cordones umbilicales humanos y tejido dérmico microvascular humano.

15 Las células se aplicaron a membranas Nucleopore gelatinizadas (poros de 5 μ m para células capilares bovinas y poros de 8 μ m para otras células) en una cámara Boyden modificada invertida. Después de dos horas, la cámara se reinvertió y se añadieron las sustancias de prueba a los pocillos superiores de cada una. De manera específica, se expusieron las poblaciones a medio de cultivo solo (control), 10 ng/ml de bFGF, 2 nM del PEDF (PEDF de longitud completa) o ambos, 10 ng/ml de bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico) y 10 nM del PEDF. A continuación, las células se dejaron migrar durante 3-4 horas. Después de esto, las membranas se fijaron y tiñeron, y se contaron el número de células que había migrado.

20 Los resultados del ensayo se presentan en la figura 1 como porcentaje de la migración máxima (las barras de error representan la medición del error estándar, n = 4). Tal como se representa, los tres tipos de células endoteliales vasculares mostraron casi un 100% de migración en presencia de bFGF. Sin embargo, en presencia del PEDF, se observó una migración considerablemente menor. Estos resultados demuestran que el PEDF inhibe la migración de células endoteliales. Estos resultados son sorprendentes, dado que se sabe que la proteína PEDF induce la diferenciación neural de células tumorales de retinoblastoma cultivadas, en que es un factor neurotrópico para células granulares cerebelares y un factor citostático para células gliales (Taniwaki y otros, 1997, J. Neurochem. 68: 26-32; Sugita y otros, 1997, J. Neurosci. Res. 49: 710-718; Tombran-Tink y otros, 1991, Exp. Eye Res. 53: 411-414; Becerra, 1997, Structure-Function Studies on PEDF, Capítulo 21, en Chemistry and Biology of Serpins, Church y otros, eds., Plenum Press).

30

Ejemplo 2

35 Los datos presentados en la presente invención demuestran que la prevención de la migración celular por PEDF es específica para células endoteliales.

La capacidad del PEDF para evitar la migración de fibroblastos o músculos lisos se ensayó utilizando células obtenidas de la línea celular de fibroblastos diploides humanos WI-38, fibroblastos de prepucio humano, músculo liso vascular y neutrófilos humanos normales.

40

El ensayo se realizó tal como se indica en el ejemplo 1, a excepción de que la dosis del PEDF variaba desde 0,01 nM hasta aproximadamente 50 nM y que el ensayo de migración se realizó sin invertir las cámaras. Además, el inductor de la migración varió con el tipo de células (se utilizó IL-8 a 1 μ g/ml y se utilizó PEDF a 250 pg/ml).

45 Los resultados de este experimento se presentan en las figuras 2A-2D. Tal como se indica en estas figuras, el PEDF no inhibía la migración de ninguna línea celular. Este resultado indica que la actividad antimigratoria del PEDF es específica para las células endoteliales vasculares.

50 Ejemplo 3

Los datos presentados en la presente invención demuestran que el PEDF se encuentra entre los inhibidores más potentes de la migración de células endoteliales cuando se compara con otros factores antiangiogénicos.

55 Utilizando un protocolo similar al indicado en el Ejemplo 1, se expusieron células endoteliales capilares adrenales bovinas a bFGF, PEDF y varios factores antiangiogénicos conocidos. La cantidad de un factor determinado necesario para conseguir el 50% de migración se determinó y se indica aquí como ED₅₀. Una medición de ED₅₀ más pequeña indica un factor antiangiogénico más potente. Los resultados de este experimento, presentados en la Tabla 1, indican que el PEDF es un factor antiangiogénico altamente potente.

60

65

ES 2 316 437 T3

TABLA 1

	<u>Agente</u>	<u>ED₅₀ (nM)</u>
5	PEDF	0,1-0,5
	Trombospondina	0,5
	Endostatina	3,0
10	Angiostatina	3,5
	Ácido retinoico	15
	Inhibidor tisular de	3500
15	metaloproteinasa -I	
	Captopril	10.000

Ejemplo 4

Estos datos demuestran que el PEDF inhibe la actividad angiogénica de agentes angiogénicos conocidos.

Utilizando un protocolo similar al indicado en el Ejemplo 1, se expusieron células endoteliales capilares adrenales bovinas a cinco agentes angiogénicos conocidos solos o en combinación con PEDF 0,1 μ g/ml. En particular, se utilizó aFGF a una concentración de 50 ng/ml, se utilizó bFGF a una concentración de 10 ng/ml, se utilizó IL-8 a una concentración de 40 ng/ml, se utilizó PDGF a una concentración de 250 pg/ml y se utilizó VEGF a una concentración de 100 pg/ml.

Los resultados del ensayo se presentan en la figura 3. Tal como se representa, la migración de las células fue inhibida de forma considerable por PEDF, independientemente del agente angiogénico. Estos resultados demuestran que la inhibición mediada por PEDF de la migración endotelial vascular no es específica para la inducción por bFGF, sino que el PEDF actúa, en general, para inhibir la migración de estas células.

Ejemplo 5

Estos datos demuestran que el PEDF inhibe la neovascularización *in vivo*.

Los gránulos que comprenden varias proteínas se implantaron en las córneas avasculares de ratas. Los gránulos contenían o carecían de bFGF y contenían también PEDF o albúmina de suero bovino (BSA) que funcionaban como control. Después de siete días, se examinaron las córneas de las ratas para determinar si había tenido lugar la angiogénesis.

Los resultados de este ensayo se presentan en la tabla 2. Tal como se indica, no se observó vascularización a partir de la inyección de gránulos que carecían de bFGF. Sin embargo, se observó vascularización en todos los ojos implantados con bFGF y BSA. Además, la inyección simultánea de bFGF y PEDF no dio lugar a neovascularización en ninguna córnea. Estos resultados indican que el PEDF es un potente inhibidor de la angiogénesis *in vivo*.

TABLA 2*

	<u>Tratamiento</u>	<u>Sin bFGF</u>	<u>Con bFGF</u>
55	PEDF (8 nM)	0/3	0/3
60	BSA	0/2	4/4

*resultados expresados como el número de córneas con angiogénesis/número de córneas implantadas.

Ejemplo 6

Los datos presentados en la presente invención demuestran que los polipéptidos de PEDF diferentes de la proteína PEDF completa son agentes antiangiogénicos activos.

La digestión con tripsina de la proteína PEDF completa rompe la proteína en el aminoácido 352 de la SEC ID No. 1, eliminando la parte carboxi terminal de la proteína de aproximadamente 3-5 kDa (Becerra y otros, 1995, J. Biol. Chem. 270: 25992-25999). Este procedimiento se utilizó para generar los fragmentos y se purificó el fragmento N-PEDF truncado (que representa los aminoácidos 21-382 de la SEC ID No. 1) a partir de tripsina mediante cromatografía de afinidad de heparina.

Utilizando un protocolo similar al indicado anteriormente, se evaluaron varias concentraciones del PEDF de longitud completa o el péptido truncado por sus respectivas capacidades para afectar a la migración de células endoteliales. Los datos generados para el péptido truncado se indican en la figura 5. La comparación de estos datos con la actividad del PEDF de longitud completa (véase la figura 4) revela que ambas proteínas tienen una potencia similar en la inhibición de la migración de células endoteliales. Estos resultados indican que los péptidos diferentes del PEDF de longitud completa son polipéptidos de PEDF activos.

Se ensayaron péptidos truncados adicionales derivados del PEDF en la eficacia en el ensayo de migración de células endoteliales utilizando células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (Clonetics, Cell Systems) en el párrafo 9 en una Cámara de Boyden modificada, tal como se ha descrito anteriormente, y los resultados se muestran en la figura 7. En la figura 7A, las células se expusieron al gradiente de VEGF en presencia del PEDF recombinante purificado (rPEDF), PEDF producido de forma bacteriana (BH) o péptidos PEDF que contenían sólo los residuos de aminoácidos 78-121 (44 unidades) y 44-77 (34 unidades) en referencia a la SEC ID No. 1. Se añadieron anticuerpos neutralizantes donde se mostraba para verificar si el efecto antiangiogénico es específico para péptidos PEDF y no debido a la contaminación. Ambas preparaciones del PEDF de longitud completa se utilizaron a 25 nM, se utilizó antisuero policlonal neutralizante contra PEDF a una dilución de 1:200, se utilizó VEGF humano recombinante (R&D Systems) a 200 pg/ml. En la figura 7B, las células se expusieron al gradiente de VEGF en presencia de concentraciones crecientes de péptidos de 34 unidades y 44 unidades. El antisuero utilizado en este experimento no se purificó por afinidad, mientras que el antisuero utilizado en todos los otros experimentos presentados en la presente invención se purificaron por afinidad.

Los datos demuestran que un fragmento de péptido de 34 aminoácidos de la proteína PEDF de 418 aminoácidos tiene actividad antiangiogénica. Este péptido bloqueaba la migración de células endoteliales capilares hacia un inductor, VEGF. Además, los datos demuestran que la actividad del péptido de 34 aminoácidos se podría inhibir mediante la adición de anticuerpos policlonales específicos para dos péptidos, uno de los cuales estaba contenido en el fragmento de 34 unidades. El péptido tiene un ED50 de aproximadamente 10 nM. Esto es inhabitualmente inactivo para un péptido pequeño, ya que la mayoría de los péptidos tienen un ED50 en el rango de micromolar en lugar del rango de nanomolar. EL ED50 para el PEDF intacto es aproximadamente 0,3 nM. Debido a la inusual potencia de este péptido, puede ser particularmente útil en los métodos de la presente invención y para el desarrollo de un compuesto terapéutico capaz de afectar a la angiogénesis.

Estos datos también diferencian la región del PEDF que es antiangiogénica de la región que induce la diferenciación en células de tumores de retinoblastomas y que es neurotrópica. Se ha observado por (Alberdi y otros, 1999, J. Biol. Chem. 274: 31605-31612), que estas dos últimas características no están inducidas por el péptido de 34 aminoácidos descubiertos de la presente invención, sino por un fragmento de péptido adyacente del PEDF que no se superpone con el péptido de 34 aminoácidos. De este modo, en los métodos de la presente invención, en el caso de que las actividades neurales del PEDF provoquen complicaciones durante la terapia angiogénica, dichas complicaciones se pueden evitar mediante la utilización del fragmento de péptido de PEDF de 34 aminoácidos. Este descubrimiento se ejemplifica en la figura 7 en la que se muestra que el péptido de 34 aminoácidos, que representa los aminoácidos 44 a 77 en la proteína del PEDF, era activo como agente antiangiogénico, mientras que péptido de 44 aminoácidos adyacente que comprendía los aminoácidos 78 a 121 no era activo como agente antiangiogénico.

Ejemplo 7

Estos datos demuestran que el PEDF exógeno aplicado a la piel activa el crecimiento de pelo en la misma.

En experimentos adicionales, las inyecciones del PEDF marcado con histidina purificado dieron lugar a una mayor densidad de folículos pilosos y el crecimiento de una mata de pelo en la piel de ratones atímicos (desnudo/desnudo) que no tienen pelo de forma natural. Este resultado sugiere que el PEDF tiene el potencial para estimular el crecimiento de nuevos pelos.

PEDF es una proteína expresada por muchos tipos de células que incluyen células presentes en folículos pilosos (glándula pilosebáceas). Se observó un aumento en la densidad de folículos pilosos en la piel que recubre los tumores de neuroblastoma producidos experimentalmente que se inyectaron diariamente durante cuatro días consecutivos con PEDF purificado. Esto no se observó en la piel de animales de control, cuyos tumores se inyectaron de manera similar con vehículo de solución salina.

El tratamiento consistía en la inyección de un total de 2 μg del PEDF marcado con histidina purificado en un volumen de 100 μl de solución salina tamponada con fosfato en 2-3 sitios/tumor cada día durante 4 días consecutivos. En el quinto día, se observó una pequeña área de mayor crecimiento de pelo en los sitios de inyección. Los ratones se sacrificaron utilizando una sobredosis de metafano y los tumores se extrajeron de forma quirúrgica. El tejido tumoral se dividió en partes y se colocó en formalina tamponada durante, como mínimo, 24 horas. El tejido se introdujo en parafina y se preparó para el examen histológico. La piel que recubría los tumores de neuroblastoma tratados con PEDF había aumentado la densidad de folículos pilosos en comparación con la piel que recubría los tumores inyectados con vehículo de solución salina (figura 8). Se observaron aumentos similares en la densidad de folículos pilosos en ausencia de tumores después de la inyección del PEDF purificado.

Ejemplo 8

Los datos mostrados en la presente descripción representan el hecho de que el PEDF desencadena la diferenciación de tumores de neuroblastoma, dando a conocer, de este modo, las bases para el tratamiento de estos tumores. El tratamiento *in vitro* de células de neuroblastoma y el tratamiento *in vivo* de tumores de neuroblastoma producidos experimentalmente con proteína PEDF marcada con histidina purificada desencadenaron la diferenciación de las células. Por lo tanto, estos datos sugieren que la administración del PEDF a estas células es un medio efectivo para inducir que estos tumores se diferencien y, por lo tanto, crezcan más lentamente.

PEDF es una proteína expresada y secretada por muchos tipos de células, incluyendo células de Schwann. Los neuroblastomas son tumores malignos, y la presencia de células de Schwann en estos tumores está asociada con los mejores resultados. Los datos mostrados en la presente descripción indican que una de las razones de que la presencia de células de Schwann conduzca a un pronóstico favorable para los tumores de neuroblastoma es el hecho de que estas células producen PEDF. El PEDF producido en las mismas actúa de modo paracrino en las células tumorales para inducir su diferenciación. Dado que las células de neuroblastoma diferenciadas crecen más lentamente, si es que lo hacen, la administración del PEDF a tumores de neuroblastoma da a conocer una nueva terapia para este tumor mediante la ralentización del crecimiento de las células. El crecimiento celular se ralentiza de dos maneras, (1) mediante la unión del PEDF a células endoteliales que forman los vasos sanguíneos que alimentan al tumor y evitando su crecimiento y, de este modo, inhibiendo indirectamente el tumor, y (2) mediante la unión del PEDF directamente a las células tumorales induciendo, de este modo, su diferenciación.

Los experimentos *in vitro* se realizaron para verificar el efecto del PEDF en las líneas celulares derivadas de tumores de neuroblastoma. Dos líneas celulares derivadas de neuroblastoma se obtuvieron de la American Tissue Type and Culture, SK-N-BE(2) y SK-N-SH. Ambas líneas celulares se mantuvieron en un cultivo en DMEM que contenía suero bovino fetal al 10% (Flow Laboratories, McLean, VA) a 37°C y CO₂ al 5%. Las células (1,25 x 10⁴/ml) se resuspendieron y se utilizó 1 ml/pocillo para sembrar placas de 24 pocillos. Veinticuatro horas más tarde, se añadió PEDF a pocillos por triplicado a 0, 1,0, 0,75, 1 ó 10 nM y las células se incubaron durante un periodo adicional de 24 horas. Se determinó el porcentaje de células diferenciadas mediante el recuento del número total de células en tres áreas de 1 mm² no solapantes por pocillo. Una célula se consideraba diferenciada si poseía crecimientos externos de neuritas superiores a 50 micras de longitud.

Los resultados se presentan en las figuras 9A y 9B y las fotografías de grupos de control y grupos de tratamiento con PEDF se muestran en la figura 10. Además, cuando se añadió a las células un anticuerpo desarrollado contra el péptido derivado del PEDF que es capaz de neutralizar la actividad del PEDF en ensayos de angiogénesis, se bloqueó de manera eficaz la diferenciación desencadenada por PEDF (figura 10).

Los experimentos *in vivo* se realizaron para determinar el efecto del PEDF en tumores de neuroblastoma. Se indujeron experimentalmente neuroblastomas humanos en ratones atímicos (desnudo/desnudo) mediante la inyección subcutánea de 1 x 10⁶ células SK-N-BE(2) en 2 sitios en las patas traseras de cada ratón. Cuando los tumores crecieron hasta un tamaño palpable (aproximadamente 8 mm de diámetro) se inició el tratamiento con PEDF. Se inyectaron un total de 2 μg del PEDF marcado con histidina purificado en un volumen de 100 μl de solución salina tamponada con fosfato en 2-3 sitios/tumor cada día durante 4 días consecutivos. En el quinto día, se sacrificaron los ratones mediante una sobredosis de metafano, y los tumores se extrajeron de forma quirúrgica. El tejido tumoral se dividió en partes y se colocó en formalina tamponada durante, como mínimo, 24 horas. El tejido se introdujo en parafina y se preparó para el examen histológico. Se tiñeron las secciones con un anticuerpo que reconocía la proteína del neurofilamento (Dako, Carpinteria, CA). Los tumores de neuroblastoma tratados con PEDF mostraron una diferenciación incrementada determinada mediante la adquisición de una tinción positiva para la proteína del neurofilamento (Figura 11). Se trataron un total de seis tumores SK-N-BE(2) con PEDF y 6/6 dieron positivo de forma moderada a intensa en la tinción del neurofilamento. Se trataron un total de 4 tumores con PBS y todos dieron negativo o mostraron una tinción focal de células individuales con citoplasma más abundante (Figura 11).

Ejemplo 9

Los datos presentados en este ejemplo proporcionan pruebas de que el PEDF es el principal inhibidor de la angiogénesis en el humor vítreo y en la córnea de ojos humanos y de ratón y se controla mediante la tensión de oxígeno *in vitro* e *in vivo*.

En ausencia de enfermedad, la vasculatura del ojo de los mamíferos está inactiva, debido a la presencia de inhibidores naturales de la angiogénesis. En la presente invención se ha demostrado que el PEDF es responsable de prevenir que los vasos sanguíneos invadan la córnea y responsable de la actividad antiangiogénica del humor vítreo. En los experimentos presentados en la presente descripción, se incrementó la secreción del PEDF por parte de células retinales a niveles bajos de oxígeno y se disminuyó a niveles altos de oxígeno, sugiriendo que su pérdida juega un papel permisivo en la neovascularización retinal. De este modo, el PEDF es útil como agente terapéutico para el tratamiento del ojo, especialmente en retinopatías de origen isquémico en las que la neovascularización patológica compromete la visión y conduce a la ceguera.

La angiogénesis, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de unos preexistentes, se encuentra bajo la fuerte regulación en la mayoría de tejidos sanos en los que la influencia de inhibidores naturales evita el crecimiento de nuevos vasos (Bouck y otros, 1996, *Adv. Cancer* 69:135; Hanahan y Folkman, 1996, *Cell* 86:353). La interrupción de dichos controles juega un papel esencial en el desarrollo de una variedad de enfermedades, desde artritis hasta cáncer (Folkman y otros, 1995, *Molecular Basis of Cancer* 206-232). En el ojo de un mamífero sano, los vasos están normalmente excluidos de la córnea y del humor vítreo, los dos compartimentos que han mostrado tener actividad antiangiogénica (Brem y otros, 1977, *Am. Ophthalmol.* 84: 323; Henkind, 1978, *Am. Ophthalmol.* 85: 287; Kaminska y Niederkorn, 1993, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34:222). El fallo en impedir vasos en la córnea se asocia con la pérdida de agudeza visual, la opacificación y la curación anormal (Kaminska and Niederkorn, 1993, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34:222). En la retina, una neovascularización excesiva conlleva a retinopatías isquémicas, tales como la retinopatía diabética proliferativa, así como la degeneración macular relacionada con la edad, actualmente las causas principales de pérdida de vista en el mundo occidental. Los datos presentados a continuación identifican el factor derivado del epitelio del pigmento de proteína retinal (PEDF) como un nuevo inhibidor excepcionalmente potente de la angiogénesis y como una molécula responsable de la actividad antiangiogénica largamente reconocida del humor vítreo y la córnea sanos.

En estudios dirigidos a la identificación de los factores antiangiogénicos en el ojo que podrían estar regulados por el gen supresor del tumor de retinoblastoma (*Rb*), se fraccionó el medio donde se condicionó previamente el medio mediante una línea celular de retinoblastoma que había sido infectada con un retrovirus que expresaba el gen *Rb* de tipo natural, WERI-Rb-27R. (Xu y otros, 1991, *Cancer Res.* 51: 4481). Un esquema de purificación de proteínas dio como resultado un enriquecimiento de 1000 a 1250 veces la actividad antiangiogénica y una única banda de 50 kD en un gel de proteína teñido con plata. Se purificó PEDF a partir de medio condicionado sin suero con WERI-Rb-27R mediante etapas secuenciales que consistían en diálisis (corte de masa molecular, 30 kD) frente a agua destilada, precipitación de sulfato de amonio del 60 al 95%, etapa de elución a partir de Sepharose 4B de lecitina de lenteja (Pharmacia) con α -metil-D-manopiranosido 0,5 M, y elución a partir de una columna de Sepharose de heparina HiTrap (Pharmacia) con gradiente creciente de NaCl. (Xu, y otros, 1991, *Cancer Res.* 51:4481). Se monitorizó la purificación mediante un ensayo de migración de células endoteliales, y el rendimiento fue del 17,5%. Los ensayos de migración se realizaron por cuadruplicado por cada muestra con células endoteliales capilares adrenales bovinas o células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (Clonetics, San Diego, CA) tal como se ha descrito. (Polverini, y otros, 1991, *Methods Enzymol.* 198: 440). Para combinar múltiples experimentos, se restó primero la migración de base (Base) del vehículo (albúmina de suero bovino al 0,1%) y, a continuación, se normalizaron los datos estableciendo la migración máxima de hacia el inductor solo en el 100%. Se repitieron todos los experimentos de dos a cinco veces. Se realizaron las estadísticas sobre los datos originales antes de la normalización con la prueba de la *t* de Student. Se convirtieron los errores estándar en porcentajes. La degradación de Edman de péptidos internos derivados proteolíticamente de la proteína produjo dos secuencias inequívocas (TSLED FYL-DEERTVRVPM MXD (SEC ID No: 3) y IAQL-PLTGXM (SEC ID No: 4)). Las abreviaturas de una sola letra para los residuos de aminoácido son tal como se indican a continuación: A, Ala; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; I, Ile; L, Leu; M, Met; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; X, cualquier aminoácido; e Y, Tyr. Una búsqueda de homología de proteínas por BLAST reveló que el PEDF contiene secuencias idénticas. El análisis de microsecuencia de proteína mostró que esta proteína era idéntica al factor derivado de epitelio de pigmento (PEDF) descrito previamente.

El PEDF se purificó en primer lugar del medio acondicionado de células epiteliales de pigmento retinal humano como factor que induce la diferenciación de células de retinoblastoma Y79 cultivadas. (Beccerra, *Chemistry and Biology of Serpins*, Church y otros, Eds. (Plenum, Nueva York, 1997), páginas 223-237). (Tombran-Tink y otros, 1991, *Exp. Eye Res.* 53: 411 1991; Steele y otros, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 1526). El PEDF es neurotrófico para células de gránulos del cerebelo, inhibe el crecimiento microglial, y también se le hace referencia como el ADNC del nivel de duplicación de la población temprana (EPC-1), que refleja su regulación por incremento durante la fase Go del ciclo celular en fibroblastos jóvenes, pero no en fibroblastos senescentes cultivados. (Tanawaki, y otros, 1995, *J. Neurochem.* 64: 2509; Y. Sugita y otros, 1997, *J. Neurosci. Res.*, 49: 710). Pignolo, y otros, 1993, *J. Biol. Chem.* 268: 8949 1993); (Tombran-Tink, y otros, *J. Neurosci.*, 15: 4992 1995). La proteína comparte secuencia y homología estructural con la familia de inhibidores de serina proteasas (Serpina) pero no inhibe las proteasas. (Beccerra, y otros, 1993, *J. Biol. Chem.* 268: 23148 1993); Becerra, y otros, 1995 *ibid.* 270: 25992). La actividad antiangiogénica purificada del medio acondicionado con WERI-Rb-27R era debida probablemente a PEDF y no a un contenido menor, ya que se retenía cuando la proteína se recuperaba como una única banda de un gel de SDS-poliacrilamida (Dawson y otros, datos no publicados) y se neutralizó mediante anticuerpos desarrollados contra PEDF recombinante o un péptido PEDF. (Figura 12A).

Las formas purificadas bioquímicamente, así como las formas recombinantes, inhibían potencialmente la neovascularización en la córnea de la rata (Figuras 13A y 13B). El ADNc del PEDF humano se manipuló mediante la reacción en cadena de la polimerasa para codificar una etiqueta de hexahistidina en COOH terminal, se clonó en pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transfectó en células de riñón embrionarias humanas. El PEDF recombinante se purificó del medio acondicionado con el Sistema de Purificación de Proteína Xpress (Invitrogen, Carlsbad, CA). *In vitro*, el PEDF inhibía la migración de células endoteliales de una manera dependiente de la dosis con una dosis efectiva media (ED₅₀) de 0,4 nM (Figura 12B), colocándolo entre los inhibidores de angiogénesis naturales más potentes en este ensayo (ver figuras complementarias, disponibles en www.sciencemag.org/feature/data/104007), ligeramente más puro que la angiostatina pura (Figura 12B), trombospondina-1 (ED₅₀ de 0,5 nM) y endostatina (ED₅₀ de 3 nM). A dosis de 1,0 nM o superiores, el PEDF también inhibía la proliferación inducida por el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) de células endoteliales capilares en un 40%.

El PEDF inhibía la migración de células endoteliales hacia cada inductor angiogénico que se ensayó, incluyendo el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la interleuquina-8, el factor de crecimiento de fibroblastos ácido y el ácido lisofosfatídico (véase las figuras complementarias disponibles en www.sciencemag.org/feature/data/104007). Se observó cierta especificidad por las células endoteliales, inhibiendo la migración de células microvasculares cultivadas de la glándula adrenal bovina o la dermis humana y de aquellas de la vena umbilical. En cambio, no inhibía la migración de fibroblastos de prepucio o pulmón humano, células de músculo liso de aorta, queratinocitos orales o neutrófilos hacia citoquinas estimuladoras, incluso cuando el PEDF estaba presente a concentraciones 10 veces superiores a la necesaria para inhibir las células endoteliales. (Véase las figuras complementarias disponibles en www.sciencemag.org/feature/data/104007).

Los anticuerpos del PEDF neutralizantes redujeron la inhibición de la quimiotaxis de células endoteliales por extractos estromales (Klintworth, 1991, Corneal Angiogenesis: A Comprehensive Critical Review (Springer-Verlag, Nueva York); Kaminska y Niederkorn, 1993, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34: 222) preparados a partir de corneas humanas (Figura 12C), de ratón y bovinas. Para la preparación de los extractos estromales, se liberaron las corneas del epitelio asociado y tanto epitelio como era posible, se lavaron de forma intensa en solución salina tamponada de fosfato enfriada con hielo (PBS, pH 7,4) y se desmenuzó en pequeños fragmentos que se incubaron durante 24 horas en PBS que contenía 0,5 mM de fluoruro de fenilmetanosulfonilo. El extracto se esterilizó por filtración, se almacenó a -80°C y se analizó en los ensayos de migración a una concentración final de 10 µg de proteína por mililitro. De manera similar, la extracción del PEDF y anticuerpo unido a partículas de proteína A eliminó completamente la actividad antiangiogénica en extractos estromales bovinos y humanos (Figura 13A y 13B). Además, la adición de anticuerpos neutralizantes a PEDF, en ausencia de inductores angiogénicos exógenos, estimulaba la invasión de nuevos vasos sanguíneos en la córnea de rata (Figura 12A y 12B). Esto parecía ser debido al bloqueo local del PEDF, que desenmascaraba la actividad estimuladora angiogénica endógena en la córnea (Figuras 12C, 13A y 13B). El anticuerpo para el PEDF solo no estimulaba la migración de células endoteliales *in vitro* (Figura 12A) y no se observó vascularización en las corneas de las ratas cuando el anticuerpo se preincubó con el péptido PEDF 327 a 343 contra el que se desarrolló (Figura 13A y 13B). El péptido PEDF solo era neutro en los ensayos angiogénicos (Figura 13A).

Como la córnea, el humor vítreo es antiangiogénico (Brem y otros, 1977, *Am. J. Ophthalmol.* 84: 323; Henkind 1978 *ibid.* 85: 287) y, en general, carente de vasos sanguíneos, y también contiene concentraciones elevadas del PEDF (Beccerra, 1997, *Chemistry and Biology of Serpins*; Church, y otros, 1997, Eds (Plenum, Nueva York) páginas 223-237); Wu y Beccerra, 1996, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37: 1984). Se descubrió que la eliminación del PEDF del fluido vítreo anulaba su actividad antiangiogénica y revelaba una actividad estimuladora angiogénica subyacente (figuras 12C, 13A y 13B). El nivel del PEDF en el humor vítreo era suficiente para inhibir la migración de células endoteliales incluso en presencia de 4 ng de VEGF por mililitro de humor vítreo, una concentración similar a la encontrada en fluido vitreo obtenido de pacientes con retinopatía diabética proliferativa (Aiello y otros, 1994, *N. Engl. J. Med.* 331: 1480; Adamis y otros, 1994, *Am. J. Ophthalmol.* 118: 445). Se ha postulado que el factor β de crecimiento transformante (TGFβ) es un inhibidor de la neovascularización ocular (Ogata y otros, 1997, *Curr. Eye Res.* 16: 9; Hayasaka, y otros, 1998, *Life Sci.* 63: 1089; Viores, y otros, 1998, *J. Neuroimmunol.* 89: 43). Sin embargo, en nuestros experimentos, la neutralización de las isoformas de TGFβ 1, 2 y 3 no alteró la actividad antiangiogénica de extractos del fluido vítreo o la córnea *in vitro* (véase las figuras complementarias disponibles en www.sciencemag.org/feature/data/104007) ni indujo la neovascularización de la córnea *in vivo* (Figura 13A).

En recién nacidos, los cambios en la concentración de oxígeno en el ambiente pueden regular la densidad vascular de la retina. Este efecto se atribuye normalmente a cambios en el nivel del inductor angiogénico VEGF, que se regula por incremento cuando el oxígeno es limitante y se regula por disminución cuando está en exceso (Aiello, y otros, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 10457; Adamis, y otros, 1996, *Arch. Ophthalmol.* 114: 66; Provis, y otros, 1997, *Exp. Eye Res.* 65: 555). Para determinar si el PEDF está también regulado por oxígeno, los ratones recién nacidos se expusieron a un 75% de oxígeno (hiperoxia) desde el día 7 al 12 después del nacimiento, una condición que conduce al desarrollo de retinas subvascularizadas (Smith y otros, 1995, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35: 101) y un descenso del ARNm de VEGF (Pierce y otros, 1996, *Arch Ophthalmol.* 114: 1219). Las retinas de ocho de nueve ratones expuestos a hiperoxia se tiñeron de forma intensa por PEDF en el día 12 (Figura 14B), mientras que ninguno de los 10 animales no tratados que permanecían con normoxia (21% de oxígeno) mostró tinción por PEDF (Figura 14A). En los animales no tratados, los niveles del PEDF durante el desarrollo retinal siguió el patrón que podría esperarse para un inhibidor angiogénico. La inmunotinción por PEDF estaba ausente o era débil en tres de tres

animales antes del día 18 (Figura 14A y 14C) cuando la vasculatura retinal está en desarrollo (Connolly y otros, 1988, Microvas. Res. 36: 275), pero intensa en cuatro de cuatro ratones (figura 14D) en el día 21 y en seis de seis adultos cuando la neovascularización de la retina es esencialmente completa (Connolly y otros, 1988, Microvas. Res. 36: 275). Los niveles del PEDF más elevados se observaron en la capa de células fotorreceptoras, la capa más avascular de la retina.

Para investigar más en detalle el efecto de la regulación de oxígeno sobre PEDF, se mantuvieron las células tumorales de retinoblastoma en niveles bajos de oxígeno (0,5%) o en agentes químicos que simulan la hipoxia (Goldberg y otros, 1988, Science 242: 1214). Tal como se esperaba, la hipoxia inducía un incremento de $9,5 \pm 4,8$ veces en el nivel de VEGF en medio acondicionado medido mediante un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima y reducía el nivel del PEDF en $11,8 \pm 4,7$ veces (Figura 15A). Las respuestas de células de retinoblastoma negativas de Rb y de revertientes que reexpresan Rb fueron similares (Figura 15A). No se detectó diferencia en los niveles de ARNm del PEDF entre las células tratadas con hipoxia y no tratadas (Figura 15B), sugiriendo que la regulación hipóxica del PEDF tenía lugar a nivel de traducción o posterior a la traducción.

El medio acondicionado por células tumorales hipóxicas era más angiogénico que el acondicionado por células tumorales normóxicas (Figura 15C). La hipoxia reducía la concentración de medio necesario para inducir el 50% de la quimiotaxis máxima de células endoteliales de 4,0 a $0,3 \mu\text{g}$ de proteína total por mililitro. La neutralización de VEGF, que produjo una contribución menor a la actividad angiogénica de estas células, no redujo la actividad angiogénica del medio acondicionado hipóxico, pero la neutralización del PEDF hizo que el medio de tumores normóxico fuera tan angiogénico como el derivado de células hipóxicas. (Figura 15C). En concordancia con estos estudios *in vitro*, las células tumorales presentes en 12 de 12 muestras patológicas de retinoblastoma humano no consiguieron teñirse por PEDF, presumiblemente en parte debido al oxígeno limitado en el medio tumoral (Gulledge y Dewhirst, 1996, Anticancer Res. 16: 741), mientras que la retina normal adyacente era positiva.

En resumen, es probable que el PEDF contribuya a la regulación del crecimiento de vasos sanguíneos en el ojo mediante la creación de un medio permisivo para la angiogénesis cuando el oxígeno es limitante (como lo es en tumores y en retinopatías) y un ambiente inhibitorio cuando las concentraciones de oxígeno son normales o elevadas. Dada su potencia elevada y el amplio rango de inductores angiogénicos contra los que puede actuar, puede demostrarse que el PEDF es un agente terapéutico útil para la neovascularización ocular patológica, así como para retinoblastomas, cuando sus actividades duales de inducción de la diferenciación celular (Tombran-Tink, y otros, 1991, Exp. Eye Res. 53: 411; Steele, y otros, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 1526) e inhibición de la angiogénesis pueden ser particularmente efectivas.

Ejemplo 10

Los datos presentados en la presente descripción demuestran la mejora de la retinopatía isquémica mediante el tratamiento sistémico con PEDF.

Se indujo la retinopatía en ratones C57/BL6 mediante la colocación de ratones de siete días de vida con sus madres en una carpa de oxígeno y manteniendo los animales en un ambiente de 75% de oxígeno/25% de nitrógeno hasta el día 12. En el día doce, los animales se extrajeron de la carpa y se colocaron atmósfera ambiente (21% de oxígeno). Desde el día doce hasta el día dieciséis, las crías se trataron mediante inyección intraperitoneal una vez por día con $100 \mu\text{l}$ de vehículo de solución salina tamponada con fosfato (PBS) ó $11,2 \mu\text{g}$ ó $22,4 \mu\text{g}$ del PEDF en PBS. Las crías se anestesiaron con Metafano y perfundieron con 1 ml de fijador (4% de paraformaldehído/100 mM de tampón de fosfato sódico (pH 7,2)/4% sacarosa) a través del ventrículo izquierdo del corazón. Se extrajeron los ojos y se colocaron en fijador, introducidos en parafina, y se procesaron para el examen histológico. Se realizaron secciones transversales del ojo, se tiñeron con hematoxilina-floxina-safarina (HPS) y se contó el número de núcleos de células endoteliales que atravesaban la membrana limitante interna de la retina en una sección transversal que contenía la córnea, el cristalino, la retina y el nervio óptico. La figura 16A muestra la retinopatía en el ojo de un animal tratado con PBS, las líneas rodean una red vascular que ha penetrado la membrana limitante interna de la retina en la fotografía de baja resolución. En la Figura 16B se muestra una vista de resolución elevada de esta red vascular. Las Figuras 16C y 16D muestran el ojo de un ratón tratado con PEDF, sin presencia de redes vasculares. Se cuantificó el número de núcleos de células endoteliales (Tabla 3). Los animales tratados con PEDF presentaban una reducción significativa en células endoteliales que habían cruzado la membrana limitante interna de la retina, y se podía demostrar una relación de dosis/respuesta (figura 17).

TABLA 3

Reducción de la retinopatía isquémica inducida por hipoxia mediante tratamiento sistémico con PEDF

Tratamiento	No. de ratones	Número promedio de núcleos de células endoteliales que atraviesan ILM ^a en el humor vítreo por sección transversal ^b
vehículo PBS	4	91,3 +/- 12,0
11,2 µg PEDF/día	5	18,6 +/- 2,2*
22,4 µg PEDF/día	5	18,2 +/- 2,5*

* $p < 0,003$ en comparación con PBS (vehículo)

^a ILM = membrana limitante interna

^b La sección transversal del ojo se encuentra en el plano que incluye córnea, cristalino y nervio óptico.

Aunque la invención se ha descrito haciendo referencia a realizaciones específicas, es evidente que otros expertos en la materia pueden idear otras realizaciones y variaciones de la presente invención sin apartarse del alcance de las reivindicaciones que se acompañan.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de residuos 44-77 de la SEC ID No. 1.
2. Composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido definido en la reivindicación 1.
3. Composición farmacéutica que comprende una población de células que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada definida en la reivindicación 2.
4. Polipéptido según se define en la reivindicación 1, la molécula de ácido nucleico según se define en la reivindicación 2, o la población de células según se define en la reivindicación 3, para tratar el neuroblastoma.
5. Polipéptido según se define en la reivindicación 1, la molécula de ácido nucleico según se define en la reivindicación 2, o la población de células según se define en la reivindicación 3, para tratar y/o prevenir una enfermedad **caracterizada** por una neovascularización patológica.
6. Utilización del polipéptido según se define en la reivindicación 1, la molécula de ácido nucleico según se define en la reivindicación 2, o la población de células según se define en la reivindicación 3, para la preparación de un medicamento para tratar el neuroblastoma.
7. Utilización del polipéptido según se define en la reivindicación 1, la molécula de ácido nucleico según se define en la reivindicación 2, o la población de células según se define en la reivindicación 3, para la preparación de un medicamento para tratar y/o prevenir una enfermedad **caracterizada** por una neovascularización patológica mediante la inhibición de la angiogénesis en un tejido de un mamífero.
8. Utilización, según la reivindicación 7, en el que el tejido se selecciona del grupo que consiste en tejido ocular, tejido de la piel, un tumor, tejido en una articulación, médula espinal, epitelio nasal, próstata, ovario y tejido endometrial.
9. Utilización, según la reivindicación 7 u 8, en el que el tejido es tejido ocular.
10. Utilización, según la reivindicación 7 ó 9, en el que el mamífero se selecciona del grupo que consiste en un mamífero que tiene degeneración macular y un mamífero que tiene el riesgo de desarrollar degeneración macular.
11. Utilización, según la reivindicación 7 ó 9, en el que la enfermedad es degeneración macular.
12. Utilización del polipéptido según se define en la reivindicación 1, la molécula de ácido nucleico según se define en la reivindicación 2, o la población de células según se define en la reivindicación 3, para la preparación de un medicamento para tratar una neoplasia benigna en un mamífero.
13. Utilización, según la reivindicación 12, en el que la neoplasia benigna es un pólipo nasal.
14. Utilización, según la reivindicación 12, en el que la neoplasia benigna se encuentra en la glándula de la próstata.
15. Utilización, según la reivindicación 12, en el que el mamífero es un ser humano que tiene fibrosis quística.
16. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15, en el que el medicamento se prepara para la administración sistémica.
17. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15, en el que el medicamento se prepara para la administración tópica.
18. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 17, en el que el medicamento es adecuado para ser administrado a células endoteliales asociadas con dicho tejido.
19. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 18, en el que el medicamento comprende además otro factor antiangiogénico.
20. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19, en el que el medicamento es para su utilización conjuntamente con, como mínimo, uno de los tratamientos seleccionados del grupo que consiste en radiación, quimioterapia, la utilización de, como mínimo, un modificador de la respuesta biológica, y tratamiento con láser.
21. Método *in vitro* de inducción de la diferenciación de una célula de neuroblastoma, que comprende la etapa de administrar el polipéptido según se define en la reivindicación 1 o el ácido nucleico según se define en la reivindicación 2, a dicha célula.

ES 2 316 437 T3

22. Método *in vitro* de ralentización del crecimiento de una célula de neuroblastoma, que comprende la etapa de administrar el polipéptido según se define en la reivindicación 1 o el ácido nucleico según se define en la reivindicación 2, a dicha célula.

5 23. Método *in vitro* de inhibición de la angiogénesis en un tejido, que comprende la etapa de suministrar el polipéptido según se define en la reivindicación 1 o el ácido nucleico según se define en la reivindicación 2, a células endoteliales asociadas con dicho tejido.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

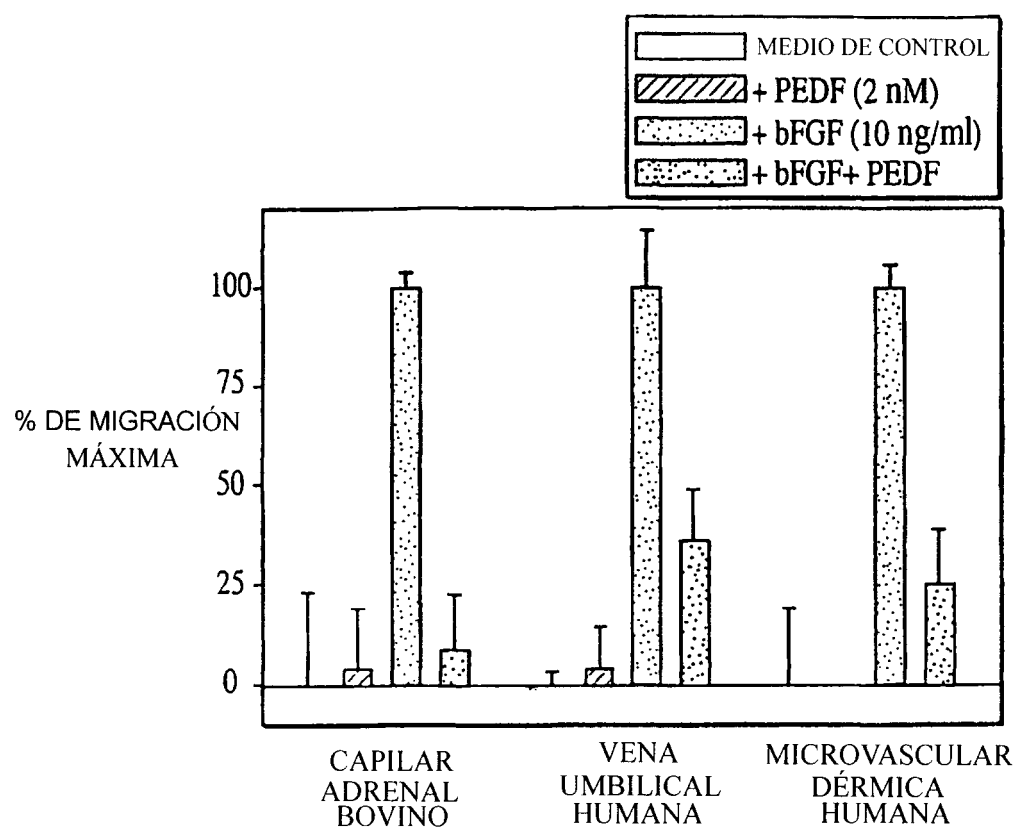


FIG. 1

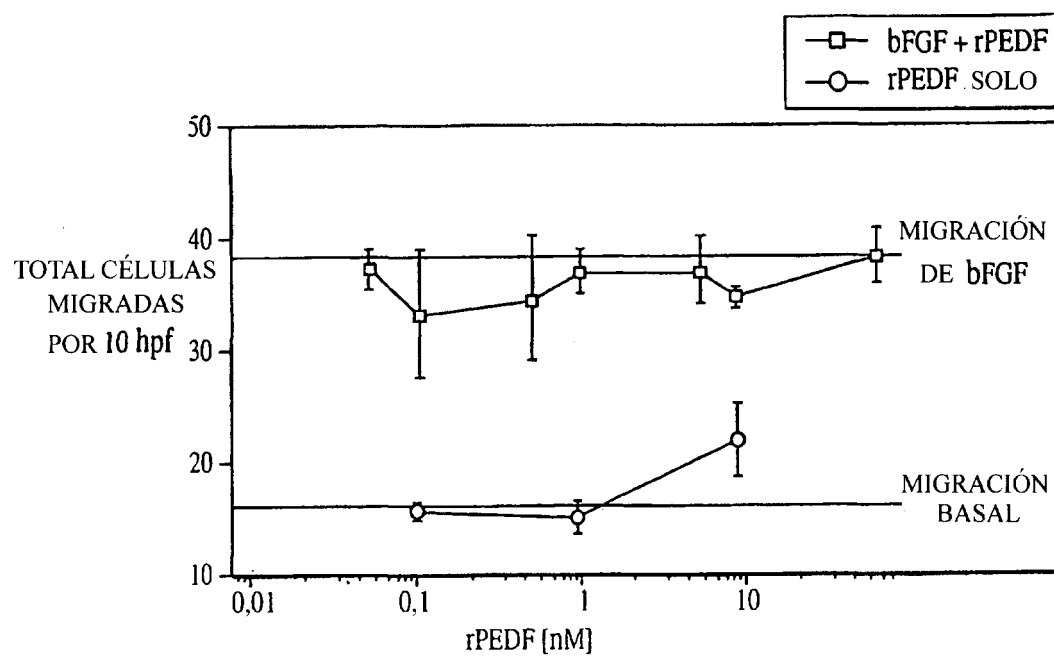


FIG. 2A

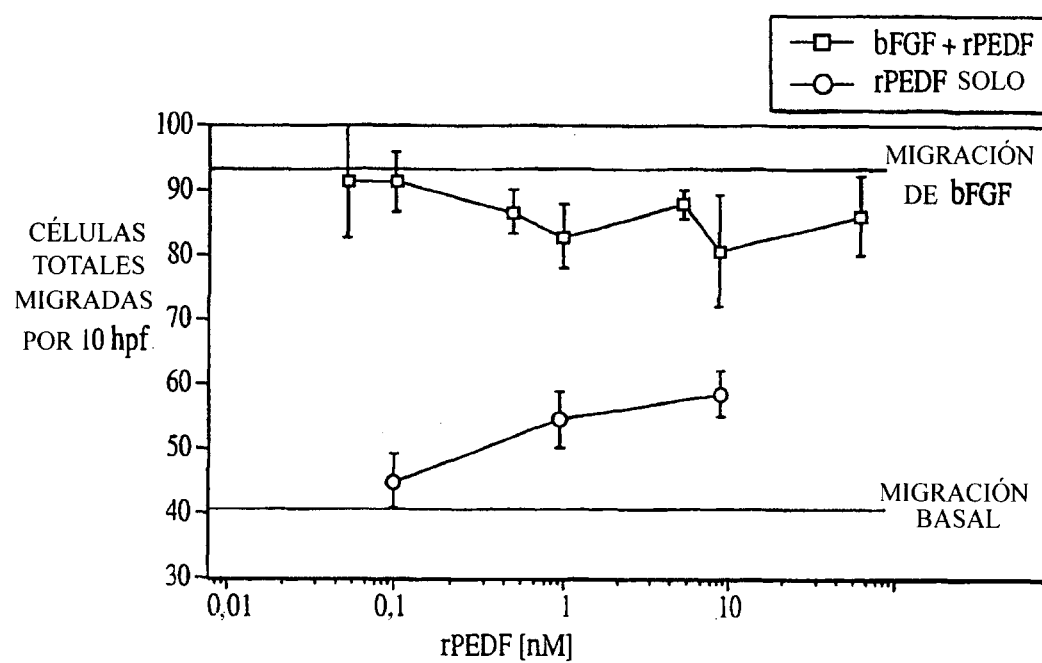


FIG. 2B

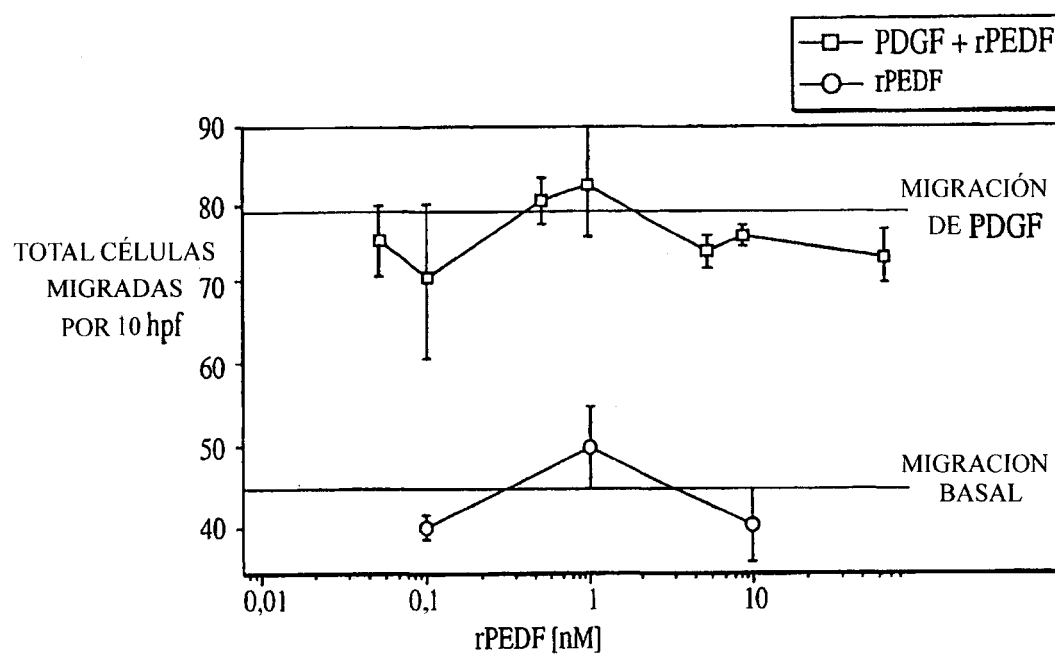


FIG. 2C

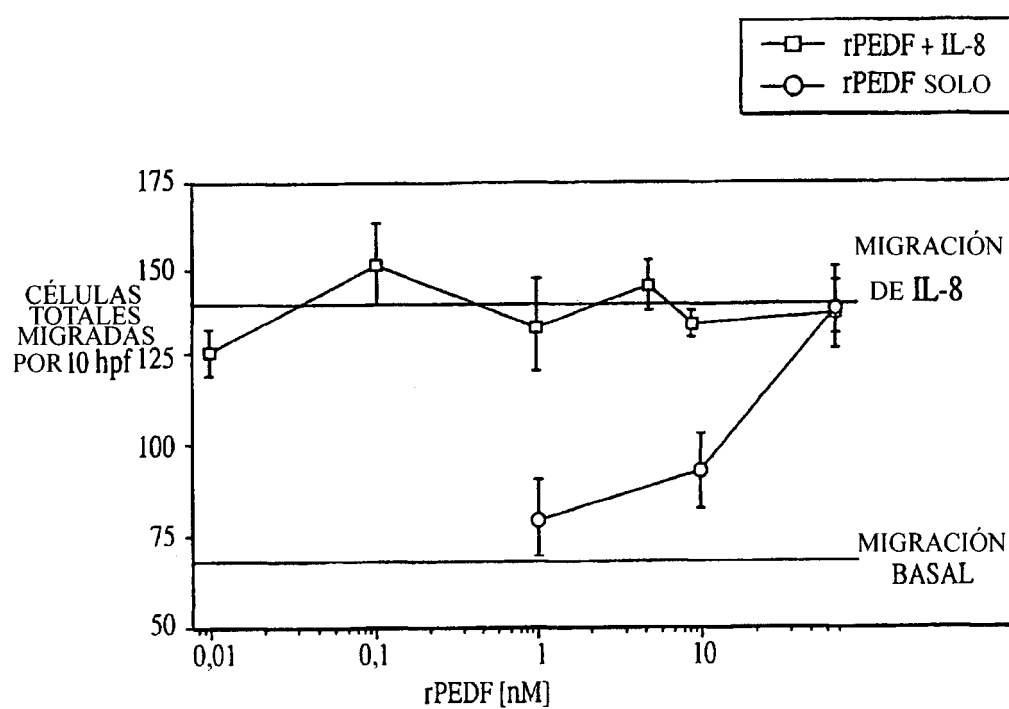


FIG. 2D

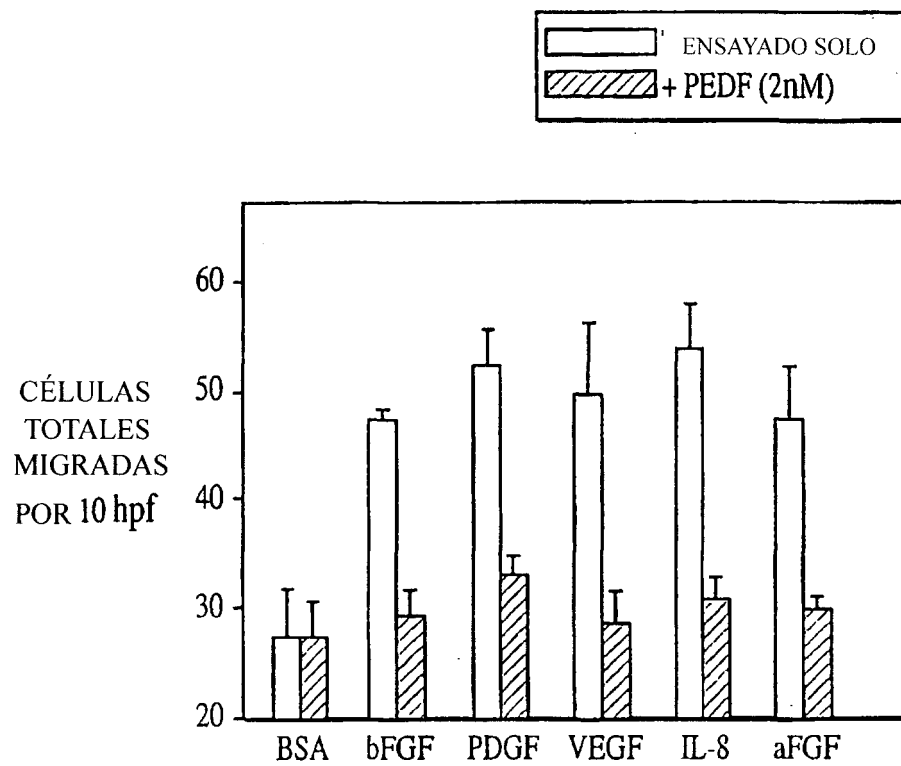


FIG. 3

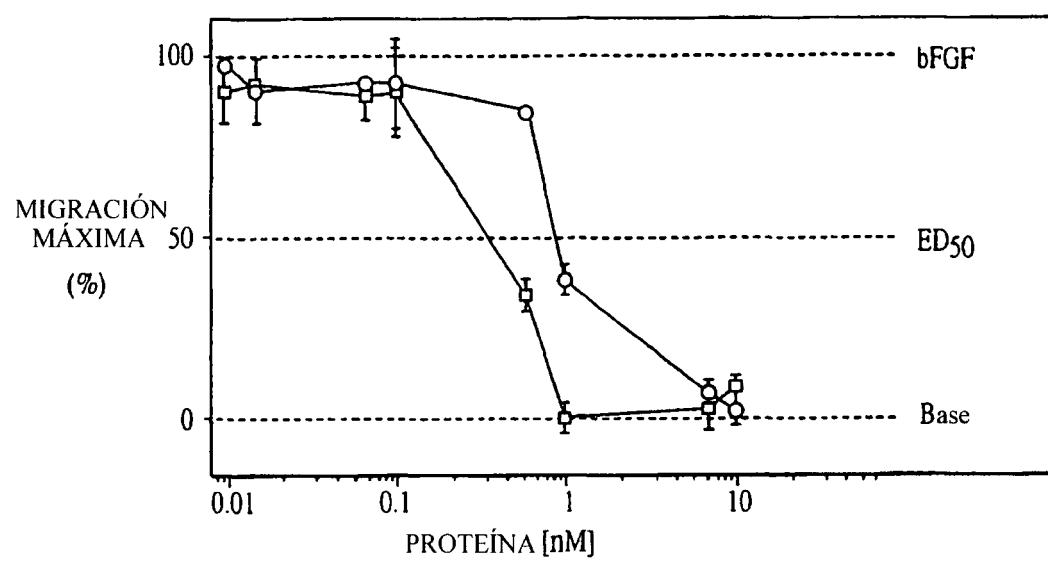


FIG. 4

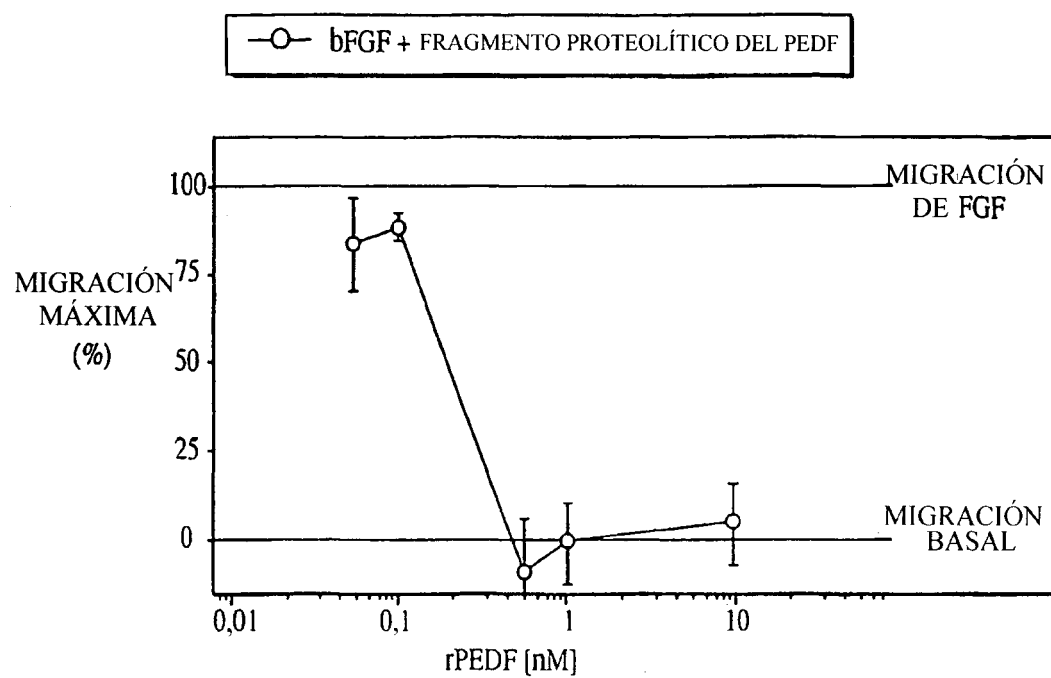


FIG. 5

MQALVLLLCIGALLGHSSCQNPASPP EEGSPDPDS
TGALVEEEDPFFKVPVNKLAAAVSNFGYDLYRVRS
SMSPTTNVLLSPLSVATAALSLSLGADERTESI IH
RALYYDLISSPDIHGTYKELLDTVTAPQKNLKSAS
RIVFEKKLRIKSSFVAPLEKSYGTRPRVLTGNPRL
DLQEINNWWVQAQMKGKLARSTKEIPDEISILLGV
AHFKGQWVTKFDSRKTSLEDFYLDEERTVRVPMMS
DPKAVLRYGLDSDLCKIAQLPLTGSMMSIIFFLPL
KVTQNLTLIEESLTSEFIHDI DRELKTVQAVLTVP
KLKLSYEGEVTKSLQEMKLQSLFDSPDFSKITGKP
IKLTQVEHRAGFEWNEDGAGTTPSPGLQPAHLTFP
LDYHLNQPFIFVLRD TD TGALLFIGKILDPRGP

FIG. 6A

FIG. 6B

GGACGCTGGA TTAGAAGGCA GCAAAAAAG ATCTGTGCTG GCTGGAGCCC CCTCAGTGTG CAGGCTTAGA
GGGACTAGGC TGGTGTGGA GCTGCAGCGT ATCCACAGGC CCCAGGATGC AGGCCCTGGT GCTACTCCTC
TGCAATTGGAG CCTCCTCGG GCACAGCAGC TGCCAGAACC CTGCCAGCCC CCGGAGGAG GGCTCCCCAG
ACCCCGACAG CACAGGGCG CTGGTGAGG AGGAGGATCC TTTCTTCAA GTCCCCGTGA ACAAGCTGGC
AGCGGCTGTC TCCAACCTCG GCTATGACCT GTACCGGGTG CGATCCAGCA TGAGCCCCAC GACCAACGTG
CTCCTGTCTC CTCACAGTGT GGCCACGGCC CTCCTGGCCC TCTCGCTGG AGCGACGAG CGAACAGAAT
CCATCATTTCA CCGGCTCTC TACTATGACT TGATCAGCAG CCCAGACATC CATGGTACCT ATAAGGAGCT
CCTTGACACG GTCACTGCCC CCAGAAAGAA CCTCAAGAGT GCCTCCCGA TCGTCTTTGA GAAGAAGCTR
CGCATAAAAT CCAGCTTTGT GGCACCTCTG GAAAAGTCAT ATGGACCAG GCCCAGAGTC CTGACGGGCA
ACCCCTCGCTT GGACCTGCAA GAGATCAACA ACTGGGTGCA GGCGCAGATG AAAGGGAAGC TCGCCAGGTC
CACAAAGGAA ATTCCCGATG AGATCAGCAT TCTCCTTCTC GGTGTGGCG ACTTCAAGGG GCAGTGGGT
ACAAAGTTG ACTCCAGAAA GACTTCCCTC GAGGATTCTT GATTCAGAT CTCAGCTGCA AGATTGCCCA
CCATGATGTC GGACCCCTAAG GCTGTTTAC GCTATGGCTT GGATTCAGAT TGACCCAGAA TTTGACCTTG
GCTGCCCTTG ACCGGAAGCA TGAGTATCAT CTTCTTCCCTG CCCCTGAAAG ACCGACCCGTG CAGCGGTCC
ATAGAGGAGA GCTCACCTC CGAGTTCATT CATGACATAG ACCGAGAACT GAAGACCCGTG CAGCGGTCC
TCACTGTCCC CAAGCTGAGG CTGAGTTACG AAGGCGAAGT CACCAAGTCC CTGCAGGAGA TGAAGCTGCA
ATCCTTGTTT GATTCACCAG ACTTTAGCAA GATCACAGGC AAACCCATCA AGCTGACTCA GGTGGAACAC
CGGGCTGGCT TTGAGTGGAA CGAGGATGGG GCGGGAACCA CCCCAGCCC AGGCTGCAG CCTGCCACCC
TCACCTTCCC GCTGGACTAT CACCTTAACC AGCCTTTTCAT CTTCTGTAATG AGGACACAG ACACAGGGGC
CCTTCTCTTC ATTGGCAAGA TTCTGGACCC CAGGGGCCCC TAATATCCCA GTTAAATATT CCAATACCT
AGAAGAAAC CCGAGGACA GCAGATTCCA CAGGACACGA AGGCTGCCCC TGTAAAGGTTT CAATGCATAC
AATAAAGAG CTTTATCCCT

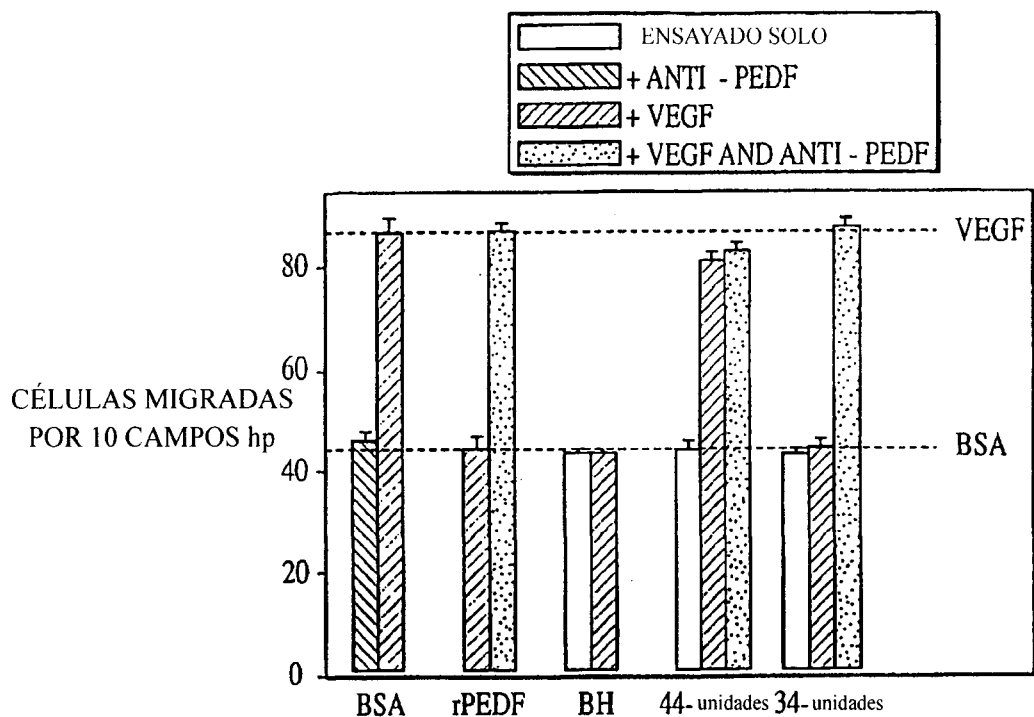


FIG. 7A

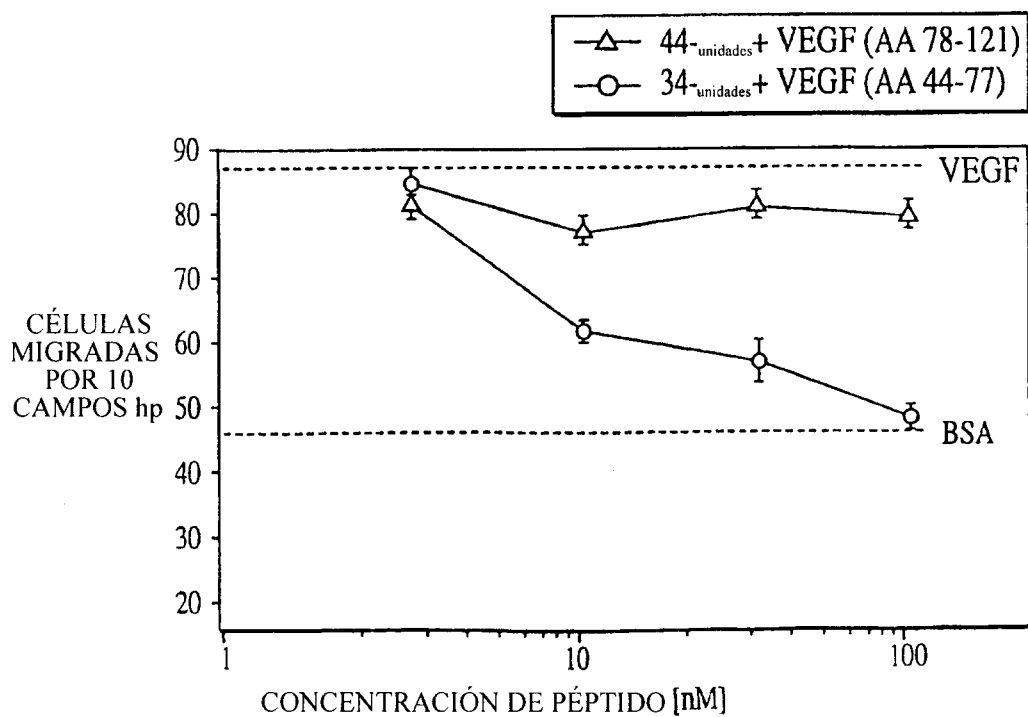


FIG. 7B



FIG. 8A



FIG. 8B



FIG. 8C

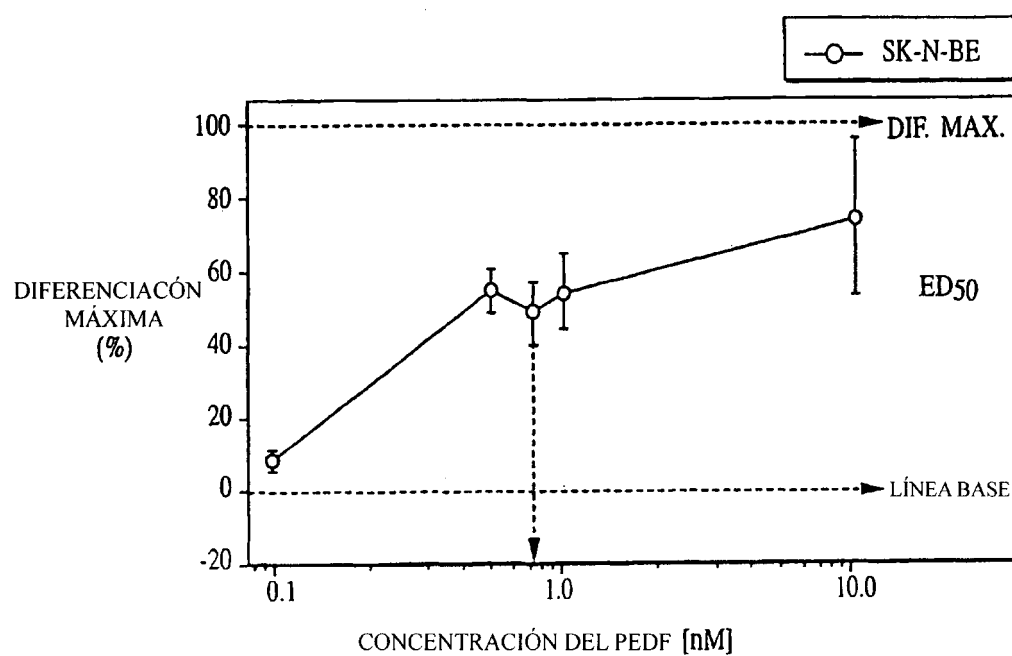


FIG. 9A

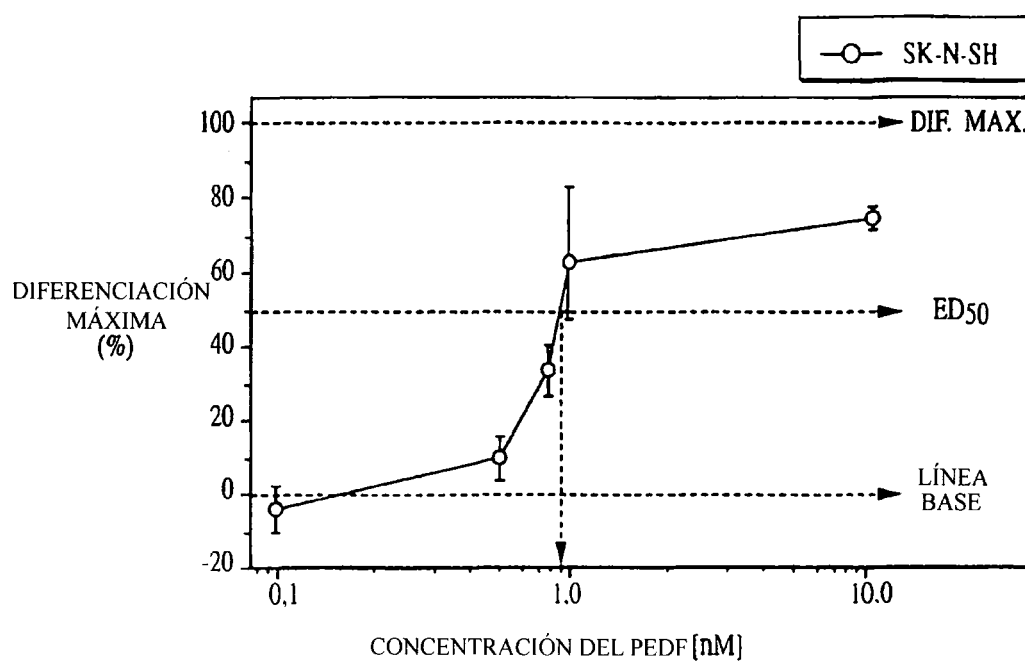


FIG. 9B

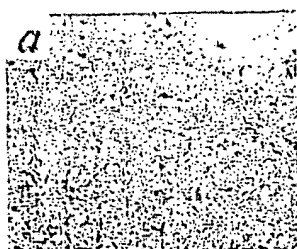


FIG.10A

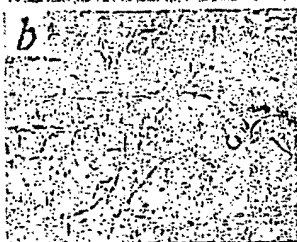


FIG.10B



FIG.10C



FIG.11A



FIG.11B

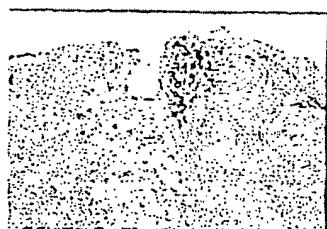


FIG.11C



FIG.11D

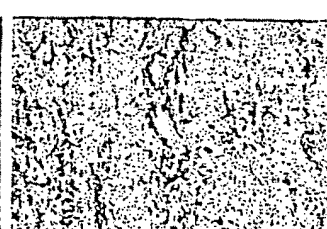


FIG.11E

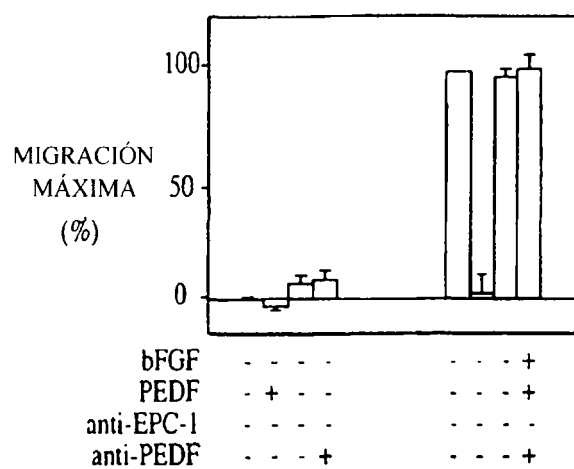


FIG. 12A

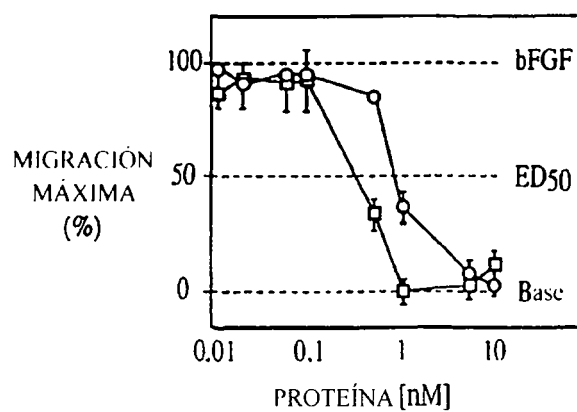


FIG. 12B

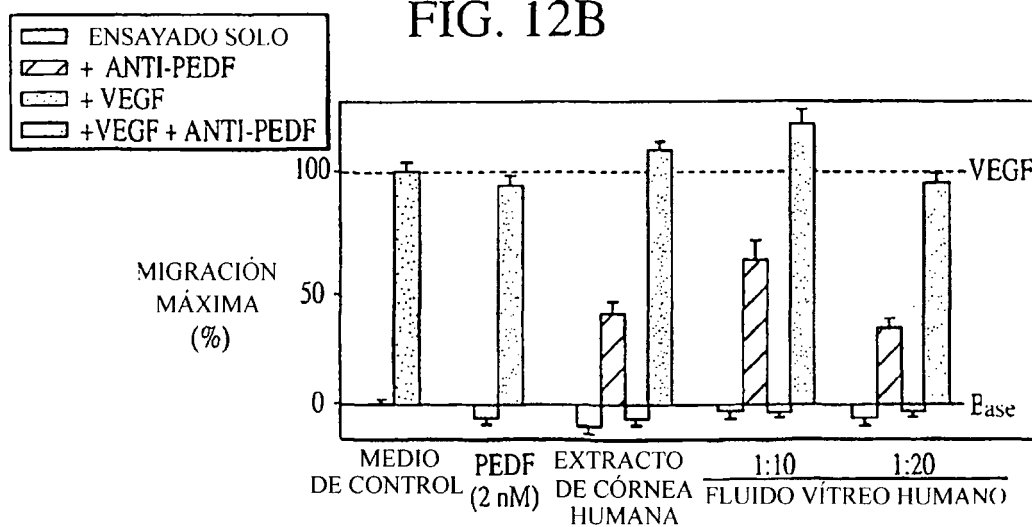


FIG. 12C

FIG. 13A

Muestra	bFGF (0,15 nM)	anti-PEDF (20 microgramos por mililitro)	anti-TGF-beta (50 microgramos por mililitro)	Córneas positivas/total implantadas
1. PBS	-	-	-	0/2
2. PBS	+	-	-	8/8
3. PBS	-	+	-	5/5
4. PBS	-	-	+	0/2
5 péptido PEDF	-	-	-	0/2
6. péptido PEDF	-	+	-	1/4 ^a
7. rPEDF	-	-	-	0/2
8. rPEDF	+	-	-	0/3
9. pPEDF	-	-	-	0/3
10. pPEDF	+	-	-	0/3
ANTES	PEDF	EXTRACCIÓN		
11. Vitreo	-	-	-	0/4
12. Vitreo	+	-	-	0/4
13. Vitreo	-	-	+	0/3
14. Vitreo	+	-	+	0/3
15. Extracto de córnea	-	-	-	0/3
16. extracto de córnea	+	-	-	1/4 ^a
DESPUÉS	PEDF	EXTRACCIÓN		
17. Vitreo	-	-	-	6/6
18. extracto de córnea	-	-	-	4/4
19. extracto de córnea	+	-	-	3/3

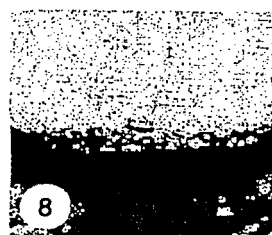
^a Una córnea produjo una respuesta suave con varios nuevos vasos sanguíneos que no alcanzaron el gránulo

FIG.13B-1



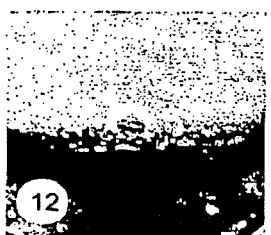
bFGF

FIG.13B-5



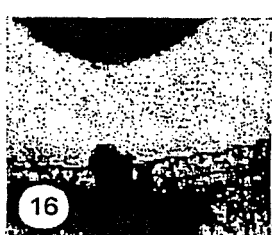
bFGF + rPEDF

FIG.13B-2



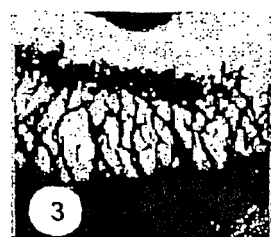
bFGF + humor vítreo

FIG.13B-6



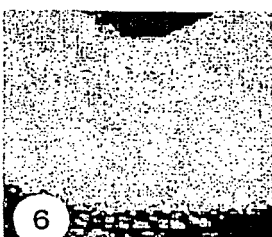
bFGF + extracto de córnea

FIG.13B-3



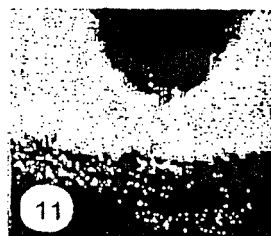
Anti- PEDF

FIG.13B-7



Anti-PEDF + péptido

FIG.13B-4

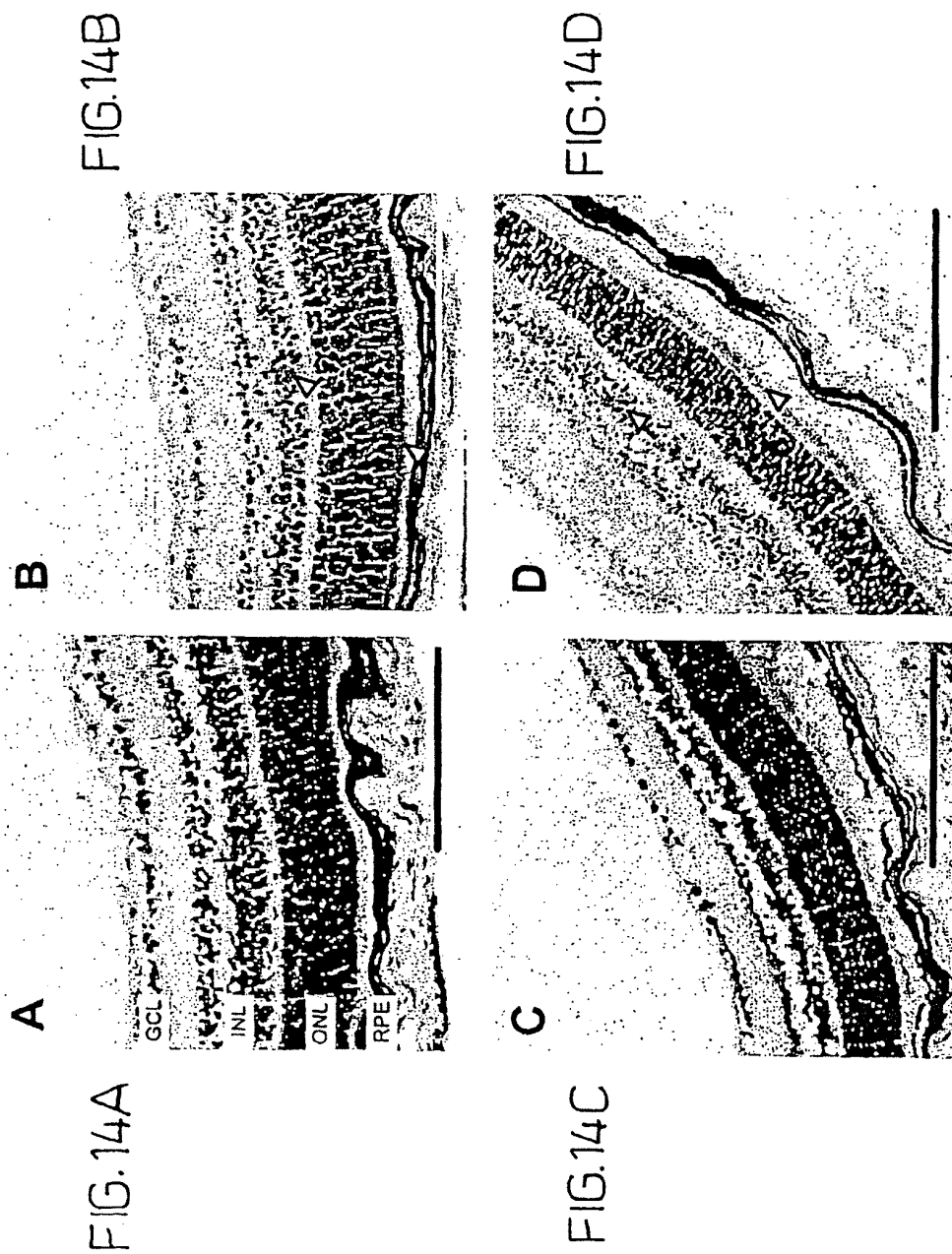


Humor vítreo

FIG.13B-8



Humor vítreo sin PEDF



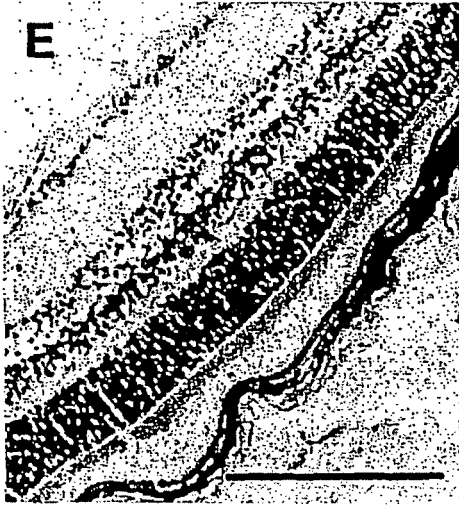


FIG.14E

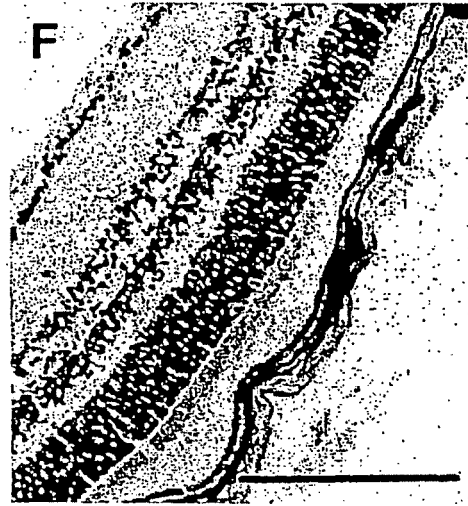
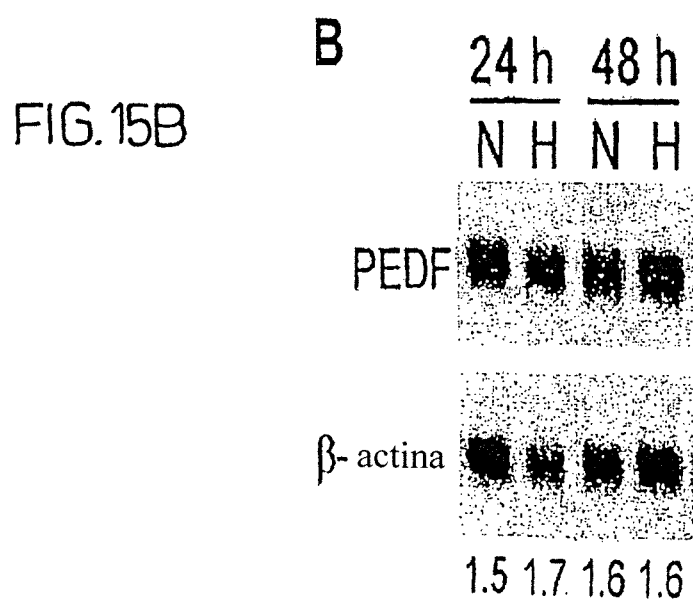
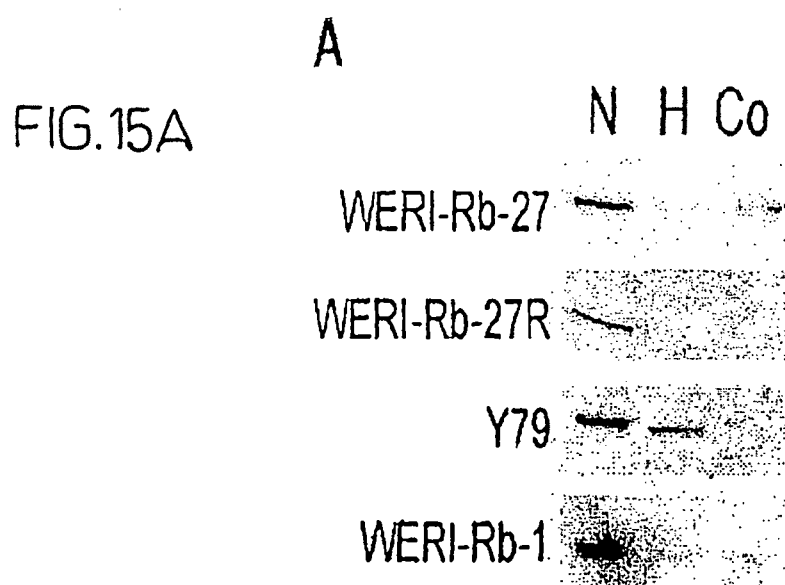


FIG.14F



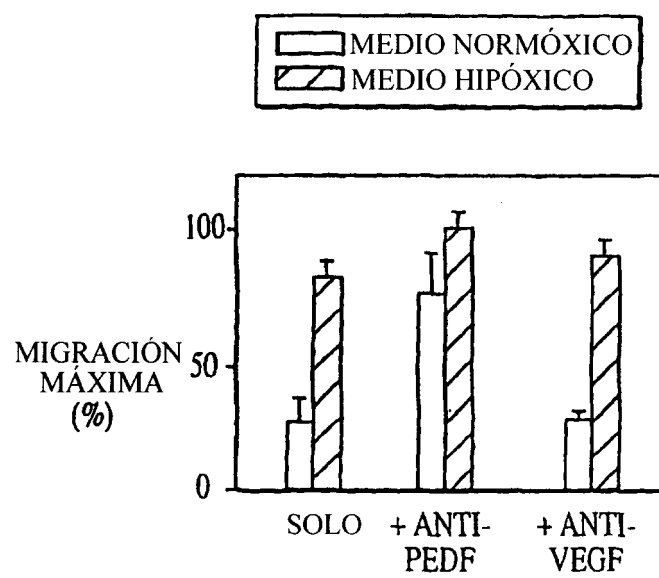


FIG. 15C

FIG.16A

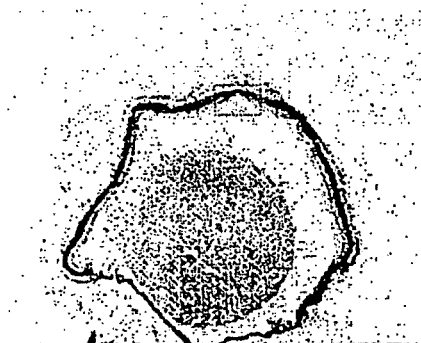


FIG.16B



FIG.16C



FIG.16D

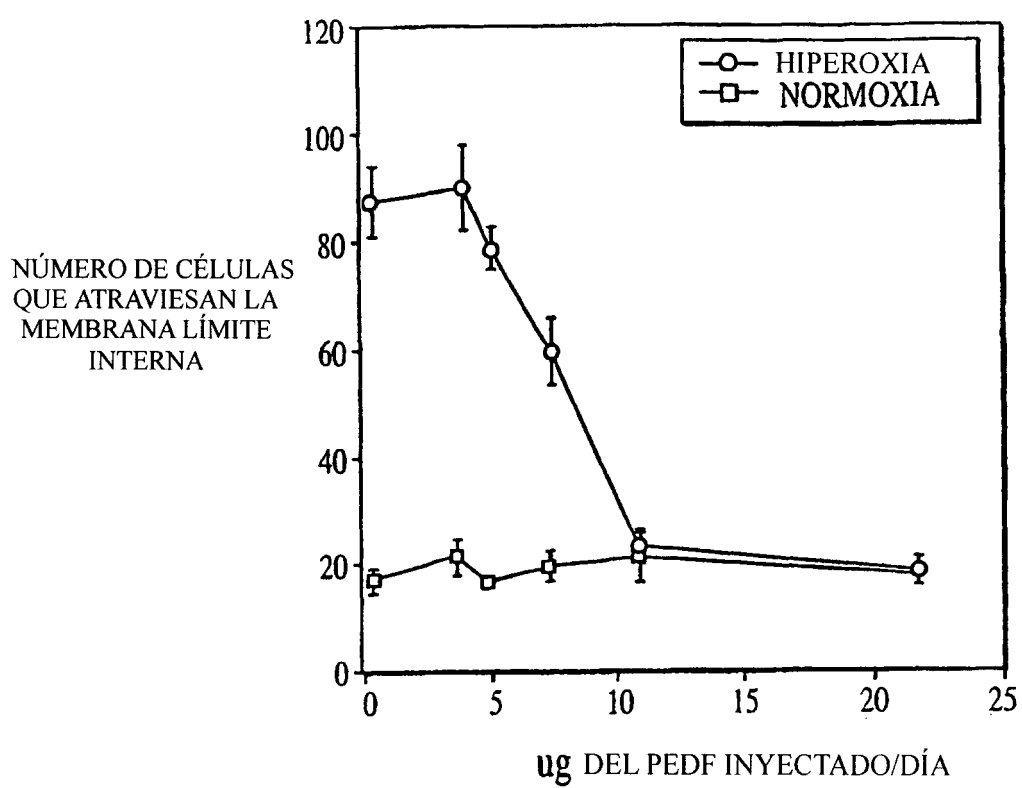


FIG. 17

ES 2 316 437 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE NORTHWESTERN

5 <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INHIBIR LA ANGIOGÉNESIS
<130> 0290-26WO

<140> NO ASIGNADO AÚN

<141> 2001-02-22

10 <150> US 09/603,478
<151> 2000-02-23
<160> 4

15 <170> PatentIn versión 3.0
<210> 1
<211> 418
<212> PRT

20 <213> *Homo Sapiens*

<400> 1

25 Met Gln Ala Leu Val Leu Leu Leu Cys Ile Gly Ala Leu Leu Gly His
1 5 10 15

Ser Ser Cys Gln Asn Pro Ala Ser Pro Pro Glu Glu Gly Ser Pro Asp
30 20 25 30

Pro Asp Ser Thr Gly Ala Leu Val Glu Glu Glu Asp Pro Phe Phe Lys
35 40 45

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 316 437 T3

	Val	Pro	Val	Asn	Lys	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Ser	Asn	Phe	Gly	Tyr	Asp	
	50						55					60					
5	Leu	Tyr	Arg	Val	Arg	Ser	Ser	Met	Ser	Pro	Thr	Thr	Asn	Val	Leu	Leu	
	65					70					75					80	
	Ser	Pro	Leu	Ser	Val	Ala	Thr	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Ser	Leu	Gly	Ala	
10					85					90					95		
	Asp	Glu	Arg	Thr	Glu	Ser	Ile	Ile	His	Arg	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Asp	Leu	
				100					105					110			
15	Ile	Ser	Ser	Pro	Asp	Ile	His	Gly	Thr	Tyr	Lys	Glu	Leu	Leu	Asp	Thr	
			115					120					125				
	Val	Thr	Ala	Pro	Gln	Lys	Asn	Leu	Lys	Ser	Ala	Ser	Arg	Ile	Val	Phe	
20			130				135					140					
	Glu	Lys	Lys	Leu	Arg	Ile	Lys	Ser	Ser	Phe	Val	Ala	Pro	Leu	Glu	Lys	
	145					150					155					160	
25	Ser	Tyr	Gly	Thr	Arg	Pro	Arg	Val	Leu	Thr	Gly	Asn	Pro	Arg	Leu	Asp	
					165					170					175		
	Leu	Gln	Glu	Ile	Asn	Asn	Trp	Val	Gln	Ala	Gln	Met	Lys	Gly	Lys	Leu	
				180					185					190			
30	Ala	Arg	Ser	Thr	Lys	Glu	Ile	Pro	Asp	Glu	Ile	Ser	Ile	Leu	Leu	Leu	
			195					200					205				
	Gly	Val	Ala	His	Phe	Lys	Gly	Gln	Trp	Val	Thr	Lys	Phe	Asp	Ser	Arg	
35		210					215					220					
	Lys	Thr	Ser	Leu	Glu	Asp	Phe	Tyr	Leu	Asp	Glu	Glu	Arg	Thr	Val	Arg	
	225					230					235					240	
40	Val	Pro	Met	Met	Ser	Asp	Pro	Lys	Ala	Val	Leu	Arg	Tyr	Gly	Leu	Asp	
					245					250					255		
	Ser	Asp	Leu	Ser	Cys	Lys	Ile	Ala	Gln	Leu	Pro	Leu	Thr	Gly	Ser	Met	
45				260					265					270			
	Ser	Ile	Ile	Phe	Phe	Leu	Pro	Leu	Lys	Val	Thr	Gln	Asn	Leu	Thr	Leu	
		275					280						285				
50	Ile	Glu	Glu	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Phe	Ile	His	Asp	Ile	Asp	Arg	Glu	
	290						295					300					
	Leu	Lys	Thr	Val	Gln	Ala	Val	Leu	Thr	Val	Pro	Lys	Leu	Lys	Leu	Ser	
	305					310					315					320	
55	Tyr	Glu	Gly	Glu	Val	Thr	Lys	Ser	Leu	Gln	Glu	Met	Lys	Leu	Gln	Ser	
					325					330					335		
	Leu	Phe	Asp	Ser	Pro	Asp	Phe	Ser	Lys	Ile	Thr	Gly	Lys	Pro	Ile	Lys	
60				340					345					350			

ES 2 316 437 T3

Leu Thr Gln Val Glu His Arg Ala Gly Phe Glu Trp Asn Glu Asp Gly
 355 360 365
 5 Ala Gly Thr Thr Pro Ser Pro Gly Leu Gln Pro Ala His Leu Thr Phe
 370 375 380
 10 Pro Leu Asp Tyr His Leu Asn Gln Pro Phe Ile Phe Val Leu Arg Asp
 385 390 395 400
 Thr Asp Thr Gly Ala Leu Leu Phe Ile Gly Lys Ile Leu Asp Pro Arg
 405 410 415
 15 Gly Pro

<210> 2
 20 <211> 1490
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 2

ggacgctgga ttagaaggca gcaaaaaaag atctgtgctg gctggagccc cctcagtgtg 60
 30 caggccttaga gggactaggc tgggtgtgga gctgcagcgt atccacaggc cccaggatgc 120
 aggccttggt gctactcttc tgcattggag ccctcctcgg gcacagcagc tgccagaacc 180
 35 ctgccagccc cccggaggag ggctccccag accccgacag cacaggggag ctggtggagg 240
 aggaggatcc tttcttcaaa gtccccgtga acaagctggc agcggctgtc tccaacttcg 300
 gctatgacct gtaccgggtg cgatccagca tgagccccac gaccaacgtg ctctgtcttc 360
 40 ctctcagtgt ggccacggcc ctctcgcccc tctcgctggg agcggacgag cgaacagaat 420
 ccatcattca cggggctctc tactatgact tgatcagcag cccagacatc catggtacct 480
 45 ataaggagct ccttgacacg gtcaactgcc cccagaagaa cctcaagagt gcctcccgga 540
 tcgtctttga gaagaagctr cgcataaaat ccagctttgt ggcacctctg gaaaagtcac 600
 atgggaccag gccagagtc ctgacgggca accctcgctt ggacctgcaa gagatcaaca 660
 50 actgggtgca ggcgcagatg aaaggaagc tcgccaggtc cacaaggaa attcccgatg 720
 agatcagcat tctccttctc ggtgtggcgc acttcaaggg gcagtgggta acaaagtttg 780
 55 actccagaaa gacttccttc gaggatttct acttgatga agagaggacc gtgagggtcc 840
 ccatgatgtc ggaccctaag gctgttttac gctatggctt ggattcagat ctcaagtgc 900
 agattgcccc gctgcccttg accggaagca tgagtatcat cttcttcctg cccctgaaag 960

65

ES 2 316 437 T3

```

    tgacccagaa tttgaccttg atagaggaga gcctcacctc cgagttcatt catgacatag 1020
    accgagaact gaagaccgtg caggcgggtcc tcaactgtccc caagctgagg ctgagttacg 1080
5    aaggcgaagt caccaagtc cctgcaggaga tgaagctgca atccttggtt gattcaccag 1140
    acttttagcaa gatcacaggc aaacccatca agctgactca ggtggaacac cgggctggct 1200
10   ttgagtggaa cgaggatggg gcgggaacca ccccagccc agggctgcag cctgcccacc 1260
    tcaccttccc gctggactat caccttaacc agcctttcat cttcgtactg agggacacag 1320
    acacaggggc ccttctcttc attggcaaga ttctggaccc caggggcccc taatatccca 1380
15   gtttaatat ccaataccct agaagaaaac ccgagggaca gcagattcca caggacacga 1440
    aggctgcccc tgtaagggtt caatgcatac aataaaagag ctttatccct 1490

```

```

20   <210> 3
    <211> 21
    <212> PRT
25   <213> Homo sapiens
    <220>
    <221> NO SEGURO
    <222> (20)..(20)
30   <223> X puede ser cualquier aminoácido

    <400> 3

```

```

35   Thr Ser Leu Glu Asp Phe Tyr Leu Asp Glu Glu Arg Thr Val Arg Val
    1           5           10           15
40   Pro Met Met Xaa Asp
    20

```

```

    <210> 4
45   <211> 10
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <220>
50   <221> NO SEGURO
    <222> (9)..(9)
    <223> X puede ser cualquier aminoácido
55   <400> 4

```

```

60   Ile Ala Gln Leu Pro Leu Thr Gly Xaa Met
    1           5           10

```

65