



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 316 194**

(51) Int. Cl.:

|                             |                               |
|-----------------------------|-------------------------------|
| <b>A61K 38/18</b> (2006.01) | <b>A61K 38/17</b> (2006.01)   |
| <b>A61K 48/00</b> (2006.01) | <b>A61K 31/7088</b> (2006.01) |
| <b>A61P 9/00</b> (2006.01)  | <b>A61P 17/02</b> (2006.01)   |
| <b>A61P 35/00</b> (2006.01) | <b>A61P 27/02</b> (2006.01)   |
| <b>G01N 33/50</b> (2006.01) | <b>G01N 33/68</b> (2006.01)   |

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **99958695 .1**

(96) Fecha de presentación : **28.10.1999**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1126869**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2001**

(54) Título: **Métodos para la regulación de la angiogénesis y la integridad vascular utilizando los ligandos BDNF, NT-3 y NT-4.**

(30) Prioridad: **28.10.1998 US 105928 P**  
**12.02.1999 US 119994 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2009**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2009**

(73) Titular/es:  
**CORNELL RESEARCH FOUNDATION, Inc.**  
**20 Thornwood Drive, Suite 105**  
**Ithaca, New York 14850, US**  
**CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION**

(72) Inventor/es: **Hempstead, Barbara, L.;**  
**Kraemer, Rosemary;**  
**Rafii, Shahin;**  
**Wiegn, Phi y**  
**Donovan, Michael, J.**

(74) Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 316 194 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

Métodos para la regulación de la angiogénesis y la integridad vascular utilizando los ligandos BDNF, NT-3 y NT-4.

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de Patente Provisional de EE.UU. No. de serie 60/105.928, presentada el 28 de Octubre, 1998, y la solicitud de Patente Provisional de EE.UU. No. de serie 60/119.994, presentada el 12 de Febrero, 1999.

### Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de ligandos de receptores trk en la preparación de un medicamento para regular la angiogénesis y la integridad vascular, como la inducción de la angiogénesis, la promoción del crecimiento o estabilización de los vasos sanguíneos y en el tratamiento de desórdenes patológicos.

### Antecedentes de la invención

La angiogénesis es un proceso precisamente regulado el cual coordina el ensamblaje y diferenciación de numerosos tipos celulares para formar las arterias, capilares y venas del lecho vascular preexistente. La vasculatura primitiva está compuesta de un plexo endotelial, el cual requiere el reclutamiento de los pericitos y las células del músculo liso vascular por factores de crecimiento solubles secretados por las células endoteliales para configurar los vasos sanguíneos en arterias y venas (Risau, "Mecanismos de la Angiogénesis", *Nature* 386: 671-674 (1997)). Al final, los pasos de formación de los vasos sanguíneos, las células endoteliales de nueva formación son estabilizadas por la matriz extracelular, la formación de una membrana basal y una cubierta con pericitos y células del músculo liso. Numerosos factores de crecimiento de los polipéptidos han sido implicados en la iniciación de la vasculogénesis y el desarrollo angiogénico, incluyendo los factores de crecimiento de fibroblastos (bFGF y FGF-2), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y las angiopoyetinas (Darland *et al.*, "Maduración de los Vasos Sanguíneos: Desarrollo Vascular Con la Edad", *J. Clin. Invest.* 103: 167-168 (1999); Ferrara *et al.*, "Biología del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular", *Endocrin. Rev.* 18: 4-25 (1997)). Además, el factor de crecimiento B derivado de las plaquetas (PDGF-BB), la angiopoyetina-1 (ang-1), la efrina B2, y el TGF  $\beta$  han sido implicados por regular tardíamente aspectos del proceso de la angiogénesis, en el reclutamiento de las células murales, y en la configuración del lecho vascular (Yancopoulos *et al.*, "Vasculogenesis, Angiogenesis and Growth Factors: Ephrins Enter the Fray at the Border", *Cell* 93: 661-664 (1998); Lindahl *et al.*, "Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in the PDGF-B-deficient mice", *Science* 277: 242-245 (1997); Dickman *et al.*, "Defective Haematopoiesis and Vasculogenesis in Transforming Growth Factor Beta 1 Knock Out Mice", *Development* 121:1845-1854 (1995); Yang *et al.*, "Angiogenesis Defects and Mesenchymal Apoptosis in Mice Lacking SMAD5", *Development* 126:1571-1580 (1999)). Se sabe muy poco acerca de los factores de crecimiento que regulan la estabilización y supervivencia de la vasculatura madura, aunque la angiopoyetina-1 ha sido propuesta como una molécula candidata de ésto. De estos factores, solo el VEGF ha sido probado rigurosamente por su capacidad para iniciar la angiogénesis madura en ensayos clínicos y preclínicos (Ferrara *et al.*, "The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor", *Endocrin. Rev.* 18:4-25 (1997); Mack *et al.*, "Biologic Bypass With the Use of Adenovirus-Mediated Gene Transfer of the Complementary Deoxyribonucleic Acid for Vascular Endothelial Growth Factor 121 Improves Myocardial Perfusion and Function in the Ischemic Porcine Heart", *J. Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 115:168-176 (1998); Losordo *et al.*, "Gene Therapy for Myocardial Angiogenesis: Initial Clinical Results with Direct Myocardial Injection of phVEGF 165 as Sole Therapy for Myocardial Ischemia", *Circulation* 98:2800-2804 (1998)). Aunque la liberación del VGFE por la transferencia de gen puede inducir una respuesta angiogénica en tejidos isquémicos, el VGFE exógeno induce la formación de vasos sanguíneos malformados, dilatados y frágiles (Springer *et al.*, "VEGF Gene Delivery to Muscle: potencial Role for Vasculogenesis in Adults", *Molecular Cell* 2: 549-558 (1998); Drake *et al.*, "Exogenous Vascular Endothelial Growth Factor Induces Malformed and Hyperfused Vessels During Embryonic Development", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:7657-7661 (1995)). Además, estudios recientes sugieren que las células endoteliales de los vasos sanguíneos postnatales pueden convertirse en independientes de VEGF para sus continuadas supervivencias a las varias semanas de nacimiento en roedores (Gerber *et al.*, "VEGF is Required for Growth and Survival in Neonatal Mice", *Development* 126: 1149-1159 (1999)). Así, el punto final a fin de cuentas es la definición de los pasos celulares y las secuencias moleculares que dirigen y mantienen el ensamblaje microvascular conduciendo a blancos terapéuticos para la reparación y el remodelaje adaptable.

En estudios recientes, han sido investigados los roles de las neurotrofinas en la regulación del desarrollo cardiovascular y en la modulación de la respuesta vascular frente a un daño (Donovan *et al.*, "Neurotrophin-3 is Required for Mammalian Cardiac Development: Identification of an Essential Nonneuronal Neurotrophin Function", *Nature Genetics* 14:210-213 (1996); Donovan *et al.*, "Neurotrophin and Neurotrophin Receptors in Vascular Smooth Muscle Cells: Regulation of Expression in Response to Injury", *A.J. Path.* 147:309-324 (1995); Kraemer *et al.*, "NGF Activates Similar Intracellular Signaling Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells as PDGF-BB But Elicits Different Biological Responses", *Arteriol. Thromb. And Vasc. Biol.* 19:1041-1050 (1999)). Las neurotrofinas constan hoy en día de una familia de 5 factores de crecimiento de polipéptidos relacionados: factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y las neurotrofinas 3,4 (también referidas como neurotrofina 5), y 6 (NT-3, NT-4, NT-6) (Lewin *et al.*, "Physiology of the Neurotrophins", *Ann. Rev. Neuro.* 19: 289-317 (1996)). Estas proteínas estructuralmente relacionadas median sus acciones sobre las neuronas excitadas mediante la unión a dos clases de receptores de la superficie de la célula (Lewin *et al.*, "Physiology of the Neurotrophins", *Ann. Rev. Neuro.* 19: 289-317

(1996)). La baja afinidad del receptor de la neurotrofina, p75, une todas las neurotrofinas y modula la señal iniciada por los receptores de segunda clase de las neurotrofinas, la familia del receptor trk de las tirosina quinasas (lo que fue identificado originalmente como un receptor trk de la tirosina quinasa es ahora referido como trk A, un miembro de la familia de receptores trk). Las Trk A, trk B, y trk C tirosina quinasas sirven como receptores para el NGF, BDNF, y el NT-3, respectivamente, y el trk B puede también ser activado mediante el NT-4.

El NT-3 inicia un número de efectos tróficos sobre las neuronas que expresan su receptor, trk C, variando de una mitogénesis, promoción de la supervivencia, o diferenciación, dependiendo del estado de desarrollo de las células blanco (Chalazonitis, "Neurotrophin-3 as an Essential Signal for the Developing Nervous System", *Molecular Neurobiology* 12:29-53 (1996)). Los sitios de acción reportados del NT-3 residen primariamente en el sistema nervioso periférico (PNS), varias áreas del sistema nervioso central (CNS), y en el sistema nervioso entérico (ENS). *Id.* Los análisis de los fenotipos de ratones transgénicos carentes de NT-3 o la inyección de embriones con anticuerpos bloqueantes de poblaciones específicas de PNS, y en particular de neuronas propioceptivas, nodosas y sensoriales auditivas, y de neuronas simpáticas. *Id.* Las acciones del NT-3 también están extendidas a la modulación de transmisores liberados en varios tipos de sinapsis en el CNS periférico, así como en el CNS adulto. *Id.*

El NT-4 actúa vía el receptor trk B y proporciona la supervivencia de las neuronas sensoriales viscerales y somáticas (Erickson *et al.*, "Mice Lacking Brain-Derived Neurotrophic Factor Exhibit Visceral Sensory Neuron Losses Distinct from Mice Lacking NT4 and Display a Severe Developmental Deficit in Control of Breathing", *J. Neurosci.* 16:5361-5371 (1996)). La principal población sensorial visceral, el complejo ganglio-petroso-nodoso (NPG), requiere del BDNF y NT-4 para la supervivencia de un complemento extenso de neuronas, sin embargo, solo un alelo funcional del NT-4 es requerido para proporcionar la supervivencia de todas las neuronas dependiente de NT-4. *Id.* El NT-4 parece tener el único requerimiento de unirse al p75 para una señalización eficiente y un transporte retrógrado en las neuronas (Ibáñez, "Neurotrophin-4: The Odd One out in the Neurotrophin Family", *Neurochemical Research* 21:787-793 (1996)). Además, mientras todas las otras neurotrofinas en knock-outs han probado ser letales durante el desarrollo inicial postnatal, los ratones deficientes en NT-4 han mostrado solo mínimas deficiencias celulares y un desarrollo normalmente hasta edad adulta.

Los receptores Trk B y BDNF son expresados altamente por las neuronas periféricas y centrales, y estudios de ablación de genes han demostrado el rol crítico del trk B y el BDNF en la diferenciación neuronal y la supervivencia, con genes dianas en animales exhibiendo anormalidades en la función del cerebelo y el manejo respiratorio (Lewin *et al.*, "Physiology of the neurotrophins", *Ann. Rev. Neuro.* 19:289-317 (1996); Jones *et al.*, "Targeted Disruption of the BDNF Gene Perturbs Brain and Sensory Neuron Development But Not Motor Neuron Development", *Cell* 76: 989-999 (1994); Erickson *et al.*, "Mice Lacking Brain-Derived Neurotrophic Factor Exhibit Visceral Sensory Neuron Losses Distinct From Mice Lacking NT4 and Display a Severe Developmental Deficit in Control of Breathing", *J. Neurosci.* 16:5361-5371 (1996); Schwartz *et al.*, "Abnormal Cerebellar Development and Foliation in the BDNF (-/-) Mice Reveals a Role for Neurotrophins in CNS Patterning", *Neuron* 19: 269-281 (1997)).

Sin embargo, el sistema receptor BDNF: trk B es expresado a altos niveles en tejidos no neuronales, incluyendo músculo, pulmón, riñón, corazón y vasculatura, donde sus funciones biológicas son poco evidentes (Donovan *et al.*, "Neurotrophin and Neurotrophin Receptors in Vascular Smooth Muscle Cells: Regulation of Expression in Response to Injury", *A.J. Path.* 147:309-324 (1995); Timmusk *et al.*, "Widespread and Developmentally Regulated Expression of Neurotrophin-4 mRNA in Rat Brain and Peripheral Tissues", *Eur. J. Neurosci.* 5:605-613 (1993); Hiltunen *et al.*, "Expression of mRNAs for Neurotrophins and Their Receptors in Developing Rat Heart", *Circ. Res.* 79:930-939 (1996); Scarisbrick *et al.*, "Coexpression of the mRNAs for NGF, BDNF and NT-3 in the Cardiovascular System of Pre- and Post-Natal Rat", *J. Neurosci.* 13:875-893 (1993)). Estudios anteriores han identificado el papel de neurotrofina relacionada, NT-3, y su receptor, trk C, en la regulación de la septación cardíaca y la valvulogénesis (Donovan *et al.*, "Neurotrophin-3 is Required for Mammalian Cardiac Development: Identification of an Essential Nonneuronal Neurotrophin function", *Nature Genetics* 14:210-213 (1996); Tessarollo *et al.*, "Targeted Deletion of all Isoforms of the trk C Gene Suggests the Use of Alternate Receptor by its Ligand Neurotrophin-3 in Neural Development and Implicates trk C in Normal Cardiogenesis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14766-014781 (1997). Además, ha sido demostrado que el BDNF, t y el trk B son expresados por las células del músculo liso vascular de la aorta mayor, y la expresión de este sistema receptor: ligando es sobre regulado en células neointimales después de un daño vascular (Donovan *et al.*, "Neurotrophin-3 is Required for Mammalian Cardiac Development: Identification of an Essential Nonneuronal neurotrophin Function", *Nature Genetics* 14:210-213 (1996)). Sin embargo, las acciones biológicas del BDNF y las neurotrofinas relacionadas en la función cardiovascular y el desarrollo no han sido evaluadas.

La presente invención está dirigida a las funciones de las neurotrofinas y de la familia del receptor trk relacionadas con la biología vascular.

## Resumen de la invención

La presente invención se refiere al uso del ligando del receptor trk seleccionado entre un grupo que consta de el BDNF, NT-3, y NT-4, o una molécula de ácido nucleico que codifica para dicho ligando del receptor trk, en la preparación de un medicamento para la inducción de la angiogénesis mediante la liberación del ligando del receptor trk o de la molécula de ácido nucleico en una cantidad eficaz para inducir la angiogénesis. En particular, la presente invención se refiere al uso de un ligando al receptor trk seleccionado entre el grupo que consta de BDNF, NT-3, y NT-4, o una molécula de ácido nucleico que codifica para dicho ligando del receptor trk, en la preparación de un medicamento para

el tratamiento en pacientes con un desorden patológico definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, mediante la administración del ligando del receptor trk o de la molécula de ácido nucleico en una cantidad eficaz para tratar el desorden patológico mediante la inducción de la angiogénesis.

- 5 La presente invención comprende el uso de un ligando del receptor trk en la preparación de un medicamento para promover la estabilización o crecimiento de los vasos sanguíneos mediante la liberación del ligando del receptor trk o de la molécula de ácido nucleico en una cantidad eficaz para promover la estabilización o crecimiento de los vasos sanguíneos.
- 10 La presente invención comprende el uso de un ligando del receptor trk en la preparación de un medicamento para el tratamiento en un paciente de un desorden patológico mediante la administración del ligando del receptor trk o de la molécula de ácido nucleico en una cantidad eficaz para tratar el desorden patológico mediante la promoción de la estabilización o crecimiento de los vasos sanguíneos.
- 15 Aunque varios factores de crecimiento han sido identificados por jugar un rol en la iniciación de la patogénesis, más notablemente el VEGF, la presente invención muestra que los ligandos del receptor trk, e.g., los ligandos trk B y trk C, tienen funciones únicas en la biología vascular, incluyendo la inducción de la angiogénesis, crecimiento de los vasos sanguíneos, y la estabilización de los vasos sanguíneos. A diferencia de los receptores VEGF y VEGF, los cuales son expresados a altos niveles durante la adultez, la expresión de los ligandos trk B y trk C por la vasculatura es
- 20 iniciada durante la gestación tardía, y la expresión se incrementa con la vida postnatal hasta la adultez. Estos patrones característicos de expresión sugieren que las células del endotelio no pueden requerir una exposición continuada al VEGF durante la adultez, un punto recientemente confirmado en modelos animales (Gerber *et al.*, "VEGF is Required for Growth and Survival in Neonatal Mice", *Development* 126:1149-1159 (1999)).
- 25 Estudios *in vivo* e *in vitro* de la presente invención apoyan un rol de supervivencia para los ligandos trk B y trk C, frente a los efectos mitogénicos bien caracterizados del VEGF sobre las células endoteliales. Como tal, los ligandos trk B y trk C muestran una función estabilizadora crítica para la vasculatura, en la prevención de la apoptosis de las células endoteliales. Es también importante reconocer que la liberación de otros factores angiogénicos, como el VEGF, a altos niveles, ha sido acompañada por efectos adversos significativos, con un aumento en la fragilidad de
- 30 los vasos sanguíneos y la inducción local de hemangiomas, efectos los cuales podrían reflejar los efectos mitogénicos y de promoción de la permeabilidad conocidos del VEGF (Drake *et al.*, "Exogenous Vascular Endothelial Growth Factor Induced Malformed and Hyperfused Vessels During Embryonic Development", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7657-7661 (1995); Springer *et al.*, "VEGF Gene Delivery to Muscle: Potential Role for Vasculogenesis in Adults", *Molecular Cell* 2:549-558 (1998)). Por el contrario, la sobreexpresión de ligandos del receptor trk en el corazón en
- 35 desarrollo da como resultado un incremento en la red capilar, pero no hay evidencias de la fragilidad vascular o de una permeabilidad alterada de los vasos sanguíneos.

Las acciones de los ligandos del receptor trk también son diferenciables de aquellos reportados para las angiopoyetinas. Las angiopoyetinas juegan un rol en la angiogénesis mediante la transmisión de señales que estabilizan las células endoteliales dentro de los vasos sanguíneos de nueva formación. Estudios *in vitro* sugieren que la angiopoyetina-1 puede actuar como un factor de supervivencia para las células endoteliales (Hayes *et al.*, "Angiopoietin-1 and Its Receptor Tie-2 Participate in the Regulation of Capillary-Like Tubule Formation and Survival of Endothelial Cells", *Microvasc. Res.* 58: 224-237 (1999)). Como tal, la angiopoyetina-1 es ampliamente expresada por las células del músculo liso que rodean las células endoteliales, las cuales expresan el receptor de la angiopoyetina-1, el Tie 2. De ese

45 modo, a diferencia de los ligandos del receptor trk los cuales pueden actuar en una forma autocrina para proporcionar la supervivencia de las células endoteliales, la angiopoyetina-1 es producida por las células del músculo liso y actúa en una forma paracrina para promover la supervivencia de las células endoteliales. Aunque tanto la angiopoyetina-1 y los ligandos del receptor trk son expresados por células de la vasculatura postnatal y en la adultez, son característicos el fenotipo BDNF mutante nulo y de los animales mutantes nulos para la angiopoyetina-1 o Tie2. Hay también importantes diferencias en la capacidad de los ligandos del receptor trk y de las angiopoyetinas para iniciar la angiogénesis en modelos *in vivo*. En la mayoría de los estudios *in vivo* cuando la angiopoyetina-1 ha sido inyectada sola localmente o sistémicamente en el ratón. Los resultados han mostrado cambios marginales en la angiogénesis. Por contraposición, los ligandos del receptor trk BDNF, NT-3 y NT-4 parecen ser similarmente efectivos como el VEGF en promover el

50 desarrollo de las redes vasculares.

## 55 Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-J muestran la expresión de las neurotrofinas en el embrión y en la adultez de corazones de roedores. En particular, estas figuras muestran la detección inmunohistoquímica del BDNF (paneles A, y D), NT-3 (panel B), NT-4 (panel C), o de la quinasa que activa al trk B (panel E) en los corazones de roedores. Los paneles A, B y C muestran secciones de la pared ventricular izquierda de ratas hembras adultas (6 semanas). Resultados comparables fueron obtenidos con secciones de corazón de un ratón maduro. Los paneles D y E muestran secciones de la pared ventricular de embriones de ratones BDNF (+/+) en E18.5. El panel F muestra secciones de corazón de un embrión E 18,5 (+/+) BDNF incubado con un antisuero anti-BDNF para documentar la especificidad del antisuero. En los

60 paneles A-F, fue utilizada la inmunodetección basada en VIP, dando como rendimiento un producto de reacción rojo. Los paneles G, H, I y J muestran una detección por inmunofluorescencia doble de la reactividad del PECAM (CD31) (utilizando un anticuerpo primario conjugado a rodamina) y tanto la reactividad del BDNF (paneles G e I) o de la reactividad de la quinasa que activa al trk B (utilizando un anticuerpo secundario conjugado a FITC) (paneles H e I),

con secciones de corazones de ratones maduros (paneles I y J). Las barras, 50  $\mu\text{m}$  (paneles A, B, y C), 25  $\mu\text{m}$  (paneles D, E, y F); 30  $\mu\text{m}$  (paneles G, H, I, y J).

Las Figuras 2 A-H muestran que animales BDNF (-/-) exhiben una hemorragia dentro de las paredes ventriculares a través análisis histológico de corazones de animales sacrificados a las 8 horas de nacimiento. Los paneles A, B, C, y D son secciones teñidas con hematoxilina y eosina. El **ra** y **la** = atrio derecho e izquierdo; **rv** y **lv** = ventrículos derecho e izquierdo; **asd** = defecto del septo atrial. Los paneles E, F, G, y H muestran secciones finas de tejidos teñidos con azul de toluidina embebidos en Epon de animales PO. Nótese la arteriola anormal, no la vénula normal en secciones de BDNF (-/-). Los paneles A, C, E, y G son animales BDNF (+/+). Los paneles B, D, F y H son animales BDNF (-/-). Las barras, 150  $\mu\text{m}$  (paneles A, y B), 50  $\mu\text{m}$  (paneles D, E, y F); 5  $\mu\text{m}$  (paneles G, y H).

Las Figuras 3A-J muestran anomalías de las células endoteliales en animales BDNF (-/-). Los paneles A, B, y C son análisis por microscopía electrónica de la pared ventricular izquierda de la descendencia de BDNF (+/+) (panel A) o de la descendencia PO (-/-) (paneles B y C). Las células endoteliales vacuoladas con una matriz extracelular extensiva y desorganizada fueron detectadas consistentemente en los capilares y las arteriolas de los animales BDNF (-/-). Los paneles D, E, F, y G muestran el uso de la microscopía de inmunofluorescencia para detectar el PECAM (CD31) (rodamina) y la positividad a TUNEL (FITC) en embriones E18,5 (paneles D y E) o neonatos P2 (paneles F y G). Los paneles D y F son secciones a partir de animales BDNF (-/-), y los paneles E y G son secciones a partir de animales BDNF (-/-). La **c**= miocito cardíaco; **en**= célula endotelial; **e**=edema perivascular. Las barras, 0,4  $\mu\text{m}$  (paneles A, y B), 0,2  $\mu\text{m}$  (paneles C); 30  $\mu\text{m}$  (paneles D, E, F y G).

Las Figuras 4 A-F muestran la hemorragia intramiocárdica y la vascularización en embriones BDNF (-/-). Los embriones E 16,5 (paneles A y B) y los embriones E 17,5 (paneles C, D, E, y F) fueron colectados a partir de hembras BDNF (+/-), y las secciones del corazón en desarrollo fueron analizados histológicamente después de una tinción con hematoxilina y eosina. Los paneles E y F muestran los análisis inmunohistoquímicos de los vasos sanguíneos intramiocárdicos utilizando un antisuero anti-CD31 para detectar las células endoteliales dentro de las arteriolas, vénulas, y capilares de la pared ventricular. Los paneles A, C, y E son animales BDNF (+/+). Los paneles B, D, y F son animales BDNF (-/-). Las barras, 40  $\mu\text{m}$  (paneles A, B, C, y D), 20  $\mu\text{m}$  (paneles E y F).

Las Figuras 5A-J muestran la formación del septo atrial en embriones BDNF (+/+) y (-/-) a través de análisis histológico e inmunohistoquímico de la formación del septo atrial en animales BDNF en E 11,5 (paneles A y D), E 14,5 (paneles B y E), E 16,5 (paneles C y F), y PO (paneles G y H). Las secciones del septo atrial fueron tenidas con hematoxilina y eosina en animales BDNF (+/+) (paneles A, B, y C) y animales BDNF (-/-) (paneles D, E, y F). La **p**= septum primum; **s**= septum secundum. Los paneles G, H, I y J muestran el uso de análisis inmunohistoquímicos para detectar CD31) panel H), BDNF (panel I), y la quinasa que activa el trk B (panel J) para medir la expresión en la región del septo atrial de embriones BDNF (+/+) E 18,5. La preincubación de un antisuero específico para trk B con el péptido inmunizante confirma la especificidad del antisuero sobre secciones de embriones BDNF (+/+) E 18,5 (panel G). Las barras, 40  $\mu\text{m}$  (paneles A-F), 20  $\mu\text{m}$  (paneles G-J).

Las Figuras 6A-I muestran que el BDNF apoya la supervivencia de las células endoteliales de la microvasculatura cardíaca. Los paneles A y B muestran análisis por citometría de flujo de las células endoteliales de la microvasculatura cardíaca incubadas con un antisuero CD31 (panel A) o un control IgG (panel B). El 97% de las células exhibieron una reactividad al CD31 y el 1% reaccionaron con el control de IgG. El panel C muestra un análisis por RCP-RT de ARNm transcritos para el BDNF y la quinasa que activa el trk B en las células endoteliales de la microvasculatura cardíaca ("ECs") y en el cerebro de un murino maduro (B). La amplificación del BDNF (360 pb) y de las regiones del dominio de la quinasa del trk B (571 pb) es detectada en las células endoteliales cardíacas y en las muestras de cerebro maduro. Para asegurar la ausencia de contaminación con ADN, muestras de ARN fueron amplificadas utilizando cebadores sin el paso de la transcriptasa reversa y estas regiones no rindieron productos (no RT). Los paneles D, E, y F muestran el análisis por TUNEL de las células del endotelio microvascular. Los Ecs fueron cultivados en medios conteniendo 10% de suero (panel D), o en un medio conteniendo 0% de suero (paneles E y F) en presencia de BDNF (100 ng/mL) (panel F) durante 48 horas. Fueron analizadas 1 500 células por muestra y la media y desviación estándar es indicada para 4 muestras. Los resultados son representativos para los 2 experimentos realizados en cuadruplicado en los cultivos a partir de diferentes descendencias de los animales (Aumento: 20X). El panel G muestra el análisis por citometría de flujo de la unión de la anexina-V. Las células endoteliales de la microvasculatura cardíaca fueron cultivadas en las condiciones indicadas en presencia de BDNF (25 ng/mL) o VEGF (10 ng/mL) durante 48 horas antes de la incubación con la FITC-anexina V y el yoduro de propidio para la citometría de flujo de  $1 \times 10^2$  células por cada condición. Los resultados son representativos para los dos experimentos realizados en los cultivos de diferentes descendencias de animales.

Las Figuras 7A-L muestran que la sobreexpresión del BDNF en los corazones en gestación da como resultado un incremento en la densidad capilar a través de análisis de corazones de Nes-BDNF a partir de embriones E 18,5 (paneles A, C, D, G, I, y K) o de las descendencias salvajes (paneles B, E, F, H, J, y L). Los paneles A y B muestran que el análisis histológico revela una vascularidad anormal de la pared ventricular del Nes-BDNF. Los paneles C, D, E, y F muestran que la detección por inmunofluorescencia demuestra una expresión incrementada de Nes-BDNF (panel F) comparado con las descendencias salvajes (panel D). La preincubación del antisuero BDNF con el péptido inmunizante antes de la inmunofluorescencia (paneles C y E) confirma la especificidad del antisuero. La inmunofluorescencia sobre muestras pareadas fue realizada en paralelo, utilizando un antisuero secundario conjugado a FITC y reflejada mediante un seccionamiento óptico en sitios idénticos. Los resultados son representativos para aquellos observados con tres

embriones transgénicos y tres embriones tipo salvaje. Los paneles E y F muestran que la inmunoreactividad al CD31 revela una densidad aumentada de los vasos sanguíneos en embriones Nes-BDNF comparados con la descendencia tipo salvaje. La inmunoreactividad fue detectada utilizando un sustrato VIP (producto de reacción rojo). Las secciones de tejido son representativas para aquellos analizados en cuatro descendencias transgénicas y cuatro descendencias de tipo salvaje. Los paneles G y H muestran una inmunoreactividad a la  $\alpha$ -actinina, para detectar las células del músculo liso vascular, que es similar en corazones transgénicos de Nes-BDNF y en corazones de tipo salvaje. Nótese la positividad de los grandes vasos sanguíneos en la sección del tipo salvaje, pero la ausencia de reactividad de los capilares en embriones de tipo salvaje y de embriones Nes-BDNF. Los paneles I y J muestran la inmunoreactividad al PCNA en secciones de corazones del tipo salvaje y de corazones Nes-BDNF. Los paneles G-H muestran que los resultados son representativos para aquellos analizados en cuatro descendencias transgénicas y cuatro descendencias de tipo salvaje. Las barras, 15  $\mu$ m (paneles A, y B), 100  $\mu$ m (paneles C-F); 40  $\mu$ m (paneles G-L).

Las Figuras 8A-E muestran un análisis en bloque de Matrigel conteniendo factores de crecimiento recombinantes. El Matrigel conteniendo 50 ng/mL del factor de crecimiento indicado, o sin adición del factor de crecimiento (control), fue inyectado subcutáneamente en la región del *rectus abdominus* de ratones de 6 semanas de edad. Después de 14 días, los animales fueron sacrificados, y el tapón de matrigel fue visualizado después de la disección de la pared abdominal anterior (aumento 10X).

Las Figuras 9A-D muestran análisis histológico de secciones de Matrigel conteniendo el factor de crecimiento indicado (a 50 ng/mL) o sin un factor de crecimiento adicional (control); Después de la fijación con paraformaldehído, el tejido embebido en parafina fue seccionado a 10 micrómetros, y procesado con una tinción de hematoxilina y eosina. Un mínimo de 7 mm de tejido fue analizado en análisis de secciones seriadas y secciones representativas fueron fotografiadas a los aumentos indicados (paneles de la izquierda: 40X; paneles de la derecha: 160X).

Las Figuras 10A-F muestran el análisis histológico de secciones de Matrigel conteniendo el factor de crecimiento indicado (a 50 ng/mL) o sin un factor de crecimiento adicional (control); Después de la fijación con paraformaldehído, el tejido embebido en parafina fue seccionado a 10 micrómetros, y procesado con una tinción de hematoxilina y eosina. Un mínimo de 7 mm de tejido fue analizado en análisis por secciones seriadas y secciones representativas fueron fotografiadas a los aumentos indicados (paneles de la izquierda: 40X; paneles de la derecha: 160X).

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de un ligando del receptor trk seleccionado entre el grupo que consta de BDNF, NT-3, y NT-4, o una molécula que codifica para dicho ligando del receptor trk, en la preparación de un medicamento para la inducción de la angiogénesis mediante la liberación del ligando del receptor trk o de una molécula de ácido nucleico en una cantidad eficaz para inducir la angiogénesis.

En una realización preferente, el ligando del receptor trk es un ligando del receptor trk B.

En otra realización preferente el ligando del receptor trk es un ligando del receptor trk C.

Como es utilizado en el presente documento, los ligandos a trk incluyen proteínas o polipéptidos y fragmentos de éstos, incluyendo las neurotrofinas nativas y mutantes de estos, pequeñas moléculas químicas, moléculas recombinantes, y moléculas quiméricas las cuales interactúan con receptores trk activados. Los ligandos a los receptores trk quiméricos incluyen neurotrofinas mutadas las cuales son capaces de activar más de un receptor trk (ver, e.g., Urfer *et al.*, "Specificity Determinant in Neurotrophin-3 and Design of Nerve Growth Factor-Based trk C Agonists by Changing Central Beta-Strand Bundle Residues to Their Neurotrophin-3 Analogs," *Biochemistry* 36:4775-4781 (1997); Ilag *et al.*, "Pan-Neurotrophin 1: A Genetically Engineered Neurotrophic Factor Displaying Multiple Specificities in Peripheral Neurons *in vitro* and *in vivo*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 607-611 (1995)).

Los ligandos al receptor trk de la presente invención son factores neurotróficos derivados del cerebro ("BDNF", por sus siglas en inglés), el NT-3 y el NT-4.

El BDNF, es la neurotrofina mejor caracterizada para su supervivencia y para los efectos diferenciales sobre las neuronas que expresan la quinasa del receptor trk B. Una expresión deficiente de BDNF no afecta el ensamblaje o configuración de las células endoteliales en los vasos sanguíneos intramiocárdicos, pero deteriora sus supervivencias. La deficiencia de BDNF induce la apoptosis de las células endoteliales, conduciendo a una hemorragia de la pared intraventricular, una contractilidad cardíaca deprimida, y una muerte postnatal temprana. A diferencia, la sobreexpresión de BDNF ectópico está asociada con una incrementada densidad capilar y una supervivencia incrementada de las células endoteliales de la microvasculatura cardíaca. Por ende, la expresión de BDNF es requerida para la estabilización de los vasos sanguíneos intramiocárdicos durante la embriogénesis tardía, a través de acciones directas sobre las células endoteliales.

El NT-3 es un miembro de la familia de neurotrofinas y exhibe una homología significativa con el NGF y el BDNF ((Hohn *et al.*, "Identification and Characterization of a Novel Member of the Nerve Growth Factor/Brain-Derived Neurotrophic Factor Family", *Nature* 334: 339-341 (1990)). El NT-3 media sus acciones sobre las neuronas que expresan el trk C, y su rol en la promoción de la supervivencia de las subclases de neuronas sensoriales y neuronas simpáticas ha sido establecido durante el desarrollo del sistema de nervios periféricos a través de análisis de genes marcados

en ratones (Snider, "Functions of the Neurotrophins During Nervous System Development: What the Knockouts are Teaching Us", *Cell* 77: 627-638 (1994)). El NT-3 es altamente expresado por los capilares en los corazones de ratones maduros (ver Figura 1). Además, el NT-3 promueve la angiogénesis en un ensayo con Matrigel (ver Ejemplo 14, más abajo).

El NT-4 es el miembro más divergente de las neurotrofinas y, a diferencia con otras neurotrofinas, su expresión es ubicua y menos influenciada por las señales ambientales (). Comparte sus dos receptores (trk b y p75) con otros miembros de la familia de neurotrofinas, e.g., el BDNF. Id. La evidencia sugiere que el nivel de ARN m del NT-4 en el músculo esquelético es controlado por la actividad muscular y que el NT-4 derivado del músculo es una señal neurotrófica dependiente de actividad para el crecimiento y la remodelación de la innervación de la neurona motora adulta, y puede por ende ser parcialmente responsable de los efectos de la simulación de ejercicio y eléctrica sobre el rendimiento neuromuscular. Id. EL ARNm del NT-4 es expresado a niveles significativos en el corazón embrionario, pero cae a niveles indetectables en el corazón maduro ((Ibáñez, "Neurotrophin-4: The Odd One Out in the Neurotrophin Family". *Neurochemical Research*, 21: 787-793 (1996)). Sin embargo, el NT-4 es tan potente como el VEGF en promover la formación de las redes vasculares en un ensayo *in vivo* con Matrigel (ver Ejemplo 14, más abajo).

El ligando del receptor trk puede ser empleado según la presente invención para la expresión de dicho ligando del receptor trk *in vivo*, lo cual es con frecuencia referido como "terapia de genes".

Los genes que codifican para el ligando del receptor trk y las proteínas o polipéptidos derivados de éstos son conocidos en la técnica, así como los métodos para producir dichas proteínas o polipéptidos, e.g., recombinantemente (Patente de los EE.UU. No. 5.180.820 de Barde *et al.*, Patente de los EE.UU. No. 5.438.121 de Barde *et al* Patente de los EE.UU. No. 453.361 de Yancopoulos *et al.*; Patente de los EE.UU. No. 5.770.577 de Kinstler *et al.*; Patente de los EE.UU. No. 5.235.043 de Collins *et al.*; Enfors *et al.*, "Molecular Cloning and Neurotrophic Activities of a Protein with Structural Similarities to Nerve Growth Factor: Developmental and Topographical Expression in the Brain", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5454-5458 (1990); John *et al.*, "Identification and Characterization of a Novel Member of the Nerve Growth Factor/Brain-Derived Neurotrophic Family", *Nature* 344: 339-341 (1990); Jones *et al.*, "Molecular Cloning of a Human Gene that is a Member of the Nerve Growth Factor Family", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8060-8064 (1990); Maisonnier *et al.*, "Neurotrophin-3: A Neurotrophic Factor Related to NGF and BDNF", *Science* 24: 1446-1451 (1990); y Rosenthal *et al.*, "Primary Structure and Biological Activity of a Novel Human Neurotrophic Factor", *Neuron* 4: 767-773 (1990); Fandl *et al.*, "Characterization and Crystallization of Recombinant Human Neurotrophin-4", *J. Biol. Chem.* 269:755-759 (1994); Ibanez *et al.*, "Neurotrophin-4 is a Target-Derived Neurotrophic Factor For Neurons of the Trigeminal Ganglion", *Development* 117: 1345-1353 (1993); Ip *et al.*, "Mammalian Neurotrophin-4: Structure, Chromosomal Localization, Tissue Distribution, and Receptor Specificity", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3060-3064 (1992); Hallbrook *et al.*, "Evolutionary Studies of the Nerve Growth Factor Family Reveal A Novel Member Abundantly Expressed in Xenopus Ovary", *Neuron* 6: 845-858 (1991)).

Las células pueden ser manipuladas genéticamente mediante procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo el uso de partículas retrovirales que contienen ARN que codifica para el ligando del receptor trk de la presente invención. Similarmente, las células pueden ser manipuladas genéticamente *in vivo* para la expresión *in vivo* del ligando del receptor trk mediante procedimientos conocidos en la técnica. Como es conocido en la técnica, por ejemplo, una célula productora que comprende una partícula retroviral conteniendo ARN que codifica para el ligando del receptor trk de la presente invención puede ser administrado a un paciente para la expresión *in vivo* del ligando del receptor trk. Este y otros métodos para la administración del ligando del receptor trk de la presente invención deben ser evidentes para aquellos expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de la presente invención.

La construcción de vehículos y vectores apropiados de expresión para las aplicaciones de la terapia de genes dependerán en base al órgano a ser tratado y al propósito de la terapia de genes. La selección de promotores apropiados y otros reguladores de ADN procederá según los principios conocidos, basados en una variedad de técnicas de terapia de genes conocidas. Por ejemplo la transferencia de genes mediada por un retrovirus es un método muy efectivo para la terapia de genes, como sistemas que utilizan el empaquetamiento de virus defectuosos que permiten la producción de recombinantes los cuales son infecciosos solo una vez, evitando de este modo la introducción de un virus tipo salvaje dentro de un organismo. Metodologías alternativas de la terapia de genes incluyen métodos de transferencias no virales, como la coprecipitación con fosfato de calcio, técnica mecánica, por ejemplo la microinyección, fusión a membrana mediada por la transferencia de liposomas, así como la toma de ADN directo y la transferencia de ADN mediada por receptor.

Los vectores virales los cuales pueden ser utilizados para producir una integración estable de la información genética dentro del genoma de la célula del hospedero incluyen los adenovirus, vectores de virus asociados con adenovirus (AAV) ((Flotte *et al.*, *Gene Ther.*, 2: 29-37 (1995); Zeitlin *et al.*, *Gene Ther.*, 2: 623-31 (1995); Baudard *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 7: 1309-22 (1996)), and retrovirus. For a review of retrovirus vectors, see Austin, *Gene Ther.*, 1 Suppl 1): S6-9 (1994) and Eglitis, *Blood*, 71: 717-22 (1988). Otros vectores virales son derivados de los herpesvirus, etc.

Los retrovirus son virus de ARN los cuales son útiles para la incorporación estable de la información genética dentro del genoma de la célula del hospedero. Cuando ellos infectan a las células, sus genomas de ARN son convertidos a una forma de ADN (mediante la enzima viral transcriptasa reversa). El ADN viral es integrado eficientemente al genoma del hospedero, donde reside permanentemente, replicándose con el ADN del hospedero en cada división

celular, Este provirus integrado produce ARN viral constantemente a partir de un promotor fuerte localizado al final del genoma (en una secuencia denominada repetición terminal larga o LTR). Este ARN viral sirve tanto como un ARNm para la producción de proteínas virales y como ARN genómico para nuevos virus. Los virus son ensamblados en el citoplasma y envueltos a partir de la membrana celular, generalmente con poco efecto en la integridad de la célula. De este modo, el genoma de los retrovirus se convierte en una parte permanente del genoma de la célula del hospedero, y cualquier gen foráneo colocado en un retrovirus debería ser expresado en las células indefinidamente.

Los retrovirus son por tanto vectores atractivos, ya que pueden expresar permanentemente en las células un gen foráneo. Por otra parte, pueden infectar virtualmente cualquier tipo de célula mamífera, haciéndolos a ellos excepcionalmente en su versatilidad. En el diseño y uso de vectores retrovirales, los vectores contienen generalmente un marcador seleccionable, así como el gen foráneo a ser expresado. La mayoría de los genes estructurales virales están ausentes, por lo que estos vectores no pueden replicarse como virus por ellos mismos. Para preparar las cepas virales, el ADN proviral clonado es transfectado a una célula empaquetada. Estas células contienen generalmente un provirus integrado con todos sus genes intactos, pero carecen de la secuencia reconocida por el aparato de empaquetamiento. De este modo, el provirus empaquetado produce todas sus proteínas requeridas para el empaquetamiento del ARN viral dentro de partículas virales infecciosas pero no puede empaquetar por ella misma su ARN. El sistema de empaquetamiento puede permitir el uso de una variedad de envolturas virales para alterar el tropismo viral, y la capacidad para infectar a las células humanas. Ejemplos incluyen los vectores retrovirales que utilizan una envoltura anfotrópica, como el VIH-1/2, SIV, virus de la leucemia del Gibon ("GALV", de sus siglas en inglés). Los sistemas de empaquetamiento del vector y/o estabilidad pueden ser derivados de varias fuentes como el MoMuLV, o incluso de lentivirus como el HIV-1, SIV, etc. El ARN transcrito a partir del vector transfectado es empaquetado dentro de partículas virales infecciosas y liberadas de la célula. La cepa del virus resultante es denominada libre de virus auxiliar, debido a que carece del componente del virus para la replicación del tipo salvaje. La cepa viral puede ser utilizada para infectar a un cultivo celular diana. El genoma recombinante es introducido eficientemente, transcrito por la transcriptasa reversa a ADN (mediante la transcriptasa reversa depositada en el virus por las células empaquetadas), e integrado al genoma. De este modo, la célula expresa ahora el nuevo gen viral introducido, pero no puede producir nunca cualquier virus, ya que el genoma del virus recombinante carece de los genes virales necesarios.

La invención, por ende, proporciona para la expresión *in vivo* los ligandos del receptor trk mediante métodos que incluyen los vectores virales los cuales portan los ácidos nucleicos que codifican para el ligando del receptor trk.

Preferiblemente, el ligando del receptor trk es liberado en cualquier sistema de ensayo, muestra u órgano diana.

Para la inducción de la angiogénesis y la promoción de la supervivencia vascular, la liberación de una cantidad eficaz de un ligando del receptor trk incluye la liberación de concentraciones nanomolares del ligando al sitio diana, como fue descrito para la administración de VEGF (ver, e.g., Mack *et al.*, "Biologic Bypass With the Use of Adenovirus-Mediated Gene Transfer of the Complementary Deoxyribonucleic Acid for Vascular Endothelial Growth Factor 121 Improves Myocardial Perfusion and Function in the Ischemic Porcine Heart", *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 115:168-176 (1998); Magovern *et al.*, "Direct *in vivo* gene Transfer to Canine Myocardium Using a Replication-Deficient Adenovirus Vector", *Ann. Thorac. Surg.* 62:425-433 (1996); Symes *et al.*, "Gene Therapy with Vascular Endothelial Growth Factor for Inoperable Coronary Artery Disease", *Ann. Thorac. Surg.* 68:830-836 (1999); Losordo *et al.*, "Gene Therapy for Myocardial Angiogenesis", *Am. Heart J.* 138 (2, Pt. 2):132-141 (1999); Losordo *et al.*, "Gene Therapy for Myocardial Angiogenesis: Initial Clinical Results With Direct Myocardial Injection of phVEGF165 as Sole Therapy for Myocardial Ischemia", *Circulation* 98: 2800-2804 (1998)). Para la liberación del gen, una cantidad eficaz es suficiente para las cantidades del vector que aseguran la síntesis de las concentraciones nanomolares del ligando de proteína o polipéptido en el sitio diana.

Según la presente invención, el medicamento comprende el ligando del receptor trk, o una molécula de ácido nucleico que codifica para dichos ligandos al trk, la cual es conveniente para la administración *in vivo* oralmente, intravenosamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, subcutáneamente, mediante instilación intranasal, mediante la aplicación a membranas mucosas, como por ejemplo, en la nariz, garganta, y tubos bronquiales, intracerebralmente, dentro del fluido espinal cerebral, o mediante la instilación dentro de las paredes de órganos huecos o de nuevos vasos sanguíneos vascularizados. Puede ser administrada sola o con portadores fisiológicamente o farmacéuticamente aceptables, excipientes, o estabilizadores, y puede estar en forma sólida o líquida como, tabletas, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, o emulsiones.

Las formas sólidas de unidad de dosis pueden ser del tipo convencional. La forma sólida puede ser una cápsula, como un tipo de gelatina ordinaria conteniendo el ligando del receptor trk de la presente invención y un portador, por ejemplo, lubricantes y materiales de sellado inertes como la lactosa, sacarosa, o el almidón del maíz. En otra realización, estos compuestos son entabletados con bases de tableta convencional como la lactosa, sacarosa, o almidón del maíz en combinación con adhesivos tipo de la acacia, almidón del maíz, o gelatina, agentes desintegrantes, como el almidón del maíz, almidón de papa, o el ácido algínico, y un lubricante, como el ácido esteárico o el estereato de magnesio.

Según la presente invención, el medicamento comprende el ligando del receptor trk o la molécula de ácido nucleico que codifica para dicho ligando al trk, que es conveniente para la administración en dosis inyectables por solución o suspensión de los ligandos al trk o de la molécula de ácido nucleico en un disolvente farmacéuticamente aceptable con un portador farmacéutico. Dichos portadores incluyen líquidos estériles, como el agua y aceites, con o sin la adición de

un surfactante y otro portador farmacéuticamente y fisiológicamente aceptables, incluyendo adyuvantes, excipientes o estabilizadores. Los aceites, son los de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, el aceite de maní, aceite de soya, o aceite mineral. En general, el agua, solución salina, dextrosa acuosa y la solución de alguna azúcar relacionada, y los glicoles, como el propilenglicol o el polietilenglicol, son portadores líquidos preferentes, particularmente para soluciones inyectables.

Para el uso como aerosoles, el ligando-receptor trk de la presente invención en solución o suspensión puede ser empaquetado en un contenedor de aerosol presurizado junto a propelentes convenientes, por ejemplo, propelentes hidrocarburos como el propano, butano, o el isobutano con adyuvantes convenientes. El ligando del receptor trk de la presente invención puede ser también administrado en una forma no presurizada como por un nebulizador o atomizador.

En particular, la presente invención se refiere al uso de un ligando del receptor trk seleccionado entre el grupo que consta de BDNF, NT-3 y NT-4, o una molécula de ácido nucleico que codifica para dicho ligando del receptor trk, en la preparación de un medicamento para el tratamiento en un paciente de un desorden patológico como es definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-5 mediante la administración del ligando del receptor trk o de la molécula de ácido nucleico en una cantidad eficaz para tratar el desorden patológico mediante la inducción de la angiogénesis en la manera descrita anteriormente.

En una realización, el desorden patológico es una isquemia cardiaca. La isquemia cardiaca incluye desórdenes cerebrovasculares causados por la circulación cerebral insuficiente. El trombo o émbolo debido a un desorden aterosclerótico o de otro tipo (e.g., arteritis, enfermedad cardiaca reumática), causa comúnmente una obstrucción arterial isquémica.

En otra realización, el desorden patológico es un desorden vascular no cardiaco que incluye la aterosclerosis, enfermedad vascular renal, y la apoplejía.

En otra realización adicional, el desorden patológico es una herida. Dichas heridas incluyen, pero no están limitadas a, úlceras venosas crónicas, complicaciones diabéticas, complicaciones e la enfermedad siclémica, talasemia y otros desordenes de la hemoglobina, y heridas posquirúrgicas.

En una posterior realización, el desorden patológico es una condición de la insuficiencia placentaria. Dichas condiciones incluyen, pero no están limitadas a, retardo del crecimiento intrauterino.

En una realización todavía posterior, el desorden patológico es un tejido no vascularizado relacionado a injertos y transplantes (ver, e.g., Solicitud Internacional PCT No. WO 99/06073 de Isner).

La presente invención comprende el uso de un ligando del receptor trk en la preparación de un medicamento para promover el crecimiento o estabilización de los vasos sanguíneos mediante la liberación de una cantidad eficaz del ligando del receptor trk o de la molécula de ácido nucleico en una cantidad eficaz para promover el crecimiento o estabilización de los vasos sanguíneos en la forma descrita anteriormente.

La presente invención comprende el uso de un ligando del receptor de trk en la preparación de un medicamento para tratar un un desorden patológico en un paciente como se define en cualquiera de las Reivindicaciones 1-5, mediante la administración del ligando del receptor de trk o la molécula de ácido nucleico en una cantidad efectiva para tratar el desorden patológico promoviendo el crecimiento o la estabilización de los vasos sanguíneos de la forma descrita anteriormente.

En una realización preferente, el desorden patológico se relaciona a la apoptosis o necrosis de células endoteliales. Un ejemplo de esto como desorden patológico es la vasculitis.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Ratones mutantes al BDNF

Ratones BDNF (+/-) heterocigóticos (Ernfors *et al.*, "Mice Lacking Brain-Derived Neurotrophic Factor Develop with Sensory Defects", *Nature*, 368:147-150, (1994)), (cepas BDNF<sup>tmJae</sup> y C5713L/6J cruzadas con BDNF<sup>tm1Jae</sup> fueron obtenidas de los laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME), y fueron inter cruzadas con apareamientos hermano/hermana para el análisis de los embriones. La mañana de la detección de un tapón vaginal fue considerado al día 0,5, y la edad gestacional fue asignada. A la hora de la colección de los embriones, criterios morfológicos fueron utilizados en la asignación del desarrollo de la edad. Los criterios de Key- incluidos el crecimiento de las extremidades, desarrollo del ojo y oído, y la longitud y peso de la cabeza-grupa (Kaufman, "The Atlas of Mouse Development", *Academic Press, Inc.* San Diego (1992)). El genotipo de cada embrión o ratón recién nacido fue determinado mediante el análisis del ADN derivado de la cabeza utilizando la amplificación del RCP con secuencias de cebadores descritas por Ernfors *et al.*, "Mice Lacking Brain-Derived Neurotrophic Factor Develop with Sensory Deficits", *Nature* 368: 147-150 (1994).

Los ratones fueron sacrificados y los cuerpos fijados inmediatamente en paraformaldehído al 3% en salina tamponada con fosfato durante 18 horas, y los contenidos de la cavidad torácica fueron diseccionados *en bloc*. Los tejidos fueron embebidos en parafina para los análisis histológicos. Los tejidos utilizados para la inmunohistoquímica fueron infiltrados con sacarosa/OCT al 30%. Los cuerpos de los embriones de edad gestacional E 14,5 o menor a este fueron embebidos sin una disección anterior. Secciones de 10 micrómetros fueron teñidas utilizando hematoxilina y eosina como fue descrito por Donovan *et al.*, “Neurotrophins-3 is Required for Mammalian Cardiac Development Identification of an Essential Nonneuronal Neurotrophin Function”. *Nature Genetics* 14: 210-213 (1996)). Para el análisis por microscopía electrónica, los corazones fueron removidos inmediatamente de los ratones recién nacidos sacrificados por decapitación, y fijados mediante la fijación de Karnovsky (glutaraldehído al 2% paraformaldehído en un tampón de cacodilato) durante 18 horas antes de embeberse en Epon. Los tejidos fueron seccionados a 1 micrómetro y teñidos con azul de toluidina para una evaluación inicial y después fueron cortadas secciones ultrafinas con una cuchilla de diamante, contrateñidas con citrato de plomo, y vistas en un microscopio electrónico.

## Ejemplo 2

### *Análisis Inmunohistoquímico*

Un anticuerpo monoclonal específico para la  $\alpha$ -actinina 1E12 (sobrenadante no diluido del monoclonal) fue utilizado para la detección de las células del músculo liso vascular. Un anticuerpo específico PECAM-1 biotinilado para el CD 31 (dilución 1:100, clon MEC 13,3, Pharmingen, San Diego, CA) fue utilizado para detectar las células endoteliales y el anticuerpo monoclonal dc101 (Imclone, New York, NY), fue utilizado para detectar el flk-1. Un antisuero policlonal específico para el BDNF, NT-3, NT-4 (sc-546, sc-547, sc-545, respectivamente, dilución 1:50-1:500, Santa Cruz Immunochemicals, Santa Cruz, California) o la quinasa que activa el trk B (sc-12-G, dilución 1:100 Santa Cruz Immunochemicals, Santa Cruz, California) fueron utilizados sobre tejidos los cuales habían sido separados en congelación sobre vapor de nitrógeno líquido y seccionados sobre un criostato. La especificidad del antisuero a la neurotrofina ha sido previamente confirmada por la ausencia de tinción de los tejidos neuronales a partir de genes dianas marcados en ratones. Además, la preincubación del antisuero policlonal con el péptido inmunizante fue utilizada para confirmar la especificidad del anticuerpo. Las secciones fueron tratadas con peróxido de hidrógeno al 0,1% antes de la incubación con el anticuerpo primario, y la señal de amplificación utilizó el método del complejo de la peroxidasa de rábano biotinilada: avidina (ABC Vectastain, Vector Labs, Burlingame, CA). El procedimiento de TUNEL fue realizado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Boehringer Mannheim, Chicago, IL) utilizando secciones congeladas. La microscopía de inmunofluorescencia variante doble fue realizada utilizando un microscopio Zeiss Axioskop (Thornwood, NY), o un microscopio confocal Zeiss (Thornwood, NY), para generar secciones ópticas de 0,5 micrómetros.

## Ejemplo 3

### *Generación de ratones NesPIXpBDNF*

La generación de ratones transgénicos ha sido descrita (Ringstedt *et al.*, “BDNF Regulates Reelin Expression and Cajal Retzius Cell Development on the Cerebral Cortex”, *Neuron* 21: 299-310 (1998)). Brevemente, la construcción del Nes PIX-pBDNF consistió de una región de extensión 5,8 kb corriente arriba a partir del codón de iniciación del gen de la nestina de ratón seguido por un fragmento de 1kb a partir del quinto exón de un intervalo del gen de ratón conteniendo la secuencia completa que codifica para la proteína BDNF, una señal de poliadenilación SV40 de 300 pb de longitud, y 5,4 kb de la secuencia corriente abajo del gen de la nestina incluyendo los intrones 1, 2 y 3. La construcción fue inyectada a oocitos fertilizados de ratones los cuales fueron transplantados subsiguientemente a hembras pseudopreñadas. Los embriones fueron colectados en E 17,5-E 18,5 de madres en estado de gestación, y que fueron decapitadas, y los contenidos torácicos fueron diseccionados y fijados sea en paraformaldehído al 4% antes de embeberse en parafina, o separados por congelación por nitrógeno líquido antes de la disección por congelación. El tejido de la cabeza fue utilizado para el genotipado utilizando la RCP como fue descrito (Ringstedt *et al.*, “BDNF Regulates Reelin Expression and Cajal-Retzius Cell Development on the Cerebral Cortex”, *Neuron* 21: 299-310 (1998)).

## Ejemplo 4

### *Conteo capilar*

La inmunohistoquímica fue realizada en secciones de corazón utilizando el antisuero anti-CD-31 biotinilado el cual detecta todas las células endoteliales vasculares (Gerber *et al.*, “VEGF is Required for Growth and Survival in Neonatal Mice”, *Development* 126:1149-1159 (1999)). Las secciones inmunoteñidas fueron fotografiadas a 400X, y las imágenes fueron importadas y analizadas utilizando una imagen NTH. Las regiones subepicárdicas fueron seleccionadas aleatoriamente y el área de inmunoreactividad fue cuantificada y expresada como un porcentaje del total del área analizada. Tres campos independientes fueron contados a partir de cada sección de corazón obtenida, utilizando tejido de tres descendencias transgénicas y tres descendencias tipo salvaje.

## Ejemplo 5

*Cultivo celular*

Las células del endotelio microvascular fueron aisladas de los corazones de ratones C57/B1 en el día postnatal 2-4 según los protocolos establecidos (Lodge *et al.*, "A Simple Method of Vascular Endothelial Cell Isolation", *Transplantation Proceedings* 24: 2816-2817 (1992)). En resumen, los corazones picados fueron digeridos con colagenasa y DNasa 1, y las células plaqueadas en placas cubiertas de gelatina. Las células endoteliales fueron liberadas mediante una breve tripsinización después de 48 horas en cultivo, y mantenidas sobre placas cubiertas de gelatina en un medio DMEM/F12 conteniendo 5% de suero fetal bovino, 0,1% de suero de ratón, insulina, transferrina, y selenio (1:100, Gibco, Rockville, MD) y utilizado en los pasajes 1 y 2. Utilizando este procedimiento, fueron aisladas aproximadamente  $0,5-1 \times 10^6$  células a partir de 20 corazones neonatales, y la pureza de la célula fue cuantificada utilizando una unión de LDL acetilado y la expresión de CD-21 fue medida por análisis por citometría de flujo como fue descrito (Bergers *et al.*, "Effects of Angiogenesis Inhibitors on Multistage Carcinogenesis in Mice", *Science* 284: 808-812 (1999)). Para el análisis por TUNEL,  $4 \times 10^2$  células/cm<sup>2</sup> fueron plaqueadas sobre la cubierta de gelatina. Las láminas permanox (Nalgene Nunc, Naperville, IL) fueron cultivadas como está anteriormente indicado durante 24 horas. Las células fueron lavadas y realimentadas con X-vivo conteniendo 0% de suero  $\pm$  factor de crecimiento indicado, o en X-vivo 20 (Biowhittaker, Walkersville, MD) conteniendo 10% de suero durante 48 horas antes de la fijación y el ensayo de TUNEL. Fueron contadas 1 500 células en cada pocillo para la positividad por TUNEL. Para la medición de la unión de la anexina V, las células fueron sembradas sobre una cubierta de gelatina y cultivadas como fue indicado anteriormente con la adición de 1 nl/mL de bFGF al medio. Después de 24 horas, las células fueron lavadas, y realimentadas con X-vivo 20 conteniendo 0% de suero y factores de crecimiento adicionales como fue indicado, o X-vivo 20 conteniendo 10% de suero. Después de 48 horas, fueron generadas las suspensiones celulares utilizando PBS/EDTA, lavadas en suero libre de DMEM y la unión a la anexina V fue determinada por la incubación de las células con Anexina V conjugada a Fits (Immunotech, Miami, FL) en DME conteniendo 1,5 mM de Ca<sup>2+</sup> sobre hielo durante diez minutos. Después del lavado para remover la anexina V no unida, las células fueron incubadas con yoduro de propidio y las muestras de células fueron analizadas por citometría de flujo utilizando un Sistema Coulter Elite (Miami, FL).

## Ejemplo 6

30

*RCP-RT*

El ARN total fue extraído de las células endoteliales microvasculares (pasajes 4-5) y del cerebro murino maduro como fue descrito (Chomczynski *et al.*, "Single-step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction", *Anal Biochem* 162: 156-159 (1987)). Un microgramo del ARN total, fue sujeto a la transcripción reversa utilizando una transcriptasa del virus de la leucemia murina (Perkin-Elmer, Brauchburg, NJ). El ARN total no incubado con la transcriptasa reversa fue utilizado como control negativo. La RCP-RT fue realizada utilizando secuencias de cebadores del BDNF o del trk B truncado como fue descrito (Labouyrie *et al.*, "Expression of Neurotrophins and their Receptors in Human Bone Marrow", *Am. J. Pathol.* 154: 405-415 (1999)). Las secuencias del cebador para la quinasa que activa al trk B fueron modificadas por Labourie *et al.*, "Expression of Neurotrophins and their Receptors in Human Bone Marrow"; *Am. J. Pathol.* 154: 405-415 (1999), para reflejar el uso del codón en la secuencia murina. Los productos de la RCP fueron resueltos mediante electroforesis en geles de acrilamida al 7%, seguido por una visualización con bromuro de etidio.

## Ejemplo 7

*Imagen ecocardiográfica*

A las 48 horas de nacimiento, todos los animales fueron sujetos a una imagen sonográfica en una descendencia en una forma a ciegas. Los animales fueron vistos mediante la colocación de una sonda Scimed de 40 MHz a la coronaria (Boston Scientific Scimed, Minneapolis, MN) en geles calientes sobre la cámara anterior del pecho, utilizando un sistema Clear View Ultra Boston Scientific (model 15006, Minneapolis, MN) con un análisis de imágenes en tiempo real. Las imágenes del eje menor y del eje mayor del corazón fueron identificadas, y las imágenes procedieron de un mínimo de cuatro minutos por animal. La tasa cardiaca, las dimensiones de la cámara, y el movimiento de la pared fue determinada en cada animal mediante análisis de las imágenes grabadas, utilizando el sistema de análisis Diagnostic Off-line (Diagnostics, Inc., Houston, TX). Los animales fueron sacrificados mediante análisis genotípico e histológico a las 4 horas de imagen.

## Ejemplo 8

60

*BDNF y trk B expresados por los vasos sanguíneos en los corazones de roedores embrionarios y maduros*

La expresión del BDNF y las neurotrofinas relacionadas en corazones maduros de roedores no isquémicos y sin heridas fue medida inmunohistoquímicamente. El BDNF es expresado por las células endoteliales que recubren las arterias y arteriolas musculares y una proporción de los capilares intramiocárdicos (Figura 1A), mientras que la neurotrofina relacionada, NT-3, es expresada mayormente por los capilares en el corazón maduro del roedor (Figura 18). Estudios previos han demostrado que el ARNm del NT-4 es expresado en niveles significativos en el corazón embrionario de la rata pero cae a niveles indetectables en el corazón maduro del roedor (Timmusk *et al.*, "Widespread

and Developmentally Regulated Expression of Neurotrophin-4 mRNA in Rat Brain and Peripheral Tissues”, *Eur. J. Neurosci* 5: 605-613 (1993)), y son consistentes con una incapacidad para detectar la proteína NT-4 en secciones del corazón maduro en el roedor (Figura 1C). En el corazón gestacional tardío del roedor, el BDNF y la quinasa que activa la isoforma del trk B son localizados en los vasos sanguíneos intramiocárdicos (Figuras 1D, E, y el control (Figura 1F)). Utilizando una inmunofluorescencia doble y un microscopio confocal, el BDNF y el trk B se colocan con el marcador endotelial, CD 31 (PECAM), sugiriendo que las células endoteliales expresan tanto el receptor como el ligando en el corazón maduro (Figuras 1G y H) y en una gestación tardía en el día embrionario E 18,5 (Figuras 1I y J). Los patrones similares de expresión del BDNF y el trk B con el CD 31 sugieren que el BDNF y el trk B se colocan en las arterias intramiocárdicas en desarrollo en la gestación tardía, y la expresión de este sistema ligando:receptor por los vasos sanguíneos intramiocárdicos persisten hasta la adultez.

## Ejemplo 9

### *Defectos vasculares en ratones BDNF (-/-)*

Para determinar si el BDNF realiza un rol crítico en el desarrollo vascular o cardíaco en mamíferos, fueron examinados los corazones de ratones con una delección marcada del gen BDNF. Los ratones mutantes nulos BDNF (-/-) exhiben una bien caracterizada pérdida en los trk que expresan las neuronas sensoriales periféricas que regulan el ritmo respiratorio, y en las neuronas de Purkinje (Jones *et al.*, “Targeted Disruption of the BDNF Gene Perturbs Brain and Sensory Neuron Development but not Motor Neuron Development”, *Cell* 76: 989-999 (1994); Ernfors *et al.*, “Mice Lacking Brain-Derived Neurotrophic Factor Develop with Sensory Deficits”, *Nature* 368: 147-150 (1994); Erickson *et al.*, “Mice Lacking Brain-Derived Neurotrophic Factor Exhibit Visceral Sensory Neuron Losses Distinct from Mice Lacking NT4 and Display a Severe Developmental Deficit in Control of Breathing”, *J. Neurosci* 16: 5361-5371 (1996); Schwartz *et al.*, “Abnormal Cerebellar Development and Foliation in the BDNF (-/-) Mice Reveals a Role for Neurotrophins in CNS Patterning”, *Neuron* 19: 269-281 (1997)). La mayoría de los cachorros BDNF (-/-) mueren a los 1-4 días de nacimiento, aunque aproximadamente el 10% de los animales sobreviven por una a dos semanas, con un peso corporal reducido marcadamente, y movimientos espontáneos defectuosos, un fenómeno que sugiere defectos potenciales en el desarrollo cardiovascular. Por el examen grosero de los ratones BDNF (-/-) en el día postnatal 0 (PO), la talla del corazón y las relaciones anatómicas del corazón y de los grandes vasos sanguíneos no parecían notables. De los animales examinados, 14 de 15 BDNF (-/-), sin embargo, exhibieron una hemorragia intramiocárdica, la cual varió de áreas focales dentro de la pared ventricular izquierda hasta una hemorragia difusa dentro de las paredes de ambos ventrículos y en la base del atrio (Figuras 2B y D, compárese con las Figuras 2A y C). La hemorragia intramiocárdica estuvo confinada típicamente a las regiones más epicárdicas de las paredes ventriculares, y fue raramente observada en el septum intraventricular.

Debido a que el BDNF y el trk B son expresados por la gestación tardía en los vasos sanguíneos intramiocárdicos maduros, los defectos potenciales fueron medidos en la morfogénesis de los vasos sanguíneos en animales BDNF (-/-) mediante análisis ultraestructural. Anormalidades en la morfología de las arteriolas intramiocárdicas (15 de 18 vasos sanguíneos examinados) fueron detectadas en animales BDNF (-/-), comparados con la descendencia (+/+) (16 vasos sanguíneos examinados). Estas incluyeron hipertrofia y vacuolización anormal de las células endoteliales (15 de 18 vasos sanguíneos), edema perivascular (9 de 18 vasos sanguíneos), y una reducción modesta en el número de pericitos y de células del músculo liso vascular en la túnica media (10 de 18 vasos sanguíneos) (Figura 2F, compárese con la Figura 2E). Las vénulas intramiocárdicas tanto en ratones, BDNF (-/-) (6 vasos sanguíneos examinados) y en animales BDNF (+/+) (5 vasos sanguíneos examinados), no parecían notables (Figuras 2H, compárese con la Figura 2G). Mediante análisis con microscopía electrónica, las células endoteliales dentro de las arteriolas y capilares parecían alargadas degeneradas localmente, con un citoplasma vacuolado y prominentes vesículas en la membrana plasmática. (Figuras 3B y C, compárese con la Figura 3A). Más del 60% de las células endoteliales de los capilares examinados (51 de 80) en secciones del corazón de animales BDNF (-/-) (PO) exhibieron una desorganización de la matriz extracelular, y edema perivascular.

Para determinar si los cambios ultraestructurales notados en las células endoteliales reflejaron un proceso apoptótico, fue realizado un análisis TUNEL concomitante y una inmunofluorescencia CD 31 utilizando secciones de tejidos a partir de animales BDNF (-/-) y descendencias (+/+) a E 18,5 o P2 (Figuras 3D, E, F, y G). En secciones a partir de corazones de BDNF (-/-) E 18,5 fueron detectadas numerosas células positivas a TUNEL por cada campo de bajo poder y la mayoría de estas células desarrollaron una inmunoreactividad al CD 31, mientras que secciones de embriones (+/+) exhibieron células con mucha menos positividad a TUNEL, las cuales fueron CD 31 negativas. En el examen de los corazones de BDNF (-/-) P2, un incremento marcado en las células positivas a TUNEL fue detectado. Aunque la mayoría de las células positivas a TUNEL se colocaron con la inmunodetección del CD 31, en regiones con una alta detección de TUNEL, fueron notadas también las células negativas a CD 31, las cuales pueden reflejar la apoptosis de los miocitos en regiones locales de compromiso de los vasos sanguíneos. Estos resultados sugieren que la pérdida de BDNF da como resultado la apoptosis de las células endoteliales en los capilares y arteriolas del corazón neonatal temprano y gestacional tardío.

Para establecer el inicio de la formación anormal de los vasos sanguíneos intramiocárdicos fueron examinados en ratones BDNF (+/+), 11 embriones BDNF (-/-), y 6 descendientes BDNF (+/+) desde E 11,5 hasta E 19,5. La hemorragia intramiocárdica en embriones BDNF (-/-) pudiera ser detectada primero a E 16,5 (2 de 2 embriones BDNF (-/-) de diferentes de des (Figura 4B)), y estuvo presente en 3 de 3 embriones examinados BDNF (-/-) (Figura 4D) a E 17,5, y ausentes en descendencias BDNF (+/-) y (+/+) (Figuras 4A y C). El inicio de la hemorragia en la gestación

tardía sugirió que la expresión deficiente de BDNF no deteriora la vasculogénesis o el desarrollo de la angiogénesis, como los genes dianas en los embriones con defectos en estos procesos murieron típicamente en el útero entre los días embrionarios 9-13 (Carmeliet *et al.*, “abnormal Blood Vessel Development and Lethality in Embryos Lacking a Single VEGF Allele”, *Nature* 380: 435-439 (1996); Fong *et al.*, “Role of the Flt-1 Receptor Tyrosine Kinase in Regulating Assembly of Vascular Endothelium”, *Nature* 376: 66-70 (1995); Shalaby *et al.*, “Failure of Blood-Island Formation and Vasculogenesis in FLK-1-Deficient Mice”, *Nature* 376: 62-66 (1995)). De hecho, la densidad y la configuración del lecho capilar intramiocárdico en embriones BDNF (-/-) a E 18,5 fue indistinguible de aquellas descendencias BDNF (+/+) tal como son medidas mediante la inmunoreactividad al CD 31 (Figuras 4G y H). Estos resultados sugieren que el desarrollo de la angiogénesis prosigue normalmente en los corazones de embriones (-/-) durante la gestación de media a tardía.

#### Ejemplo 10

##### *Imagen ecocardiográfica de ratones BDNF (-/-)*

Para evaluar *in vivo* el deterioro funcional del corazón deficiente en BDNF, fue realizada una ecocardiografía en tiempo real sobre las descendencias a las 48 horas de nacimiento utilizando un catéter intravascular de ultrasonido 40 MHz para las imágenes trans-torácicas. Tres de tres animales BDNF (-/-) que fueron vistos desarrollaron una disminución significativa en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (EF) comparado con descendencias normales (ver Tablas 1 y 2, más adelante).

TABLA 1

*Fracciones de Eyección para dos de tres animales BDNF (-/-) cualquiera de dos descendencias*

| BDNF (+/+) | BDNF (-/-) |
|------------|------------|
| 73%        | 42%        |
| 77%        | 62%        |
|            | 31%        |

TABLA 2

*Medida representativa a partir de descendencias BDNF (+/+) y BDNF (-/-)*

|                       | BDNF (+/+)           | BDNF (-/-)           |
|-----------------------|----------------------|----------------------|
| 1 vidd                | 1,10 mm              | 1,20 mm              |
| 1 vids                | 0,70 mm              | 1,00 mm              |
| días vol              | 1,3 mm <sup>3</sup>  | 1,73 mm <sup>3</sup> |
| sys vol               | 0,34 mm <sup>3</sup> | 1,00 mm <sup>3</sup> |
| volumen en movimiento | 0,99 mm <sup>3</sup> | 0,73 mm <sup>3</sup> |
| Fracción de eyección  | 73%                  | 42%                  |

La reducción en la fracción de eyección en neonatos deficientes en BDNF es consistente con la evidencia histológica y ultraestructural de la fragilidad de los vasos sanguíneos intramiocárdicos y la hemorragia la cual impacta sobre la contractilidad miocárdica.

#### Ejemplo 11

##### *Deficiencia en BDNF Dando como resultado un Septo Atrial Deficiente*

Además de los defectos vasculares, el examen microscópico de los animales BDNF (-/-) fue notable para las anomalías en la septación atrial en 10 de 12 animales examinados mediante un análisis por secciones seriadas a PO (Figura 2B). En los animales afectados, el septum primum apareció por estar con un vestigio más alargado mientras que el septum secundum exhibió grados variables de hipoplasia. El resultado de estos defectos es la incompetencia del foramen oval con un prominente defecto del septo atrial involucrando tanto el septum primum y el secundum. Mediante análisis morfométrico, los defectos en el septo atrial que exceden a las 100 micrómetros en el plano antero-posterior fueron detectados en cuatro de los animales BDNF (-/-). No fueron detectados defectos atriales en 10 descendencias

BDNF (+/-) o (-/-) examinados (Figura 2A). Un marcado engrosamiento atrial y una disminución de la pared atrial, con una congestión pulmonar concomitante y una hemorragia intraalveolar ocasional fueron notados en 10 animales BDNF (-/-) con defectos en el septo atrial. No fueron detectados defectos en la formación del septo ventricular o en la valvulogénesis. Además de esto, no fueron notables la trabeculación ventricular y la formación de septo muscular.

Para establecer el inicio de la formación y los mecanismos defectivos subyacentes observados en PO, fueron examinados embriones BDNF (-/-) y sus descendencias (+/+) desde E 11,5 hasta E 18,5 (Figura 4). La formación del componente dorsal del septum primum es iniciado entre E 10,5 y E 11,5 (Kaufman, "The Atlas of Mouse Development", Academic Press, Inc., San Diego (1992), un proceso el cual parece no afectado por la expresión deficiente de BDNF (Figuras 4Ay B). Sin embargo, mediante E 14,5, una fase en la cual el septum primum ha sido formado, y las crestas dorsales y ventriculares del septum secundum están emergiendo en animales de tipo salvaje, las descendencias BDNF (-/-) exhiben una hipoplasia de los componentes dorsal y ventral en desarrollo del septum secundum (Figuras 4C y D). La hipoplasia del septum secundum en embriones BDNF (-/-) es progresiva en las fase gestacional E 16,5 y E 18,5 (Figura 4F), y en los resultados en la incompetencia del foramen oval a PO (Figura 2B). Para determinar si las anomalías en la señalización del trk B mediada por el BDNF B pudieran dar como resultado la hipoplasia del septo observada, fue acometida una localización inmunohistoquímica de la quinasa que activa al trk B y el BDNF en el atrio en desarrollo. La expresión de la quinasa que activa al receptor del trk B y la expresión del BDNF es detectable en el endocardio del atrio en desarrollo, en la región del septum primum (Figuras 4I y J). Estos resultados sugieren que la señalización del trk B mediada por el BDNF requerida para el crecimiento persistente y continuado del septum primum atrial y el septum secundum.

#### Ejemplo 12

##### *Efectos del BDNF sobre las células endoteliales purificadas de la microvasculatura cardiaca*

Para confirmar las acciones directas del BDNF sobre las células endoteliales, fueron obtenidos cultivos de células endoteliales de gran pureza de la microvasculatura cardiaca del neonato a partir de ratones tipo salvaje. La pureza de los cultivos celulares fue cuantificada mediante análisis por citometría de flujo de la expresión del CD 31 (PECAM) y la toma de Dil-LDL, y fue determinada rutinariamente por ser mayor que el 95% (Figura 6A). Utilizando un análisis por RCP-RT, la expresión del ARNm del BDNF fue detectable en muestras de células endoteliales de la microvasculatura cardiaca (Figura 6C), con una ampliación en estudios recientes documentando la expresión de BDNF por las células endoteliales de la microvasculatura cerebral (Leventhal *et al.*, "Endothelial Trophic Support of Neuronal Production and Recruitment From the Adult Mammalian Subependyma", *Mol. Cell. Neurosci.* 13: 450-464 (1999)). Las células endoteliales de la microvasculatura cardiaca con un paso inferior expresan consistentemente transcritos para la quinasa que activa el trk B (Figura 6C), utilizando juegos de cebadores bien caracterizados para detectar las isoformas del trk B (Labouyrie *et al.*, "Expression of Neurotrophins and Their Receptors in Human Bone Marrow", *Am. J. Pathol.* 154: 405-415 (1999)). Los transcritos para los receptores truncados del trk B que carecen de actividad quinasa fueron detectados ocasionalmente a partir del ARN obtenido de las células en un pasaje mayor.

Aunque una expresión deficiente *in vivo* del BDNF da como resultado una apoptosis de las células endoteliales (como fue indicado anteriormente, Figura 3E), es deseable evaluar si el BDNF actúa directamente sobre las células endoteliales para proporcionar una supervivencia en condiciones de pérdida de suero. Utilizando células endoteliales cultivadas de la microvasculatura cardiaca, la concentración nanomolar del BDNF fue capaz de mantener la viabilidad de las células endoteliales, tal como es cuantificado utilizando el ensayo LIVE/DEAD. Para confirmar que el BDNF fue capaz de inhibir la apoptosis de las células endoteliales inducido por la retirada de suero, fue tomada una cuantificación de la apoptosis utilizando el análisis por TUNEL y la unión de la anexina V (Figuras 6 D, E, F, y G). Por otra parte, fueron eficaces las concentraciones nanomolares del BDNF en reducir el cincuenta por ciento aproximadamente de la apoptosis celular de las células endoteliales de la microvasculatura cardiaca seguido de una retirada de suero (Figura 6F, compárese con la Figura 6E). El tratamiento con BDNF dio como resultado una reducción del 50% de la unión de la anexina V, relacionado a las células perdidas en el suero (Figura 6G), y fue tan eficaz como el VEGF en mantener la viabilidad celular. La capacidad del BDNF para mantener la supervivencia de las poblaciones purificadas de las células endoteliales de la microvasculatura cardiaca sugiere acciones directas de este factor de crecimiento sobre estas poblaciones de células que expresan el trk B.

#### Ejemplo 13

##### *Sobreexpresión del BDNF en corazones en gestación induce la angiogénesis*

Para determinar si un exceso en los niveles de BDNF puede dar como resultado anomalías vasculares durante la embriogénesis, fueron generados ratones transgénicos que sobreexpresan el BDNF bajo el control del promotor y regiones donde hay un incremento de la expresión del gen de la nestina. Estos ratones utilizaron secuencias aumentadas en el intrón 1, las cuales tienen una expresión directa en el desarrollo muscular, y las secuencias en el intrón 2 las cuales son requeridas para la expresión en el sistema nervioso en desarrollo (Zimmerman *et al.*, "Independent Regulatory Elements in the Nestin Gene Direct Transgene Expression to Neural Stem Cells or Muscle", *Neuron* 12: 11-24 (1994)). Ya que estos ratones murieron rápidamente antes de su nacimiento (Ringstedt *et al.*, "Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Target Invasion in the Gustatory System", *J. Neurosci* 19: 3507-3518 (1999)), fueron colectados embriones transgénicos (E 17,5 -E 18,5) derivados de inyecciones independientes de la construcción y encontrados en las paredes ventriculares cardiacas sobreexpresando focalmente el BDNF (Figura 7F, compara con

la Figura 7D). Los análisis histológicos de los corazones de 6 embriones BDNF o tipo salvaje que sobreexpresan el BDNF revelaron anomalías focales en la pared ventricular de los animales transgénicos, caracterizados por el número incrementado del diámetro predominantemente pequeño de los vasos sanguíneos (menos de 10 micrómetros), las cuales aparecieron desprovistas del tegumento que rodea la célula muscular lisa (Figura 7B, compárese con la Figura 7A). La inmunohistoquímica del marcador CD 31 de las células endoteliales reveló un incremento en 2-3 veces en la densidad de los vasos sanguíneos que recubren el endotelio en estas regiones de los ventrículos del transgénico, comparado con las descendencias no transgénicas (Figura 7H, compárese con la Figura 7G). No fueron detectadas diferencias en la inmunopositividad a la  $\alpha$ -actinina, un marcador de la célula del músculo liso (Hungerford *et al.*, "Identification of a Novel Marker for Primordial Smooth Muscle and its Differentiation Expression pattern in Contractile vs. Noncontractile Cells", *J. Cell Biol.* 137:925-937 (1997)), sugiriendo que estos vasos sanguíneos fueron vasos capilares (Figuras 7I y J). Para determinar si el incremento en el número de los vasos sanguíneos reflejó un incremento en la proliferación de la célula endotelial, fue tomada la detección inmunohistoquímica del antígeno de proliferación celular nuclear (PCNA) (Figuras 7K y L). No fueron detectadas diferencias en la positividad PCNA en los embriones transgénicos, comparada con los embriones tipo salvaje, sugiriendo que la sobreexpresión del BDNF promueve la supervivencia de la célula endotelial, en vez de la proliferación celular *in vitro*. Significativamente, no fue notada evidencia de hemorragia en la pared ventricular en embriones que sobreexpresan BDNF sugiriendo que el BDNF no induce la permeabilidad vascular.

#### Ejemplo 14

*La expresión de BDNF es requerida para la estabilización de los vasos sanguíneos intramiocárdicos durante la embriogénesis tardía*

Los datos anteriores demuestran que la expresión del BDNF es requerida para la estabilización de los vasos sanguíneos intramiocárdicos durante la embriogénesis tardía, a través de acciones directas sobre las células endoteliales. A diferencia de los factores de la angiogénesis bien caracterizados, como el VEGF, el cual inicia la vasculogénesis y el desarrollo de la angiogénesis, el BDNF parece actuar en las fases tardías de la formación de las arteriolas y capilares para mantener la integridad de los vasos sanguíneos. El BDNF no parece regular la vasculogénesis, la configuración de los vasos sanguíneos intraembrionarios, o el desarrollo de la angiogénesis, como parece normal en los embriones BDNF (-/-) a través de E 14,5 en el desarrollo inicial de los capilares a partir de estos canales primitivos. A diferencia de los ratones deficientes en VEGF o de receptores VEGF flk-1 o flt-1, los cuales mueren entre E 8,5 y E 11,5 con defectos severos en la vasculogénesis, angiogénesis y la hematopoyesis en el saco vitelino (Carmeliet *et al.*, "Abnormal Blood Vessel Development and Lethality in Embryos Lacking a Single VEGF Allele", *Nature* 380: 435-439 (1996); Fong *et al.*, "Role of the Flt-1 Receptor Tyrosine Kinase in Regulating the Assembly of Vascular Endothelium", *Nature* 376: 66-70 (1995); Shalaby *et al.*, "Failure of Blood Island Formation and Vasculogenesis in the Flk-1 Deficient Mice", *Nature* 376: 62-66 (1995)), los ratones deficientes en BDNF desplegaron una configuración vascular y una ramificación capilar normales. Las anomalías vasculares son también distintivas en el ratón deficiente de BDNF de aquellas exhibidas por animales deficientes en la expresión de la angiopoyetina-1 y su receptor la tirosina quinasa Tie2. Los animales que carecen de la expresión de la angiopoyetina 1 o el Tie2 exhibieron defectos severos en la ramificación capilar, y una incapacidad para remodelar la red capilar para formar las arterias (Sato *et al.*, "Distinct Roles of the Receptor Tyrosine Kinases Tie-1 and Tie-2 in Blood Vessel Formation", *Nature* 376:70-74 (1995); Suri *et al.*, "Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the Tie-2 Receptor, During Embryonic Angiogenesis", *Cell* 87: 1171-1180 (1996)). Aunque el análisis ultraestructural de los vasos sanguíneos a partir de animales mutantes nulos a la angiopoyetina-1 y el Tie2 demuestra una degeneración de la célula endotelial, la letalidad embrionaria más temprana de estos animales a E 10,5-E 12, y las amplias anomalías de los vasos sanguíneos distinguen los efectos de la angiopoyetina-1 del BDNF.

Estudios recientes han identificado varios factores angiogénicos los cuales funcionan para modular las interacciones recíprocas entre las células endoteliales y el pericitos derivados del parénquima y las células del músculo liso vascular. Estas células mesenquimales son reclutadas durante el proceso de remodelaje vascular y son importantes en la estabilización de los vasos sanguíneos (Risau, "Mechanisms of Angiogenesis", *Nature* 386: 671-674 (1997); Darland *et al.*, "Blood Vessel Maturation: Vascular Development Comes of Age", *J. Clin. Invest.* 103: 167-168 (1999); Yancopoulos *et al.*, "Vasculogenesis, Angiogenesis and Growth Factors: Ephrins Enter the Fray at the Border", *Cell* 93: 661-664 (1998)). El PDGF-BB y el HB-EGF sintetizados por las células endoteliales reclutan los pericitos y las células del músculo liso a la túnica media en el desarrollo, y la producción deficiente de PDGF-BB da como resultado una cubierta vascular defectiva por estos tipos de células de soporte (Lindahl *et al.*, "Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in the PDGF-B- deficient mice", *Science* 277: 242-245 (1997)). Las células del músculo liso vascular, en cambio, sintetizan y secretan la angiopoyetina-1 para activar los receptores Tie2 sobre las células endoteliales adyacentes, dando como resultado una señalización bi-direccional entre las células endoteliales, y las células de soporte las cuales se cubren entre sí Yancopoulos *et al.*, "Vasculogenesis, Angiogenesis and Growth Factors: Ephrins Enter the Fray at the Border", *Cell* 93:661-664 (1998)). La colocalización del BDNF y el trk B en las células endoteliales de las arterias y capilares intramiocárdicos, así como la capacidad del BDNF para apoyar la supervivencia de las células endoteliales de la microvasculatura cardíaca en el cultivo proporcionan una evidencia mecanicista de las acciones directas del BDNF sobre las células endoteliales. Además, el análisis ultraestructural de animales deficientes en BDNF documentando una degeneración de la célula endotelial y la apoptosis dentro de los capilares intramiocárdicos sugiere que este factor de crecimiento ejerce un rol importante en la supervivencia de la célula endotelial. La extensión de la vacuolización de la célula endotelial y la degeneración observada en ratones deficiente de BDNF pudiera dar como resultado la producción local deficiente de factores de crecimiento como el PDGF-BB, deteriorando secundariamente de este modo la supervivencia y la cubierta de la célula del músculo liso.

El fenotipo vascular observado en la sobreexpresión del BDNF en el corazón gestacional apoya además el rol hipotetizado del BDNF como un factor que regula la supervivencia de la célula endotelial y la estabilización de los vasos sanguíneos. Aunque estos animales exhibieron una densidad incrementada de los capilares, no fue observada hemorragia en estos vasos sanguíneos, distinguiendo los efectos del BDNF de aquellos del VEGF, los cuales pueden promover la formación de capilares con una fragilidad incrementada. La sobreexpresión del BDNF no altera significativamente la proliferación de la célula endotelial, sugiriendo que la densidad incrementada de los capilares puede ser resultado de la supervivencia aumentada de la célula durante los procesos normales de remodelamiento de los vasos sanguíneos.

Los defectos del septo atrial en los capilares de animales BDNF (-/-), tal como es medido por análisis morfométrico, son considerablemente más grandes que aquellos que han sido descritos para los defectos fisiológicos secundarios en el septo. La hipoplasia marcada de estas estructuras septales, así como la expresión local del trk B y el BDNF por el endocardio atrial, sugiere que el BDNF es requerido para el desarrollo normal del septo además de su rol presente en mantener la función de la célula endotelial. Este defecto estructural puede reflejar ya sea deficiencias primarias en la supervivencia en las células mesenquimales del septo como una disfunción de las estructuras derivadas de célula endotelial/ mesenquimal. Se sabe muy poco acerca de la fase del desarrollo del septo de la válvula cardíaca, específicamente a qué factores definen la formación competente de la válvula junto con un desarrollo apropiado del septo. La integridad total de estas estructuras probablemente será definida por una variedad de mecanismos, incluyendo la heterogeneidad de la célula endotelial del endocardio, factores de crecimiento de la familia del TGF $\beta$ , y factores de transcripción de la familia hélice-bucle-hélice (Fishman *et al.*, “Fashioning the Vertebrate Heart: Earliest Embryonic Decisions”, *Development* 124: 2099-2117 (1997); Schott *et al.*, “Congenital Heart Disease Caused by Mutations in the Transcription Factor NKX 2.5”, *Science* 281: 08-111 (1998)). Interesantemente, la coexistencia de un sistema competente de la válvula en conjunción con estructuras marcadamente hipoplásicas del septo en animales BDNF (-/-) apoya un patrón aun más complicado de vías que definen este período del desarrollo del corazón.

¿Hay tres facciones adicionales, sin embargo, para el BDNF sobre las células del músculo liso vascular? Varios estudios han documentado bajos niveles de expresión del BDNF en las células de músculo liso vascular de vasos sanguíneos maduros y grandes como la aorta (Nemoto *et al.*, “Gene Expression of Neurotrophins and Their Receptors in Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells”, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 245: 284-288 (1998); Scarisbrick *et al.*, “Coexpression of the mRNAs for NGF, BDNF and NT-3 in the Cardiovascular System of Pre and Post Natal Rat”, *J. Neurosci.* 13: 875-893 (1993)) y estudios anteriores han documentado un incremento en la expresión tanto del BDNF como del trk B por las células neointimales después de un daño vascular (Donovan *et al.*, Neurotrophin and Neurotrophin Receptors in Vascular Smooth Muscle Cells: Regulation of Expression in Response to Injury”, *A. J. Path.* 147:309-324 (1995)). La migración de las células centrales del músculo liso es una respuesta primaria a un daño vascular, y han sido demostradas acciones quimiotácticas directas de las neurotrofinas sobre el receptor trk que expresan las células del músculo liso maduro. Estos resultados sugieren que las neurotrofinas pueden mediar los efectos directos sobre las células del músculo liso vascular en los vasos sanguíneos grandes y maduros en modelos patológicos de daño. Aunque la sobreexpresión del BDNF en el corazón en desarrollo no conduce a una formación aumentada de las arteriolas, o a una cubierta anormal de los vasos sanguíneos intramiocárdico, serán necesarios estudios adicionales para determinar si el BDNF puede mediar los efectos quimiotácticos directos, o la supervivencia sobre los pericitos o las células del músculo liso vascular en otros lechos vasculares.

Aunque las células endoteliales alinean los vasos sanguíneos en todos los órganos, la expresión local de factores de crecimiento los cuales regulan la función de la célula endotelial puede conferir una especialización y heterogeneidad funcional sobre los grandes vasos sanguíneos característicos y los lechos vasculares (Edelberg *et al.*, “PDGF Mediates Cardiac Microvascular Communication”, *J. Clin. Invest.* 102: 837-843 (1998)). Los análisis mencionados anteriormente de los ratones BDNF (-/-) revela una hemorragia grosera solo en el corazón y los pulmones, con un desarrollo normal de los grandes vasos sanguíneos, y de los vasos sanguíneos dentro de otros órganos como el riñón y el cerebro. Dos mecanismos diferentes pudieran dar como resultado una hemorragia limitada en animales BDNF (-/-): (1) expresión de un ligando del trk B alternado o (2) expresión regional, restringida del BDNF y el trk B en el embrión en desarrollo. Aunque el BDNF es un ligando selectivo y específico para el trk B, un ligando alternativo, el NT-4, es muy expresado durante la embriogénesis y en la madurez (Timmusk *et al.*, “Widespread and Developmentally Regulated Expression of Neurotrophin-4 mRNA in Rat Brain and Peripheral Tissues”, *Eur. J. Neurosci.* 5: 645-613 (1993)). En el sistema nervioso, los estudios del BDNF, NT-4, y ratones mutantes nulos dobles BDNF/NT-4 sugieren que las funciones de estos ligandos durante el desarrollo del sistema nervioso periférico son parcialmente superpuestas (Jones *et al.*, “Targeted Disruption of the BDNF Gene Perturbs Brain and Sensory Neuron Development But Not Motor Neuron Development”, *Cell* 76: 989-999 (1994); Ernfors *et al.*, “Mice Lacking Brain-Derived Neurotrophic Factor Develop with Sensory Deficits”, *Nature* 368: 147-150 (1994); Erickson *et al.*, “Mice Lacking Brain-Derived Neurotrophic Factor Exhibit Visceral Sensory Neuron Losses Distinct From Mice Lacking NT4 and Display a Severe Developmental Deficit in Control of Breathing”, *J. Neurosci.* 16: 5361-5371 (1996)). Durante la gestación, la mayoría de los tejidos no neuronales expresan tanto ARNm del BDNF como ARNm del NT-4 aunque la expresión local de ambos ligandos del trk B es grandemente recíproca en el adulto (Timmusk *et al.*, “Widespread and Developmentally Regulated Expression of Neurotrophin-4 mRNA in Rat Brain and Peripheral Tissues”, *Eur. J. Neurosci.* 5: 605-613 (1993)). El corazón en desarrollo, por el contrario, expresa constantemente el ARN m del NT-4 hasta la gestación tardía, cuando la expresión del ARNm del BDNF se incrementa significativamente. De este modo, los defectos vasculares en animales BDNF (-/-) pueden estar limitados a aquellos órganos que expresan un ligando selectivamente. Sorprendentemente, no fueron detectadas anomalías en los corazones en desarrollo de ratones deficientes en NT-4. Sin embargo, estudios anteriores han demostrado que las plaquetas circulantes expresan altos niveles de BDNF (Ya-

mamoto *et al.*, "Human Platelets Contain Brain-Derived Neurotrophic Factor", *J. Neurosci* 10: 3469. 3478 (1990)), los cuales pueden ser suficientes para mantener la integridad y supervivencia de la célula endotelial.

Alternativamente, el patrón relativamente restringido del BDNF y la expresión del trk B en las células endoteliales que recubren algunos vasos capilares y arteriolas intramiocárdicas, y la expresión parcialmente sobrelapada del NT-3 por las células endoteliales de los capilares, sugieren que las células endoteliales de los capilares y arteriolas pueden requerir factores de crecimientos diferentes, pero relacionados, para asegurar la supervivencia de la célula. La heterogeneidad recientemente descrita de la respuesta de las células endoteliales de la microvasculatura cardíaca al PDGF-AB, y la capacidad del PDGF-AB para regular selectivamente la expresión del gen de la célula endotelial, sugieren que la expresión local de los factores de crecimiento selectivos pueden regular la función de la célula endotelial microvascular (Edelberg *et al.*, (PDGF Mediate Cardiac Microvascular Communication, *J. Clin. Invest.* 102: 837-843. (1998)). Además, la identificación reciente de la efrina B2 y su receptor Eph B4 como marcadores embrionarios de las células endoteliales dentro de los capilares venosos y arteriales, respectivamente, sugiere que las células endoteliales son molecularmente diferentes antes de su recubrimiento por las células del músculo liso vascular (Wang *et al.*, "Molecular Distinction and Angiogenic Interaction Between Embryonic Arteries and Veins Revealed by Ephrin-B2 and its Receptor Eph-B4", *Cell* 93:741-753 (1998)). Una hipótesis a considerar para los patrones de expresión de las neurotrofinas por las células endoteliales vasculares es que la producción de neurotrofinas puede estar regulada por la efrina-B2:Eph-B4, o la señalización interendotelial mediada por el PDGF-AB, preguntas más sensibles a un examen genético.

#### Ejemplo 14

##### *Angiogenesis de los ligandos del receptor trk*

Para evaluar las acciones potenciales de los ligandos del receptor trk en iniciar la angiogenesis en tejidos no isquémicos, fue utilizado un sistema de modelo *in vivo* bien establecido y no isquémico de Matrigel (Passaniti *et al.*, "A Simple Quantitative Method for Assessing Angiogenesis and Antiangiogenic Agents Using Reconstituted Basement Membrane, Heparin, and Fibroblast Growth Factor", *Lab. Invest.*, 67:519-528 (1992)). Ratones hembras jóvenes adultos fueron inyectados subcutáneamente con 0,3 mL del factor de crecimiento Depleted Matrigel (Becton Dickinson, Bedford, MA) conteniendo 64 U/mL de heparina y rhVEFG (Upstate Biotechnologies, Lake Placid, NY) (30-50 ng/mL), rhBDNF (50-100 ng/mL), rhNT-4 (50-100 ng/mL), o rhNT-3 (50-100 ng/mL), o de ninguna adición de factor de crecimiento ( rhBDNF, rhNT-4, y rhNT-3 de Promega, Madison, WI). Después de 14 días, los animales fueron sacrificados, y el tapón de Matrigel fue aislado, fotografiado, y procesado por análisis inmunohistoquímico y de histoquímica (ver Figuras 8-10). Secciones seriadas fueron analizadas de una forma a ciegas para cada tapón de Matrigel, y fue cuantificado el grado de celularidad en las regiones centrales del Matrigel. Siete de las ocho muestras de Matrigel, no conteniendo factores de crecimiento adicionales, exhibieron una baja celularidad. A diferencia, los tampones de Matrigel conteniendo VEGF fueron altamente celulares en diez de los doce animales. El Matrigel conteniendo los ligandos del trk dio también secciones altamente celulares, específicamente, el Matrigel conteniendo BDNF dio origen a secciones altamente celulares en siete de nueve animales, el Matrigel conteniendo NT-4 fue altamente celular en ocho de nueve animales, y el Matrigel conteniendo NT-3 fue altamente celular en cinco de siete animales.

Las secciones del Matrigel conteniendo VEGF, BDNF, NT-3, NT-4, o ningún factor de crecimiento adicional fueron examinados en 45 animales. Microscópicamente los experimentos controles del tapón de Matrigel dio una ausencia o pocos números de células endoteliales infiltradas mezcladas con algunas células mesenquimales dispersadas. Por comparación, las secciones de Matrigel conteniendo VEGF exhibieron una de la red capilar difusa, organizada adecuadamente, la cual en algunos casos estuvo compuesta de una red densa del tipo de células endoteliales con una hemorragia focal. En algunos tapones de Matrigel conteniendo VEGF en los cuales el contenido celular endotelial fue más bien denso, hubo áreas dilatadas, llenas de sangre aparentemente cubiertas por las células endoteliales. Cuando se examinaron los tapones de Matrigel conteniendo tanto el BDNF o el NT-4 hubo un dramático incremento en el número de células tipo endoteliales infiltradas a través del material cuando es comparado con los controles de las muestras tratadas con VEGF. En algunos de los casos, la red densa de células estuvo contenida por figuras mitóticas y cuerpos apoptóticos. Adicionalmente, en algunos casos, hubo áreas dilatadas llenas de sangre similares a aquellas notadas con los tapones tratados con VEGF. Las muestras de Matrigel conteniendo NT-3 exhibieron un contenido celular que fue menor que el que se exhibió por las muestras de Matrigel con BDNF o NT-4, pero que fue más denso cuando se compara con el grupo tratado con Matrigel-VEGF. En todos los experimentos tratados con Matrigel, hubo grados variables de un componente inflamatorio; en las muestras de NT-4 y BDNF, este pareció estar compuesto por granulocitos incluyendo los eosinófilos.

#### Referencias citadas en la descripción

*Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- US 10592898 P
- US 5453361 A, Yancopoulos
- US 11999499 P
- US 5770577 A, Kinstler
- US 5180820 A, Barde
- US 5235043 A, Collins
- US 5229500 A, Barde
- WO 9906073 A, Isner
- US 5438121 A, Barde

**Literatura no relacionada con patentes citada en la descripción**

- **RISAU**. Mechanisms of Angiogenesis. *Nature*, 1997, vol. 386, 671-674
- **DARLAND et al.** Blood Vessel Maturation: Vascular Development Comes of Age. *J. Clin. Invest.*, 1999, vol. 103, 167-168
- **FERRARA et al.** The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrin. Rev.*, 1997, vol. 18, 4-25
- **BORDER**. *Cell*, 1998, vol. 93, 661-664
- **LINDAHL et al.** Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in the PDGF-B-deficient mice. *Science*, 1997, vol. 277, 242-245
- **DICKMAN et al.** Defective Haematopoiesis and Vasculogenesis in Transforming Growth Factor Beta 1 Knock Out Mice. *Development*, 1995, vol. 121, 1845-1854
- **YANG et al.** Angiogenesis Defects and Mesenchymal Apoptosis in Mice Lacking SMAD5. *Development*, 1999, vol. 126, 1571-1580
- **MACK et al.** Biologic Bypass With the Use of Adenovirus-Mediated Gene Transfer of the Complementary Deoxyribonucleic Acid for Vascular Endothelial Growth Factor 121 Improves Myocardial Perfusion and Function in the Ischemic Porcine Heart. *J. Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 1998, vol. 115, 168-176
- **LOSORDO et al.** Gene Therapy for Myocardial Angiogenesis: Initial Clinical Results with Direct Myocardial Injection of phVEGF 165 as Sole Therapy for Myocardial Ischemia. *Circulation*, 1998, vol. 98, 2800-2804
- **SPRINGER et al.** VEGF Gene Delivery to Muscle: Potential Role for Vasculogenesis in Adults. *Molecular Cell*, 1998, vol. 2, 549-558
- **DRAKE et al.** Exogenous Vascular Endothelial Growth Factor Induces Malformed and Hyperfused Vessels During Embryonic Development. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995, vol. 92, 7657-7661
- **GERBER et al.** VEGF is Required for Growth and Survival in Neonatal Mice. *Development*, 1999, vol. 126, 1149-1159
- **DONOVAN et al.** Neurotrophin-3 is Required for Mammalian Cardiac Development: Identification of an Essential Nonneuronal Neurotrophin Function. *Nature Genetics*, 1996, vol. 14, 210-213
- **DONOVAN et al.** Neurotrophin and Neurotrophin Receptors in Vascular Smooth Muscle Cells: Regulation of Expression in Response to Injury. *A.J. Path.*, 1995, vol. 147, 309-324
- **KRAEMER et al.** NGF Activates Similar Intracellular Signaling Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells as PDGF-BB But Elicits Different Biological Responses. *Arteriol. Thromb. And Vasc. Biol.*, 1999, vol. 19, 1041-1050
- **LEWIN et al.** Physiology of the Neurotrophins. *Ann. Rev. Neuro.*, 1996, vol. 19, 289-317
- **CHALAZONITIS**. Neurotrophin-3 as an Essential Signal for the Developing Nervous System. *Molecular Neurobiology*, 1996, vol. 12, 29-53
- **ERICKSON et al.** Mice Lacking Brain-Derived Neurotrophic Factor Exhibit Visceral Sensory Neuron Losses Distinct from Mice Lacking NT4 and Display a Severe Developmental Deficit in Control of Breathing. *J. Neurosci.*, 1996, vol. 16, 5361-5371

• **IBÁÑEZ.** Neurotrophin-4: The Odd One out in the Neurotrophin Family. *Neurochemical Research*, 1996, vol. 21, 787-793

• **LEWIN et al.** Physiology of the neurotrophins. *Ann. Rev. Neuro.*, 1996, vol. 19, 289-317

• **JONES et al.** Targeted Disruption of the BDNF Gene Perturbs Brain and Sensory Neuron Development But Not Motor Neuron Development. *Cell*, 1994, vol.76, 989-999

• **ERICKSON et al.** Mice Lacking Brain-Derived Neurotrophic Factor Exhibit Visceral Sensory Neuron Losses Distinct From Mice Lacking NT4 and Display a Severe Developmental Deficit in Control of Breathing. *J. Neurosci.*, 1996, vol. 16, 5361-5371

• **SCHWARTZ et al.** Abnormal Cerebellar Development and Foliation in the BDNF (-/-) Mice Reveals a Role for Neurotrophins in CNS Patterning. *Neuron*, 1997, vol. 19, 269-281

• **TIMMUSK et al.** Widespread and Developmentally Regulated Expression of Neurotrophin-4 mRNA in Rat Brain and Peripheral Tissues. *Eur. J. Neurosci.*, 1993, vol. 5, 605-613

• **HILTUNEN et al.** Expression of mRNAs for Neurotrophins and Their Receptors in Developing Rat Heart. *Circ. Res.*, 1996, vol. 79, 930-939

• **SCARISBRICK et al.** Coexpression of the mRNAs for NGF, BDNF and NT-3 in the Cardiovascular System of Pre- and Post-Natal Rat. *J. Neurosci.*, 1993, vol. 13, 875-893

• **DONOVAN et al.** Neurotrophin-3 is Required for Mammalian Cardiac Development: Identification of an Essential Nonneuronal Neurotrophin function. *Nature Genetics*, 1996, vol. 14, 210-213

• **TESSAROLLO et al.** Targeted Deletion of all Isoforms of the trk C Gene Suggests the Use of Alternate Receptor by its Ligand Neurotrophin-3 in Neural Development and Implicates trk C in Normal Cardiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 14766-014781

• **DONOVAN et al.** Neurotrophin-3 is Required for Mammalian Cardiac Development: Identification of an Essential Nonneuronal neurotrophin Function. *Nature Genetics*, 1996, vol. 14, 210-213

• **DRAKE et al.** Exogenous Vascular Endothelial Growth Factor Induced Malformed and Hyperfused Vessels During Embryonic Development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 7657-7661

• **HAYES et al.** Angiopoietin-1 and Its Receptor Tie-2 Participate in the Regulation of Capillary-Like Tubule Formation and Survival of Endothelial Cells. *Microvasc. Res.*, 1999, vol. 58, 224-237

• **URFER et al.** Specificity Determinant in Neurotrophin-3 and Design of Nerve Growth Factor-Based trk C Agonists by Changing Central Beta-Strand Bundle Residues to Their Neurotrophin-3 Analogs. *Biochemistry*, 1997, vol. 36, 4775-4781

• **ILAG et al.** Pan-Neurotrophin 1: A Genetically Engineered Neurotrophic Factor Displaying Multiple Specificities in Peripheral Neurons *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 607-611

• **HOHN et al.** Identification and Characterization of a Novel Member of the Nerve Growth Factor/Brain-Derived Neurotrophic Factor Family. *Nature*, 1990, vol.334, 339-341

• **SNIDER.** Functions of the Neurotrophins During Nervous System Development: What the Knockouts are Teaching Us. *Cell*, 1994, vol. 77, 627-638

• **IBÁÑEZ.** Neurotrophin-4: The Odd One Out in the Neurotrophin Family. *Neurochemical Research*, 1996, vol. 21, 787-793

• **ENFORS et al.** Molecular Cloning and Neurotrophic Activities of a Protein with Structural Similarities to Nerve Growth Factor: Developmental and Topographical Expression in the Brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 5454-5458

• **JOHN et al.** Identification and Characterization of a Novel Member of the Nerve Growth Factor/Brain-Derived Neurotrophic Family. *Nature*, 1990, vol. 344,339-341

• **JONES et al.** Molecular Cloning of a Human Gene that is a Member of the Nerve Growth Factor Family. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 1990, vol. 87, 8060-8064

- **MAISONPIERRE** *et al.* Neurotrophin-3: A Neurotrophic Factor Related to NGF and BDNF. *Science*, 1990, vol. 24, 1446-1451
- **ROSENTHAL** *et al.* Primary Structure and Biological Activity of a Novel Human Neurotrophic Factor. *Neuron*,  
5 1990, vol. 4, 767-773
- **FANDL** *et al.* Characterization and Crystallization of Recombinant Human Neurotrophin-4. *J. Biol. Chem.*,  
1994, vol. 269, 755-759
- **IBANEZ** *et al.* Neurotrophin-4 is a Target-Derived Neurotrophic Factor For Neurons of the Trigeminal Ganglion.  
10 *Development*, 1993, vol. 117, 1345-1353
- **IP** *et al.* Mammalian Neurotrophin-4: Structure, Chromosomal Localization, Tissue Distribution, and Receptor  
Specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 3060-3064
- **HALLBROOK** *et al.* Evolutionary Studies of the Nerve Growth Factor Family Reveal A Novel Member Abun-  
dantly Expressed in Xenopus Ovary. *Neuron*, 1991, vol. 6, 845-858
- **FLOTTE** *et al.* *Gene Ther.*, 1995, vol. 2, 29-37
- **ZEITLIN** *et al.* *Gene Ther.*, 1995, vol. 2, 623-31
- **BAUDARD** *et al.* *Hum. Gene Ther.*, 1996, vol. 7, 1309-22
- **AUSTIN**. *Gene Ther.*, 1994, vol. 1 (1), 6-9
- **EGLITIS**. *Blood*, 1988, vol. 71, 717-22
- **MACK** *et al.* Biologic Bypass With the Use of Adenovirus-Mediated Gene Transfer of the Complementary  
30 Deoxyribonucleic Acid for Vascular Endothelial Growth Factor 121 Improves Myocardial Perfusion and Function in  
the Ischemic Porcine Heart. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1998, vol. 115, 168-176
- **MAGOVERN** *et al.* Direct *in vivo* gene Transfer to Canine Myocardium Using a Replication-Deficient Adenovi-  
rus Vector. *Ann. Thorac. Surg.*, 1996, vol. 62, 425-433
- **SYMES** *et al.* Gene Therapy with Vascular Endothelial Growth Factor for Inoperable Coronary Artery Disease.  
35 *Ann. Thorac. Surg.*, 1999, vol. 68, 830-836
- **LOSORDO** *et al.* Gene Therapy for Myocardial Angiogenesis. *Am. Heart J.*, 1999, vol. 138 (2), 132-141
- **LOSORDO** *et al.* Gene Therapy for Myocardial Angiogenesis: Initial Clinical Results With Direct Myocardial  
Injection of phVEGF165 as Sole Therapy for Myocardial Ischemia. *Circulation*, 1998, vol. 98, 2800-2804
- **ERNFORS** *et al.* Mice Lacking Brain-Derived Neurotrophic Factor Develop with Sensory Defects. *Nature*,  
45 1994, vol. 368, 147-150
- **KAUFMAN**. The Atlas of Mouse Development. *Academic Press, Inc.*, 1992
- **ERNFORS** *et al.* Mice Lacking Brain-Derived Neurotrophic Factor Develop with Sensory Deficits. *Nature*,  
50 1994, vol. 368, 147-150
- **DONOVAN** *et al.* Neurotrophins-3 is Required for Mammalian Cardiac Development Identification of an Essen-  
tial Nonneuronal Neurotrophin Function. *Nature Genetics*, 1996, vol. 14, 210-213
- **RINGSTEDT** *et al.* BDNF Regulates Reelin Expression and Cajal Retzius Cell Development on the Cerebral  
Cortex. *Neuron*, 1998, vol. 21, 299-310
- **RINGSTEDT** *et al.* BDNF Regulates Reelin Expression and Cajal-Retzius Cell Development on the Cerebral  
Cortex. *Neuron*, 1998, vol. 21, 299-310
- **LODGE**. A Simple Method. of Vascular Endothelial Cell Isolation. *Transplantation Proceedings*, 1992, vol. 24,  
2816-2817
- **BERGERS** *et al.* Effects of Angiogenesis Inhibitors on Multistage Carcinogenesis in Mice. *Science*, 1999, vol.  
65 284, 808-812
- **CHOMCZYNSKI** *et al.* Single-step Method of RNAI solution by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Ch-  
loroform Extraction. *Anal Biochem*, 1987, vol. 162, 156-159

- **LABOUYRIE** *et al.* Expression of Neurotrophins and their Receptors in Human Bone Marrow. *Am. J. Pathol.*, 1999, vol. 154, 405-415
- 5 • **LABOURIE** *et al.* Expression of Neurotrophins and their Receptors in Human Bone Marrow. *Am. J. Pathol.*, 1999, vol. 154, 405-415
- **TIMMUSK** *et al.* Widespread and Developmentally Regulated Expression of Neurotrophin-4 mRNA in Rat Brain and Peripheral Tissues. *Eur. J. Neurosci.*, 1993, vol. 5, 605-613
- 10 • **JONES** *et al.* Targeted Disruption of the BDNF, Gene Perturbs Brain and Sensory Neuron Development but not Motor Neuron Development. *Cell*, 1994, vol. 76, 989-999
- **ERICKSON** *et al.* Mice Lacking Brain-Derived Neurotrophic Factor Exhibit Visceral Sensory Neuron Losses Distinct from Mice Lacking NT4 and Display a Severe Developmental Deficit in Control of Breathing. *J. Neurosci.*, 15 1996, vol. 16, 5361-5371
- **CARMELET**. abnormal Blood Vessel Development and Lethality in Embryos Lacking a Single VEGF Allele. *Nature*, 1996, vol. 380, 435-439
- 20 • **FONG** *et al.* Role of the Flt-1 Receptor Tyrosine Kinase in Regulating Assembly of Vascular Endothelium. *Nature*, 1995, vol. 376, 66-70
- **SHALABY** *et al.* Failure of Blood-Island Formation and Vasculogenesis in FLK-1-Deficient Mice. *Nature*, 1995, vol. 376, 62-66
- 25 • **KAUFMAN**. The Atlas of Mouse Development. *Academic Press. Inc.*, 1992
- **LEVENTHAL** *et al.* Endothelial Trophic Support of Neuronal Production and Recruitment From the Adult Mammalian Subependyma. *Mol. Cell. Neurosci.*, 1999, vol. 13, 450-464
- 30 • **LABOUYRIE** *et al.* Expression of Neurotrophins and Their Receptors in Human Bone Marrow. *Am. J. Pathol.*, 1999, vol. 154, 405-415
- **ZIMMERMAN** *et al.* Independent Regulatory Elements in the Nestin Gene Direct Transgene Expression to Neural Stem Cells or Muscle. *Neuron*, 1994, vol. 12, 11-24
- 35 • **RINGSTEDT** *et al.* Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Target Invasion in the Gustatory System. *J. Neurosci.*, 1999, vol. 19, 3507-3518
- 40 • **HUNGERFORD** *et al.* Identification of a Novel Marker for Primordial Smooth Muscle and its Differentiation Expression pattern in Contractile vs. Noncontractile Cells. *J. Cell Biol.*, 1997, vol. 137, 925-937
- **CARMELET** *et al.* Abnormal Blood Vessel Development and Lethality in Embryos Lacking a Single VEGF Allele. *Nature*, 1996, vol. 380, 435-439
- 45 • **FONG** *et al.* Role of the Flt-1 Receptor Tyrosine Kinase in Regulating the Assembly of Vascular Endothelium. *Nature*, 1995, vol. 376, 66-70
- **SHALABY** *et al.* Failure of Blood Island Formation and Vasculogenesis in the Flk-1 Deficient Mice. *Nature*, 50 1995, vol. 376, 62-66
- **SATO** *et al.* Distinct Roles of the Receptor Tyrosine Kinases Tie-1 and Tie-2 in Blood Vessel Formation. *Nature*, 1995, vol. 376, 70-74
- 55 • **SURI** *et al.* Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the Tie-2 Receptor, During Embryonic Angiogenesis. *Cell*, 1996, vol. 87, 1171-1180
- **YANCOPOULOS** *et al.* Vasculogenesis, Angiogenesis and Growth Factors: Ephrins Enter the Fray at the Boarder. *Cell*, 1998, vol. 93, 661-664
- 60 • **YANCOPOULOS** *et al.* Vasculogenesis, Angiogenesis and Growth Factors: Ephrins Enter the Fray at the Border. *Cell*, 1998, vol. 93, 661-664
- **FISHMAN** *et al.* Fashioning the Vertebrate Heart: Earliest Embryonic Decisions. *Development*, 1997, vol. 124, 65 2099-2117
- **SCHOTT** *et al.* Congenital Heart Disease Caused by Mutations in the Transcription Factor NKX 2.5. *Science*, 1998, vol. 281, 108-111

• **NEMOTO** *et al.* Gene Expression of Neurtrophins and Their Receptors in Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, vol. 245, 284-288

• **SCARISBRICK** *et al.* Coexpression of the mRNAs for NGF, BDNF and NT-3 in the Cardiovascular System of Pre and Post Natal Rat. *J. Neurosci.*, 1993, vol. 13, 875-893

• **DONOVAN** *et al.* Neurotrophin and Neurotrophin Receptors in Vascular Smooth Muscle Cells: Regulation of Expression in Response to Injury. *A. J. Path.*, 1995, vol. 147, 309-324

• **EDELBERG** *et al.* PDGF Mediates Cardiac Microvascular Communication. *J. Clin. Invest.*, 1998, vol. 102, 837-843

• **TIMMUSK** *et al.* Widespread and Developmentally Regulated Expression of Neurotrophin-4 mRNA in Rat Brain and Peripheral Tissues. *Eur. J. Neurosci.*, 1993, vol. 5, 645-613

• **ERICKSON** *et al.* Mice Lacking Brain-Derived Neurotrophic Factor Exhibit Visceral Sensory Neuron Losses Distinct From Mice Lacking NT4 and Display a Severe Developmental Deficit in Control of Breaching. *J. Neurosci.*, 1996, vol. 16, 5361-5371

• **YAMAMOTO** *et al.* Human Platelets Contain Brain-Derived Neurotrophic Factor. *J. Neurosci.*, 1990, vol. 10, 3469-3478

• **EDELBERG** *et al.* PDGF Mediates. Cardiac Microvascular Communication. *J. Clin. Invest.*, 1998, vol. 102, 837-843

• **WANG** *et al.* Molecular Distinction and Angiogenic Interaction Between Embryonic Arteries and Veins Revealed by Ephrin-B2 and its Receptor Eph-B4. *Cell*, 1998, vol. 93, 741-753

• **PASSANITI** *et al.* A Simple Quantitative Method for Assessing Angiogenesis and Antiangiogenic Agents Using Reconstituted Basement Membrane, Heparin, and Fibroblast Growth Factor. *Lab. Invest.*, 1992, vol. 67, 519-528.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un ligando del receptor trk seleccionado entre el grupo que consta del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el NT-3, y NT-4, o una molécula de ácido nucleico que codifica para dicho ligando del receptor trk, en la preparación de un medicamento para la inducción de la angiogénesis en un paciente que presenta una isquemia cardiaca, para así tratar la isquemia cardiaca.

2. Uso de un ligando del receptor trk seleccionado entre el grupo que consta de BDNF, NT-3 y NT-4, o una molécula de ácido nucleico que codifica para dicho ligando del receptor trk, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un desorden vascular que es tratable mediante la inducción de la angiogénesis.

3. Uso según la Reivindicación 2 en donde el desorden vascular es un desorden vascular no cardiaco.

4. Uso según la Reivindicación 3 en donde el desorden vascular no cardiaco es la aterosclerosis o una enfermedad vascular renal.

5. Uso según cualquiera de las Reivindicaciones 1-4 en donde el medicamento es conveniente para la administración oral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, mediante instilación intranasal, mediante la aplicación a membranas mucosas o mediante instilación dentro de las paredes de órganos huecos o de los nuevos vasos sanguíneos vascularizados.

Figura 1

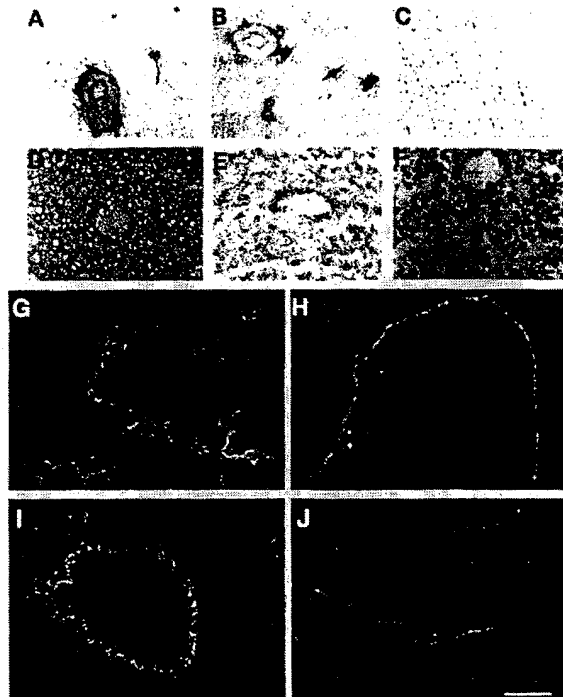


Figura 2

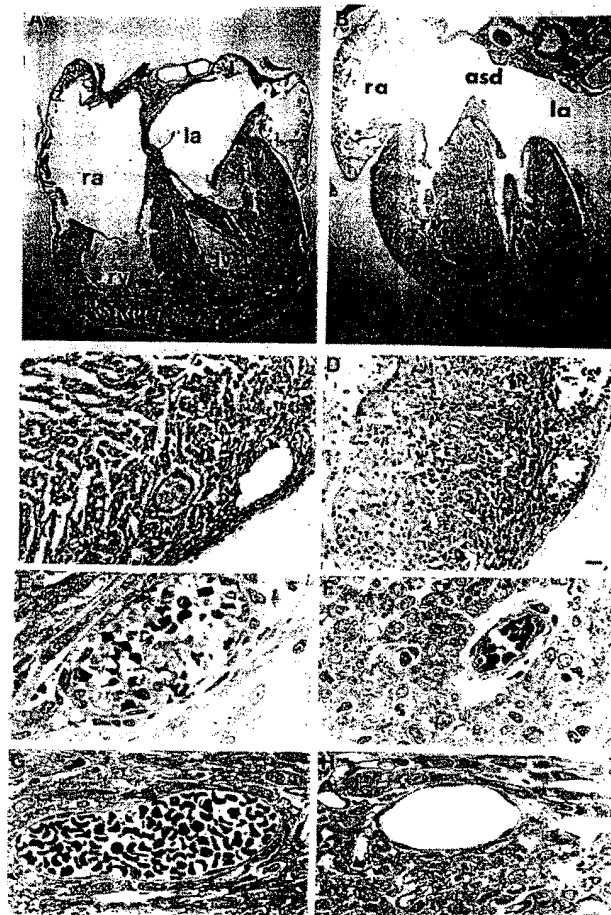


Figura 3

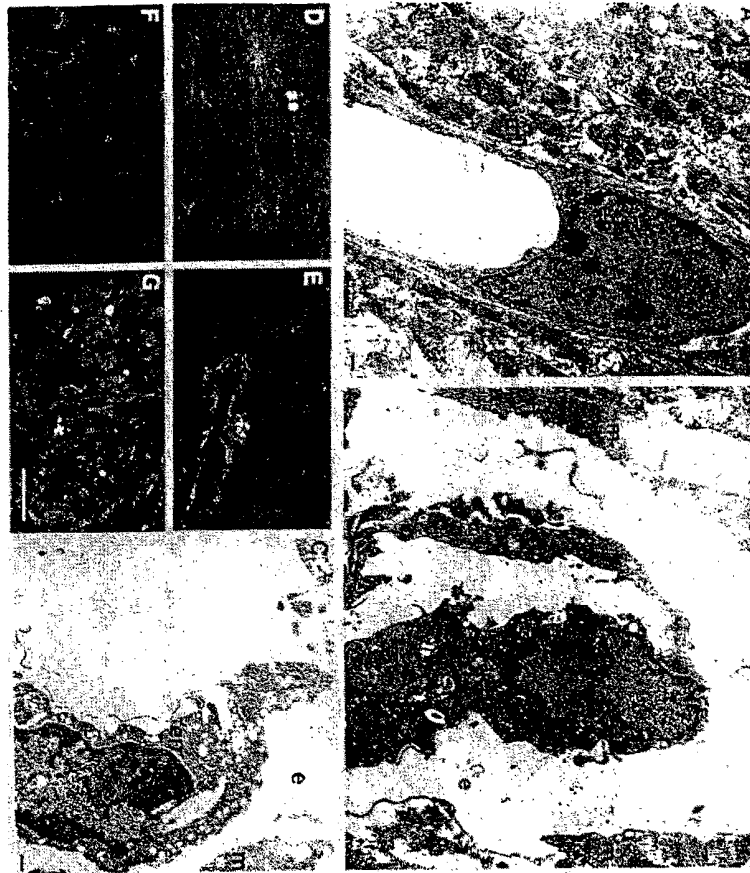


Figura 4

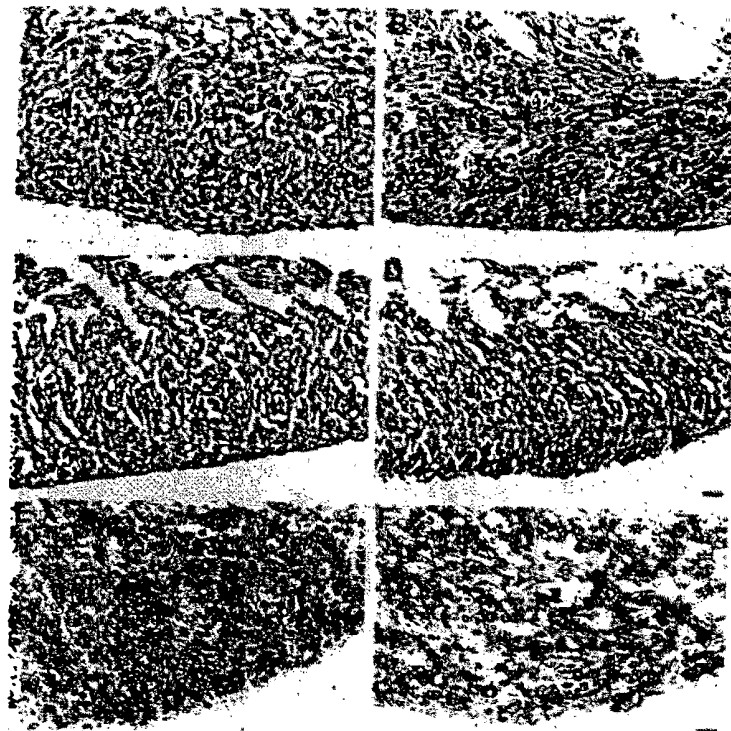
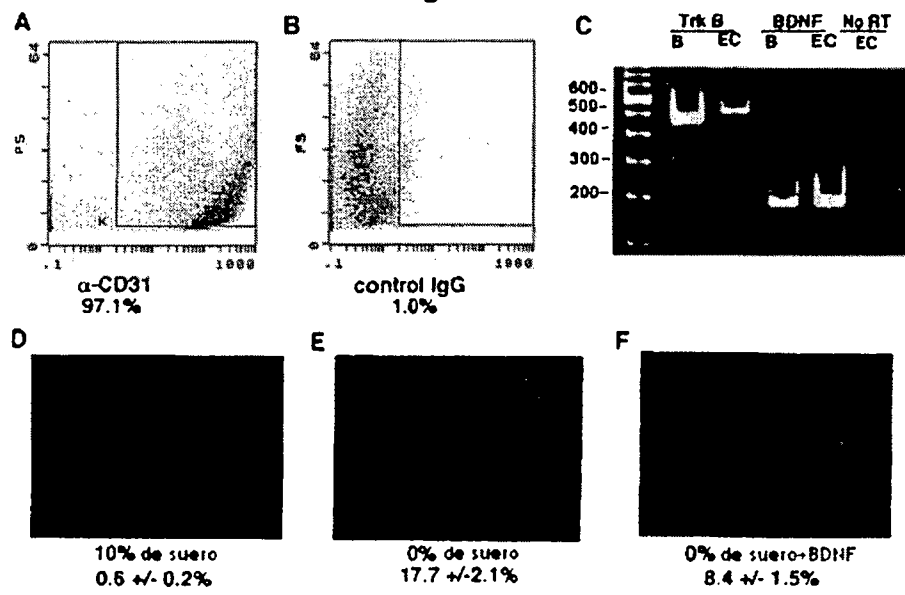


Figura 5



Figura 6



**G**

|                         | Análisis por citometría de flujo de unión de anexina |             |                  |                  |
|-------------------------|------------------------------------------------------|-------------|------------------|------------------|
|                         | 10% de suero                                         | 0% de suero | 0% de suero+BDNF | 0% de suero+VEGF |
| % de vida               | 95.9                                                 | 29.7        | 62.4             | 53.3             |
| % de apoptosis temprana | 1.5                                                  | 46.8        | 22.7             | 15.1             |
| % de apoptosis tardía   | 2.2                                                  | 22.6        | 12.6             | 22.1             |

Figura 7

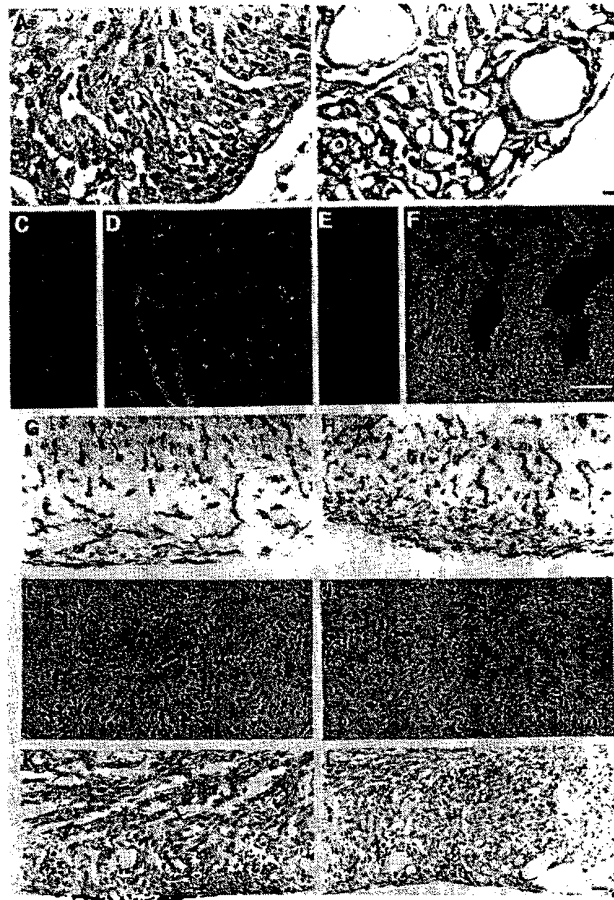


Figura 8

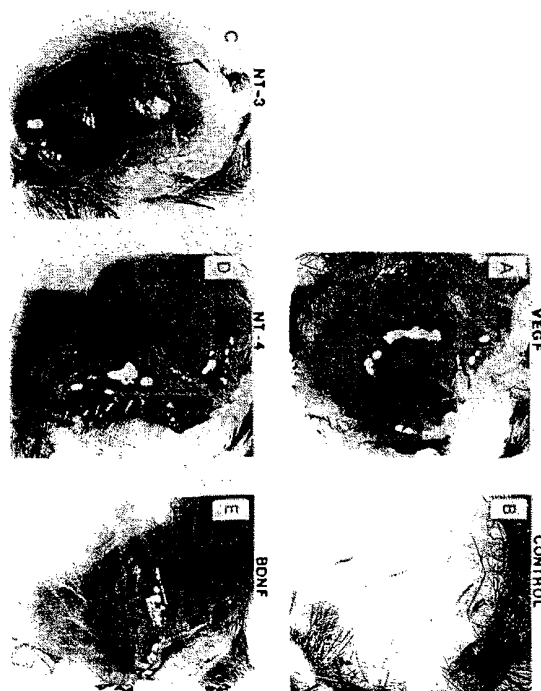


Figura 9

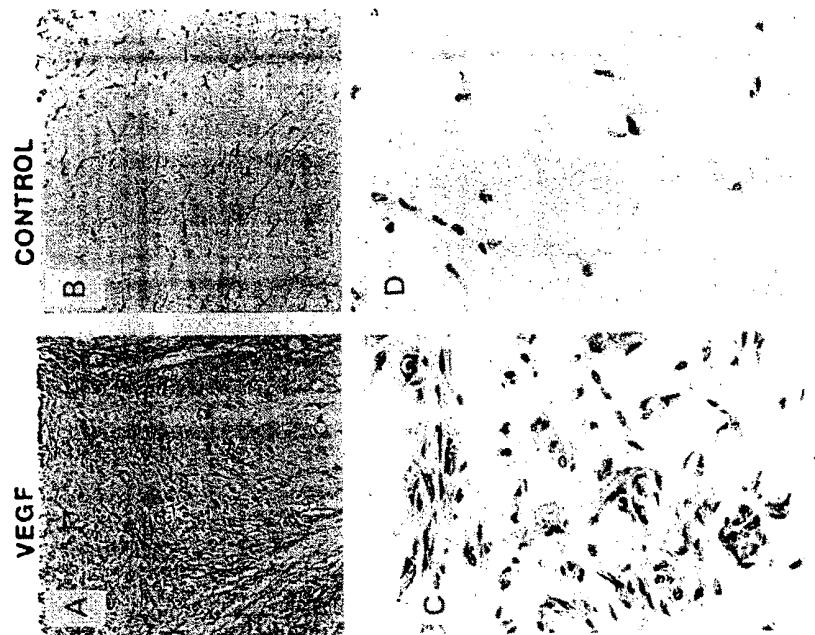


Figura 10

