



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 335 569**

(51) Int. Cl.:

**A61K 38/22** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

**A61P 15/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **00956758 .7**

(96) Fecha de presentación : **04.09.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1210108**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **05.06.2002**

(54) Título: **Uso de leptina junto con un inhibidor de VEGF y/o un inhibidor de angiogénesis para la inhibición de la proliferación de células endoteliales.**

(30) Prioridad: **05.09.1999 IL 131739**  
**10.10.1999 IL 132312**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.03.2010**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.03.2010**

(73) Titular/es:  
**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT Co., Ltd.**  
**The Weizmann Institute of Science**  
**P.O. Box 95**  
**Rehovot 76100, IL**

(72) Inventor/es: **Rubinstein, Menachem;**  
**Cohen, Batya y**  
**Barkan, Dalit**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

**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

Uso de leptina junto con un inhibidor de VEGF y/o un inhibidor de angiogénesis para la inhibición de la proliferación de células endoteliales.

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la inhibición reversible de la proliferación de células endoteliales y a la modulación de la angiogénesis en el sistema reproductor de las hembras. Más particularmente, la presente invención se refiere al uso de leptina u homólogos o derivados de leptina, opcionalmente junto con inhibidores de la acción del factor de crecimiento endotelial vascular (abreviadamente en lo sucesivo VEGF por sus iniciales en inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) o inhibidores de la síntesis del VEGF, en la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis o modular procesos angiogénicos. La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende leptina un homólogo o derivado de leptina junto con un inhibidor de la acción del VEGF o de la síntesis del VEGF y/o un inhibidor de la angiogénesis.

**Fundamento de la invención**

Como se usa en la presente memoria, el término “angiogénesis” significa la generación de nuevos vasos sanguíneos en un tejido u órgano. En estados fisiológicos normales, los seres humanos o los animales experimentan angiogénesis solamente en situaciones específicas muy restringidas. Por ejemplo, la angiogénesis se observa normalmente en la curación de heridas, el desarrollo del feto y del embrión, la formación del cuerpo lúteo, el endometrio y la placenta y el crecimiento de tejido adiposo.

El término “endotelio” significa una capa delgada de células epiteliales planas que reviste las cavidades serosas, los vasos linfáticos, y los vasos sanguíneos. La angiogénesis tanto la controlada como la no controlada se piensa que transcurren de un modo similar. Las células endoteliales y los pericitos, rodeados por una membrana basal, forman los vasos sanguíneos capilares. La angiogénesis comienza con la erosión de la membrana basal por enzimas liberadas por las células endoteliales y los leucocitos. Las células endoteliales, que revisten el lumen de los vasos sanguíneos, luego sobresalen a través de la membrana basal. Los estimulantes angiogénicos inducen a las células endoteliales a migrar a través de la membrana basal erosionada. Las células que emigran forman un “brote” del vaso sanguíneo precursor, en donde las células endoteliales experimentan mitosis y proliferan. Los brotes endoteliales se unen entre sí formando bucles o lazos capilares, que crean el nuevo vaso sanguíneo.

La angiogénesis no regulada persistente ocurre en una multiplicidad de estados morbosos, metástasis de tumores y crecimiento anormal por células endoteliales y da cuenta del daño patológico visto en estos estados. Los diversos estados morbosos patológicos en los cuales está presente la angiogénesis no regulada se han agrupado como enfermedades dependientes de angiogénesis o asociadas a angiogénesis. La hipótesis de que el crecimiento tumoral es dependiente de angiogénesis fue propuesto primeramente en 1971. (Folkman J., *Tumor angiogenesis: Therapeutic implications*. *N. Engl. J. Med.* 285:1182-1186, 1971). En sus términos más sencillos establece: “Una vez que prende un tumor, cada aumento en la población de células tumorales debe ser precedido por el aumento de nuevos capilares que convergen, en el tumor.” El “prendimiento” de un tumor se entiende corrientemente que indica una fase pre-vascular de crecimiento del tumor en la cual una población de células tumorales que ocupa un volumen de unos cuantos milímetros cúbicos y que no sobrepasa unos cuantos millones de células, puede sobrevivir en microvasos hospedantes existentes. La expansión del volumen del tumor más allá de esta fase requiere la inducción de nuevos vasos sanguíneos capilares. Por ejemplo, las micro-metástasis pulmonares en la fase pre-vascular temprana en ratones sería indetectable excepto por microscopía de alta resolución en secciones histológicas.

La morfogénesis vascular está regulada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) inducido por hipoxia y sus receptores celulares endoteliales Flk1 y Flt 1. Se han identificado otros dos factores angiogénicos, angiopoietina-1 y 2 (Ang1 y Ang2), que se unen a un receptor celular endotelial común (Tie2), (S. Davis, *et al.*, *Cell* 87, 1161-1169, 1996; P. C. Maisonpierre, *et al.*, *Science* 277, 55-60, 1997). Ang1 es un agonista del receptor (C. Suri, *et al.*, *Science* 282, 468-471, 1998), expresado constitutivamente en muchos tejidos, mientras que Ang2 es un antagonista del receptor, cuya expresión está limitada a sitios de remodelación vascular. Hasta ahora, Ang2 se identificó en tejidos fetales, en células endoteliales, en células de la musculatura lisa y en órganos reproductivos de hembras de ratones adultos y seres humanos (P. C. Maisonpierre, *et al.*, *Science* 277, 55-60, 1997; B. Witzanbichler, P. C. Maisonpierre, P. Jones, G. D. Yancopoulos, J. M. Isner, *J. Biol. Chem.* 273, 18514-18521, 1998; S. J. Mandriota, M. S. Pepper, *Circ. Res.* 83, 852-859, 1998). Tanto el VEGF como Ang2 están sobre-regulados en órganos reproductivos de hembras en la morfogénesis vascular, mientras que solamente Ang2 se expresa en la regresión de los vasos sanguíneos. Ang2 probablemente marca estos vasos para regresión por un mecanismo apoptótico, aunque no se ha obtenido inducción de la apoptosis por Ang2 en células endoteliales cultivadas (B. Witzanbichler, P. C. Maisonpierre, P. Jones, G. D. Yancopoulos, J. M. Isner, *J. Biol. Chem.* 273, 18514-18521, 1998; J. Holash, *et al.*, *Science* 284, 1994-1998, 1999; D. Hanahan, *Science* 277, 48-50, 1997).

Un anticuerpo específico contra el VEGF reduce la densidad de los microvasos y causa una inhibición “significativa o acusada” del crecimiento de tres tumores humanos, que dependen del VEGF como su único mediador de la angiogénesis (en ratones atímicos). El anticuerpo no inhibe el crecimiento de las células tumorales *in vitro*. (Kim K J,

*et al., Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. Nature* 362:841-844, 1993).

Un inhibidor específico de la angiogénesis (AGM-1470) inhibe el crecimiento tumoral y la metástasis *in vivo*, pero es mucho menos activo en inhibir la proliferación de células tumorales *in vitro*. Inhibe la proliferación de células endoteliales vasculares la mitad del máximo a un concentración logarítmica 4 veces inferior a la que inhibe la proliferación de células tumorales. (Ingber D, *et al.*, *Angiogenesis: Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. Nature*, 48:555-557, 1990). También hay una evidencia clínica indirecta de que el crecimiento es dependiente de la angiogénesis.

La microcirculación en el tejido adiposo es única dentro del sistema vascular debido a la capacidad de este sistema de crecer durante la mayor parte de la vida de un adulto (D. L. Crandall, G. J. Hausman, J. G. Kral, *Microcirculation* 4, 211-232, 1997). Realmente, los tejidos adiposos pardos y blancos tienen una microvasculatura extensa y expresan altos niveles de VEGF (K. P. Claffey, W. O. Wilkison, B. M. Spiegelman, *J. Biol. Chem.* 267, 16317-16322, 1992; Q. X. Zhang, *et al.*, *J. Surg. Res.* 67, 147-154, 1997). Por tanto, es evidente que la angiogénesis desempeña un papel principal en el crecimiento y mantenimiento del tejido adiposo. Si esta actividad angiogénica pudiera ser reprimida o eliminada, entonces entraría en regresión el tejido adiposo.

La obesidad, definida como un exceso de grasa del cuerpo con respecto a una masa corporal delgada, está asociada con morbilidades psicológicas y médicas importantes, incluyendo estas últimas hipertensión, elevados lípidos en sangre, y diabetes mellitus de tipo II o no dependiente de insulina (NIDDM). Hay 6-10 millones de personas con NIDDM en EE.UU., incluyendo 18% de la población de 65 años (Hanis *et al.*, *Ira. J. Obes.*, 11:275-283, 1987). Aproximadamente 45% de los varones y 70% de las mujeres con NIDDM son obesos, y su diabetes se mejora sustancialmente o se elimina mediante reducción del peso (Harris, *Diabetes Care*, 14(3):639-648, 1991).

Y. Zhang *et al* (*Nature*, 372, 425-431, 1994) sugieren que una de las moléculas que desempeña un papel clave en la regulación del balance energético es la proteína *ob* también denominada leptina. Zhang *et al.*, también describen la clonación y secuenciación de la leptina, tanto de ratón como humana. La memoria de la patente GB N° 2292382 se refiere entre otras cosas a polipéptidos, polipéptidos *ob* o sus variantes alélicas o análogos y a su uso para modular el peso corporal. En particular, dicha patente GB 2292382 describe que las leptinas y algunos de sus análogos, tales como agonistas, serían útiles para el tratamiento de la obesidad. Realmente, se encontró que la leptina derivada de adipocitos regula la ingesta de alimentos en roedores a través de su acción sobre un receptor hipotalámico. Además, estudios posteriores han mostrado que la leptina del suero está elevada en individuos obesos y que hay una correlación directa entre la leptina en suero y el índice de masa corporal (peso en kg dividido por el cuadrado de la altura en metros). La discrepancia entre el efecto de la leptina como un inhibidor de la ingesta de alimentos y los altos niveles de leptina en individuos obesos condujo a la teoría de "resistencia a la leptina", una expresión que sugiere que los individuos obesos no responden a sus elevados niveles de leptina y mantienen su alta masa corporal. Por tanto, está claro que la leptina por sí misma no es eficaz en reducir la masa de tejido adiposo (P. Prole, M. L. Wong, J. Licinio, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 1285-1290, 1998).

Por tanto, existe la necesidad de una composición y método que pueda inhibir el crecimiento indeseado de vasos sanguíneos, especialmente en tumores y tejidos adiposos. La composición también debe ser capaz de modular la formación de capilares en otros procesos angiogénicos, tales como la curación de heridas y la reproducción. La composición y el método para inhibir la angiogénesis deben ser preferiblemente no tóxicos y producir pocos efectos secundarios. Si la actividad angiogénica pudiera reprimirse o eliminarse, entonces el tumor, aunque presente, no crecería y el tejido adiposo entraría en regresión. En el estado morbosos, la prevención de la angiogénesis podría evitar el daño causado por la invasión del nuevo sistema microvascular. Las terapias dirigidas al control de los procesos angiogénicos podrían conducir a la abrogación o mitigación de estas enfermedades.

Los ratones carentes de leptina no son fértiles debido a que se requiere la leptina para la liberación por el hipotálamo de la hormona liberadora de la gonadotropina (GNRH). La GNRH actúa sobre la glándula pituitaria y es esencial para la liberación de las gonadotropinas FSH y LH. De hecho, la inyección de leptina a ratones deficientes en leptina restableció su esterilidad. Las hembras que tienen una baja masa de tejido adiposo, como es el caso de las atletas o las pacientes con anorexia nerviosa no son fértiles debido a un nivel insuficiente de leptina producida por el tejido adiposo.

Una de las características del ciclo del estro es la angiogénesis de los ovarios, que tiene lugar durante la maduración del folículo en el ovario. La ruptura del folículo y la formación del cuerpo lúteo están asociadas con una regresión extensa de los vasos sanguíneos. Se mostró que estos tejidos expresan VEGF y Ang2. Las terapias dirigidas al control de los procesos angiogénicos en el sistema reproductor de hembras podría regular la fertilidad.

## Sumario de la invención

La presente invención se refiere al uso de leptina, un homólogo o un derivado de leptina, opcionalmente junto con un inhibidor de la acción del VEGF o de la síntesis del VEGF y/o un inhibidor de la angiogénesis, en la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis por inducción de Ang2, en donde dicho homólogo de leptina tiene una actividad similar a la leptina, y en donde dicho derivado de leptina induce la actividad inhibidora endotelial.

Se puede emplear de acuerdo con la invención cualquier inhibidor del VEGF conocido farmacéuticamente aceptable.

La invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que comprenden leptina, un homólogo de leptina o un derivado de leptina junto con un inhibidor de la acción del VEGF o de la síntesis del VEGF y/o un inhibidor de la angiogénesis, en donde dicho homólogo de leptina tiene una actividad sustancialmente similar a la leptina, y en donde dicho derivado de leptina induce actividad inhibidora endotelial.

Preferiblemente la composición se emplea en enfermedades mediadas por angiogénesis.

## Breve descripción de las figuras de los dibujos

La Figura 1 muestra una regresión de un vaso sanguíneo inducida por leptina y la apoptosis en tejidos adiposos de ratones C57BL-*ob*<sup>-/-</sup>. Los ratones C57BL-*ob*<sup>-/-</sup> fueron inyectados con leptina de m $\ddot{u}$ rdo (2x1  $\mu$ g/g) en los tiempos 0 y 9 horas. Los tejidos adiposos abdominales se retiraron a las 24 y 48 horas. Se visualizaron los vasos sanguíneos en secciones de tejidos por inmuno-tinción con anticuerpos para el Factor VIII (DAKO A/S, Dinamarca). Adviértase que el número de vasos sanguíneos teñidos ha disminuido en 24 y 48 horas tras la inyección.

La Figura 2 muestra un gráfico de dosis-respuesta de la regresión de vasos sanguíneos en tejido adiposo de ratones *ob*<sup>-/-</sup> 24 y 48 horas después de la inyección de leptina.

La Figura 3 muestra el transcurso de tiempo de la regresión de vasos sanguíneos en tejidos adiposos de ratones *ob*<sup>-/-</sup> inyectados con leptina de m $\ddot{u}$ rdo (2x1  $\mu$ g/g).

La Figura 4 muestra una inducción mediada por leptina de angiopoyetina-2 (Ang2) según se analizó PCR con transcripción inversa de RNA de tejidos adiposos. Pista 1, control (sin RNA); pista 2, RNA de tejido adiposo de ratón C57BL normal; pista 3, RNA de tejido adiposo de ratón C57BL inyectado con leptina (2x5  $\mu$ g/g); pista 4, RNA de tejido adiposo de ratón C57BL-*ob*<sup>-/-</sup>; pista 5, RNA de tejido adiposo de ratón C57BL-*ob*<sup>-/-</sup> inyectado con leptina (2x5  $\mu$ g/g). Las reacciones PCR se terminaron antes de la saturación. Los cebadores para PCR de Ang2, n $^{\circ}$  de acceso en GeneBank AF004326, correspondían a las posiciones 637-657 (sentido) y 1167-1147 (inversa).

La Figura 5 muestra el transcurso del tiempo de la inducción de Ang2 por leptina en tejido adiposo de ratones *ob*<sup>-/-</sup>. La leptina (2x5  $\mu$ g/g) se administró a ratones C57BL-*ob*<sup>-/-</sup>, se extrajo el RNA adiposo total en los tiempos indicados y se analizó por transferencia de RNA con sondas para Ang2 de ratón, VEGF y actina.

La Figura 6 muestra un gráfico de dosis-respuesta de inducción de Ang2 en tejido adiposo de ratones *ob*<sup>-/-</sup>. La leptina se administró a los ratones C57BL-*ob*<sup>-/-</sup> y las proteínas adiposas se extrajeron a 48 horas. Se determinó Ang2 por análisis de inmunotransferencia (50  $\mu$ g proteína/pista) con antisuero específico (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). La banda no específica (N.S.) sirve para la normalización de la inmunotransferencia.

La Figura 7 muestra la inducción de Ang2 por leptina en adipocitos cultivados. Los cultivos de pre-adipocitos de ratón no diferenciados 3T3-F442A y adipocitos diferenciados fueron inducidos con leptina (1  $\mu$ g/ml). El RNA total se extrajo en diferentes tiempos y se sometió a transferencia de RNA con sondas para Ang2 de ratón, VEGF y actina. Adviértase la inducción puntuada de Ang2 en adipocitos a las 24 horas y la reducción en el nivel de VEGF después de la diferenciación de pre-adipocitos en adipocitos maduros.

## Descripción detallada

Recientemente, se ha descrito que la leptina actúa como factor angiogénico. Indujo la proliferación celular endotelial *in vitro* en la vena umbilical humana, aumentó la formación de tubos similares a capilares *in vitro* e indujo la neovascularización en córneas de ratones y en una membrana corioalantoica de pollo (M. R. Sierra-Honigsmann, *et al.*, *Science* 281., 1683-1686, 1998; A. Bouloumie, H. C. Drexler, M. Lafontan, R. Busse, *Circ. Res.* 83, 1059-1066, 1998). Aunque estos estudios sugirieron que la leptina puede inducir la angiogénesis en su sitio de producción, todavía no se ha estudiado el papel de la leptina como factor angiogénico en tejido adiposo y en tumores.

De acuerdo con la presente invención se ha encontrado que la leptina, opcionalmente junto con otros agentes, actúa como inductor de la regresión de los vasos sanguíneos en tejidos y en tumores. La potencia de la leptina induce la expresión del factor angiostático angiopoyetina-2 (Ang2) en diversos tejidos, incluyendo los tejidos adiposos y tumorales. La Ang2 es angiostática en ausencia de VEGF. Por tanto la leptina es eficaz para modular la angiogénesis, e inhibir la angiogénesis no deseada, especialmente la angiogénesis relacionada con el crecimiento tumoral, el crecimiento del tejido adiposo y el ciclo del estro.

La presente invención incluye el uso de leptina u homólogos de leptina, o derivados de leptina, opcionalmente junto con uno o más inhibidores de la producción del VEGF o la acción del VEGF (en lo sucesivo: "inhibidores de VEGF") como inhibidores de angiogénesis tumoral y moduladores de la angiogénesis en los órganos reproductivos de hembras.

La presente invención también incluye el uso de leptina u homólogos de leptina, o derivados de leptina, junto con inhibidores del VEGF para inducir la regresión de tejido adiposo y modular la angiogénesis en los órganos reproductivos de hembras.

5 La administración de leptina u homólogos de leptina o derivados de leptina, bien solos o junto con inhibidores del VEGF a un ser humano o animal con tumores metastizados prevascularizados impedirá el crecimiento o expansión de dichos tumores.

10 La administración de leptina u homólogos de leptina o derivados de leptina; en combinación con inhibidores del VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis a hembras modulará la angiogénesis en sus órganos reproductores.

Las enfermedades y procesos que están mediados por la angiogénesis incluyen, pero sin limitación, hemangioma, tumores sólidos, tumores llevados por la sangre, leucemia, metástasis, telangiectasia, psoriasis, escleroderma, granuloma piógeno, angiogénesis del miocardio, enfermedad de Crohn, neovascularización de placas, colaterales de coronarias, colaterales cerebrales, malformaciones arterio-venosas, angiogénesis isquémicas del limbo, enfermedades de la córnea, rubeosis, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, fibroplasia retrolental, artritis, neovascularización diabética, degeneración macular, curación de heridas, úlcera péptica, enfermedades relacionadas con *Helicobacter*, fracturas, queloides, vasculogénesis, hematopoyesis, ovulación, menstruación, placentación, y fiebre por arañazo de gato.

20 La administración de leptina u homólogos de leptina o derivados de leptina, junto con inhibidores del VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis a un ser humano o un animal reducirá la angiogénesis aberrante asociada con las enfermedades antes mencionadas más eficazmente que el inhibidor del VEGF solo u otros inhibidores de la angiogénesis cuando se aplican sin leptina. También es posible modular los procesos angiogénicos por terapia de genes como se describirá más adelante.

La presente invención incluye un uso de leptina u homólogos de leptina o derivados de leptina, opcionalmente junto con inhibidores del VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad mediada por la angiogénesis. La cantidad eficaz de leptina u homólogos de leptina o derivados de leptina, opcionalmente junto con inhibidores del VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis se administra a los

30 pacientes en una composición farmacéuticamente aceptable.

Ha de entenderse que en la presente invención se contempla incluir el uso de cualquiera de los homólogos de leptina que induzcan la actividad inhibidora endotelial. Los homólogos de leptina se refieren a proteínas, en las cuales uno o más de los residuos de aminoácidos de una leptina natural están reemplazados por diferentes residuos de aminoácidos o están delecionados, o uno o más residuos de aminoácidos están añadidos a la secuencia natural de leptina, sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con una leptina de tipo natural. Estos homólogos se preparan por síntesis conocidas y/o por técnicas de mutagénesis dirigidas al sitio, o cualesquiera otras técnicas conocidas adecuadas.

40 Cualquiera de tales homólogos tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de la de la leptina, de tal modo que tiene una actividad sustancialmente similar a la de la leptina. Una de tales actividades es la capacidad de un homólogo de leptina de reducir el peso corporal de ratones *ob/ob*. Por tanto, se puede determinar si cualquier homólogo dado tiene sustancialmente la misma actividad que la leptina por medio de experimentación habitual.

En una realización preferida, cualquiera de tales muteínas tiene al menos 40% de identidad de secuencia u homología con la secuencia de cualquier leptina. Más preferiblemente, tiene al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o, más preferiblemente al menos 90% de identidad de secuencia u homología.

50 Los homólogos de los polipéptidos de leptina, que se pueden usar de acuerdo con la presente invención, o los ácidos nucleicos que los codifican, incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que pueden ser obtenidos por métodos usuales por un experto ordinario en la técnica, sin experimentación indebida, basándose en las enseñanzas y directrices presentadas en esta memoria. Para una descripción detallada de la química y estructura de las proteínas, véase Schulz, G.E. *et al.*, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, New York, 1978; y Creighton, T.E., *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, que se incorporan en la presente memoria como referencia. Para una presentación de sustituciones de secuencias de nucleótidos, tales como preferencia de codones, véase Ausubel *et al.*, *supra*, en §§ A.1.1-A.1.24, y Sambrook *et al.*, *supra*, en los Apéndices C y D.

60 Los cambios preferidos para homólogos de acuerdo con la presente invención son las que son conocidos como sustituciones "conservadoras". Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de polipéptidos de leptina pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que tenga propiedades físico-químicas suficientemente similares a la sustitución entre miembros del grupo que conservarán la función biológica de la molécula, Grantham, *Science*, Vol. 185, pp. 862-864 (1974). Es evidente que también pueden hacerse inserciones y delecciones de aminoácidos en las secuencias antes definidas sin alterar su función, particularmente si las inserciones o delecciones sólo implican unos cuantos aminoácidos, por ejemplo, menos de treinta, y preferiblemente menos de diez, y no eliminan o desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, por ejemplo, residuos de cisteína, Anfinsen, "*Princi-*

## ES 2 335 569 T3

*ples That Govern The Folding of Protein Chains*”, *Science*, Vol. 181, pp. 223-230 (1973). Las proteínas y muteínas producidas por tales deleciones y/o inserciones caen dentro del alcance de la presente invención.

Preferiblemente, los grupos aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla I. Más preferiblemente, los grupos aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla II; y más preferiblemente los grupos aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla III.

TABLA I

*Grupos preferidos de sinónimos*

|    | <b>Aminoácidos</b> | <b>Grupo sinónimo de aminoácidos</b> |
|----|--------------------|--------------------------------------|
|    | Ser                | Ser, Thr, Gly, Asn                   |
| 15 | Arg                | Arg, Gln, Lys, Glu, His              |
|    | Leu                | Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu         |
|    | Pro                | Gly, Ala, Thr, Pro                   |
|    | Thr                | Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr    |
| 20 | Ala                | Gly, Thr, Pro, Ala                   |
|    | Val                | Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val         |
|    | Gly                | Ala, Thr, Pro, Ser, Gly              |
|    | Ile                | Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile         |
| 25 | Phe                | Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe    |
|    | Tyr                | Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr    |
|    | Cys                | Ser, Thr, Cys                        |
|    | His                | Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His         |
| 30 | Gln                | Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln    |
|    | Asn                | Gln, Asp, Ser, Asn                   |
|    | Lys                | Glu, Gln, His, Arg, Lys              |
|    | Asp                | Glu, Asn, Asp                        |
| 35 | Glu                | Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu    |
|    | Met                | Phe, Ile, Val, Leu, Met              |
|    | Trp                | Trp                                  |

TABLA II

*Grupos más preferidos de sinónimos*

|    | <b>Aminoácidos</b> | <b>Grupo sinónimo de aminoácidos</b> |
|----|--------------------|--------------------------------------|
|    | Ser                | Ser                                  |
|    | Arg                | His, Lys, Arg                        |
| 50 | Leu                | Leu, Ile, Phe, Met                   |
|    | Pro                | Ala, Pro                             |
|    | Thr                | Thr                                  |
|    | Ala                | Pro, Ala                             |
| 55 | Val                | Val, Met, Ile                        |
|    | Gly                | Gly                                  |
|    | Ile                | Ile, Met, Phe, Val, Leu              |
|    | Phe                | Met, Tyr, Ile, Leu, Phe              |
| 60 | Tyr                | Phe, Tyr                             |
|    | Cys                | Cys, Ser                             |
|    | His                | His, Gln, Arg                        |
|    | Gln                | Glu, Gln, His                        |
| 65 | Asn                | Asp, Asn                             |
|    | Lys                | Lys, Arg                             |
|    | Asp                | Asp, Asn                             |

|     |                         |
|-----|-------------------------|
| Glu | Glu, Gln                |
| Met | Met, Phe, Ile, Val, Leu |
| Trp | Trp                     |

5

10

TABLA III

*Grupos más preferidos de sinónimos*

15

| Aminoácidos | Grupo sinónimo de aminoácidos |
|-------------|-------------------------------|
|-------------|-------------------------------|

20

25

30

35

40

|     |               |
|-----|---------------|
| Ser | Ser           |
| Arg | Arg           |
| Leu | Leu, Ile, Met |
| Pro | Pro           |
| Thr | Thr           |
| Ala | Ala           |
| Val | Val           |
| Gly | Gly           |
| Ile | Ile, Met, Lou |
| Phe | Phe           |
| Tyr | Tyr           |
| Cys | Cys, Ser      |
| His | His           |
| Gln | Gln           |
| Asn | Asn           |
| Lys | Lys           |
| Asp | Asp           |
| Glu | Glu           |
| Met | Met, Ile, Leu |
| Trp | Met           |

45

Ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que se pueden usar para obtener homólogos de polipéptidos o proteínas de leptina para uso en la presente invención incluyen etapas de métodos conocidos, tales como las presentadas en las patentes de EE.UU. RE 33.653, 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462 de Mark *et al*; 5.116.943 de Koths *et al.*, 4.965.195 de Namen *et al*; 4.879.111 de Chong *et al*; y 5.017.691 de Lee *et al*; y proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente de EE.UU. 4.904.584 (Shaw *et al*).

50

55

En otra realización preferida de la presente invención, un homólogo de leptina tiene una secuencia de aminoácidos esencialmente correspondiente a la de la leptina. La expresión “esencialmente correspondiente a” pretende abarcar las proteínas con cambios secundarios en la secuencia de la proteína natural que no afectan a las características básicas de las proteínas naturales, particularmente en lo que se refiere a su capacidad para inducir actividad angiostática. El tipo de cambios que se considera generalmente que caen dentro del significado de la expresión “esencialmente correspondiente a” son aquellos que resultarían de técnicas de mutagénesis convencionales del DNA que codifica estas proteínas, dando como resultado unas cuantas modificaciones secundarias, y el escrutinio de la actividad deseada del modo antes indicado.

60

65

Ha de entenderse que la presente invención contempla incluir el uso de los de cualquiera de los derivados de leptina que inducen actividad inhibidora endotelial cuando se aplican opcionalmente junto con un inhibidor del VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis. La presente invención incluye el uso de una proteína de leptina completa, el uso de derivados de la proteína leptina y el uso de fragmento biológicamente activos de la proteína leptina. Los derivados de leptina de acuerdo con la invención tienen uno o más restos químicos unidos a ellos, incluyendo polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol. Los derivados de polietilenglicol derivatizados pueden ser mono-, di-, tri- o tetra-pegilados, por ejemplo, monopegilados N-terminales. Los derivados monopegilados N-terminales preferidos de leptina, tienen opcionalmente una metionina (pegilada) en el extremo N.

Se han descrito diversos inhibidores de la actividad de VEGF o la producción de VEGF y se pueden usar en combinación con leptina para inhibir la angiogénesis. Entre estos inhibidores están 3,7-dimetil-1-propargilxantina (DMPX), un antagonista A2, 7-(beta-hidroxietil)teofilina, 8-fenilteofilina, el antagonista del receptor A2 de adenosina CSC (8-(3-cloroestiril)cafeína), teobromina, una variante antagonística del VEGF, el receptor de VEGF soluble sFLT-1, Tranilast, ácido 8-(3-oxo-4,5,6-trihidroxi-3H-xanten-9-il)-1-naftoico, suramina y el factor 4 de plaquetas (E. Hashimoto, *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 318-24, 1994; S. Fischer, R. Knoll, D. Renz, G. F. Karliczek, W. Schaper, *Endothelium* 5, 155-165, 1997; H. Takagi, G. L. King, G. S. Robinson, N. Ferrara, L. P. Aiello, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 2165-2176, 1996; E. Barcz, *et al.*, *Oncol. Rep.* 5, 517-520, 1998; G. Siemeister, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4625-4629, 1998; W. Roeckl, *et al.*, *Exp. Cell Res.* 241, 161-170, 1998; S. Komaya *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* 127, 537-545, 1999; K. Igarashi *et al.*, *Int. J. Mol. Med.* 2, 211-215, 1998; J. Waltenberger *et al.*, *J. Mol. Cell Cardiol.* 28, 1523-1529, 1996; S. Greengrinvitch *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270, 15059-15065, 1995).

Se han descrito diversos inhibidores de angiogénesis y se pueden usar en combinación con leptina para inhibir la angiogénesis más eficazmente que cuando se usa sola. Entre estos inhibidores están K1-5 (Cao, R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 5728-5733, 1999), angiostatina, endostatina, BB-94 y AGM-1470 (Bergers G. *et al.*, *Science* 284, 808-812, 1999).

También está comprendido en la presente invención el uso de vectores de expresión que codifican leptina u homólogos de leptina, proporcionados por terapia génica, junto con inhibidores de la acción o producción de VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis para preparar medicamentos para la inhibición de la angiogénesis en tumores. Tales medicamentos pueden ser empleados en métodos terapéuticos que implican sistemas de administración intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, nasal, oral o pulmonar.

También está comprendido en la presente invención el uso de vectores de expresión que codifican leptina u homólogos de leptina, proporcionados por terapia génica, en combinación con inhibidores de la acción o la producción del VEGF u otros inhibidores de angiogénesis para preparar medicamentos para la regresión de tejidos adiposos. Dicho uso puede ser útil para tratar un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diabetes, alta presión de la sangre y alto colesterol y como parte de una terapia de combinación con un medicamento para tratar dichos trastornos. Dichos medicamentos se pueden emplear en métodos terapéuticos que implican sistemas de administración intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, nasal, oral o pulmonar.

Las enfermedades mediadas por angiogénesis incluyen, pero sin limitación, obesidad; tumores sólidos; tumores llevados por la sangre, tal como leucemias; metástasis tumoral; tumores benignos, por ejemplo hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomias, y granulomas piógenos; artritis reumatoide; psoriasis; enfermedades angiogénicas oculares, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía de prematuridad, degeneración macular, rechazo de injerto de córnea, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rubeosis; síndrome de Osler-Webber; angiogénesis del miocardio; neovascularización de placas; telangiectasia; articulaciones hemofiliacas, angiofibroma; y granulación de heridas.

La leptina o los homólogos de leptina, o los derivados de leptina, junto con VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis son útiles en la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades con una estimulación excesiva o anormal de las células endoteliales. Estas enfermedades incluyen, pero sin limitación, adherencias intestinales, enfermedad de Crohn, arteriosclerosis, escleroderma y cicatrices hipertróficas, es decir, queloides.

La leptina o los homólogos de leptina o los derivados de leptina, junto con inhibidores del VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis pueden usarse en combinación con otras composiciones y métodos para preparar medicamentos para el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, un tumor se puede tratar convencionalmente por cirugía, radiación o quimioterapia combinadas con leptina u homólogos de leptina o derivados de leptina, opcionalmente junto con inhibidores del VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis y luego se pueden administrar al paciente leptina u homólogos de leptina o derivados de leptina, opcionalmente junto con inhibidores del VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis para extender la dormición de las micrometástasis y estabilizar e inhibir el crecimiento de cualquier tumor primario residual.

Adicionalmente, la leptina o los homólogos de leptina o los derivados de leptina, junto con inhibidores del VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis, se combinan con excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la composición isotónica con la sangre del receptor al que van destinadas; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones pueden ser presentadas en recipientes de monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas herméticamente cerradas y viales, y pueden ser conservadas estado secado por congelación (liofilizado) que sólo requiere la adición de vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos de la clase previamente descrita.

Las composiciones pueden incluir opcionalmente una matriz de liberación prolongada, tal como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas. Una matriz de liberación prolongada, tal como se usa en la presente memoria es una matriz hecha de materiales, usualmente polímeros, que son degradables por hidrólisis enzimática o con ácido/base o por disolución. Una vez insertada en el cuerpo, la matriz es activada por las enzimas y los fluidos corporales. La matriz de liberación prolongada se elige deseablemente de materias biocompatibles, tales

como liposomas, polilactidas [poli(ácido láctico)], poliglicolida (polímero de ácido glicólico), polilactida co-glicolida (co-polímeros de ácido láctico y ácido glicólico), polianhídridos, poli(orto)ésteres, polipéptidos, ácido hialurónico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, fosfolípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos tales como fenilalanina, tirosina, isoleucina, polinucleótidos y polivinilpirrolidona.

Una matriz biodegradable preferida es una matriz de uno de polilactida, poliglicolida o polilactida co-glicolida (co-polímeros de ácido láctico y ácido glicólico). Los polímeros que se implantan en las proximidades donde se desea la administración del fármaco, por ejemplo, en el tejido adiposo o en un sitio de un tumor o se implantan de modo que la leptina o derivados de leptina, opcionalmente junto con inhibidores del VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis se libera lentamente de modo sistémico. Los polímeros biodegradable y su uso están descritos por ejemplo, en detalle en Brem *et al.*, *J. Neurosurg.* 74:441-446 (1991), que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad.

Las composiciones farmacéuticas moduladoras de la angiogénesis de acuerdo con la presente invención pueden ser un sólido, líquido o aerosol y se pueden administrar por cualquier ruta conocida de administración. Ejemplos de composiciones terapéuticas sólidas incluyen píldoras, cremas y unidades de dosificación implantables. Las píldoras se pueden administrar por vía oral; las cremas terapéuticas se pueden administrar tópicamente. Las unidades de dosificación implantables se pueden administrar localmente, por ejemplo en un sitio de tumor, o pueden ser implantadas para liberación sistémica de la composición terapéutica moduladora de la angiogénesis, por ejemplo subcutáneamente. Ejemplos de composiciones líquidas incluyen composiciones adaptadas para la inyección subcutánea, intravenosa, intra-arterial y composiciones para administración tópica e intraocular. Ejemplos de composiciones en aerosol incluyen una composición de inhalador para administración a los pulmones.

Debe entenderse que además de los ingredientes, mencionados específicamente antes, las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica en relación con el tipo de composición en cuestión. Opcionalmente, se pueden incorporar, o combinar de otro modo, con leptina u homólogos de leptina o derivados de leptina agentes citotóxicos, opcionalmente junto con inhibidores del VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis, para proporcionar una terapia dual al paciente.

Las composiciones de acuerdo con la invención se pueden administrar por las vías normales. En general, las combinaciones pueden ser administradas por las vías tópica (incluyendo la bucal y sublingual), o parenteral (incluyendo la subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intracerebral, intracerebroventricular, intracranial, intraespinal, intratraqueal y epidural), transdérmica, intravaginal, intrauterina, oral, rectal, oftálmica (incluyendo intravítrea o intracameral) o intranasal.

Las minibombas osmóticas también se pueden usar para proporcionar la administración controlada de altas concentraciones de leptina o derivados de leptina, opcionalmente junto con inhibidores del VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis a través de cánulas al sitio de interés, tal como directamente en un crecimiento metastásico o en la administración vascular a ese tumor.

La dosificación de la leptina o los derivados de leptina, junto con inhibidores del VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis de la presente invención dependerá del estado o condición de la enfermedad que se trata y otros factores clínicos como el peso y el estado del ser humano o animal que se trata y la vía de administración del compuesto. Para tratar seres humanos o animales pueden administrarse entre aproximadamente 0,5 mg/kilogramo a 10 mg/kilogramo de la leptina u homólogo de leptina o derivado de leptina, opcionalmente junto con una dosis adecuada de un inhibidor de VEGF o un inhibidor de la producción de VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis. Dependiendo de la semivida de la leptina o el homólogo de leptina o el derivado de leptina en el animal o ser humano particular, la leptina o el homólogo de leptina o el derivado de leptina pueden ser administrados entre varias veces al día y una vez a la semana. Las composiciones de unidades de dosis preferidas son las que contienen una dosis o unidad diaria, una sub-dosis diaria, o una de sus fracciones apropiadas, del ingrediente administrado. Los métodos de la presente invención contemplan las administraciones sencillas o múltiples, dadas bien sea simultáneamente o durante un periodo prolongado de tiempo.

Las composiciones leptina u homólogo de leptina o de derivado de leptina pueden presentarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por técnicas farmacéuticas convencionales. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en asociación el ingrediente activo y los vehículo(s) o excipiente(s) farmacéuticos. En general, las composiciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente el ingrediente activo con vehículos líquidos o con los vehículos sólidos finamente divididos, y si es necesario, conformando el producto.

Las composiciones de dosis unitaria preferidas son las que contienen una dosis o unidad diaria, una sub-dosis diaria o una de sus fracciones apropiadas, del ingrediente administrado. Debe entenderse que además de los ingredientes, específicamente mencionados antes, las composiciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica con respecto al tipo de composición en cuestión.

Ha de entenderse que la presente invención tiene aplicación tanto para uso humano como veterinario.

Esta invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos.

## Ejemplos

## Ejemplo 1

5 *Inducción de regresión de vasos sanguíneos por leptina*

Para analizar el efecto de las leptinas en la homeostasis de vasos sanguíneos en tejido adiposo adulto, se inyectó leptina de múrido (0,1-5  $\mu\text{g/g}$ ) en los tiempos 0 y 9 horas a ratones hembras obesas (*C57BL-ob<sup>-/-</sup>*) de 8-10 semanas, que carecían de leptina endógena. Se observó una apreciable pérdida de peso a las 48 horas en ratones que recibieron  
 10  $>2 \times 1 \mu\text{g/g}$  de leptina ( $65,4 \pm 0,5$  g vs.  $62,7 \pm 1,0$  g,  $n=6$ ). Se retiró y fijó la grasa abdominal 24 y 48 h después de la primera inyección, y se contaron los vasos sanguíneos después de teñir secciones de parafina con anticuerpos para el Factor VIII (D.D. Wagner *et al.*, *J. Cell Biol.* 95, 355-360 (1982)). Se observó una reducción significativa en el número de vasos sanguíneos ( $198 \pm 1$  vasos por 5 campos de alta potencia (abreviadamente HPF en la figura 3 de los dibujos por la expresión inglesa *High Power Fields* con 400 aumentos) en ratones testigos;  $159 \pm 2,5$  vasos por 5 HPF  
 15 en ratones tratados con leptina ( $2 \times 1 \mu\text{g/g}$ ) a las 24 horas y  $106 \pm 7,5$  vasos por 5 HPF a las 48 horas. La Figura 1 muestra micrografías de los vasos sanguíneos en secciones del tejido adiposo. La Figure 2 muestra el gráfico de dosis-respuesta de la regresión de vasos sanguíneos y la Figura 3 muestra el transcurso del tiempo de esta regresión.

## 20 Ejemplo 2

*La leptina induce angiopoyetina 2 (Ang2) en tejidos adiposos*

Se estudió el mecanismo mediante el cual la leptina indujo la regresión de vasos sanguíneos en tejidos adiposos midiendo su efecto en el nivel de expresión de los factores angiogénicos y angiostáticos. Se aisló el RNA total de  
 25 tejido adiposo de ratones *C57BL* y *C57BL-ob<sup>-/-</sup>* en los tiempos 0 y 24 horas después de la primera administración de leptina. El RNA total se aisló con el reactivo TRI. La transcripción inversa se llevó a cabo en un volumen de 20  $\mu\text{l}$  usando RNasa H-transcriptasa inversa (SuperScript II, GIBCO-BRL) con 1  $\mu\text{g}$  de cebador aleatorio ( $\text{N}_6$ ) (New England Biolabs) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó una parte alícuota de (2  $\mu\text{l}$ ) del producto  
 30 de la transcripción inversa usado para la PCR con DNA-polimerasa VENT (New England Biolabs) y los siguientes cebadores con sentido y antisentido: mRNA de  $\mu\text{Ang-2}$ , N° de acceso en GeneBank AF4326 nucleótidos 637-657 y 1147-1167;  $\mu\text{VEGF}$ , N° de acceso en GeneBank M95200 nucleótidos 385-406 y 962-980; mRNA de  $\mu\text{Actina}$ , N° de acceso en GeneBank J00691 nucleótidos 1670-1691 y 2452-2431. Las reacciones por PCR se terminaron antes de la saturación. Se encontró que el mRNA de Ang2 se expresa en el tejido adiposo de ratones normales y en el de  
 35 ratones *ob<sup>-/-</sup>*. Además, la inyección de leptina indujo la expresión de Ang2 en ambos tipos de ratones (Figura 4). Estos resultados demuestran que la leptina es un potente inductor del factor angiostático factor Ang2.

Luego se estudiaron los niveles y la inducción de mRNA de Ang2 por leptina en el tejido adiposo de ratones *ob<sup>-/-</sup>* por transferencia de RNA con sondas específicas para Ang2 y VEGF. El RNA total del tejido adiposo se aisló con el kit de reactivos TRI (Molecular Research Center Inc.). Muestras de RNA (15  $\mu\text{g}$ ) se resolvieron por electroforesis a través de gel de agarosa al 1% en tampón de MOPS-formaldehído, se transfirieron a una membrana de nilón (Hybond N, Amersham) en tampón 20XSSC y la membrana se calentó luego durante 2 horas a 80°C en una estufa de vacío. La membrana se pre-hibridó (6 h, 42°C) con DNA de esperma de salmón desnaturalizado (100  $\mu\text{g/ml}$  en formamida al 50%, 5xSSC, solución 4xDenhard y SDS al 0,5%). Luego se añadió una sonda de DNA [ $^{32}\text{P}$ ] dCTP  
 45 ( $1 \times 10^6$  cpm/ml), preparada por cebado al azar y la hibridación continuó durante 18 horas a 42°C. La membrana se lavó luego a temperatura ambiente (1xSSC, dos veces con SDS al 0,1%, 0,25xSSC, SDS al 0,1% y 0,1xSSC, SDS al 0,1% dos veces, siendo cada lavado de 30 minutos) y se auto-radiografió. Las manchas se re-hibridaron luego con una sonda marcada con  $^{32}\text{P}$  correspondiente a actina de ratón mostrando cantidades iguales de RNA en la mancha. Se obtuvo una inducción significativa de Ang2 después de la administración de leptina ( $2,9 \pm 0,4$  veces,  $P < 0,05$ ,  $n=3$  a 24 horas y  $16,0 \pm 0,31$  veces,  $P < 0,01$ ,  $n=3$  a 48 horas; (Figura 5). La cinética de la expresión de Ang2 correspondía a la de apoptosis y regresión de vasos sanguíneos. El nivel de mRNA de VEGF se indujo sólo ligeramente ( $1,4$ - $0,1$  veces,  $n=3$  a 48 hora; Figura 5).

El gráfico dosis-respuesta de Ang2 inducida por leptina en tejidos adiposos se estudió por inmunotransferencia 48  
 55 horas después de la primera inyección de leptina. Los extractos celulares del tejido adiposo se aislaron usando el kit de reactivos TRI (Molecular Research Center Inc.) en paralelo a la extracción del RNA total. Cincuenta microgramos de proteína se separaron en un gel de SDS al 10%-poliacrilamida. El análisis por inmunotransferencia se llevó a cabo con 5  $\mu\text{g}$  de un anticuerpo anti Ang2 humana de cabra específico. El Ang2 estuvo por debajo del nivel de detección en el tejido adiposo de control de ratones *ob<sup>-/-</sup>*, mientras que la administración de  $2 \times 1 \mu\text{g/g}$  de leptina fue suficiente para  
 60 una alto nivel de inducción de Ang2 (Figura 6).

## Ejemplo 3

65 *La leptina induce angiopoyetina 2 (Ang2) en adipocitos cultivados*

Varias actividades periféricas de leptina han sido descritas previamente (M. R. Sierra-Honigmann, *et al.*, *Science* 281, 1683-1686, 1998; A. Bouloumie, H. C. Drexler, M. Lafontan, R. Busse, *Circ. Res.* 83, 1059-1066, 1998; B. Cohen,

D. Novick, M. Rubinstein, *Science* 274, 1185-1188, 1996; D. Barkan, *et al.*, *Endocrinology* 140, 1731-1738, 1999). Para analizar si una leptina puede actuar directamente sobre los adipocitos los autores de la invención estudiamos el efecto de la leptina sobre pre-adipocitos 3T3-F442A de mridos, que se sabe que dan lugar a un tejido similar al adiposo por implantación en ratones atmicos (H. Green, O. Kehinde, *J. Cell Physiol.* 101, 169-171, 1979); S. Mandrup, T. M. Loftus, O. A. MacDougald, F. P. Kuhajda, M. D. Lane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4300-4305, 1997). Pre-adipocitos de ratones suizos 3T3 F442A (H. Green, O. Kehinde, *Cell* 5, 19-27, 1975) se hicieron crecer en DMEM (GIBCO) y suero de ternera al 10%. Para la diferenciación se mantuvieron células confluentes en DMEM suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% durante seis días. El medio se reemplazó cada 48 horas. Al final del periodo la mayoría de las células había adquirido la morfología de adipocitos característica como se determinó por criterios bioquímicos y morfológicos. Se añadió leptina (1 µg/ml) a los cultivos de células diferenciadas y no diferenciadas. El RNA se aisló de las células cultivadas como se describió para los tejidos adiposos del Ejemplo 2 y se sometió a análisis por transferencia de RNA. Se encontró que la leptina indujo la expresión de mRNA de Ang2 en adipocitos 3T3-F442A diferenciados y no en los pre-adipocitos. El RNA de Ang2 apareció punteado a las 24 horas. El mRNA del VEGF se expres constitutivamente en los pre-adipocitos y fue más inducido por leptina. El nivel mRNA del VEGF era significativamente menor en los adipocitos maduros y no fue significativamente inducido por leptina (Figura 7). Estos resultados sugieren que la leptina induce una señal angiostática en adipocitos maduros y señales angiogénicas en pre-adipocitos.

#### Ejemplo 4

##### *Efecto de leptina más un inhibidor de VEGF en la reducción de masa adiposa*

La actividad angiostática de Ang2 inducida por leptina se invierte en presencia de VEGF. Además, se advirtió una modesta inducción de VEGF por leptina en los ejemplos previos. Por tanto, se inyecta leptina de mridos (0,1-5 µg/g) intraperitonealmente en los tiempos 0 y 9 h a ratones (C57BL-*ob*<sup>-/-</sup>) obesos hembras de 8-10 semanas, que carecen de leptina endógena. En paralelo, ratones (C57BL-*ob*<sup>-/-</sup>) obesos hembras de 8-10 semanas se inyectaron en los tiempos 0 y 9 horas intraperitonealmente con leptina de mridos (0,1-5 µg/g) junto con el antagonista del receptor 2 de adenosina, CSC, que se sabe que funciona como un inhibidor del VEGF (H. Takagi, G. L. King, G. S. Robinson, N. Ferrara, L. P. Aiello, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 2165-2176, 1996). Se observó una pérdida de peso apreciable a la 48 horas en ratones que recibieron > 2x1 µg/g de leptina sola (65,4±0,5 g vs. 62,7± 1,0 g, n=6). Se observó una pérdida de peso significativamente superior en ratones tratados con una combinación de leptina y CSC.

REIVINDICACIONES

1. El uso de leptina o un homólogo o derivado de leptina opcionalmente junto con un inhibidor de la acción del VEGF o de la síntesis del VEGF y/o un inhibidor de la angiogénesis, en la preparación de un medicamento para inhibir la angiogénesis induciendo Ang-2, en donde dicho homólogo de leptina tiene actividad similar a la leptina, y en donde dicho derivado de leptina induce actividad inhibidora endotelial.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, para inhibir la angiogénesis en tejido adiposo.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que incluye un inhibidor de la angiogénesis.

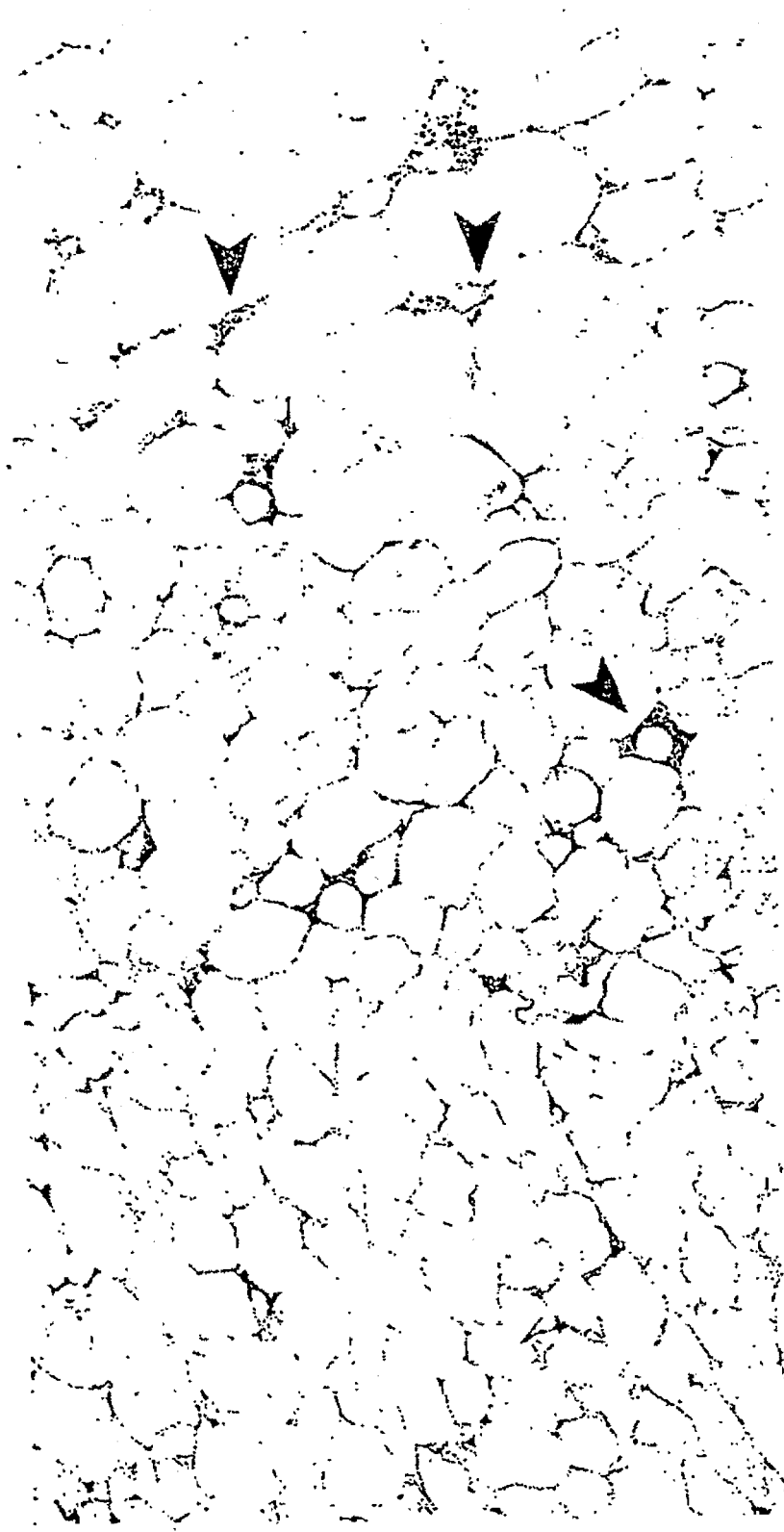
4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el inhibidor del VEGF se selecciona de DMPX, un A2-antagonista 7-(beta-hidroxietil)teofilina, 8-fenilteofilina, el antagonista del receptor A2 de adenosina CSC, teobromina, una variante del VEGF antagonística, sFLT-1, Tranilast, ácido 8-(3-oxo-4,5,6-trihidroxi-3H-xanten-9-il)-1-naftoico, suramina y factor-4 plaquetario.

5. Una composición farmacéutica que comprende leptina o un homólogo o derivado de leptina junto con un inhibidor de la acción del VEGF o de la síntesis de VEGF y/o un inhibidor de la angiogénesis, en donde dicho homólogo de leptina tiene actividad similar a la leptina, y en donde dicho derivado de leptina induce actividad inhibidora endotelial.

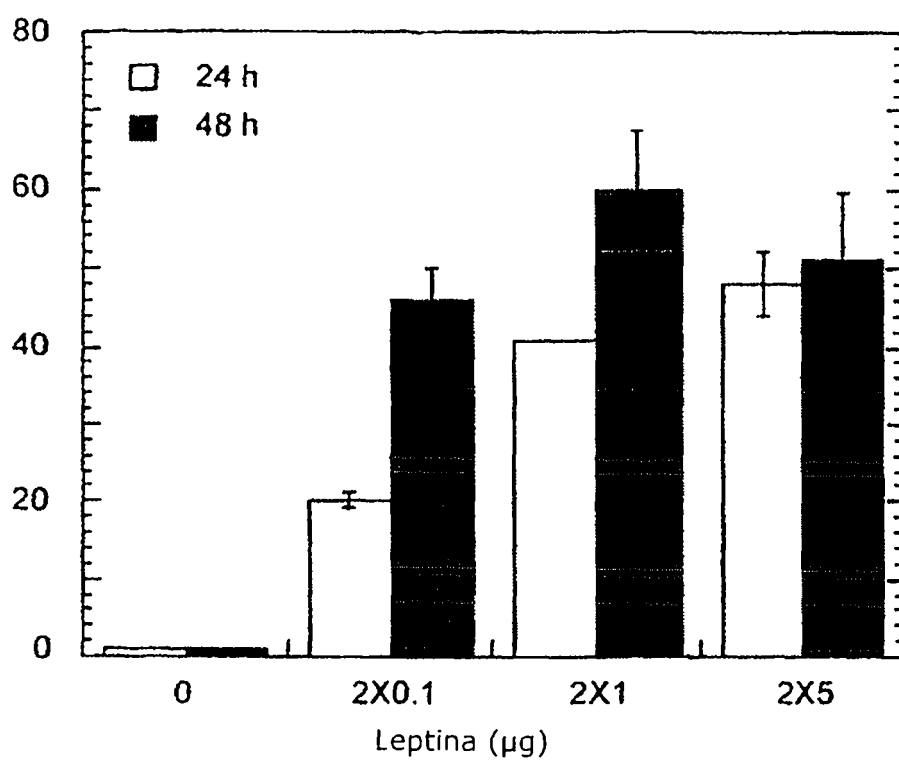
6. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, para modular procesos angiogénicos.

7. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, para inhibir la angiogénesis.

8. Una mezcla que comprende leptina y un inhibidor del VEGF.



**FIGURA 1**



**FIGURA 2**

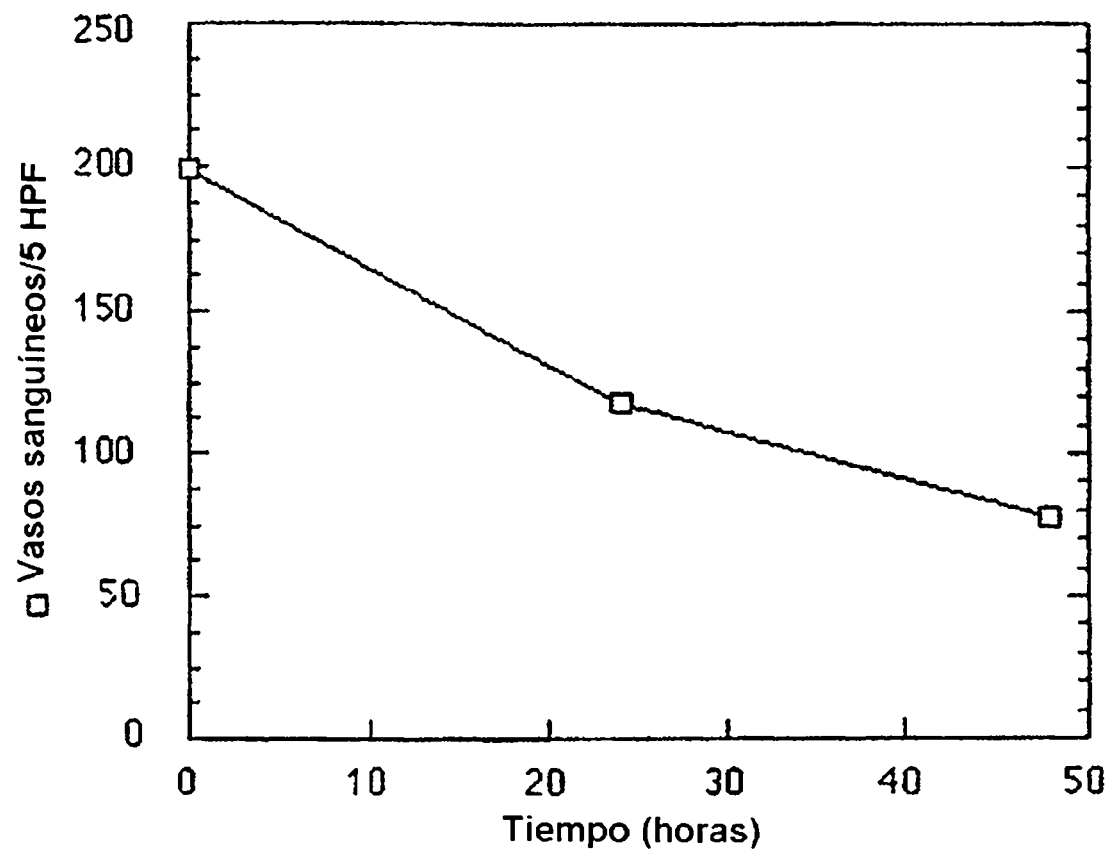
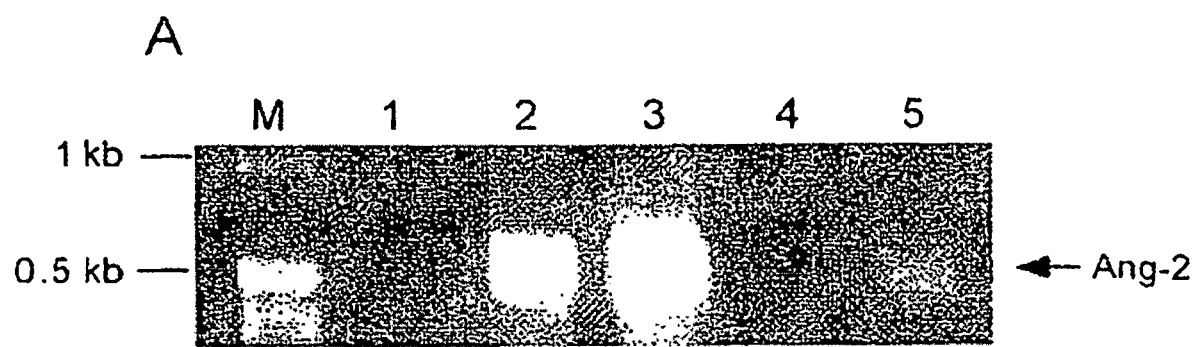
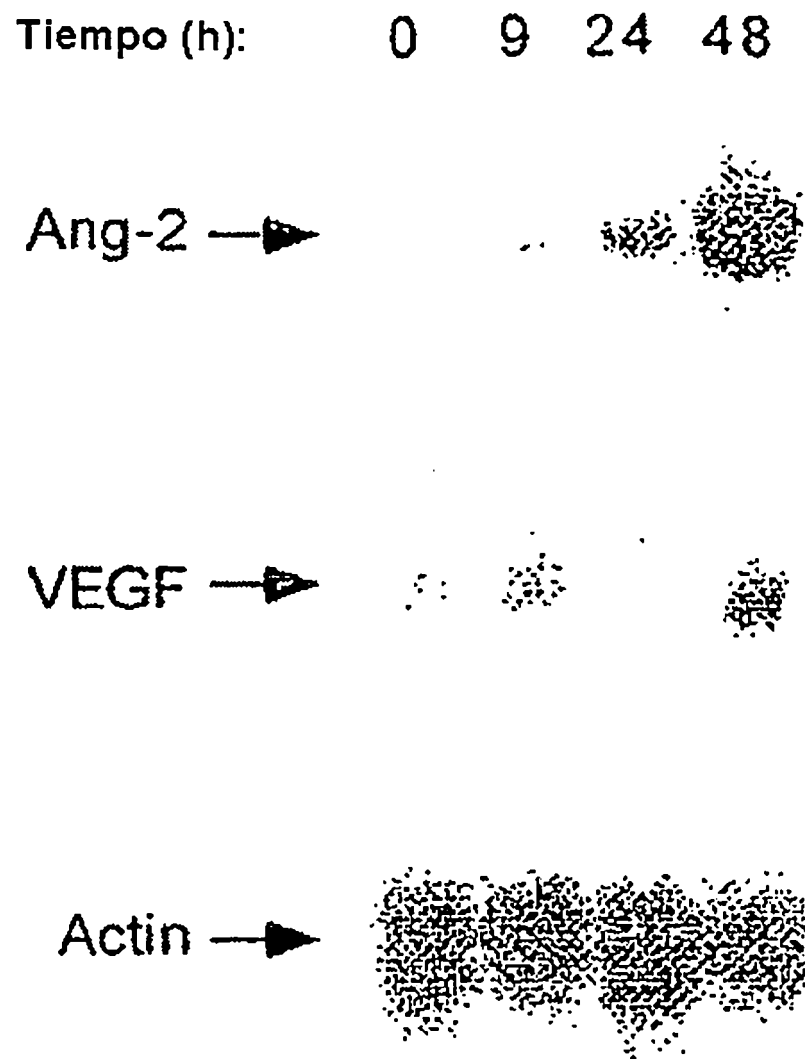


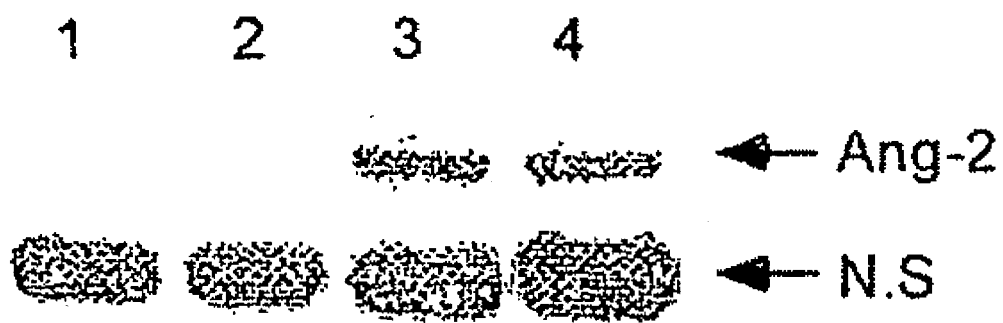
FIGURA 3



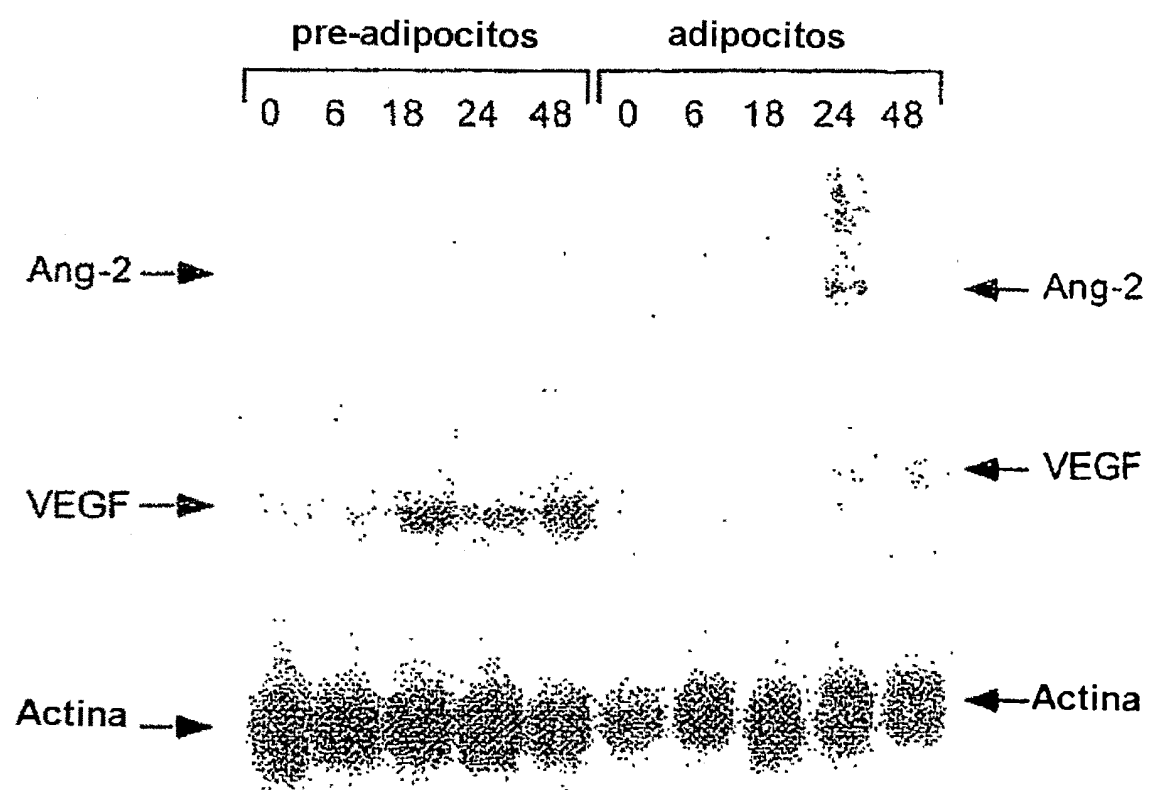
**FIGURA 4**



**FIGURA 5**



**FIGURA 6**



**FIGURA 7**