

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 138**

51 Int. Cl.:
A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04782166 .5**
96 Fecha de presentación: **26.08.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1660057**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2006**

54 Título: **Terapia de combinación para tratamiento de trastornos neovasculares oculares**

30 Prioridad:
27.08.2003 US 498407 P
26.03.2004 US 556837 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.10.2012

73 Titular/es:
Ophthotech Corporation
5 Vaughn Drive Suite 106
Princeton, NJ 08540, US

72 Inventor/es:
SHIMA, David;
CALIAS, Perry y
ADAMIS, Anthony P.

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 388 138 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

Terapia de combinación para tratamiento de trastornos neovasculares oculares

5 Campo de la invención

10 La invención se relaciona con los campos de la oftalmología y la medicina. Más específicamente esta invención se relaciona con el tratamiento de trastornos neovasculares del ojo usando una combinación de agentes que inhiben tanto el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Antecedentes de la invención

15 La angiogénesis, también denominada neovascularización, involucra la formación de ramificaciones de vasos sanguíneos persistentes y su invasión en el tejido circundante. Un proceso relacionado, la vasculogénesis, involucra la diferenciación de las células endoteliales y angioblastos que ya están presentes a partir de un tejido, y su subsecuente unión entre sí para formar vasos sanguíneos.

20 La angiogénesis se presenta extensamente durante el desarrollo, y también se presenta en cuerpos sanos durante la curación de heridas con el fin de restaurar el flujo sanguíneo a tejidos después de la lesión o daño. La angiogénesis, sin embargo también ha sido implicada en la formación de cáncer y tumores. En efecto, la cantidad de vasos sanguíneos en un tejido tumoral es un indicador pronóstico negativo fuerte en cáncer de seno (Weidner et al., (1992) J. Natl. Cancer Inst. 84: 1875 - 1887), cáncer de próstata (Weidner et al., (1993) Am. J. Pathol. 143: 401 - 409), tumores de cerebro (Li et al., (1994) Lancet 344: 82 - 86), y melanoma (Foss et al., (1996) Cancer Res. 56: 2900 - 2903). La angiogénesis también ha sido implicada recientemente en otros estados de enfermedad de muchas áreas de la medicina, incluyendo reumatología, dermatología, cardiología y oftalmología. En particular, la angiogénesis específica de tejidos indeseable o patológica ha sido asociada con ciertos estados de enfermedad específicos incluyendo artritis reumatoide, aterosclerosis y psoriasis (véase por ejemplo, Fan et al., (1995) Trends Pharmacol. Sci. 16: 57; and Folkman (1995) Nature Med. 1: 27). Adicionalmente, se cree que la alteración de la permeabilidad vascular juega un papel en los procesos fisiológicos tanto normales como patológicos (Cull- inan-Bove et al., (1993) Endocrinol. 133: 829; Senger et al., (1993) Cancer and Metastasis Reviews 12: 303). Aunque el proceso angiogénico en cada una de estas enfermedades probablemente comparte muchas características con la angiogénesis de desarrollo y la angiogénesis tumoral, cada uno puede tener también aspectos únicos conferidos por la influencia de las células circundantes.

35 Varios trastornos oculares involucran alteraciones en la angiogénesis. Por ejemplo, la retinopatía diabética, la tercera causa líder de ceguera en adultos (que representa casi el 7% de la ceguera en los Estados Unidos), está asociada con eventos angiogénicos extensos. La retinopatía no proliferativa está acompañada por la pérdida selectiva de pericitos dentro de la retina, y su pérdida da como resultado una dilatación de los vasos capilares asociados y un incremento resultante en el flujo sanguíneo. Los capilares dilatados, proliferan las células endoteliales y forman embolsamientos, los cuales se convierten en microaneurismas y los capilares adyacentes se bloquean de tal manera que el área de retina que circunda estos microaneurismas no es perfusionada. Eventualmente, aparecen vasos de desviación entre áreas adyacentes de microaneurismas, y aparece el dibujo clínico de la retinopatía diabética temprana con microaneurismas y con áreas de retina no perfusionada. La ruptura de microaneurismas y los vasos capilares pueden sangrar, produciendo exudados y hemorragias. Una vez que se establecen las etapas iniciales de retinopatía diabética de fondo, la condición avanza durante un período de años, convirtiéndose en retinopatía diabética proliferativa y ceguera en aproximadamente el 5% de los casos. La retinopatía diabética proliferativa se presenta cuando algunas áreas de la retina continúan perdiendo sus vasos capilares y se convierten en no perfusionadas llevando a la aparición de nuevos vasos en el disco en cualquier lugar de la retina. Estos nuevos vasos sanguíneos crecen hacia el vítreo y sangra fácilmente, llevando hemorragias prerretinales. Retinopatía diabética proliferativa avanzada, una hemorragia vítrea masiva puede llenar una porción principal de la cavidad vítrea. Además, los nuevos vasos están acompañados por la proliferación de tejido fibroso que puede llevar al desprendimiento de la retina por tracción.

55 La retinopatía diabética se asocia primariamente con la duración de la diabetes mellitus. Por lo tanto, a medida que la población envejece y los pacientes diabéticos viven más tiempo, se incrementará la prevalencia de la retinopatía diabética. Se utiliza actualmente la terapia con láser en retinopatía diabética no proliferativa y proliferativa. El tratamiento con láser focal de las microaneurismas rotos que rodean el área macular reduce la pérdida visual en un 50% de los pacientes con edema vascular clínicamente significativo. En la retinopatía diabética proliferativa, la fotocoagulación retinal da como resultado miles de varios pequeños vacíos dispersos a través de la retina (exceptuando el área macular). Este tratamiento reduce la velocidad de la ceguera en un 60%. El tratamiento temprano del edema macular y la retinopatía diabética proliferativa evita la ceguera durante cinco años en el 95% de los pacientes, mientras que el tratamiento tardío evita la ceguera solamente en el 50%. Por lo tanto, son esenciales el diagnóstico y tratamiento tempranos.

65 Otro trastorno ocular que involucra la neovascularización es la degeneración macular relacionada con la edad

(AMD), una enfermedad que afecta aproximadamente a una decima parte de los americanos por encima de 65 años. La AMD se caracteriza por una serie de cambios patológicos en la mácula, la región central de la retina, la cual está acompañada por una agudeza visual disminuida, que afecta particularmente la visión central. La AMD involucra una capa sencilla de células denominadas el epitelio de pigmento retinal que yace inmediatamente por detrás de la retina sensorial. Estas células alimentan y soportan la porción de la retina que está en contacto con ellas, esto es, las células fotorreceptoras que contienen los pigmentos visuales. El epitelio de pigmento retinal descansa sobre la membrana de Bruch, una membrana de base compleja la cual, en la AMD, se engruesa y se hace esclerótica. Pueden irrumpir nuevos vasos sanguíneos a través de la membrana de Bruch desde el corioide subyacente, el cual contiene un lecho vascular rico. Estos vasos pueden a su vez liberar fluido o sangrar por detrás del epitelio de pigmento retinal y también entre el epitelio de pigmento retinal y la retina sensorial. Las lesiones fibrosas subsecuentes perturban la nutrición de las células fotorreceptoras y legan a su muerte, dando como resultado una pérdida de agudeza visual central. Este tipo de maculopatía relacionada con la edad es denominada del tipo "húmedo" debido a los vasos con fugas y al edema o sangre subretinal. El tipo agudo representa solamente el 10% de los casos de maculopatía relacionados con la edad pero da como resultado el 90% de los casos de ceguera legal por la degeneración macular en la edad avanzada. El tipo de maculopatía relacionado con la edad del tipo "seca" involucra la desintegración del epitelio del pigmento retinal junto con pérdida de las células fotorreceptoras que lo recubre, El tipo seco reduce la visión pero usualmente solo a niveles de 20/50 hasta 20/100.

La AMD está acompañada por la distorsión de la visión central con objetos que parecen más grandes o más pequeños o líneas rectas que parecen distorsionadas, dobladas, o sin un segmento central. En el tipo húmedo de AMID, un pequeño desprendimiento de la retina sensorial puede notarse en el área macular, pero el diagnóstico efectivo de una membrana neovascular subretinal requiere angiografía con fluoresceína. En el tipo seco, los drusen pueden perturbar el patrón de pigmentación en el área macular. Los drusen son excrecencias de la membrana de base del epitelio de pigmento retinal que protruyen hacia las células haciendo que sobresalgan en su cara anterior. Su papel como un factor de riesgo en la maculopatía relacionada con la edad no es claro. No existe un tratamiento concurrente para la maculopatía de tipo seco relacionada con la edad. El tratamiento con láser se utiliza en el tipo de maculopatía relacionada con la edad húmeda e inicialmente oblitera la membrana neovascular y evita pérdida visual posterior en alrededor del 50% de los pacientes a los 18 meses. Al cabo de los 60 meses, sin embargo, solamente el 20% tiene aún un beneficio sustancial.

Se han identificado los mediadores moleculares múltiples de la angiogénesis incluyendo los factores de crecimiento de fibroblastos ácidos (aFGF, bFGF), factores de crecimiento de transformación alfa y beta (TGF α , TGF β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), angiogenina, factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), interleucina-8 (IL-8) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Otros estimuladores implicados en la angiogénesis incluyen angiopoyetina-1, Del-1, folistatina, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), leptina, midkina, factor de crecimiento de placenta, pleiotropina (PTN), progranulina, proliferina, y factor alfa de necrosis tumoral (TNF-alfa). Además, el control de la angiogénesis es mediado adicionalmente por un cierto número de reguladores negativos de la angiogénesis producidos por el cuerpo incluyendo la angioarrestina, ngiostatina (fragmento de plasminógeno), antitrombina antiangiogénica III, inhibidor derivado de cartilago (CDI), fragmento complementario CD59, endostatina (fragmento de colágeno XVIII), fragmento de fibronectina, gro-beta, heparinasas, fragmento de heparina hexasacárido, gonadotropina coriónica humana (hCG), interferón alfa/beta/gama, proteína inducible por interferón (IP-10), interleucina-12, Kringle 5 (fragmento de plasminógeno), inhibidores de metaloproteínasa (TIMPs), 2-metoxiestradiol, inhibidor de la ribonucleasa de placenta, inhibidor del activador de plasminógeno, factor-4 de plaquetas (PF4), fragmento 16kD de prolactina, proteína relacionada con la proliferina (PRP), retinoides, tetrahydrocortisol-S, tromboespondina (TSP-1), vasculostatina y vasostatina (fragmentos calreticulina).

Entre estos reguladores angiogénicos, el VEGF parece jugar un papel importante como regulador positivo de la angiogénesis anormal acompañando el crecimiento tumoral (revisado en Brown et al., (1996) Control of Angiogenesis (Goldberg and Rosen, eds.) Birkhauser, Basel, and Thomas (1996) J. Biol. Chem. 271: 603 - 606). Adicionalmente, recientemente el papel del miembro PDGF-B de la familia PDGF de las moléculas de señalización ha estado bajo investigación, puesto que parece jugar un papel importante en la formación, expansión y función apropiada de las células perivasculares, algunas veces denominadas como células murales, por ejemplo, músculos lisos vasculares, células mesangiales y pericitos.

A la vez que se ha aprendido mucho acerca de la angiogénesis o la neovascularización, el desarrollo asociado con la curación de lesiones y la formación de tumores, sigue por determinar si hay diferencias entre estas formas de angiogénesis y la angiogénesis ocular. Significativamente, mientras que la angiogénesis acompañante, por ejemplo de la formación de vasos sanguíneos colaterales en el corazón, puede ser benéfica y adaptativa para el organismo, la neovascularización ocular patológica acompaña, por ejemplo, AMD, no tiene beneficio conocido y frecuentemente lleva a la ceguera (para revisión, véase Campochiaro (2000) J. Cell. Physiol. 184: 301 - 10). Por lo tanto, aunque se han hecho avances en el entendimiento de los eventos moleculares que acompañan la neovascularización, existe una necesidad de utilizar este entendimiento para desarrollar métodos adicionales para tratar en trastornos de enfermedades neovasculares, incluyendo enfermedades neovasculares oculares y trastornos tales como la neovascularización coroidal que ocurre con AMD y retinopatía diabética.

Resumen de la invención

Se ha descubierto que la combinación de agentes anti-VEGF y anti-PDGF sorprendentemente permiten beneficios terapéuticos sinérgicos para tratar una enfermedad neovascular ocular.

5 De acuerdo con lo anterior, la invención presenta un método para tratar un paciente diagnosticado con o en riesgo de desarrollar una trastorno neovascular. Este método incluye la administración al paciente de un agente anti-VEGF y de un agente anti-PDGF como tratamiento terapéutico primario o adjunto.

10 En un aspecto, la invención provee un antagonista de PDGF y un antagonista de VEGF para uso en un método para el tratamiento de un trastorno neovascular ocular, en donde el antagonista de PDGF es 4-[(4-metil-piperazin-1-il)metil]-N-[4-metil-3-[(4-piridin-3-ilpi-rimidin-2-il)amino]fenil]benzamida (imatinib), y el antagonista de VEGF es pegaptanib o una sal del mismo, en donde el antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF son para administración simultánea, separada o secuencial.

15 En otro aspecto, la invención provee un antagonista de PDGF y un antagonista de VEGF para uso en un método para el tratamiento o prevención de un trastorno neovascular ocular, en donde el antagonista de PDGF es un anticuerpo anti-PDGF o un fragmento de enlace del mismo, y el antagonista de VEGF es pegaptanib o una sal del mismo, donde el antagonista de PDGF y el antagonista de VEGD son para administración simultánea, separada o secuencial.

20 En un aspecto adicional, la invención provee un antagonista de PDGF y un antagonista de VEGF para uso en un método en el tratamiento o prevención de un trastorno neovascular ocular, en donde el antagonista de PDGF es un aptámero anti-PDGF pegilado o no pegilado que tienen las secuencias CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT, en donde las posiciones 6, 20 y 30 son las posiciones 2'-fluoro-2'-desoxiuridina, las posiciones 8, 21, 28, 29 son 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, las posiciones 9, 15, 17 y 31 son 2'-O-metil-2'-desoxiguanosina, la posición 22 es 2'-O-metil-2'-desoxiadenosina, "N" en las posiciones 10 y 23 es de la hexaetilen glicol fosforamidita, y la posición 32 está enlazada 3' - 3' o un aptámero anti-PDGF pegilado o no pegilado que tiene la secuencia CAGGCUACGN CGTA- GAGCAU CANTGATCCU GT, donde la posición 8 es O-metil-2-desoxicitidina, las posiciones 9, 17 y 31 son 2-O-metil-2-desoxiguanosina, la posición 22 es 2-O-metil-2-desoxiadenina, la posición 30 es 2-O-metil-2-desoxiuridina, las posiciones 6 y 20 son 2-fluoro-2-desoxiuridina, las posiciones 21, 28 y 29 son 2-fluoro-2-desoxicitidina, "N" en las posiciones 10 y 23 es un espaciador de pentaetilen glicol y la posición 32 está enlazada 3' - 3', y el antagonista de VEGF es pegaptanib o una sal del mismo, en donde el antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF son para administración simultánea, separada o secuencial.

35 En aún un aspecto adicional, la invención provee un antagonista de PDGF y un antagonista de VEGF para uso en un método para el tratamiento o prevención de un trastorno neovascular ocular, en donde el antagonista de PDGF es un aptámero anti-PDGF pegilado o no pegilado que tiene una secuencia CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT, donde las posiciones 6, 20 y 30 son 2'-fluoro-2'-desoxiuridina, las posiciones 8, 21, 28 y 29 son 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, las posiciones 9, 15, 17 y 31 son 2'-O-metil-2'-desoxiguanosina, la posición 22 es 2'-O-metil-2'-desoxiadenosina, "N" en las posiciones 10 y 23 es de hexaetilen glicol fosforamidita y la posición 32 está enlazada 3'-3', o un aptámero anti-PDGF pegilado o no pegilado que tiene la secuencia CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT, donde la posición 8 es O-metil-2-desoxicitidina, las posiciones 9, 17 y 31 son 2-O-metil-2-desoxiguanosina, la posición 22 es 2-O-metil-2-desoxiadenina, la posición 30 es 2-O-metil-2-desoxiuridina, las posiciones 6 y 20 son 2-fluoro-2-desoxiuridina, las posiciones 21, 28 y 29 son 2-fluoro-2-desoxicitidina, "N" en las posiciones 10 y 23 es un espaciador de pentaetilen glicol y la posición 32 está enlazada 3' - 3', y el antagonista de VEGF es un anticuerpo o un fragmento de enlace del mismo, en donde el antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF son para administración simultánea, separada o secuencial.

40 La invención también provee en un aspecto adicional un antagonista de PDGF y un antagonista de VEGF para uso en un método en el tratamiento o prevención de un trastorno neovascular ocular, en donde el antagonista de PDGF es un aptámero anti-PDGF pegilado que tiene la secuencia CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT, donde las posiciones 6, 20 y 30 son 2'-fluoro-2'-desoxiuridina, las posiciones 8, 21, 28 y 29 son 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, las posiciones 9, 15, 17, y 31 son 2'-O-metil-2'-desoxiguanosina, la posición 22 es 2'-O-metil-2'-desoxiadenosina, "N" en las posiciones 10 y 23 es de hexaetilen glicol fosforamidita y la posición 32 está enlazada 3' - 3', y el antagonista de VEGF es un anticuerpo o un fragmento de enlace del mismo, en donde el antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF son para administración simultánea, separada o secuencial.

45 En una realización de los aspectos anteriores, el antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF se formulan separadamente como medicamentos.

En otra realización de los aspectos anteriores, el antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF se formulan en un medicamento individual.

60 En una realización adicional de los aspectos anteriores, el antagonista de PDGF es un anticuerpo anti-PDGF-B o un

fragmento de enlace del mismo.

En una realización aún adicional del aspecto anterior, el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF-A o un fragmento de enlace del mismo.

5 En otra realización, el antagonista de VEGF es pegaptanib sodio.

10 En una realización adicional, el trastorno neovascular ocular es retinopatía isquémica, neovascularización del iris, neovascularización intraocular, degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización de la cornea, neovascularización de la retina, neovascularización corooidal, isquemia retinal diabética o retinopatía diabética proliferativa.

15 En un aspecto adicional, la invención provee un antagonista de PDGF y un antagonista de VEGF para uso en un método para el tratamiento o prevención de un trastorno neovascular ocular, en donde el antagonista de PDGF es un anticuerpo o fragmento de enlace del mismo y el antagonista de VEGF es un anticuerpo o un fragmento de enlace del mismo.

Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 (A) es una representación esquemática de la secuencia de ácidos nucleicos de un PDGF-B humano (GenBank Accession No. X02811) (SEQ ID NO: 1).

25 La Figura 1 (B) es una representación esquemática de la secuencia de aminoácidos de un PDGF-B humano (GenBank Accession No. CAA26579) (SEQ ID NO: 2).

La Figura 1 (C) es una representación esquemática de la secuencia de ácidos nucleico de PDGF-A humano (GenBank Accession No. X06374) (SEQ ID NO: 11).

30 La Figura 1 (D) es una representación esquemática de la secuencia de polipéptidos de un PDGF-A humano (GenBank Accession No. CAA29677) (SEQ ID NO: 12).

La Figura 2 (A) es una representación esquemática de la secuencia de ácidos nucleicos de un VEGF humano (GenBank Accession No: NM_003376) (SEQ ID NO: 3).

35 La Figura 2 (B) es una representación esquemática de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido VEGF humano (GenBank Accession No. NP_003367) (SEQ ID NO: 4).

40 La Figura 3 (A) es una representación esquemática de la secuencia de ácidos nucleicos de un PDGFR-B humano (Gen- Bank Accession No. NM_002609) (SEQ ID NO: 5).

La Figura 3 (B) es una representación esquemática de la secuencia de polipéptidos de un PDGFR-B humano (GenBank Accession No. NP_002600) (SEQ ID NO: 6).

45 La Figura 3 (C) es una representación esquemática de la secuencia de ácidos nucleicos de un PDGFR-A humano (Gen- Bank Accession No. NM_006206) (SEQ ID NO: 13).

La Figura 3 (D) es una representación esquemática de la secuencia de polipéptidos de un PDGFR-A humano (GenBank Accession No. NP_006197) (SEQ ID NO: 14).

50 La Figura 4 (A) es una representación esquemática de la secuencia de ácidos nucleicos de un VEGFR-1 humano (Flt-1) (GenBank Accession No. AF063657) (SEQ ID NO: 7).

55 La Figura 4 (B) es una representación esquemática de la secuencia de polipéptidos de un VEGFR- (Flt-1) humano (GenBank Accession No.) (SEQ ID NO: 8).

La Figura 4 (C) es una representación esquemática de la secuencia de ácidos nucleicos de un VEGFR-2 humano (KDR/Flk- 1) (GenBank Accession No. AF035121) (SEQ ID NO: 9).

60 La Figura 4 (D) es una representación esquemática de la secuencia de polipéptidos de un VEGFR-2 humano (KDR/Flk-1) (GenBank Accession No. AAB88005) (SEQ ID NO: 10).

65 La Figura 5 es una representación gráfica de los resultados de una prueba de neovascularización de la córnea que compara un tratamiento de control (cont), un tratamiento Gleevec (un agente anti-PDGF), y un tratamiento con Macugen™ (esto es tratamiento con pegaptanib, un agente anti-VEGF), con los resultados de un tratamiento de combinación con Macugen™ y Gleevec (terapia de combinación anti-PDGF/anti-VEGF).

- La Figura 6 (A) es una representación fotográfica de una imagen microscópica con fluorescencia de una neovascularización de la córnea que se presenta en córnea de ratón de control (tratado con PEG).
- 5 La Figura 6 (B) es una representación fotográfica de una imagen microscópica con fluorescencia de una neovascularización de la córnea que se presenta en córnea de ratón tratada con Gleevec.
- La Figura 6 (C) es una representación fotográfica de una imagen microscópica con fluorescencia de una neovascularización de la córnea que se presenta en córnea de ratón tratada con Macugen™.
- 10 La Figura 6 (D) es una representación fotográfica de una imagen microscópica con fluorescencia de una neovascularización de la córnea que se presenta en córnea de ratón tratada tanto con Macugen™ como con Gleevec.
- 15 La Figura 7 (A) es una representación fotográfica de una imagen microscópica de fluorescencia que muestra que la vasculatura de la córnea normal no es afectada por la administración de APB5 (anticuerpo de PDGFR, un agente anti-PDGF).
- La Figura 7 (B) es una representación fotográfica de una imagen microscópica de fluorescencia que muestra que la vasculatura de la córnea normal no es afectada por la administración de Gleevec.
- 20 La Figura 7 (C) es una representación fotográfica de una imagen microscópica de fluorescencia que muestra que la vasculatura de la córnea normal no es afectada por la administración de Macugen™ (Mac) y Gleevec juntos.
- La Figura 7 (D) es una representación fotográfica de una imagen microscópica de fluorescencia que muestra que la vasculatura de la córnea normal no es afectada por la administración de PEG.
- 25 La Figura 8 es una representación gráfica de los resultados de una prueba de neovascularización coroidal inducida por láser en comparación con un tratamiento de control (cont), tratamiento con Gleevec (un agente anti-PDGF), y tratamiento con Macugen™ (esto es tratamiento con pegaptanib, un agente anti-VEGF), con los resultados de un tratamiento de combinación con Macugen™ y Gleevec (terapia de combinación anti-PDGF/anti-VEGF).
- 30 La Figura 9 es una representación gráfica de los resultados de una prueba de neovascularización coroidal inducida por láser que compara un tratamiento de control (cont), tratamiento con APB5 (un anticuerpo anti-PGFR, el cual actúa como un agente anti-PDGF), y tratamiento con Macugen (esto es, tratamiento con pegaptanib, un aptámero anti-VEGF), con los resultados de un tratamiento de combinación con Macugen y APB5 (Mac + APB5).
- 35 La Figura 10 es una representación gráfica de los resultados de un modelo de desarrollo de retina que compara un tratamiento de control (cont), tratamiento con ARC-127 (un agente anti-PDGF), y tratamiento con Macugen (esto es, tratamiento con pegaptanib, un agente anti-VEGF), con los resultados de un tratamiento de combinación con Macugen y ARC-127 (terapia de combinación anti-PDGF/anti-VEGF).
- 40 La Figura 11 es una representación gráfica de los resultados de una prueba de neovascularización de córnea que compara un tratamiento de control (cont), tratamiento con ARC-127 (un agente anti-PDGF), y tratamiento con Macugen (esto es, tratamiento con pegaptanib, un agente anti-VEGF), con los resultados de un tratamiento de combinación con Macugen y ARC-127 (terapia de combinación anti-PDGF/anti-VEGF).
- 45 La Figura 12 (A) es una representación fotográfica de una imagen microscópica de fluorescencia de una neovascularización de córnea que se presenta en córnea de ratón de control.
- 50 La Figura 12 (B) es una representación fotográfica de una imagen microscópica de fluorescencia de una neovascularización de córnea que se presenta en córnea de ratón tratado con ARC-127.
- La Figura 12 (C) es una representación fotográfica de una imagen microscópica de fluorescencia de una neovascularización de córnea que se presenta en córnea de ratón tratado con Macugen.
- 55 La Figura 12 (D) es una representación fotográfica de una imagen microscópica de fluorescencia de una neovascularización de la córnea que se presenta en una córnea de ratón tratada tanto con Macugen como con ARC-127.
- 60 La Figura 13 es una representación gráfica de los resultados de una prueba de neovascularización de córnea que compara un tratamiento de control (cont), tratamiento con APB-5 (un agente anti-PDGF), y tratamiento con Macugen (esto es, tratamiento con pegaptanib, un agente anti-VEGF), con los resultados de un tratamiento de combinación con Macugen y APB-5 (terapia de combinación anti-PDGF/anti-VEGF).
- 65 La Figura 14 es una representación gráfica de los resultados de una prueba de neovascularización de córnea que

compara un tratamiento de control (cont), tratamiento con APB-5 (un agente anti-PDGF), y tratamiento con Macugen (esto es, tratamiento con pegaptanib, un agente anti-VEGF), con los resultados de un tratamiento de combinación con Macugen y APB-5 (terapia de combinación anti-PDGF/anti-VEGF).

5 Descripción detallada de la invención

10 Tal como se utilizan aquí, los siguientes términos y expresiones tendrán los significados que se definen más abajo. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente para una persona de experiencia normal en la técnica a la cual pertenece esta invención.

15 Por "antagonista" se entiende un agente que inhibe, bien sea parcial o completamente, la actividad o producción de una molécula objetivo. En particular, el término "antagonista", tal como se aplica aquí selectivamente, significa un agente capaz de hacer disminuir los niveles de la expresión en genes de PDGF, PDGFR, VEGF o VEGFR, los niveles de ARNm, niveles de proteínas o actividad de proteína. Formas de ejemplo de antagonistas incluyen, por ejemplo, proteínas, polipéptidos, péptidos (tales como péptidos cíclicos), anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, imitadores de péptidos, moléculas de ácido nucleico, moléculas antisentido, ribozimas, aptámeros, moléculas de ARNi, y moléculas orgánicas pequeñas. Mecanismos de ejemplos no limitantes de la inhibición de antagonistas de los objetivos ligando receptor VEGF/VEGFR y PDGF/PDGFR incluyen la represión de síntesis de ligando y/o estabilidad (por ejemplo utilizando ribozimas antisentido o composiciones de ARNi que apuntan al ligando gen/ácidos nucleicos), el bloqueo de enlazamiento del ligando a su receptor cognato (por ejemplo, utilizando aptámeros antiligando, anticuerpos o un receptor cognato soluble señuelo), represión de la síntesis y/o estabilidad del receptor (por ejemplo, utilizando, ribozimas antisentido o composiciones de ARNi que apuntan al receptor ligando gen/ácidos nucleicos), bloqueo del enlazamiento del receptor a su receptor cognato (por ejemplo, utilizando anticuerpos del receptor) y bloqueo de la activación del receptor por su ligando cognato (por ejemplo, utilizando inhibidores de receptor de tirosina quinasa). Además, el antagonista puede inhibir directa o indirectamente la molécula objetivo.

30 El término "anticuerpo" tal como se utiliza aquí pretende incluir anticuerpos completos, por ejemplo, de cualquier isotipo (IgG, IgA, IgM, IgE, etc.), e incluye fragmentos de los mismos los cuales reconocen y son especialmente reactivos con proteínas, carbohidratos, etc. de vertebrados (por ejemplo, mamíferos). Los anticuerpos pueden ser fragmentados utilizando técnicas convencionales y los fragmentos pueden ser seleccionados en cuanto a su utilidad de la misma forma como se describe más arriba para los anticuerpos completos. Así, el término incluye segmentos de porciones proteolíticamente escindidas o preparadas por recombinación de una molécula de anticuerpo que son capaces de reaccionar selectivamente con una cierta proteína. Ejemplos no limitantes de tales fragmentos proteolíticos y/o recombinantes incluyen Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, y anticuerpos de cadena sencilla (scFv) que contienen un dominio V[L] y/o V[H] unido por un enlazante peptídico. Los scFv pueden ser enlazados por vía covalente o no covalente para formar anticuerpos que tienen dos o más sitios de enlace. La invención presente incluye preparaciones policlonales, monoclonales u otras purificadas de anticuerpos y anticuerpos recombinantes.

40 El término "aptámero", usado aquí de manera intercambiable con el término "ligando de ácido nucleico", significa un ácido nucleico que, a través de su capacidad para adoptar una conformación tridimensional específica, se enlaza a y tiene un efecto antagonizante (esto es, inhibidor) sobre un objetivo). El objetivo de la presente invención es PDGF o VEGF (o uno de sus receptores cognatos PDGFR o VEGFR), y por lo tanto el término aptámero de PDGF o ligando de ácido nucleico o aptámero de VEGF o ligando de ácido nucleico (o aptámero de PDGFR o ligando de ácido nucleico o aptámero de VEGFR o ligando de ácido nucleico) se utiliza aquí. La inhibición del objetivo por el aptámero puede ocurrir por enlazamiento del objetivo, alterando catalíticamente el objetivo, haciendo reaccionar el objetivo de tal manera que modifique/altere el objetivo o la actividad funcional del objetivo, enlazándose por vía covalente al objetivo como en un inhibidor suicida, facilitando la reacción entre el objetivo y otra molécula. Los aptámeros pueden comprender múltiples unidades de ribonucleótidos, unidades de desoxirribonucleótidos, o una mezcla de ambos tipos de residuos de nucleótidos. Los aptámeros pueden comprender adicionalmente una o más bases modificadas, azúcares o unidades de esqueleto de fosfato tal como se describe en más detalle aquí.

55 Por "antagonista de anticuerpos" se entiende una molécula de anticuerpo tal como se define aquí que es capaz de bloquear o reducir significativamente una o más de las actividades de un objetivo PDGF o VEGF. Por ejemplo, un anticuerpo inhibidor de VEGF puede inhibir o reducir la capacidad de VEGF para estimular la angiogénesis.

60 Una secuencia de nucleótidos es "complementaria" a otra secuencias de nucleótidos y cada una de las bases de las dos secuencias coincide, esto es, son capaces de formar pares de bases de Watson Crick. El término "cadena complementaria" se utiliza aquí de forma intercambiable con el término "complemento". El complemento de una cadena de ácido nucleico puede ser el complemento de una cadena de codificación o el complemento de una cadena codificadora.

65 Las expresiones "residuo conservado" o "sustitución de aminoácidos conservadoras" se refiere al agrupamiento de aminoácidos sobre la base de ciertas propiedades comunes. Una forma funcional de definir las propiedades

comunes entre aminoácidos individuales es analizar las frecuencias normalizadas de los cambios del aminoácido entre las correspondientes proteínas de organismos homólogos. De acuerdo con tales análisis, pueden definirse grupos de aminoácidos donde los aminoácidos dentro de un grupo se intercambian preferiblemente uno con otro, y por lo tanto recuerdan uno al otro lo máximo en su impacto y en la estructura global de la proteína (Schulz, G. E. and R. H. Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag). Ejemplos de grupos de aminoácidos definidos de esta manera incluyen:

- (i) un grupo cargado, consistente de Glu y Asp, Lys, Arg y His,
- (ii) un grupo cargado positivamente, consistente de Lys, Arg y His,
- (iii) un grupo cargado negativamente, consistente de Glu y Asp,
- (iv) un grupo aromático, consistente de Phe, Tyr y Trp,
- (v) un grupo anillo con nitrógeno, consistente de His y Trp,
- (vi) un grupo alifático grande, no polar, consistente de Val, Leu y Ile,
- (vii) un grupo ligeramente no polar, consistente de Met y Cys,
- (viii) un grupo de residuo pequeño, consistente de Ser, Thr, Asp, Asn, Gly, Ala, Glu, Gln y Pro,
- (ix) un grupo alifático consistente de Val, Leu, Ile, Met and Cys, y
- (x) un grupo hidroxilo pequeño consistente de Ser y Thr.

Además de los grupos presentados anteriormente, cada residuo de aminoácidos puede formar su propio grupo, y el grupo formado por el aminoácidos individual puede ser referido simplemente con abreviatura de una o tres letras para ese aminoácido utilizada comúnmente en la técnica.

El término "interacción" tal como se utiliza aquí está previsto para incluir relaciones o asociación detectables (por ejemplo, interacciones bioquímicas) entre moléculas, tales como interacción entre proteína-proteína, proteína-ácido nucleico, ácido nucleico-ácido nucleico y proteína-molécula pequeña o ácido nucleico-molécula pequeña en la naturaleza.

El término "proteína interactuante" se refiere a una proteína capaz de interactuar, enlazarse a, y /o de otra manera asociarse con una proteína de interés, tal como por ejemplo una proteína de PDGF o VEGF, o sus receptores cognatos correspondientes.

El término "aislado" tal como se utiliza aquí con respecto a ácidos nucleicos, tales como ADN o ARN, se refiere a moléculas separadas de otros ADN o ARN, respectivamente que están presentes en la fuente natural de la macromolécula. De la misma forma, el término "aislado" tal como se utiliza con respecto a los polipéptidos se refiere a moléculas de proteínas separadas de otras proteínas que están presentes en la fuente del polipéptido. El término aislado tal como se utiliza aquí se refiere también a un ácido nucleico o péptido que está sustancialmente libre de material celular, material vírico o medio de cultivo cuando se produce por técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetiza químicamente.

"Ácido nucleico aislado" se entiende que incluye fragmentos de ácidos nucleicos, los cuales no se presentan de manera natural como fragmentos, sino que se encontraría en estado natural. El término "aislado" se usa aquí también para referirse a polipéptidos, los cuales se aíslan de otras proteínas celulares y se entiende que abarcan polipéptidos tanto purificados como recombinantes.

Tal como se utiliza aquí, los términos "marcador" y "marcador detectable" se refieren a una molécula capaz de ser detectada, incluyendo, pero no limitándose a, isótopos radioactivos, fluoróforos, unidades estructurales quimioluminiscentes, enzimas, sustratos de enzimas, cofactores de enzimas, inhibidores de enzimas, colorantes, iones metálicos, ligandos (por ejemplo, biotina o haptenos) y similares. El término "fluorescente" se refiere a una sustancia o a una porción de la misma que es capaz de exhibir fluorescencia en el rango detectable. Ejemplos particulares de marcadores que pueden ser utilizados bajo la invención incluyen fluoresceína, rodamina, dansilo, umbeliferona, rojo de Texas, luminol, NADPH, alfa-beta-galactosidasa y peroxidasa de rábano.

"Nivel de expresión de un gen en una célula" se refiere al nivel de ARNm, así como a los transcriptos nacientes pre-ARNm, intermedios de procesamiento de transcriptos, ARNm maduros y productos de degradación, codificados por el gen en la célula, así como el nivel de proteína traducido a partir de ese gen.

Tal como se utiliza aquí, el término "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (ADN), y cuando es apropiado, ácido ribonucleico (ARN). También debe entenderse que el término incluye, como equivalentes, análogos bien sea de ARN o ADN hecho a partir de análogos de nucleótidos y, tal como es aplicable a la realización que está siendo descrita, polinucleótidos de cadena sencilla (sentido o antisentido) y de cadena doble, EST, cromosomas, ADNc, ARNm y ARNr y ejemplos representativos de moléculas que pueden ser denominadas como ácidos nucleicos.

El término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de monómeros de nucleótidos o nucleósidos que consisten de bases de origen natural, azúcares y uniones interazúcar (esqueleto). El término también incluye

oligómeros modificados o sustituidos que comprenden monómeros de origen no natural o porciones de los mismos, los cuales funcionan de la misma forma, la incorporación de oligómeros sustituidos se basa en factores que incluyen consumo celular potenciado o resistencia incrementada a la nucleasa y se encogen tal como es conocido en la técnica. El oligonucleótido completo o solamente porciones del mismo pueden contener los oligómeros sustituidos.

5 El término "porcentaje de identidad" se refiere a la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos. La identidad puede ser determinada bien sea por comparación en cada secuencia, la cual puede ser alineada para propósitos de comparación. Cuando una posición equivalente en las secuencias separadas es ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando el sitio equivalente ocupado por el mismo o similar residuos de aminoácidos (por ejemplo, similar en naturaleza estérica y/o electrónica), entonces las moléculas pueden considerarse como homólogas (similares) en esa posición. La expresión de un porcentaje de homología, similitud y/o identidad se refiere a una función del número de aminoácidos idénticos o similares en posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Pueden utilizarse diversos algoritmos y/o programas de alineamiento, incluyendo el modelo Hidden Markov (HMM), FASTA y BLAST. HNiM, FASTA y BLAST están disponibles a través del National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD y el European Bioinformatic Institute EBI. En una realización, el porcentaje de identidad de las secuencias que pueden determinarse por estos programas GCG con un peso de brecha de 1, por ejemplo, cada aminoácido de brecha se pesa como si fuera un aminoácido sencillo o un nucleótido que no coincide entre las dos secuencias. Otras técnicas para alineamiento se describen en *Methods in Enzymology*, vol. 266: *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis* (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, California, Estados Unidos. Cuando sea deseable, un programa de alineamiento que permita brechas en la secuencia se utiliza para alinear las secuencias. El Smith-Waterman es un tipo de algoritmo que permite brechas en alineamientos de secuencias (véase (1997) *Met. Mol. Biol.* 70: 173 - 187). También el programa GAP que utiliza el método de alineamiento de Needleman y Wunsch puede utilizarse para alinear secuencias. Se describen más técnicas y algoritmos que incluyen el uso de HMM en *Sequence, Structure, and Databanks: A Practical Approach* (2000), ed. Oxford University Press, Incorporated and in *Bioinformatics: Databases and Systems* (1999) ed. Kluwer Academic Publishers. Una estrategia de búsqueda alternativa utiliza software MPSRCH, el cual corre sobre un ordenador MASPARE. El MPSRCH utiliza un algoritmo de Smith-Waterman para calificar secuencias en un ordenador paralelo masivamente. Esta metodología mejora la capacidad para seleccionar coincidencias distantes relacionadas, y es especialmente tolerante a pequeñas brechas y errores de secuencias de nucleótidos. Las secuencias de aminoácidos codificadas por ácidos nucleicos puede ser utilizada para buscar bases de datos tanto de proteínas como de ADN. Las bases de datos con secuencias individuales se describen en *Methods in Enzymology* ed. Doolittle, supra. Databases include Genbank, EMBL, y DNA Database of Japan (DDBJ).

35 "Coincidencia perfecta" en referencia a un dúplex significa que las cadenas de poli u oligonucleótido que conforman el dúplex forman una estructura de cadena doble una con otra de tal manera que el nucleótido en cada cadena sufre el apareamiento de bases de Watson-Crick con un nucleótido en la otra cadena. El término también abarca el apareamiento de análogos de nucleósidos, tales como desoxinosina, nucleósidos con bases de 2-aminopurina, y similares, que también pueden ser empleadas. Una no coincidencia en un dúplex entre un polinucleótido objetivo y un oligonucleótido o polinucleótido significa que un par de nucleótidos en el dúplex fracasa en sufrir el enlazamiento de Watson-Crick. En referencia a un triplete, el término significa que el triplete consiste de un dúplex perfectamente coincidente y una tercera cadena en la cual cada nucleótido sufre la asociación de Hoogsteen o de Hoogsteen reversa con un par de bases del dúplex de coincidencia perfecta.

45 Los términos "ARN de interferencia", "ARNi" o "ARNsi" se refieren todos a un método mediante el cual la expresión de un gen o producto genético es disminuida por la introducción en una célula objetivo de uno o más ARN de doble cadena, los cuales son homólogos al gen de interés (particularmente al ARN mensajero del gen de interés, por ejemplo PDGF o VEGF).

50 Las variantes polimórficas también pueden abarcar "polimorfismos de nucleótidos individuales" (SNP) en los cuales la secuencia de polinucleótidos varía en una base (por ejemplo, una variación de una base en PDGF o VEGF). La presencia de SNP puede ser indicadora de, por ejemplo, una cierta población, un estado de enfermedad o una propensión a un estado de enfermedad.

55 El "perfil" de un estado biológico aberrante, por ejemplo de una célula tumoral se refiere a los niveles de diversos constituyentes de una célula que cambia la respuesta al estado de la enfermedad. Los constituyentes de una célula incluyen los niveles de ARN, niveles de abundancia de proteínas, o niveles de actividad de proteínas.

60 El término "proteína" se utiliza de manera intercambiable aquí con los términos "péptido" y "polipéptidos". El término "proteína recombinante" se refiere a una proteína de la presente invención la cual es producida por técnicas de ADN recombinante, en donde generalmente el ADN que codifica la proteína expresada o el ARN se inserta en un vector de expresión adecuado el cual a su vez es utilizado para transformar una célula huésped para producir una proteína heteróloga o ARN. Adicionalmente, la expresión "derivado de", con respecto a un gen recombinante que codifica la proteína recombinante se entiende que incluye dentro del significado de "proteína recombinante" aquellas proteínas

65

que tienen una secuencia de aminoácidos de una proteína nativa o una secuencia de aminoácidos similar a la misma la cual es generada por mutaciones, incluyendo sustituciones y supresiones, de una proteína de origen natural.

5 Tal como se utiliza aquí, el término “transgen” significa una secuencia de ácidos nucleicos (que codifica, por ejemplo, uno de los ácidos nucleicos objetivo o un transcripto antisentido del mismo), el cual ha sido introducido en una célula. Un transgen podría ser parcial o completamente heterólogo, esto es, foráneo para el animal o célula transgénicos en los cuales se introduce, o, es homólogo a un gen endógeno del animal o célula transgénicos en el cual se introduce, pero el cual está diseñado para ser insertado, o es insertado, en el genoma del animal de tal manera que altere el genoma de la célula en la cual se inserta (por ejemplo, se inserta en una localización que difiere de la del gen natural o su inserción da como resultado una inhabilitación) un transgen también puede estar presente en la célula en forma de un episoma. Un transgen puede incluir una o más secuencias reguladoras transcripcionales y cualquier otro ácido nucleico, tales como intrones, los cuales pueden ser necesarios para la expresión óptima de un ácido nucleico seleccionado.

15 Por “trastorno neovascular” se entiende un trastorno caracterizado por la alteración o angiogénesis no regulada diferente a la de la transformación oncogénica o neoplástica acompañante, esto es, cáncer. Ejemplos de trastornos neovasculares incluyen soriasis, artritis reumatoide y trastorno neovasculares oculares incluyendo retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad.

20 Tal como se utilizan aquí, los términos “neovascularización” y “angiogénesis” se utilizan de manera intercambiable. Neovascularización y angiogénesis se refiere a la generación de nuevos vasos sanguíneos en células, tejidos u órganos. El control de la angiogénesis se altera típicamente en ciertos estados de enfermedad y, en muchos casos, el daño patológico asociado con la enfermedad está relacionado con la angiogénesis alterada, no regulada o descontrolada. Una angiogénesis persistente, no regulada se presenta en una multiplicidad de estados de enfermedad, incluyendo aquellos caracterizados por el crecimiento anormal de células endoteliales, y soporta el daño patológico visto en estas condiciones incluyendo la ruptura y permeabilidad de vasos sanguíneos.

25 Por “trastorno neovascular ocular” se entiende un trastorno caracterizado por angiogénesis alterada o no regulada en el ojo de un paciente. Trastornos neovasculares oculares de ejemplo incluyen neovascularización de disco óptico, neovascularización del iris, neovascularización de la retina, neovascularización coroidal, neovascularización de la córnea, neovascularización del vítreo, glaucoma, pannus, pterigios, edema macular, retinopatía diabética, edema macular diabético, retinopatía vascular, degeneración retinal, uveítis, enfermedades inflamatorias de la retina y vítreo retinopatía proliferativa.

30 El término “tratar” una enfermedad neovascular en un sujeto o “tratamiento de” un sujeto que tiene una enfermedad neovascular se refiere a someter al sujeto a un tratamiento farmacéutico, por ejemplo, la administración de un fármaco, de tal manera que al menos se disminuya un síntoma de la enfermedad neovascular. De acuerdo con lo anterior, el término “tratamiento” tal como se utiliza aquí se entiende que abarca la curación así como la mejora de uno de los síntomas de la condición de la enfermedad neovascular. De acuerdo con lo anterior, “tratamiento” tal como se utiliza aquí, incluye la administración o prescripción de una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un trastorno neovascular ocular.

35 Por “paciente” se entiende cualquier animal. El término “animal” incluye mamíferos, incluyendo, pero no limitándose a, humanos y otros primates. El término también incluye animales domesticados tales como vacas, cerdos, ovejas, caballos, perros y gatos.

40 Por “PDGF” o “factor de crecimiento derivado de plaquetas” se entiende un factor de crecimiento derivado de las plaquetas en mamíferos que afecta la angiogénesis o un proceso angiogénico. Tal como se utiliza aquí, el término “PDGF” incluye los diversos subtipos de PDGF incluyendo PDGF-B (véase Figura 1 (A) y (B)), y PDGF-A (véase Figura 1 (C) y (D)). Adicionalmente, tal como se utiliza aquí, el término “PDGF” se refiere a los factores angiogénicos relacionados con PDGF tales como PDGF-C y PDGF-D que actúan a través de un receptor PDGF cognato para estimular la angiogénesis o un proceso angiogénico. En particular, el término “PDGF” significa cualquier miembro de la clase de factores de crecimiento que (i) se enlaza a un receptor de PDGF tal como PDGFR-B (véase Figura 3 (A) y (B)), o PDGFR-A (véase Figura 3 (C) y (D)); (ii) activa una actividad de tirosina quinasa asociada con el receptor VEGF; y (iii) afecta por lo tanto la angiogénesis o un proceso angiogénico. Tal como se utiliza aquí, el término “PDGF” se refiere en general a aquellos miembros de la clase de factores de crecimiento que inducen la síntesis de ADN y la mitogénesis a través del enlazamiento y activación de un receptor de superficie celular del factor de crecimiento derivado de plaquetas (esto es, PDGF-FR) sobre un tipo de célula que responde. El PDGF afecta los efectos biológicos específicos que incluyen, por ejemplo: migración celular dirigida (quimiotaxis) y activación celular; activación de la fosfolipasa; rendimiento incrementado de fosfatidilinositol y del metabolismo de la prostaglandina; estimulación de la síntesis tanto de colágeno como de colagenasa por parte de células que responde; alteración de actividades metabólicas celulares, incluyendo síntesis de matriz, producción de citoquina, y consumo de lipoproteínas; inducción, indirectamente, de una respuesta proliferativa en células que carecen de receptores de PDGF; y actividad vasoconstrictora potente. El término “PDGF” se entiende que incluye tanto un polipéptido de

“PDGF” y su correspondiente gen codificador de “PDGF” o ácido nucleico.

Por “PDGF-A” se entiende un polipéptido de cadena A de PDGF y su correspondiente gen codificador o ácido nucleico.

Por “PDGF-B” se entiende un polipéptido de cadena B de PDGF y su correspondiente gen codificador o ácido nucleico.

Por “VEGF” o “factor de crecimiento endotelial vascular”, se entiende un factor de crecimiento endotelial vascular de mamíferos que afectan la angiogénesis o un proceso angiogénico. Tal como se utiliza aquí, el término “VEGF” incluye los diversos subtipos de VEGF (también conocidos como factores de permeabilidad vascular (VPF) y VEGF-A) (véase Figura 2 (A) y (B)) que surgen, por ejemplo, mediante la división alternativa del gen de VEGF-A/VPF incluyendo VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ y VEGF₁₈₉. Adicionalmente, tal como se utiliza aquí, el término “VEGF” se refiere a factores angiogénicos relacionados con VEGF tales como PIGF (factor de crecimiento de placenta) VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E que actúan a través de un receptor cognato VEGF para estimular la angiogénesis o un proceso angiogénico. En particular, el término “VEGF” significa cualquier miembro de la clase de factores de crecimiento que (i) se enlazan a un receptor VEGF tal como en VEGFR-1 (Flt-1) (véase Figura 4 (A) y (B)), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) (véase Figura 4 (C) y (D)), o VEGFR-3 (FLT-4); (ii) activan una actividad de tirosina quinasa asociada con el receptor de VEGF; y (iii) afecta por lo tanto la angiogénesis o un proceso angiogénico. El término “VEGF” se entiende que incluye un polipéptido de “VEGF” y su correspondiente gen codificador de “VEGF” o ácido nucleico.

Por “antagonista de PDGF” se entiende un agente que reduce, o inhibe, bien sea parcial o completamente, la actividad de producción de un PDGF. Un antagonista de PDGF puede reducir directa o indirectamente o inhibir un PDGF específico tal como PDGF-B. Adicionalmente, los “antagonistas de PDGF” consistente con la anterior definición de “antagonistas” pueden incluir agentes que actúan bien sea sobre un ligando de PDGF o su receptor cognato de tal manera que reduzca o inhiba una señal de receptor asociada a PDGF. Ejemplos de tales “antagonistas de PDGF” incluyen así, por ejemplo: ribozimas antisentido o composiciones de ARNi que apuntan a un ácido nucleico de PDGF; aptámeros anti PDGF, anticuerpos anti-PDGF o receptores solubles de PDGF señuelo que evitan el enlazamiento de un PDGF a su receptor cognato; ribozimas antisentido o composiciones de ARNi que apuntan a un ácido nucleico receptor de PDGF cognato (PDGFR); y aptámeros anti-PDGFR o anticuerpos anti-PDGFR que se enlazan a un receptor PDGFR cognato; e inhibidores de tirosina quinasa de DGFR.

Por “antagonista de VEGF” se entiende un agente que reduce, o inhibe, bien sea parcial o completamente, la actividad o producción de un VEGF. Un antagonista de VEGF puede reducir directa o indirectamente o inhibir un VEGF específicos tal como VEGF₁₆₅. Adicionalmente, los “antagonistas de VEGF” consistentes con la definición anterior de “antagonistas”, pueden incluir agentes que actúan bien sea sobre un ligando VEGF o su receptor cognato de tal manera que reduzca o inhiba una señal de receptor asociada con VEGF. Ejemplos de tales “antagonistas de VEGF” incluyen así, por ejemplo, ribozimas antisentido o composiciones de ARNi que apuntan a un ácido nucleico VEGF; aptámeros anti-VEGF, anticuerpos anti-VEGF o receptores de VEGF solubles señuelo que evitan el enlazamiento de un VEGF a su receptor cognato; ribozimas antisentido o composiciones de ARNi que apuntan a un ácido nucleico receptor cognato VEGF (VEGFR); aptámeros anti-VEGFR o anticuerpos anti-VEGFR que se enlazan a un receptor VEGFR cognato; inhibidores de tirosina quinasa de VEGFR.

Por “una cantidad suficiente para suprimir un trastorno neovascular” se entiende la cantidad efectiva de un antagonista, en combinación de la invención, requerida para tratar o prevenir un trastorno o síntoma neovascular del mismo. “Cantidad efectiva” de ingredientes activos utilizados para practicar la presente invención para tratamiento terapéutico de las condiciones causadas por o contribuyentes al trastorno neovascular varía dependiendo de la forma de administración, localización anatómica del trastorno neovascular, edad, peso corporal y salud general del paciente. Finalmente, un médico o veterinario decidirá la cantidad apropiada y régimen de dosificación. Tal cantidad se denomina como una cantidad suficiente para suprimir un trastorno neovascular.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Una “variante” del polipéptido X se refiere a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos del péptido X el cual es alterado en uno o más residuos de aminoácidos. La variante puede tener cambios “conservadores” en donde un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares (por ejemplo, reemplazo de leucina con isoleucina). Más raramente, una variante puede tener cambios “no conservables” (por ejemplo, reemplazo de glicina con triptófano). Variaciones menores análogas también pueden incluir eliminaciones o inserciones de aminoácidos, o ambas. La guía en la determinación de cuáles residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos, insertados o suprimidos sin abolir la actividad biológica o inmunológica pueden encontrarse utilizando programas de ordenador bien conocidos en la técnica, por ejemplo, software LASERGENE (DNASTAR).

El término “variante” cuando se utiliza en el contexto de una secuencia de polinucleótidos, puede abarcar una secuencia de polinucleótidos relacionada con la del gen o de la secuencia codificadora del mismo. Esta definición

también puede incluir, por ejemplo, variantes “alélicas”, “de división”, “de especie” o “polimórficas”. Una variante de división puede tener una identidad significativa con una molécula de referencia pero generalmente tendrá un número mayor o menor de polinucleótidos debido a la división alternativa de exones durante el procesamiento de la ARNm.

5 El polipéptido correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Variantes de especies son secuencias de polinucleótidos que varían de una especie a otra. Los polipéptidos resultantes en general tendrán una identidad de aminoácidos significativa uno con respecto al otro. Una variante polimórfica es una variación de la secuencia de polinucleótidos de un gen particular entre individuos de una especie dada.

10 El término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otra molécula de ácido nucleico a la cual se ha enlazado. Un tipo de vector útil es un episoma, esto es, un ácido nucleico capaz de una replicación extracromosómica. Vectores útiles son aquellos capaces de replicación autónoma y/o expresión de ácidos nucleicos a los cuales están enlazados. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están enlazados operativamente se denominan aquí como “vectores de expresión”. En general, los vectores de expresión de utilidad

15 en las técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en la forma de “plásmidos” los cuales se refieren en general a bucles de ADN de cadena doble circulares los cuales, en su forma de vector no están enlazados al cromosoma. En la presente especificación, “plásmido” y “vector” se utilizan de manera intercambiable puesto que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector.

20 Terapia de combinación

La invención se basa, en parte, en la inhibición específica de las actividades tanto de VEGF como de PDGF utilizando antagonistas de los factores de crecimiento apropiados como tratamientos potentes para pacientes que tienen un trastorno neovascular. La administración de un antagonista de PDGF y un antagonista de VEGF permite

25 beneficios terapéuticos mayores para tratar un trastorno neovascular ocular que un antagonista administrado solo. La acción combinada de los agentes anti-VEGF y anti-PDGF es inesperada a la luz de los estudios que no evidencian una cooperación aparente entre los factores en la estimulación de la angiogénesis en un sistema celular endotelial de la retina (véase Castellon et al., (2001) Exp. Eye Res. 74: 523 - 35).

30 El PDGF y el VEGF son estímulos importantes para el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a través del cuerpo, especialmente en el ojo. La terapia de combinación dirigida para inhibir las actividades biológicas tanto de PDGF y VEGF proporciona un método para tratar o prevenir el trastorno neovascular.

De acuerdo con lo anterior, la invención presenta antagonistas de PDGF y antagonistas de VEGF y composiciones para suprimir un trastorno neovascular utilizando terapia de combinación. En particular, la presente invención utiliza dos rutas de señalización de comunicación intracelular distintas operativas en células vasculares, a saber la señalización de PDGF y de VEGF, como objetivos terapéuticos en el tratamiento de un trastorno neovascular ocular. Este método de combinaciones es especialmente útil para tratar cualquier número de enfermedades y trastornos

40 oftalmológicos marcados por el desarrollo de neovascularización ocular, incluyendo, pero no limitándose a neovascularización del disco óptico, neovascularización del iris, neovascularización de la retina, neovascularización coroidal, neovascularización de la córnea, neovascularización del vítreo, glaucoma, pannus, terigeos, edema macular, retinopatía vascular, degeneración retinal, degeneración macular, uveítis, enfermedades inflamatorias de la retina y vítreo retinopatía proliferativa. La terapia de combinación, consistente de antagonistas que inhiben PDGF (tal como PDGF-B) y VEGF (tales como VEGF-A) en su señalización da como resultado un eficacia de tratamiento

45 incrementada en comparación con cualquiera de las dos terapias utilizadas independientemente. Mientras que los ejemplos discutidos más abajo describen la combinación de un antagonista individual de PDGF y un antagonista individual de VEGF, se entiende que la combinación de agentes antagonísticos múltiples puede ser deseable.

La terapia de combinación anti-PDGF y anti-VEGF de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo sola o en conjunción con otra terapia y puede ser provista en casa, en la consulta del médico, una clínica, un departamento de consulta externa de un hospital, o en un hospital. El tratamiento en general comienza en un hospital de tal manera que el doctor puede observar los efectos de la terapia de manera cercana y hacer cualquier ajuste que sea requerido. La duración de la terapia de combinación depende del tipo del trastorno neovascular que está siendo

50 tratado, la edad y condición del paciente, el estado y tipo de enfermedad del paciente y cómo el paciente responde al tratamiento. Adicionalmente, una persona que tiene un riesgo mayor de desarrollar una enfermedad neovascular (por ejemplo, un paciente diabético) pueda recibir tratamiento para inhibir la aparición de los síntomas. Una ventaja significativa provista por la presente invención es que la combinación de un antagonista de PDGF y un antagonista de VEGF para el tratamiento de un trastorno neovascular permite la administración de una dosis baja de cada antagonista y menos de antagonistas activos totales, proveyendo así una eficacia similar con menos toxicidad y efectos colaterales y costes reducidos.

60

La dosificación y administración de cada componente de la combinación pueden ser controladas independientemente. Por ejemplo, un antagonista, puede ser administrado tres veces al día mientras que el segundo antagonista puede ser administrado una vez por día. La terapia de combinación puede ser dada en ciclos de inicio y

65 terminación que incluyen períodos de descanso de tal manera que el cuerpo del paciente tiene la oportunidad de

recuperarse de cualquier efecto colateral aún no visto. Los antagonistas también pueden formularse juntos de tal manera que una administración suministra ambos antagonistas.

Objetivos de los antagonistas de PDGF y VEGF

5 El PDGF fue aislado originalmente a partir de lisados de plaquetas identificados como la principal actividad de promoción del crecimiento en suero pero no en plasma. La actividad mitogénica de PDGF fue vista primero en acción con las células de tejidos conectivos, tales como fibroblastos y células de músculos lisos, y en células gliales en cultivo. Se han identificado dos isoformas homólogas de PDGF, PDGF A y B, las cuales son codificadas por genes separados (en los cromosomas 7 y 22). En la especie más abundante de plaquetas es el heterodímero AB, aunque todos los tres dímeros posibles (AA, AB y BB) se presentan de manera natural. Después de la traducción, los dímeros de PDGF son procesados en proteínas secretadas de aproximadamente 30 kDa.

15 Se han identificado dos proteínas de la superficie celular que enlazan a PDGF con alta afinidad, alfa y beta (Heldin et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78: 3664; Williams et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79: 5867). Ambas especies contienen 5 dominios extracelulares similares a la inmunoglobulina, un dominio transmembrana individual y un dominio de tirosina quinasa intracelular separado por un dominio inserto de quinasa. En los últimos años, las especificidades de las tres isoformas de PDGF para los tres dímeros receptores (alfa/alfa, alfa/beta y beta/beta) se han elucidado. El homodímero receptor de alfa se enlaza a todas las tres isoformas de PDGF con alta afinidad, el homodímero receptor beta se enlaza solamente con PDGF BB con alta afinidad, y PDGF AB con una afinidad aproximadamente 10 veces menos, y el heterodímero receptor alfa/beta se enlaza a PDGF BB y PDGF AB con alta afinidad (Westermarck & Heldin (1993) Acta Oncologica 32: 101). El patrón de especificidad parece resultar de la habilidad de la cadena A para enlazarse solamente con el receptor alfa y de la cadena B para enlazarse con las subunidades receptoras tanto alfa como beta con gran afinidad.

25 En general, la invención proporciona los agentes que inhiben una o más actividades de PDGF. Estos agentes inhibidores de PDGF, o antagonistas de PDGF pueden actuar en una o más formas del ligando PDGF. Los factores de crecimiento derivados de plaquetas incluyen homo o heterodímeros de la cadena A (PDGF-A) y la cadena B (PDGF-B) que ejercen su acción a través del enlazamiento y la dimerización de dos tirosina quinasa receptoras relacionadas, receptores [alfa] (PDGFR-[alfa]) y receptores [beta] (PDGFR-[beta]). Además, los PDGF-C y PDGF-d, dos nuevos ligandos activados por proteasa para los complejos PDGFR, han sido identificados recientemente (véase Li et al., (2000) Nat. Cell. Biol. 2: 302 - 9; Bergsten et al., (2001) Nat. Cell. Biol. 3: 512 - 6; and Uutele et al., (2001) Circulation 103: 2242 - 47). Debido a las especificidades de enlazamiento de los ligandos diferentes del PDGFR, se sabe que el PDGFR-[alfa] enlaza a PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB y PDGF-CC; el PDGFR-[beta] [beta] enlaza a PDGF-BB y PDGF-DD; mientras que PDGFR-[alfa] [beta] enlaza a PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC y PDGF-DD (véase Betsholtz et al., (2001) BioEssays 23: 494 - 507).

40 El VEGF es un homodímero enlazado a disulfuro secretado que estimula selectivamente las células endoteliales para que proliferen, migren y produzcan enzimas degradadoras de matriz (Conn et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 1323 - 1327); Ferrara and Henzel (1989) Biochem. Biophys. Res. Commun. 161: 851 - 858; Pepper et al., (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 181: 902 - 906; Unemori et al., (1992) J. Cell. Physiol. 153: 557 - 562), procesos todos los cuales son requeridos para la formación de nuevos vasos. El VEGF se presenta en cuatro formas (VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189, VEGF-206) como resultado de la división alternativa del gen VEGF (Houck et al., (1991) Mol. Endocrinol. 5: 1806 - 1814; Tischer et al., (1991) J. Biol. Chem. 266: 11947 - 11954). Las dos formas más pequeñas son se difunden mientras que las dos formas más grandes permanecen predominantemente localizadas en la membrana celular como consecuencia de su alta afinidad por la heparina. El VEGF-165 también se enlaza a la heparina y es la forma más abundante. El VEGF-121, la única forma que no se enlaza a la heparina, parece tener una afinidad menor por los receptor de VEGF (Gitay-Goren et al., (1996) J. Biol. Chem. 271: 5519 - 5523) as well as lower mitogenic potency (Keyt et al., (1996) J. Biol. Chem. 271: 7788 - 7795). Los efectos biológicos de VEGF son mediados por dos receptores de tirosina quinasa (Flt-1 y Flk-1/KDR) cuya expresión está altamente restringida a células de origen endotelial (de Vries et al., (1992) Science 255: 989 - 991; Millauer et al., (1993) Cell 72: 835 - 846; Terman et al., (1991) Oncogene 6: 519 - 524). Mientras que la expresión de ambos receptores funcionales es requerida para un enlazamiento con alta afinidad, la señalización quimiotáctica y mitogénica en células endoteliales parece presentarse de manera primaria a través del receptor KDR (Park et al., (1994) J. Biol. Chem. 269: 25646 - 25654; Seetaram et al., (1995) Oncogene 10: 135 - 147; Waltenberger et al., (1994) J. Biol. Chem. 269: 26988 - 26995). La importancia de VEGF y de los receptores de VEGF para el desarrollo de los vasos sanguíneos ha sido demostrada recientemente en ratones que carecen de un alelo sencillo para el gen VEGF (Carmeliet et al., (1996) Nature 380: 435 - 439; Ferrara et al., (1996) Nature 380: 439 - 442) o ambos alelos de los genes Flt-1 (Fong et al., (1995) Nature 376: 66 - 70) o Flk-1 (Shalaby et al., (1995) Nature 376: 62 - 66). En cada caso, se observaron anomalías distintas en la formación de vasos dando como resultado la letalidad de los embriones.

65 Se sabe ahora que la angiogénesis compensatoria inducida por hipoxia de los tejidos es mediada por VEGF (Levy et al., (1996) J. Biol. Chem. 271: 2746 - 2753); Shweiki et al., (1992) Nature 359: 843 - 845). Estudios en humanos han demostrado que concentraciones alta de VRGF están presentes en el vítreo en trastornos angiogénicos de la retina

pero no en estados de enfermedad inactivos o de no neovascularización. El tejido coroidal humano escindido después de cirugía submacular experimental también muestra altos niveles de VEGF.

Además, para ser el único mitógeno específico de las células endoteliales conocido, el VEGF es único entre los factores de crecimiento angiogénicos en su capacidad para inducir un incremento transiente tanto en la permeabilidad de los vasos sanguíneos a las macromoléculas (por lo tanto su nombre original y alternativos, factor de permeabilidad vascular, VPF) (véase Dvorak et al., (1979) *J. Immunol.* 122: 166 - 174; Senger et al., (1983) *Science* 219: 983 - 985; Senger et al., (1986) *Cancer Res*, 46: 5629 - 5632). La permeabilidad vascular implementada y la deposición resultante de proteínas del plasma en el espacio extravascular ayuda a la formación de nuevos vasos proveyendo una matriz provisional para la migración de células endoteliales (Dvorak et al., (1995) *Am. J. Pathol.* 146: 1029 - 1039). La hiperpermeabilidad es en efecto una característica propia de los vasos nuevos, incluyendo aquellos asociados con los tumores.

Antagonistas de PDGF y VEGF

En lo que sigue, se discutirá una amplia variedad de antagonistas de PDGF y VEGF. Las reivindicaciones incluyen una combinación de antagonistas específicos de PDGF y VEGF, antagonistas específicos que están comprendidos por la amplia variedad de antagonistas de PDGF y VEGF tal como se discuten aquí. Aunque muchos de los antagonistas de PDGF y VEGF son referidos más adelante y no se refieren en las reivindicaciones, se mantiene aquí referencia a los mismos para propósitos ilustrativos.

General

La invención provee antagonistas (esto es, inhibidores) de PDGF y VEGF para uso juntos en terapia de combinación para trastornos neovasculares. Los antagonistas de PDGF y los antagonistas de VEGF específicos son conocidos en la técnica y se describen brevemente en las secciones que siguen. Aún otros antagonistas de PDGF y antagonistas de VEGF que ahora son, se han hecho, disponibles para las personas experimentadas en la técnica incluyen los anticuerpos, aptámeros, oligómeros antisentido, ribozimas y composiciones de ARNi que pueden ser identificados y producidos utilizando prácticas que son de rutina en la técnica junto con las enseñanzas y guías de la especificación, incluyendo las secciones provistas adicionalmente que aparecen más adelante.

Antagonismos de PDGF

En lo que sigue, se divulga una serie de antagonistas de PDGF. Aunque muchos de los antagonistas de PDGF citados más adelante no están referidos en las reivindicaciones, se mantiene referencia aquí a los mismos para propósitos de ilustración. En general, la inhibición de PDGF (por ejemplo, PDGF-B) puede lograrse en una variedad de maneras. Por ejemplo, una variedad de antagonistas de PDGF que inhiben la actividad o producción de PDGF están disponible y pueden utilizarse en la presente invención. Antagonistas de PDGF de ejemplo incluyen ligandos de ácidos nucleicos o aptámeros de PDGF, tales como descritos más adelante. Alternativamente, el antagonista de PDGF puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de anti-PDGF. De acuerdo con lo anterior, la molécula de PDGF se hace inactiva inhibiendo su enlazamiento a un receptor. Las moléculas de ácidos nucleicos tales como ARN antisentido, ribozimas y moléculas de ARNi que inhiben la expresión de PDGF al nivel del ácido nucleico se divulgan como antagonistas en la invención. Otros antagonistas de PDGF incluyen péptidos, proteínas, péptidos cíclicos, o compuestos orgánicos pequeños. Adicionalmente, la actividad de señalización de PDGF puede ser inhibida por perturbación de su señalización corriente abajo, por ejemplo, utilizando un cierto número de antagonistas inhibidores de tirosina quinasa de molécula pequeña, incluyendo aquellos que se describen más adelante. La capacidad de un compuesto o agente para servir como un antagonista de PDGF puede determinarse de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica y, adicionalmente, como se establece en, por ejemplo, Dai et al., (2001) *Genes & Dev.* 15: 1913 - 25; Zippel, et al., (1989) *Eur. J. Cell Biol.* 50(2): 428 - 34; y Zwiller et al., (1991) *Oncogene* 6: 219 - 21.

Por ejemplo, anticuerpos inhibidores dirigidos contra PDGF son conocidos en la técnica, por ejemplo, aquellos descritos en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.976.534, 5.833.986, 5.817.310, 5.882.644, 5.662.904, 5.620.687, 5.468.468, y PCT WO 2003/025019. Además, la invención incluye derivados de N-fenil-2-pirimidina-amina que son antagonistas de PDGF, tales como los divulgados en la Patente de los Estados Unidos No. 5.521.184, así como en WO2003/013541, W02003/078404, WO2003/099771, WO2003/015282, y WO2004/ 05282.

Moléculas pequeñas que bloquean la acción de PDGF son conocidas en la técnica, por ejemplo, las descritas en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6.528.526 (inhibidores de tirosina quinasa de PDGFR), 6.524.347 (inhibidores de tirosina quinasa PDGFR), 6.482.834 (inhibidores de tirosina quinasa PDGFR), 6.472.391 (inhibidores de tirosina quinasa PDGFR), 6.696.434, 6.331.555, 6.251.905, 6.245.760, 6.207.667, 5.990.141, 5.700.822, 5.618.837 y 5.731.326.

Proteínas y polipéptidos que bloquean la acción de PDGF son conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 6.350.731 (análogos de péptidos de PDGF), 5.952.304.

Compuestos arilo y heteroarilo bis mono- y bicíclicos que inhiben el receptor de tirosina quinasa de EGF y/o PDGF son conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.476.851, 5.480.883, 5.656.643, 5.795.889, y 6.057.320.

5 Oligonucleótidos antisentido para la inhibición de PDGF son conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.869.462 y 5.821.234.

10 Aptámeros (también conocidos como ligandos de ácidos nucleicos) para la inhibición de PDGF son conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6.582.918, 6.229.002, 6.207.816, 5.668.264, 5.674.685, y 5.723.594.

Otros compuestos para la inhibición de PDGF conocidos en la técnica incluyen los descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.238.950, 5.418.135, 5.674.892, 5.693.610, 5.700.822, 5.700.823, 5.728.726, 5.795.910, 5.817.310, 5.872.218, 5.932.580, 5.932.602, 5.958.959, 5.990.141, 6.358.954, 6.537.988 y 6.673.798.

15 Antagonistas de VEGF

20 En lo que sigue, se divulga una serie de antagonistas de VEGF. Aunque muchos de los antagonistas de VEGF están referidos abajo no están citados en las reivindicaciones, se mantiene aquí referencia a los mismos para propósitos ilustrativos.

25 La inhibición de VEGF (por ejemplo, VEGF-A) se logra en una variedad de maneras. Por ejemplo, hay disponible una variedad de antagonistas de VEGF que inhiben la actividad o producción de VEGF, incluyendo moléculas de ácidos nucleicos tales como aptámeros, ARN antisentido, ribozimas, moléculas de ARNi y anticuerpos de VEGF. Se usan aptámeros en la presente invención. Los antagonistas de VEGF incluyen ligandos de ácidos nucleicos o aptámeros de VEGF, tales como los descritos más adelante. Un antagonista para VEGF-A es EYE001 (denominado previamente como NX1838), el cual es un aptámero PEGilados modificados que se enlazan con afinidad alta y específica a la principal isoforma soluble humana de VEGF (véanse, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6.011.020, 6.051.698, y 6.147.204). El aptámero se enlaza e inactiva el VEGF de una manera similar a la de un anticuerpo de alta afinidad hacia VEGF. Otro aptámero de VEGF es EYE001 en su forma no pegilada. Un antagonista de VEGF tal como es prendido por la invención puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-VEGF. De acuerdo con lo anterior, la molécula de VEGF se hace inactiva inhibiendo su enlazamiento a un receptor. Además, las moléculas de ácido nucleico tales como ARN antisentido, ribozimas y moléculas de ARNi que inhiben la expresión de VEGF o la estabilidad del ARN a nivel nucleico son antagonistas. Otros antagonistas de VEGF incluyen péptidos, proteínas, péptidos cíclicos y compuestos orgánicos pequeños. Por ejemplo, las formas truncadas solubles de VEGF que se enlazan al receptor de VEGF sin actividad de señalización concomitante también sirven como antagonistas. Adicionalmente, la actividad de señalización de VEGF puede ser inhibida perturbando su señalización corriente abajo, por ejemplo, utilizando un cierto número de antagonistas que incluyen moléculas pequeñas inhibitoras del receptor de tirosina quinasa de VEGF, tal como se describe en detalle más adelante.

45 La capacidad de un compuesto o agente para servir como antagonista de VEGF puede determinarse de acuerdo con cualquier número de métodos estándar bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una de las actividades biológicas de VEGF es incrementar la permeabilidad vascular a través de enlazamiento específico a receptores sobre las células endoteliales vasculares. La interacción da como resultado la relajación de las uniones endoteliales estrechas con una fuga subsecuente de fluido vascular. La fuga vascular inducida por VEGF puede medirse in vivo siguiendo la fuga del colorante azul de Evans desde la vasculatura de una cobaya como consecuencia de una inyección intradérmica de VEGF (Dvorak et al., in Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor, Microvascular Hyperpermeability, and Angiogenesis; and (1995) Am. J. Pathol. 146: 1029). De la misma forma, la prueba puede ser utilizada para medir la capacidad de un antagonista para bloquear esta actividad biológica de VEGF.

55 En un ejemplo útil de una prueba de permeabilidad vascular, se premezcla VEGF₁₆₅ (20 - 30 nM) ex vivo con EYE001 (30 nm a 1 μM) o un antagonista de VEGF candidato y se administra subsecuentemente por inyección intradérmica en la piel afeitada sobre el dorso de cobayas. Treinta minutos después de la inyección, se cuantifica la fuga del colorante azul de Evans alrededor de los sitios de la inyección de acuerdo con métodos estándar mediante el uso de un sistema de análisis morfométrico computarizado. Un compuesto que inhibe la fuga inducida por VEGF del colorante indicador de la vasculatura se toma como un antagonista útil en los métodos y composiciones de la invención.

60 Otro ensayo para determinar si un compuesto es un antagonista de VEGF es la así denominada prueba de angiogénesis de la córnea. En esta prueba, se implantan pellas de polímeros de metacrilato que contienen VEGF₁₆₅ (3 pmol) en el estroma de la córnea de ratas para inducir el crecimiento de vasos sanguíneos en córnea normalmente avascular. Se administra entonces un antagonista de VEGF candidato por vía intravenosa a las ratas en dosis de 1 mg/kg, 3 mg/kg y 10 mg/kg bien sea una o dos veces al día durante 5 días. Al final del período de

65

tratamiento, se fotomicrografían las córneas individuales. El grado hasta el cual se desarrollan nuevos vasos sanguíneos en el tejido de la córnea y su inhibición por los compuestos candidatos, se cuantifican entonces mediante análisis morfométrico estandarizado de las fotomicrografías. Un compuesto que inhibe la biogénesis dependiente de VEGF en la córnea cuando se compara con el tratamiento con solución salina regulada con fosfato (PBS) se toma como un antagonista útil en los métodos y composiciones de la invención.

Los antagonistas de VEGF también se identifican utilizando el modelo en ratón de retinopatía de premadurez. En un ejemplo útil, se dejan camadas de 9, 8, 8, 7 y 7 ratones, respectivamente, en aire ambiental o se hacen hiperóxicos y se tratan intraperitonealmente con solución salina regulada con fosfato (PBS) o un antagonista de VEGF candidato (por ejemplo, a 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg/día). El punto final del ensayo, que es el crecimiento de nuevos capilares a través de la membrana limitante interior de la retina hacia el humor vítreo, se establece entonces mediante identificación microscópica y recuento de los vacíos neovasculares en 20 secciones histológicas de cada ojo de todos los ratones tratados y los de control. Una reducción en la neovascularización de la retina en ratones tratados con respecto al control no tratado se toma como identificación de un antagonista útil de VEGF.

En aún otra prueba de selección de ejemplo, los antagonistas de VEGF candidatos se identifican utilizando un ensayo de xenoinjerto tumoral humano in vivo. En esta prueba de selección, se prueba in vivo la eficacia de un antagonista de VEGF candidato en xenoinjertos de tumores humanos (rabdomiosarcoma A673 y tumor de Wilms) implantados en ratones desnudos. Los ratones son tratados entonces con los antagonistas de VEGF candidatos (por ejemplo, 10 mg/kg dados por vía intraperitoneal una vez al día después del desarrollo de tumores establecidos (200 mg)). Los grupos de control son tratados con un agente de control. Los compuestos candidatos identificados como inhibidores del crecimiento del tumor de rabdomiosarcoma A673 y tumor de Wilms con respecto al control se toman como antagonistas útiles en los métodos y composiciones de la invención.

Métodos adicionales para probar la actividad antagonista de VEGF son conocidos en la técnica y descritos en mayor detalle más adelante.

Por ejemplo, los anticuerpos inhibidores dirigidos contra VEGF son conocidos en la técnica, por ejemplo, aquellos descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6.524.583, 6.451.764 (anticuerpos VRP), 6.448.077, 6.416.758, 6.403.088 (para VEGF-C), 6.383.484 (para VEGF-D), 6.342.221 (anticuerpos anti-VEGF), 6.342.219, 6.331.301 (anticuerpos VEGF-B), y 5.730.977, y la publicación PCT WO 96/30046, WO 97/44453, y WO 98/45331.

Los anticuerpos de los receptores VEGF son también conocidos en la técnica, tales como los descritos por ejemplo en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.840.301, 5.874.542, 5.955.311, 6.365.157, y la publicación PCT WO 04/003211.

Pequeñas moléculas que bloquean la acción de VEGF, por ejemplo, inhibiendo una actividad de tirosina quinasa asociada con VEGFR, son conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6.514.971, 6.448.277, 6.414.148, 6.362.336, 6.291.455, 6.284.751, 6.177.401, 6.071.921, y 6.001.885 (inhibidores retinoides en la expresión de VEGF).

Proteínas y polipéptidos que bloquean la acción de VEGF son conocidos en la técnica, por ejemplo, aquellos descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6.576.608, 6.559.126, 6.541.008, 6.515.105, 6.383.486 (receptor señuelo de VEGF), 6.375.929 (receptor señuelo de VEGF), 6.361.946 (inhibidores análogos de péptidos de VEGF), 6.348.333 (receptor señuelo de VEGF), 6.559.126 (polipéptidos que enlazan VEGF y bloquean el enlazamiento a VEGFR), 6.100.071 (receptor señuelo de VEGF), y 5.952.199.

Ácidos nucleicos de interferencia cortos (siNA), ARN de interferencia corto (ARNsi), ARN de cadena doble (ARNds), microARN (ARNmi) y ARN de horquilla corto (ARNsh) capaces de mediar el ARN de interferencia (ARNi) contra la expresión genética y/o la actividad de VEGF y/o VEGFR son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se divulga en la publicación PCT WO03/074910.

Los oligonucleótidos antisentido para la inhibición del VEGF son conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.611.135, 5.814.620, 6.399.586, 6.410.322, y 6.291.667.

Aptámeros (también conocidos como ligandos de ácidos nucleicos) para la inhibición de VEGF son conocidos en la técnica por ejemplo, aquellos descritos en por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6.762.290, 6.426.335, 6.168.778, 6.051.698 y 5.859.228.

Anticuerpos antagonistas

La invención incluye anticuerpos antagonistas dirigidos contra PDGF y VEGF así como sus receptores cognatos PDGFR y VEGFR. Los anticuerpos antagonistas de la invención bloquean el enlazamiento de un ligando con su receptor cognato. De acuerdo con lo anterior, un anticuerpo antagonista de PDGF de la invención incluye anticuerpos dirigidos contra un objetivo PDGF así como un objetivo PDGFR.

Los anticuerpos antagonistas de la invención incluyen anticuerpos inhibidores monoclonales. Anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, abarcan todos las clases de inmunoglobulinas tales como IgM, IgG, IgD, IgE, IgA o sus subclases, tales como en las subclases IgG o mezclas de los mismos. La IgG y sus subclases son útiles, tales como IgG₁, IgG₂, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ o IgG_M. Los subtipos de IgG IgG_{1/kappa} y IgG_{2b/kappa} son incluidos como realizaciones útiles. Los fragmentos que pueden ser mencionados son todos fragmentos de anticuerpos truncados o modificados con uno o dos sitios de enlazamiento complementarios del antígeno los cuales muestran alta actividad de enlazamiento y neutralización hacia PDGF o VEGF de mamíferos (o sus receptores cognatos), tales como las partes de anticuerpos que tienen un sitio de enlazamiento que corresponde con el anticuerpo y se forman mediante cadenas ligeras o pesadas, tales como fragmentos Fv, Fav o F(ab')₂, o fragmentos individuales de cadenas. Fragmentos de cadena doble truncados tales como Fv, Fav o F(ab')₂ son particularmente útiles. Estos fragmentos pueden obtenerse, por ejemplo, por medios enzimáticos eliminando la parte Fc del anticuerpo con enzimas tales como papaína o pepsina, por oxidación química o por manipulación genética de los anticuerpos. También es posible y ventajoso utilizar fragmentos genéticamente manipulados no truncados. Los anticuerpos anti-PDGF o VEGF de los mismos pueden utilizarse solos o en mezclas.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, mezclas o derivados de los mismos novedosos tienen ventajosamente una afinidad de enlazamiento por PDGF o VEGF (o sus receptores cognatos) en un rango de 1×10^{-7} M a 1×10^{-12} M, o desde 1×10^{-8} M a 1×10^{-11} M, o desde 1×10^{-9} M a 5×10^{-10} M.

Los genes de anticuerpos para la manipulaciones genéticas pueden aislarse, por ejemplo, a partir de células de hibridoma, de una manera conocida para el operario experimentado. Para este propósito, se cultivan células productoras de anticuerpo y, cuando la necesidad óptica de las células es suficiente, se aísla el ARNm de las células de manera conocida sometiendo las células a lisis con tiocianato de guanidinio acidificando con acetato de sodio, extrayendo con fenol, cloroformo/alcohol isoamílico, precipitando con isopropanol y lavando con etanol. Se sintetiza entonces el ADNc a partir del ARNm utilizando transcriptasa reversa. El ADNc sintetizado puede ser insertado, directamente o después de la manipulación genética, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio, introducción de inserciones, inversiones, supresiones o intercambios de bases, en vectores adecuados, animales, fúngicos, bacterianos o virales, y pueden expresarse en organismos huésped apropiados. Vectores bacterianos o de levadura útiles son pBR322, pUC18/19, pACY184, lambda o mu de levaduras para la clonación de los genes y la expresión en bacterias tales como *E. coli* o levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*.

Las células que sintetizan anticuerpos de PDGF o VEGF incluyen células animales, fúngicas, bacterianas o células de levaduras después de la transformación tal como se mencionó anteriormente. Son ventajosamente células de hibridoma o células de trioma, típicamente células de hibridoma. Estas células de hibridoma pueden ser producidas, por ejemplo, de una manera conocida a partir de animales inmunizados con PDGF o VEGF (o sus receptores cognatos) por aislamiento de sus células B productoras de anticuerpos, seleccionando estas células para anticuerpos enlazantes a PDGF o VEGF y fusionando subsecuentemente estas células, por ejemplo, con células humanas o animales, por ejemplo, células de mieloma de ratón, células linfoblastoides humanas o células de heterohibridoma (véase, por ejemplo, Koehler et al., (1975) *Nature* 256: 496) o infectando estas células con virus apropiados para producir líneas celulares inmortalizadas. Las líneas celulares de hibridomas producidas por fusión son útiles y las líneas celulares de hibridoma de ratón son particularmente útiles. Las líneas celulares de hibridoma de la invención secretan anticuerpos útiles de tipo IgG. Los anticuerpos mAb de la invención se enlazan con alta afinidad y reducen o neutralizan la actividad biológica (por ejemplo angiogénica) de PDGF o VEGF.

La invención incluye adicionalmente derivados de estos anticuerpos anti-PDGF o VEGF los cuales mantienen su actividad inhibidora de PDGF o VEGF mientras que alteran una o más propiedades relacionadas con su uso como agente farmacéutico, por ejemplo, estabilidad en suelo o eficiencia de producción. Ejemplo de tales derivados de anticuerpos anti-PDGF o VEGF incluyen péptidos, peptidomiméticos derivados de las regiones enlazantes a los antígenos de los anticuerpos, y anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o péptidos enlazados a portadores sólidos o líquidos tales como polietilenglicol, vidrio, polímeros sintéticos tales como poliacrilamida, poliestireno, polipropileno, polietileno o polímeros naturales tales como celulosa, sefrosa o agarosa, o conjugados con enzimas, toxinas o marcadores radioactivos o no radioactivos tales como ³H, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³²P, ³⁵S, ¹⁴C, ⁵¹Cr, ³⁶Cl, ⁵⁷Co, ⁵⁵Fe, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ^{99m}Tc, ⁷¹Se, o anticuerpos, fragmentos o péptidos enlazados covalentemente a marcadores fluorescentes/quimioluminiscentes tales como rodamina, fluoresceína, isotiocianato, ficoelitrina, ficocianina, fluorescamina, quelatos metálicos, avidina, estreptavidina o biotina.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, mezclas y derivados de los mismos novedosos pueden utilizarse directamente, después de secado, por ejemplo por liofilización, después de unión a portadores antes mencionados o después de la formulación con otras sustancias farmacéuticamente activas y auxiliares para producir preparaciones farmacéuticas. Ejemplos de sustancias activas y auxiliares que pueden ser mencionados son otros anticuerpos, sustancias antimicrobianas activas tales como sustancias con acción microbicida o microbioestática tales como antibióticos en general o sulfonamidas, agentes antitumorales, agua, reguladores, soluciones salinas, alcoholes, grasas, ceras, vehículos inertes u otras sustancias habituales para productos parenterales, tales como aminoácidos, espesantes o azúcares. Estas preparaciones farmacéuticas se utilizan para controlar enfermedades y son útiles para controlar trastornos y enfermedades neovasculares oculares incluyendo AMD y retinopatía diabética.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, mezclas o derivados de los mismos pueden ser usados en terapia o diagnóstico directamente o después de acoplamiento con portadores sólidos o líquidos, enzimas, toxinas, marcadores radioactivos o no radioactivos o marcadores fluorescentes/quimioluminiscentes tal como se describió anteriormente.

5 Los anticuerpos monoclonales humanos de PDGF o VEGF de la presente invención pueden obtener por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, un mamífero es inmunizado con PDGF o VEGF humano (o sus receptores cognatos). Los PDGF y VEGF humanos purificados están disponibles comercialmente (por ejemplo, en Cell Sciences, Norwood, MA, así como otros proveedores comerciales). Alternativamente, los PDGF o VEGF
10 humanos (o sus receptores cognatos) pueden purificarse fácilmente a partir de tejido de placenta humana. El mamífero utilizado para cultivar anticuerpos antihumanos PDGF o VEGF no está restringido y puede ser un primate, un roedor (tal como un ratón, rata o conejo), un bovino, oveja, cabra o perro.

15 A continuación las células productoras de anticuerpos tales como células del bazo son retiradas del animal inmunizado y son fusionadas con células de mieloma. Las células de mieloma son bien conocidas en la técnica (por ejemplo pueden usarse células p3x63-Ag δ -653, NS-0, NS-1 o P3U1). La operación de fusión celular puede llevarse a cabo por cualquier método convencional conocido en la técnica.

20 Las células, después de ser sometidas a la operación de fusión celular son cultivadas entonces en el medio de selección HAT de tal manera que se seleccionen los hibridomas. Los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales antihumanos son seleccionados entonces. Esta selección puede llevarse a cabo, mediante por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente enlazado con enzima en sándwich (ELISA) o similares, en los cuales los anticuerpos monoclonales producidos son enlazados a los pozos en los cuales se han inmovilizado PDGF o VEGF
25 (o sus receptores cognatos) humanos. En este caso, como anticuerpo secundario, el anticuerpo específico para la inmunoglobulina del animal inmunizado, que está marcado con una enzima tal como peroxidasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, beta-D-galactosidasa, o similares, puede emplearse. El marcador puede ser detectado haciendo reaccionar la enzima de marcación con su sustrato y midiendo el color generado. Como sustrato pueden producirse 3,3-diaminobenzidina, 2,2-diaminobis-o-dianisidina, 4-cloronaftol, 4-aminoantipirina, o-fenilendiamina o similares.

30 Mediante la operación antes descrita, pueden seleccionarse hibridomas que producen anticuerpos PGDF o VEGF antihumanos. Los hibridomas seleccionados son clonados entonces por el método de dilución limitante convencional o método de agar blando. Si se desea, los hibridomas clonados pueden ser cultivados a gran escala utilizando un medio que contiene suero o un medio libre de suero, o pueden inocularse en la cavidad abdominal de ratones y recuperarse a partir de los ascitas, con lo cual puede obtenerse un gran número de los hibridomas clonados.

35 De entre los anticuerpos monoclonales PDGF o VEGF antihumanos seleccionados, se escogen entonces aquellos que tienen una capacidad de prevenir el enlazamiento y activación del correspondiente par ligando/receptor (por ejemplo en un sistema de ensayo de PDGF o VEGF basado en células (véase más arriba)), para análisis y manipulación posterior. Si el anticuerpo bloquea el enlazamiento receptor/ligando y/o la activación, significa que el anticuerpo monoclonal probado tiene una capacidad de reducir o neutralizar la actividad de PDGF o VEGF de los
40 PDGF o VEGF humanos. Esto es, el anticuerpo monoclonal reconoce y/o interfiere específicamente con el sitio de enlazamiento crítico del PDGF o VEGF humano (o sus receptores cognatos).

45 Los anticuerpos monoclonales aquí incluyen adicionalmente anticuerpos híbridos y recombinantes producidos por la división de un dominio variables (incluyendo uno hipervariable) de un anticuerpo anti-PDGF o VEGF con un dominio constante (por ejemplo, anticuerpos "humanizados"), o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena de una especie con una cadena de otra especie, o fusiones con proteínas heterólogas, independientemente del origen o de la designación de clase o subclase de inmunoglobulina, así como de fragmentos de anticuerpos [por ejemplo, Fab, F(ab)₂, y Fv], en tanto exhiban la actividad biológica deseada. [Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4.816.567 y Mage & Lamoyi, in Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.79 - 97
50 (Marcel Dekker, Inc.), New York (1987)].

55 Así, el término "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo obtenido es de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe considerarse como que requiere la producción de anticuerpos por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a ser usados de acuerdo con la presente invención pueden hacerse por el método del hibridoma a partir de bibliotecas de fagos generadas utilizando las técnicas descritas por McCafferty et al., Nature 348: 552 - 554 (1990), por ejemplo.

60 Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murínicos) son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ u otras subsecuencias de anticuerpos enlazantes a antígenos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en el cual los residuos de las regiones determinantes complementarias (CDR) del anticuerpo receptor son reemplazados por residuos de las CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un
65 ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de la

región marco Fv (FR) de la inmunoglobulina humana son reemplazados por residuos FR no humanos correspondientes. Adicionalmente, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias importadas CDR o FR. Estas modificaciones se hacen para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los residuos de FR son aquellos de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana.

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados" que son tomados típicamente de un dominio variable "importado". La humanización puede ser ejecutada esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., (1986) *Nature* 321: 522 - 525; Riechmann et al., (1988) *Nature* 332: 323 - 327; y Verhoeyen et al., (1988) *Science* 239: 1534 - 1536), sustituyendo las secuencias de CDRs o CDR de roedores por las correspondientes secuencias en anticuerpo humano. De acuerdo con lo anterior, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos, en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos, los cuales algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La selección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para ser usados en la marcación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el así llamado método de "mejor ajuste" la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor es seleccionada contra la biblioteca completa de las secuencias de dominios variables humanos. La secuencia humana que es más cercana a la de los roedores es aceptada entonces como el marco humano (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., (1993) *J. Immunol.*, 151: 2296; y Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.*, 196: 901). Otro método utiliza un marco particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas livianas o pesadas. El mismo marco puede ser utilizado para varios diferentes anticuerpos humanizados (Carter et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 89: 4285; y Presta et al., (1993) *J. Immunol.*, 151: 2623).

Es importante adicionalmente que los anticuerpos sean humanizados con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar esta meta de acuerdo con un método útil, los anticuerpos humanizados se preparan por un proceso de análisis de las secuencias progenitoras y diversos productos conceptuales humanizados utilizando modelos tridimensionales de secuencias progenitoras y humanizadas. Son comúnmente disponibles modelos de inmunoglobulina tridimensionales y son familiares para las personas experimentadas en la técnica. Hay disponibles programas de ordenador que ilustran y despliegan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estos despliegues permiten análisis del papel probable de los residuos del funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, esto es, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para enlazarse a su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse los residuos de FR a partir de las secuencias de consenso e importadas de tal manera que se alcanzan las características deseadas del anticuerpo, tales como una afinidad incrementada por el antígeno objetivo. En general, los residuos de CDR están directa y lo más sustancialmente involucrados en la influencia del enlazamiento al antígeno.

En la invención también se incluyen los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra PDGF o VEGF. Tales anticuerpos pueden hacerse mediante el método del hibridoma. El mieloma humano y las líneas celulares de heteromioma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales han sido descritos, por ejemplo por Kozbor (1984) *J. Immunol.*, 133, 3001; Brodeur, et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* pp. 51 - 63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner et al., (1991) *J. Immunol.*, 147: 86 - 95.

Es posible ahora producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, por inmunización de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal da como resultado una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del gen de inmunoglobulina de línea germinal humana dispuesto en ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos por desafío de antígenos (véase, por ejemplo, Jakobovits et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 90: 2551; Jakobovits et al., (1993) *Nature*, 362: 255 - 258; y Bruggermann et al., (1993) *Year in Immuno.*, 7: 33).

Alternativamente, puede utilizarse la tecnología de despliegue de fagos (Mc- Cafferty et al., (1990) *Nature*, 348: 552 - 553) para producir anticuerpos y fragmentos de anticuepos humanos in vitro, a partir de repertorios de genes de

dominio variable (V) de inmunoglobulina a partir de donantes no inmunizados (para una revisión véase, por ejemplo, Johnson et al., (1993) *Current Opinion in Structural Biology*, 3: 564 - 571). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de gen V para el despliegue de fagos. Por ejemplo, Clackson et al., ((1991) *Nature*, 352: 624 - 628) aislaron una disposición diversa de anticuerpo antioxazolona a partir de una biblioteca combinatorial aleatoria

5 pequeña de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Un repertorio de genes V a partir de donantes humanos inmunizados puede ser construido y pueden aislarse los anticuerpos hasta una disposición diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks et al., ((1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581 - 597, o Griffith et al., (1993) *EMBO J.*, 12: 725 - 734).

10 En una respuesta inmune natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones a una alta velocidad (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirían afinidad mayor, y las células V que despliegan inmunoglobulina de superficie de alta afinidad son replicadas y diferenciadas preferencialmente durante el desafío de antígenos subsecuente. Este proceso natural puede ser imitado empleando la técnica conocida como "barajado de cadena" (véase Marks et al., (1992) *Bio. Technol.*, 10: 779 - 783). En este método, la afinidad de anticuerpos humanos "primario" obtenidos por despliegue de fagos puede mejorarse reemplazando los genes de la

15 región de cadenas pesadas y livianas V con repertorios de variantes de origen natural (repertorios) de genes del dominio V obtenido a partir de donantes no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpos con afinidades en el rango de nM. Una estrategia para hacer repertorios de anticuerpos de fagos muy grandes ha sido descrita por Waterhouse et al., ((1993) *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265 - 2266).

20 El barajado de gen también puede ser usado para derivar anticuerpos humanos a partir de anticuerpos de roedores, en donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo del roedor de partida. De acuerdo con este método, el cual también se denomina como "grabación del epítipo", el gen del dominio V de cadena pesada o liviana de anticuerpos de roedores obtenido por técnica de despliegue de fagos es reemplazado

25 con un repertorio de genes de dominio V humanos, creando quimeras roedor-humano. La selección del antígeno da como resultado el aislamiento de un dominio humano variable capaz de restaurar un sitio de enlazamiento al antígeno funcional, esto es, el epítipo gobierna (graba) la selección del asociado. Cuando el proceso se repite con el fin de reemplazar el dominio V de roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase PCT WO93/06213, publicado el 1 de Abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos de roedores por injertos de CDR, esta técnica provee anticuerpos completamente humanos, los cuales no tienen marco o residuos de CDR

30 de origen en roedores.

Aptámeros antagonistas

35 La presente invención se refiere en las reivindicaciones a aptámeros específicos anti-PDGF los cuales se utilizan en tratamiento de combinación con un antagonista de VEGF. Los que sigue es una divulgación general de los aptámeros anti-PDGF y anti-VEGF para propósitos ilustrativos.

40 La invención provee antagonistas aptámeros dirigidos contra PDGF y/o VEGF (o sus receptores cognatos). Los aptámeros, también conocidos como ligandos de ácidos nucleico, son ácidos nucleicos de origen no natural que se enlazan a y, en general, antagonizan (esto es inhiben) con un objetivo preseleccionado.

45 Los aptámeros pueden hacerse por cualquier método conocido para la producción de oligómeros u oligonucleótidos. Se conocen muchos métodos de síntesis en la técnica. Por ejemplo, polímeros modificados con 2'-O-alilo que contienen ribonucleótidos de purina residuales, y portan un extremo 3' adecuado tal como un residuo de timidina invertido (Ortigao et al., *Antisense Research and Development* 2: 129 - 146 (1992)) o dos enlaces fosforotioato en el extremo 3' para evitar la degradación eventual por 3'-hexonucleasas, que pueden ser sintetizados por química en fase sólida de beta cianoetil fosforamidita (Sinha et al., *Nucleic Acids Res.*, 12: 4539 - 4557 (1984)) o cualquier sintetizador de ADN/ARN comercialmente disponible. Un método es la estrategia de protección con 2'-O-tertbutildimetilsilil (TBDMS) para los ribonucleótidos (Usman et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 109: 7845 - 7854 (1987)), y todas las 3'-O-fosforamiditas requeridas están disponibles comercialmente. Además, puede utilizarse aminometilpoliestireno como material de soporte debido a sus propiedades ventajosas (McCollum and Andrus (1991) *Tetrahedron Lett.*, 32: 4069 - 4072). Puede agregarse fluoresceína al extremo 5' de un ARN de sustrato durante la

50 síntesis utilizando fosforamiditas de fluoresceína disponibles comercialmente. En general, puede sintetizarse un oligómero aptámero utilizando un ciclo de ARN estándar. Al terminar el ensamblaje, todos los grupos protectores básicos lábiles son eliminados por un tratamiento durante 8 horas a 45°C con amoniaco acuoso/etanol concentrado (3:1 v/v) en un vial cerrado. El etanol suprime la eliminación prematura de los grupos 2'-O-TBDMS que de otra manera llevarían a una escisión apreciable de la cadena y las posiciones de los ribonucleótidos resultantes bajo las condiciones básicas de la desprotección (Usman et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 109: 7845 - 7854). Después de la

55 liofilización, el oligómero protegido con TBDMS es tratado con una mezcla de trihidrofluoruro de trietilamina/trietilamina/N-metilpirrolidina durante 2 horas a 60°C para producir una eliminación rápida y eficiente de los grupos siliol protectores condiciones neutras (véase Wincott et al., (1995) *Nucleic Acids Res.*, 23: 2677 - 2684). El oligómero completamente desprotegido puede ser precipitado con butanol de acuerdo con el procedimiento de Cathala y Brunel ((1990) *Nucleic Acids Res.*, 18: 201). La purificación puede llevarse a cabo bien sea por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante o mediante una combinación de HPLC con

65

intercambio de iones (Sproat et al., (1995) *Nucleosides and Nucleotides*, 14: 255 - 273) y HPLC en fase reversa. Para utilización en células, los oligómeros sintetizados son convertidos en sus sales de sodio por precipitación con perclorato de sodio en acetona. Pueden eliminarse entonces trazas de sales residuales utilizando columnas de filtración en gel desechables pequeñas que son comercialmente disponibles. Como etapa final puede verificarse la autenticidad de los oligómeros aislados por espectrometría de masas con desorción por láser asistida en matriz (Pielles et al., (1993) *Nucleic Acids Res.*, 21: 3191 - 3196) y por análisis de composición de las bases de nucleósidos.

Los aptámeros divulgados también pueden ser producidos a través de métodos enzimáticos, cuando las subunidades de nucleótidos están disponibles para manipulación enzimática. Por ejemplo, las moléculas de ARN pueden hacerse a través de reacciones de polimerasa de ARN T7 in vitro. También pueden hacerse mediante cepas de bacterias o líneas celulares que expresan T7, y luego aislarse subsecuentemente a partir de estas células. Como se discute más adelante, los aptámeros divulgados también pueden ser expresados en células directamente utilizando vectores y promotores.

Los aptámeros, al igual que otras moléculas de ácidos nucleicos, pueden contener adicionalmente nucleótidos modificados. Un asunto que debe atenderse en el uso diagnóstico terapéutico de los ácidos nucleicos es la degradación rápida y potencial de oligonucleótidos en su forma fosfodiéster en fluidos corporales por enzimas intracelulares y extracelulares tales como endonucleasas y exonucleasas antes de que se manifieste el efecto deseado. Ciertas modificaciones químicas del ligando de ácido nucleico pueden hacerse incrementar en cuanto a la estabilidad in vivo del ligando de ácido nucleico o potencial o mediar la liberación del ligando de ácido nucleico (véase, por ejemplo, la solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 5.660.985, titulada "ligandos de ácidos nucleicos de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados").

Las modificaciones de los ligandos de ácidos nucleicos pueden incluir pero no limitarse a, aquellas que proveen otros grupos químicos que incorporan carga adicional, polarizabilidad, y hidrofobicidad, puentes de hidrogeno, interacción electrostática y fluxionalidad a las bases ligandos de ácidos nucleicos o al ligando ácido nucleico como un todo. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a modificaciones en azúcares en la posición 2', modificaciones en piridina en la posición 5, modificaciones de purina en posición 8, modificaciones en las aminas hexocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodo-uracilo; modificaciones del esqueleto, modificaciones en fosforotiolato o alquilfosfato, metilaciones, combinaciones de apareamiento de bases inusuales tales como las isobases isocitidina e isoguanidina y similares. En las modificaciones también incluyen modificaciones 3' y 5' tales como cubrimiento o modificación con unidades estructurales azúcar. En algunas realizaciones de la presente invención, los ligandos de ácido nucleico son moléculas ARN que son modificadas mediante 2'-fluoro (2'-F) sobre la unidad estructural azúcar de los residuos de piridina.

La estabilidad del aptámero puede incrementarse grandemente mediante la introducción de tales modificaciones también por modificaciones y sustituciones a lo largo del esqueleto fosfato del ARN. Además, puede hacerse una variedad de modificaciones sobre las nucleobases mismas las cuales inhiben la degradación y también pueden incrementar las interacciones con nucleótidos deseadas o disminuir las interacciones no deseadas con nucleótidos. De acuerdo con lo anterior, una vez que la secuencia de un aptámero es conocida, pueden hacerse modificaciones o sustituciones por los procedimientos sintéticos descritos más abajo por otros procedimientos conocidos para los experimentados en la técnica.

Otras modificaciones incluyen la incorporación de bases modificadas (o nucleósidos modificados o nucleótidos modificados) que son variaciones de bases estándar, azúcares y/o estructuras químicas con esqueleto de fosfato que se presentan en los ácidos ribonucleico (esto es, A, C, G y U) y desoxirribonucleico (esto es, A, C, G y T). Se incluyen dentro de estos por ejemplo: Gm (ácido 2'-metoxiguanílico), Am (ácido 2'-metoxiadenílico), Cf (ácido 2'-fluorocitídilico), Uf (ácido 2'-fluorouridilico), Ar (ácido riboadenílico). Los aptámeros también pueden incluir citosina o cualquier base relacionada con la citosina incluyendo 5-metilcitosina, 4-acetilcitosina, 3-metil-citosina, 5-hidroximetil citosina, 2-tiocitosina, 5-halocitosina (e.g., 5-fluorocitosina, 5-bromocitosina, 5-clorocitosina, y 5-yodocitosina), 5-propinil citosina, 6-azocitosina, 5-trifluorometilcitosina, N4, N4-etanocitosina, fenoxazina citidina, fenotiazina citidina, carbazol citidina o piridoindol citidina. El aptámero puede incluir adicionalmente guanina o cualquier base relacionada con la guanina incluyendo 6-metilguanina, 1-metilguanina, 2,2-dimetilguanina, 2-metilguanina, 7-metilguanina, 2-propilguanina, 6-propilguanina, 8-haloguanina (e.g., 8-fluoroguanina, 8-bromoguanina, 8-cloroguanina, y 8-yodoguanina), 8-aminoguanina, 8-sutmidrilguanina, 8-tioalquilguanina, 8-hidroxilguanina, 7-metilguanina, 8-azaguanina, 7-deazaguanina o 3-deazaguanina. El aptámero aun puede incluir adicionalmente adenina o cualquier base relacionada con la adenina incluyendo 6-metiladenina, N6-isopenteniladenina, N6-metiladenina, 1-metiladenina, 2-metiladenina, 2-metil-N6-isopenteniladenina, 8-haloadenina (e.g., 8-fluoroadenina, 8-bromoadenina, 8-cloroadenina, y 8-yodoadenina), 8-aminoadenina, 8-sulfhidriladenina, 8-tioalquiladenina, 8-hidroxiladenina, 7-metiladenina, 2-haloadenina (e.g., 2-fluoroadenina, 2-bromoadenina, 2-cloro-adenina, y 2-yodoadenina), 2-aminoadenina, 8-azaadenina, 7-deazaadenina o 3-deazaadenina. También se incluyen uracilo o cualquier base relacionada con el uracilo, incluyendo 5-halouracilo (e.g., 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo), 5-(carboxihidroxilmetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, 1-metilpseudouracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, ácido uracil-5-

oxycético metiléster, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, 5-metilaminometiluracilo, 5-propinil uracilo, 6-azouracilo, o 4-tiouracilo.

5 Ejemplos de variantes de otras variantes de base modificadas conocidos en la técnica, sin limitación, incluyen las listadas en 37 C.F.R § 1.822 (p) 4-acetilcitidina, 5-(carboxihidroxilmetil) uridina, 2'-metoxicitidina, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina, dihidrouridina, 2'-O-metilpseudouridina, b-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopen teniladenosina, 1-metiladenosina, 1-metilpseudouridina, 1-metilguanosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, 3-metilcitidina, 5-metiloitidina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosina, 5-metilaminometiluridina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, b-D-manosilqueosina, 10 5-metoxicarbonilmetiluridina, 5-metoxiuridina, 2-metil-N6-isopenteniladenosina, N-((9-b-D- ribofuranosil-2-metilpurina-6-il)carbamoil)treonina, N-((9-b-D-ribofuranosilpurina-6-il)N-metil-carbamoil)treonina, ácido uridin-5-oxicético metil éster, ácido uridin-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouridina, queosina, 2-tiocitidina, 5-metil-2-tiouridina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, 5-metiluridina, N-((9-b-D-ribofuranosilpurine-6-il)carbamoil)treonina, 2'-O-metil-5-metiluridina, 2'-O-metiluridina, wybutosina, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uridina.

15 También se incluyen las nucleobases modificadas descritas en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 3.687.808, 4.845.205, 5.130.302, 5.134.066, 5.175.273, 5.367.066, 5.432.272, 5.457.187, 5.459.255, 5.484.908, 5.502.177, 5.525.711, 5.552.540, 5.587.469, 5.594.121, 5.596.091, 5.614.617, 5.645.985, 5.830.653, 5.763.588, 6.005.096, y 5.681.941. Ejemplos de variantes de esqueletos de azúcares de nucleósidos y nucleótidos conocidos en la técnica incluyen, sin limitación los que tienen sustituyentes por ejemplo 2' ribosilo tales como F, SH, SCH3, OCN, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, SOCH3, SO2, CH3, ONO2, NO2, N3, NH2, OCH2CH2OCH3, O(CH2)2ON(CH3)2, OCH2OCH2N (CH3)2, O(C1 - 10 alquil), O(C2 - 10 alquenil), O(C2 - 10 alquinil), S(C1 - 10 alquil), S(C2 - 10 alquenil), S(C2 - 10 alquinil), NH(C1 - 10 alquil), NH(C2 - 10 alquenil), NH(C2 - 10 alquinil), y O-alquil-O-alquil. Sustituyentes deseables 2' ribosilo incluyen 2'-metoxi (2'-OCH3), 2'-aminopropoxi (2' OCH2CH2CH2NH2), 2'-alil (2'-CH2-CH=CH2), 2'-O-alil (2'-O-CH2-CH=CH2), 2'-amino (2'-NH2), y 2'-fluoro (2'-F). El sustituyente en 2' puede estar en la posición arabino (arriba) o en la posición ribo (abajo).

20 Los aptámeros pueden estar hechos de nucleótidos y/o análogos de nucleótidos tales como los descritos anteriormente, o una combinación de ambos, o son análogos de oligonucleótidos. Los aptámeros de la invención pueden contener análogos de nucleótidos en posiciones que no afectan la función del oligómero para enlazarse a PDGF o VEGF (o sus receptores cognatos).

25 Hay varias técnicas que pueden ser adaptadas para refinamiento o fortalecimiento de los ligandos de ácidos nucleicos que se enlazan a una molécula objetivo particular o a la selección de aptámeros adicionales. Una técnica, denominada en general como "genética in vitro" (véase Szostak (1992) TIBS, 19: 89), involucra el aislamiento de antagonistas de aptámeros por selección a partir de un fondo de secuencias aleatorias. El fondo de moléculas de ácidos nucleicos desde el cual pueden aislarse los aptámeros divulgados puede incluir secuencias no variantes que flanquean una secuencia variable de aproximadamente 20 a 40 nucleótidos. Este método ha sido denominado Evolución Selectiva de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX). Composiciones y métodos para generar antagonistas aptámeros de la invención por SELEX y métodos relacionados son conocidos en la técnica y se enseñan por ejemplo en la Patente de los Estados Unidos No. 5.475.096 titulada "ligandos de ácidos nucleicos", y la Patente de los Estados Unidos 5.270.163, titulada "métodos para identificar ligandos de ácidos nucleicos".

30 El proceso SELEX en general, y los aptámeros y formulaciones de PEGF y VEGF en particular están descritos adicionalmente por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.668.264, 5.696.249, 5.670.637, 5.674.685, 5.723.594, 5.756.291, 5.811.533, 5.817.785, 5.958.691, 6.011.020, 6.051.698, 6.147.204, 6.168.778, 6.207.816, 6.229.002, 6.426.335, 6.582.918.

35 En resumen, el métodos SELEX involucra la selección de una mezcla de oligonucleótidos candidatos e iteraciones paso a paso de enlazamiento a un objetivo seleccionado, partición y amplificación, utilizando el mismo esquema general de selección para alcanzar virtualmente cualquier criterio de afinidad y selectividad de enlazamiento deseado. Partiendo de una mezcla de ácidos nucleicos, que comprende típicamente un segmento de secuencias aleatorizadas, el método SELEX incluye etapas de poner en contacto la mezcla con el objetivo bajo condiciones favorables para el enlazamiento, someter a partición ácidos nucleicos no enlazados de esos ácidos nucleicos que se han enlazado específicamente a moléculas objetivo, disociación de los complejos ácido nucleico-objetivo, 40 amplificación de los ácidos nucleicos disociados a partir de los complejos ácido nucleico-objetivo para producir una mezcla enriquecida en ligandos de ácidos nucleicos, reiterando entonces las etapas de enlazamiento, partición, disociación y amplificación a través de tantos ciclos como se desee para producir ligandos de ácidos nucleicos de alta afinidad altamente específicos a la molécula objetivo.

50 El método SELEX básico ha sido modificado para alcanzar un cierto número de objetivos específicos. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5.707.796, titulada "método para seleccionar ácidos nucleicos sobre la base de la estructura", describe el uso del proceso SELEX junto con electroforesis en gel para seleccionar moléculas de ácidos nucleicos con características estructurales específicas, tales como ADN flexionado. La Patente de los Estados Unidos No. 5.763.177 titulada "Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial:

Fotoselección de Ligandos de Ácidos Nucleicos y Solución SELEX” describe un método basado en SELEX para seleccionar ligandos de ácidos nucleicos que contienen grupos fotorreactivos capaces de enlazarse y/o fotoentrecruzarse y/o fotoinactivar una molécula objetivo. La Patente de los Estados Unidos No. 5.580.737 titulada “Ligandos de Ácidos nucleicos de alta afinidad que discriminan entre teofilina y cafeína” describe un método para

5 identificar ligandos de ácidos nucleicos altamente específicos capaces de discriminar entre moléculas relacionadas cercanamente, las cuales pueden ser no peptídicas denominadas Counter-SELEX. La Patente de los Estados Unidos No. 5.567.588 titulada “Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial: Solución SELEX”, describe un método basado en SELEX que alcanza una partición altamente eficiente entre oligonucleótidos que tienen alta y baja afinidad para una molécula objetivo.

10 El método SELEX abarca la identificación de ligandos de ácido nucleico de alta afinidad que contienen oligonucleótidos modificados que confieren características mejoradas al ligando, tales como estabilidad in vivo mejorada o características de administración mejoradas. Ejemplos de tales modificaciones incluyen sustituciones químicas en las posiciones ribosa y/o fosfato y/o base. Los ligandos de ácidos nucleicos identificados mediante el

15 proceso SELEX que contiene nucleótidos modificados están descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 5.660.985 titulada “Ligandos de Ácidos Nucleicos de Alta Afinidad que Contienen Nucleótidos modificados”, que describe oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótidos modificados químicamente en las posiciones 5 y 2’ de las piridinas. La Patente de los Estados Unidos No. 5.580.737, supra, describe ligandos de ácidos nucleicos altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados por 2’-amino (2’-NH₂), 2’-fluro (2’-F), y/o

20 2’-O-metil (2’- OMe). La Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 08/264,029, presentada el 22 de Junio de 1994, titulado “Método Novedoso de Preparación de Nucleósidos Modificados en 2’ Conocidos y Novedosos por Desplazamiento Nucleofílico Intramolecular”, ahora abandonada, describe oligonucleótidos que contienen diversas pirimidinas modificadas en 2’.

25 El método SELEX abarca la combinación de oligonucleótidos seleccionados con otros oligonucleótidos seleccionados y unidades funcionales no oligonucleótidos tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5.637.459 titulada “Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial: SELEX Quimérico”, y la Patente de los Estados Unidos No. 5.683.867 titulada “Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial: SELEX Combinado”, respectivamente. Estos patrones permiten la combinación de una disposición

30 amplia de formas y otras propiedades y la amplificación eficiente y las propiedades de replicación de oligonucleótidos con las propiedades deseables de otras moléculas.

35 El método SELEX abarca adicionalmente la combinación de ligandos de ácidos nucleicos con compuestos lipofílicos o no inmunogénicos, compuestos de alto peso molecular en un complejo de diagnóstico o terapéutico tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6.011.020 titulada “Complejos de Ligandos de Ácidos Nucleicos”

40 Los antagonistas de aptámeros también pueden ser refinados a través de uso de técnicas de modelación por ordenador. Ejemplos de sistemas de modelación molecular son los programas CHARMM y QUANTA, de Polygen Corporation (Waltham, Masachusets), el CHARMM lleva a cabo la minimización de la energía y las funciones dinámicas moleculares. QUANTA ejecuta la construcción, modelación gráfica y análisis de estructura molecular. QUANTE permite la construcción, modificación, visualización y análisis interactivo del comportamiento de las moléculas una con otra. Estas aplicaciones pueden ser adaptadas para definir y presentar la estructura secundaria de moléculas de ARN y ADN.

45 Los aptámeros con estas diversas modificaciones pueden ser probados en cuanto a su funcionamiento utilizando cualquier prueba adecuada para la función de interés de PDGF o VEGF, tal como el ensayo de actividad de proliferación basada en células de PDGF.

50 Las modificaciones pueden ser pre o post las modificaciones del proceso SELEX. Las modificaciones de proceso pre SELEX producen ligandos de ácidos nucleicos que tienen tanto especificidad para subjetivo SELEX como estabilidad in vivo mejorada. Las modificaciones de procesos post SELEX hechas a ligandos de ácidos nucleicos 2’-OH pueden dar como resultado una estabilidad in vivo mejorada sin afectar adversamente la capacidad de enlazamiento del ligando de ácido nucleico.

55 Otras modificaciones útiles para la producción de aptámeros son conocidas para una persona de experiencia normal en la técnica. Tales modificaciones pueden hacerse según el proceso post SELEX (modificación de ligandos no modificados identificados previamente) o por incorporación en el proceso SELEX.

60 Se ha observado que los aptámeros, o los ligandos de ácidos nucleicos, en general, y los parámetros de VEGF en particular, son los más estables, y por lo tanto eficaces cuando están cubiertos 5’ y cubiertos en 3’ de una manera que hace disminuir la susceptibilidad a las exonucleasas e incrementa la estabilidad global. De acuerdo con lo anterior, la invención se basa en una realización, con el cubrimiento de aptámeros en general, y de aptámeros anti-VEGF en particular, con una estructura de cubierta de nucleósidos 5’ - 5’ invertida en el extremo 5’ y una estructura de cubierta de nucleósido 3’ - 3’ invertida en el extremo 3’. De acuerdo con lo anterior, la invención provee

65 aptámeros anti-VEGF y/o anti-PDGF, esto es ligandos de ácidos nucleicos que están cubiertos en el extremo 5’ con

una cubierta de nucleósido 5' - 5' invertida y en el extremo 3' con una cubierta de nucleósido 3' - 3'.

Ciertos aptámeros particularmente útiles son composiciones de aptámeros anti-VEGF que incluyen, pero no se limitan a, aquellos que tienen estructuras de cubierta de nucleótidos 5' - 5' y 3' - 3' invertidos en sus extremos. Tales aptámeros cubiertos con anti-VEGF pueden ser aptámeros de ARN, aptámeros de ADN o aptámeros que tengan una composición mixta (esto es, tanto ARN como ADN). Secuencias de aptámeros adecuadas anti-VEGF de la invención incluyen la secuencia de nucleótidos GAAGAAUUGG (SEQ ID NO: 15); o la secuencia de nucleótidos UUGGACGC (SEQ ID NO: 16); o la secuencia de nucleótidos GUGAAUGC (SEQ ID NO: 17). Particularmente útiles son los aptámeros anti-VEGF cubiertos de la invención que tienen la secuencia:

X-5'-5'-CGGAAUCAGUGAAUGCUUAUACAUCG-3'-3'-X (SEQ ID NO: 18)

donde cada C, G, A y U representan, respectivamente, los nucleótidos de origen natural citidina, guanidina, adenina y uridina, o los nucleótidos modificados correspondientes a los mismos. X-5'-5' es un nucleótido invertido que cubre el extremo 5' del aptámero; 3'-3'-X es un nucleótido invertido que cubre el extremo 3' del aptámero; y los nucleótidos restantes o nucleótidos modificados son enlazados secuencialmente a través de uniones 5'-3' fosfodiéster. En algunos ejemplos, cada uno de los nucleótidos del aptámero anti-VEGF cubierto, porta individualmente una sustitución 2' ribosilo tal como -OH (el cual es estándar para ácidos ribonucleicos (ARN)), o -H (el cual es estándar para ácidos desoxirribonucleicos (ADN)). En otros la posición 2' ribosilo está sustituida con un sustituyente O(C₁₋₁₀ alquilo), en O(C₁₋₁₀ alqueno), en F, en N₃, o en NH₂.

En un ejemplo aún más particular no limitante, el aptámero anti-VEGF cubierto en 5' - 5' puede tener la estructura:

T_d-5'-5'-C_fG_mG_mA_rU_fC_fA_mG_mU_fG_mA_mA_mU_fG_mC_mC_fU_fA_mU_fA_mC_fA_mU_fC_fG_m 3'-3'-T_d (SEQ ID NO: 19) en donde "G_m" representa ácidos 2'-metoxiguanílico, "A_m" representa ácido 2'-metoxiadenílico, "C_f" representa ácido 2'-fluorocitidílico, "U_f" representa ácido 2'-fluorouridílico, "A_r" representa ácido riboadenílico, y "T_d" representa ácido desoxiribotimidílico.

Antagonistas antisentido, ribozimas y de enzima de ADN

El siguiente capítulo sobre antagonistas antisentido, ribozimas y enzimas de ADN se mantiene para propósitos ilustrativos.

Los oligonucleótidos antisentido de ribozimas que apuntan a PDGF y VEGF afectan la inhibición de PDGF/VEGF inhibiendo la traducción de proteínas a partir de los ARN mensajeros o apuntando a la degradación de los ARNm de PDGF o VEGF correspondientes, respectivamente. Estos ácidos nucleicos direccionados a PDGF- y VEGF- descritos anteriormente proveen secuencias útiles para el diseño y síntesis de estas ribozimas y oligonucleótidos antisentido de PDGF y VEGF.

Un problema en el diseño de oligonucleótidos específicos y orientados a un ARNm si efectivo (ODN antisentido) y ribozimas y antisentido es el de los sitios accesibles de identificación del apareamiento de un antisentido con el objetivo ARNm (lo cual está por sí mismo doblado en una estructura secundaria autoapareada parcialmente). Una combinación de algoritmos con ayuda de ordenador para predecir la accesibilidad al apareamiento de la ARN y la selección molecular permite la creación de ribozimas específicas y efectivas y/o oligonucleótidos antisentido dirigidos contra mayor parte de los objetivos ARNm. Se han descrito varias metodologías para determinar la accesibilidad de una molécula de ARN objetivo a inhibidores antisentido o de ribozima. Una metodología utiliza un ensayo de selección in vitro aplicando tantos oligodesoxinucleótidos antisentido como sea posible (véase Monia et al., (1996) Nature Med., 2: 668 - 675; y Milner et al., (1997) Nature Biotechnol., 15: 537 - 541). Otros utilizan bibliotecas aleatorias de ODN (Ho et al., (1996) Nucleic Acids Res., 24: 1901 - 1907; Birikh et al., (1997) RNA 3: 429 - 437; y Lima et al., (1997) J. Biol. Chem., 272: 626 - 638). Los sitios accesibles pueden ser monitoreados por escisión de RNasa H (véase Birikh et al., supra; y Ho et al., (1998) Nature Biotechnol., 16: 59 - 63). La RNasa H cataliza la escisión hidrolítica del esqueleto de fosfodiéster de la cadena de ARN en un dúplex ADN-ARN.

Otra metodología, que involucra el uso de una reserva de ODN sintetizado químicamente quimérico autoaleatorio, se utiliza para identificar sitios accesibles escindidos por la RNasa H en un objetivo ARN sintetizado in vitro. Los análisis de primera extensión se utilizan para identificar estos sitios en la molécula objetivo (véase Lima et al., supra). Otras metodologías para diseñar objetivos antisentido en ARN se basan en modelos de plegamiento asistidos por ordenador para ARN. Se han publicado varios reportes sobre el uso de bibliotecas de ribozimas aleatorias para seleccionar la escisión efectiva (véase Campbell et al., (1995) RNA 1: 598 - 609; Lieber et al., (1995) Mol. Cell Biol., 15: 540 - 551; y Vaish et al., (1997) Biochem., 36: 6459 - 6501).

Otras metodologías in vitro, que utilizan bibliotecas aleatorias o semialeatorias de ODN y RNasa H pueden ser más útiles que la simulaciones en ordenador (Lima et al., supra). Sin embargo, el uso de ARN sintetizado in vitro no predice la accesibilidad de los ODN antisentido in vivo puesto que observaciones recientes sugieren que las interacciones de fusión de los polinucleótidos son influenciadas por las proteínas de enlazamiento de ARN (véase

Tsuchihashi et al., (1993) *Science*, 267: 99 - 102; Portman et al., (1994) *EMBO J.*, 13: 213 - 221; y Bertrand and Rossi (1994) *EMBO J.*, 13: 2904 - 2912). La Patente de los Estados Unidos No. 6.652.570, provee composiciones y métodos para determinar sitios accesibles dentro de un ARNm en presencia de un extracto celular, el cual imita las condiciones in vivo.

5 En resumen, este método involucra la incubación de ARN nativos o sintetizados in vitro con ODN antisentido definido, ribozimas, o ADNzimas, con un ODN aleatorio o semialeatorio, biblioteca de ribozima o ADNzima, bajo condiciones de hibridación en un medio de reacción que incluye un extracto celular que contiene proteínas enlazantes a ARN o que imitan un extracto celular debido a la presencia de una o más proteínas enlazantes a ARN.
10 Cualquier ODN antisentido, ribozima o ADNzima que sea complementario a un sitio accesible en el ARN objetivo hibridará ese sitio. Cuando se usan ODN definidas en una biblioteca ODN, la RNasa H está presente durante la hibridación o es agregada después de la hibridación para escindir el ARN donde haya ocurrido la hibridación. La RNasa H puede estar presente cuando se usan las ribozimas o ADNzimas, pero no se requiere, puesto que las ribozimas de las ADNzimas escinden ARN, donde ha ocurrido la hibridación. En algunos casos, se usa aquí una
15 biblioteca de ODN aleatoria o semialeatoria en ambos extractos que contenga ARNm, proteínas que enlazan ARN y RNasa H.

Se pueden usar diversos métodos para identificar estos sitios sobre ARN objetivo a los cuales se han enlazado ODN antisentido, ribozimas o ADNzimas y en donde ha ocurrido la escisión. Por ejemplo, la reacción en cadena de polimerasa dependiente de desoxinucleotidilo transferasa (TDPCR) puede ser utilizada para este propósito (véase Komura and Riggs (1998) *Nucleic Acids Res.*, 26: 1807 - 11). Se usa una etapa de transcripción reversa para convertir el patrón de ARN en ADN, seguida por TDPCR. En esta invención, el extremo 3' necesario para el método TDPCR se crea mediante la transcripción reversa del ARN objetivo de interés con cualquier ADN polimerasa dependiente de ARN (por ejemplo, transcriptasa reversa). Esto se logra hibridando un primer cebador ODN (P1) al
20 ARN en una región la cual está corriente abajo (esto es, la dirección 5' hacia 3' en la molécula de ARN) desde la porción de la molécula de ARN objetivo que está bajo estudio. La polimerasa en presencia de dNTP copia el ARN en ADN desde el extremo 3' de P1 y termina el copiado en el sitio de escisión creado bien sea por una ODN/RNasa H antisentido, una ribozima o una ADNzima. La nueva molécula de ADN (denominada como ADN de primera cadena) sirve como primer patrón para la porción PCR del método TDPCR, la cual se utiliza para identificar la secuencia objetivo accesible correspondiente presente en el ARN.
25
30

Por ejemplo, puede utilizarse entonces el procedimiento de TDPCR, esto es ADN transcrito reverso con guanosina trifosfato (rGTP) se hace reaccionar en presencia de desoxinucleotidilo transferasa terminal (TdT) para agregar una cola (rG) 2 - 4 en los terminales 3' de las moléculas de ADN. A continuación se liga un enlazante de ODN de cadena doble que tiene un sobrante de 3' 2-4 en una cadena que hace apareamiento de bases con la cola (rG) 2-4. Luego se agregan dos cebadores de PCR. El primero es un cebador de enlazamiento (LP) que es complementario a la cadena del enlazador TDPCR que está ligado a la cola (rG) 2-4 (algunas veces denominada como cadena inferior). El otro cebador (P2) puede ser el mismo que P1, pero puede estar anidado con respecto a P1, esto es, es complementario al ARN objetivo en una región que está al menos parcialmente corriente arriba (esto es, en la dirección de 3' hacia 5' en las moléculas de ARN) desde la región que está enlazada por P1, pero esto es corriente abajo de la porción de la molécula de ARN que está bajo estudio. Esto es, la porción de la molécula de ARN objetivo, que está bajo estudio para determinar si tiene sitios de enlazamiento accesibles es esa porción que está corriente arriba de la región que es complementaria a P2. Cuando se lleva a cabo la PCR de la manera conocida en presencia de ADN polimerasa y DNTP para amplificar segmentos de ADN definidos por los cebadores LP y P2. El producto amplificado puede ser capturado entonces por cualquiera de los diversos métodos conocidos y secuenciados subsecuentemente en un secuenciador de ADN automatizado, proveyendo información precisa sobre el sitio de escisión. Una vez que esta identidad ha sido determinada, puede sintetizarse una ADN antisentido de secuencia definida o ribozimas para uso in vitro o in vivo.
35
40
45

50 La intervención antisentido en la expresión de los genes específicos puede lograrse mediante el uso de secuencias de oligonucleótidos antisentidos sintéticas (véase Lefebvre-d'Hellencourt et al., (1995) *Eur. Cyokine Netw.*, 6: 7; Agrawal (1996) *TIBTECH*, 14: 376; and Lev-Lehman et al., (1997) *Antisense Therap.* Cohen and Smicek, eds. (Plenum Press, Nueva York)). En resumen, las secuencias de oligonucleótidos antisentido pueden ser secuencias cortas de ADN, típicamente oligómeros de 15-30 pero puede ser tan pequeña como de 7 unidades (véase Wagner et al., (1994) *Nature* 372: 333) diseñadas para complementar un ARNm objetivo de interés y formar un dúplex ARN:AS. Esta formación de dúplex puede evitar el procesamiento, división, transporte o traducción del ARNm relevante. Además, ciertas secuencias de nucleótidos AS pueden extraer la RNasa H celular cuando se hibrida con su ARNm objetivo dando como resultado la degradación del ARNm (véase Calabretta et al., (1996) *Semin. Oncol.*, 23: 78). En este caso, la RNasa H escindirá el componente de ARN del dúplex y puede liberar potencialmente el AS para hibridar adicionalmente con moléculas adicionales del ARN objetivo. Un modo adicional de acción resulta de la interacción de AS con ADN genómico para formar una hélice triple que puede ser inactiva transcripcionalmente.
55
60

En un ejemplo no limitante de, además de, o sustituido por, una secuencia antisentido tal como se discutió aquí anteriormente, las ribozimas pueden ser utilizadas para la supresión de funciones genéticas. Esto es particularmente necesario en casos donde la terapia antisentido está limitada por consideraciones estequiométricas. Las ribozimas
65

5 pueden ser utilizadas entonces de manera que apunten a la misma secuencia. Las ribozimas son moléculas de ARN que poseen habilidad catalítica de ARN que escinden un sitio específico en un ARN objetivo. El número de moléculas de ARN que son escindidas por una ribozima es superior al número predicho por una estequiometría 1:1 (véase Hampel and Tritz (1989) *Biochem.*, 28: 4929 - 33; y Uhlenbeck (1987) *Nature*, 328: 596 - 600). Por lo tanto, la presente invención también permite el uso de secuencias de ribozima direccionadas a un dominio accesible de una especie de ARNm de PDGF o VEGF y que contiene el centro catalítico apropiado. Las ribozimas están hechas y suministradas tal como se conoce en la técnica y se discute posteriormente aquí. Las ribozimas pueden ser utilizadas en combinación con las secuencias antisentido.

10 Las ribozimas catalizan la escisión del enlace fosfodiéster del ARN. Se han identificado varias familias estructurales de ribozimas incluyendo los intrones de grupo I, RNasa P, y la ribozima del virus de la hepatitis delta, ribozimas de cabeza de martillo y la ribozima de horquilla derivada originalmente de la cadena negativa del ARN del satélite del virus de punto anular del tabaco (sTRSV) (véase Sullivan (1994) *Investig. Dermatolog.*, (Suppl.) 103: 95S; y la Patente de los Estados Unidos No. 5.225.347). Las dos últimas familias se derivan de viroides y virusoides, en los
15 cuales la ribozima se cree que separa monómeros de oligómeros creados durante la replicación del ciclo de enrollamiento (véase Symons (1989) *TIBS*, 14: 445 - 50; Symons (1992) *Ann. Rev. Biochem.*, 61: 641 - 71). Las estructuras de ribozima de cabeza de martillo y horquilla están adaptadas lo más comúnmente para la trans-escisión de ARNm para terapia genética. El tipo de ribozima utilizado en la presente invención se selecciona tal como es conocido en la técnica. Las ribozimas de horquilla están ahora en pruebas clínicas y son un tipo particularmente útil.
20 En general la ribozima tiene de 30 - 100 nucleótidos de longitud.

Las moléculas de ribozimas diseñadas para escindir catalíticamente un transcritto de ARNm objetivo son conocidas en la técnica (por ejemplo PDGF (SEQ ID NO: 1) o VEGF (SEQ ID NO: 3)) y también pueden ser utilizadas para
25 evitar la traducción de ARNm (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT WO90/11364; Sarver et al., (1990) *Science*, 247: 1222 - 1225 y la Patente de los Estados Unidos No. 5.093.246). Mientras que las ribozimas que escinden el ARNm en secuencias de reconocimiento específicas de un sitio pueden utilizarse para destruir ARNm particulares, el uso de las ribozimas de cabeza de martillo es particularmente útil. Las ribozimas de cabeza de martillo escinden los ARNm en localizaciones dictadas por las regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarios con el ARNm objetivo. El único requerimiento es que el ARNm objetivo tenga la siguiente
30 secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas de cabeza de martillo es bien conocida en la técnica y se describe más completamente en Haseloff y Gerlach ((1988) *Nature*, 334: 585).

Las ribozimas también incluyen endorribonucleasas de ARN (de aquí en adelante ribozimas tipo "Cech") tal como las que se presentan naturalmente en la *Tetrahymena thermophila* (conocida como la IVS, o ARN de L-19 IVS), y que
35 ha sido descrita extensamente por Thomas Cech y colaboradores (véase Zaug et al., (1984) *Science*, 224: 574 - 578; Zaug y Cech (1986) *Science*, 231: 470 - 475; Zaug, et al., (1986) *Nature*, 324: 429 - 433; Solicitud Internacional de Patente No. W088/04300; Been and Cech (1986) *Cell*, 47: 207 - 216). Las ribozimas tipo Cech tienen un sitio activo de 8 pares de bases, el cual hibrida a la secuencia de ARN objetivo en donde después tiene lugar la escisión del ARN objetivo. La invención abarca aquellas ribozimas tipo Cech, que apuntan a secuencias de sitios activos de
40 ocho pares de bases. Mientras que la invención no está limitada a una teoría particular de mecanismo operativo, el uso de las ribozimas cabeza de martillo en la invención puede tener ventaja sobre el uso de antisentido dirigido a PDGF/VEGF, como lo indican reportes recientes de que las ribozimas de cabeza de martillo operan bloqueando la traducción de ARN y/o la escisión específica del ARNm objetivo.

45 Como sucede en la metodología antisentido, las ribozimas pueden estar compuestas de oligonucleótidos modificados (por ejemplo para estabilidad, direccionamiento, etc., mejorado) y se suministran a las células que expresan el ARNm objetivo. Un método útil para suministrar involucra el uso de un constructo de ADN "que codifica" la ribozima bajo el control de un promotor pol III o pol II constitutivo fuerte, de tal manera que las células
50 transfectadas produzcan cantidades suficientes de las ribozimas para destruir los mensajes direccionados e inhibir la traducción. Puesto que las ribozimas, a diferencia de las moléculas antisentido son catalíticas, se requiere una concentración intracelular más baja para su eficiencia.

Como se describió anteriormente, la resistencia a la nucleasa, cuando se necesita, es prevista por cualquier método conocido en la técnica que no interfiera sustancialmente con la actividad biológica de los oligodesoxinucleótidos
55 antisentido o ribozimas según se requiera para el método de uso y administración (Iyer et al., (1990) *J. Org. Chem.*, 55: 4693 - 99; Eckstein (1985) *Ann. Rev. Biochem.*, 54: 367 - 402; Spitzer and Eckstein (1988) *Nucleic Acids Res.*, 18: 11691 - 704; Woolf et al., (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18: 1763 - 69; y Shaw et al., (1991) *Nucleic Acids Res.*, 18: 11691 - 704). Tal como se describió anteriormente para los aptámeros, pueden hacerse modificaciones representativas no limitantes a oligonucleótidos antisentido o ribozimas con el fin de potenciar la resistencia a la
60 nucleasa incluyendo la modificación del heteroátomo de fósforo u oxígeno en el esqueleto de fosfato, las uniones interazúcar alquilo o cicloalquilo de cadena corta o las uniones interazúcar heteroatómicas o heterocíclicas de cadena corta. Estas incluyen, por ejemplo, preparar metilfosfonatos, fosforotioatos, fosforoditioatos y oligómeros morfolino fluorados en la posición 2' o metilados en O. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido de la ribozima pueden tener enlaces fosforotioato que enlazan de cuatro a seis bases de nucleótidos en el extremo 3'.
65 Alternativamente, los enlaces fosforotioato pueden enlazar todas las bases de nucleótidos. Los oligonucleótidos

antisentido con fosforotioato no muestran normalmente toxicidad significativa en concentraciones que son efectivas y exhiben suficientes vidas útiles farmacodinámicas en animales (véase Agarwal et al., (1996) TIBTECH, 14: 376) y son resistentes a la nucleasa. Alternativamente, la resistencia a la nucleasa para la AS-ODN puede proveerse teniendo una secuencia formadora de un bucle de nueve nucleótidos en el extremo 3' que tiene la secuencia de nucleótidos CGCGAAGCG. La reacción de conjugación avidina-biotina también puede utilizarse para mejorar la protección de AS-ODN contra la degradación de la nucleasa en suero (véase Boado and Pardridge (1992) Bioconj. Chem., 3: 519 - 23). De acuerdo con este concepto los agentes AS-ODN son monobiotinilados en su extremo 3'. Cuando se hacen reaccionar con avidina, forman complejos apretados resistentes a la nucleasa con una estabilidad seis veces mayor en comparación con los ODN no conjugados.

Otros estudios muestran la extensión in vivo de los oligonucleótidos antisentido (Agarwal et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88: 7595). Este proceso, presumiblemente útil como mecanismo de consumo para eliminar oligonucleótidos AS foráneos de la circulación, depende de la existencia de terminales 3' libres en los oligonucleótidos anexos sobre los cuales ocurre la extensión. Por lo tanto, una protección de bucle parcial con fosforotioato o biotina-avidina en esta importante posición debería ser suficiente para asegurar la estabilidad de estos oligodesoxinucleótidos AS.

Además de utilizar bases modificadas tal como se describió anteriormente, pueden prepararse análogos de nucleótidos en la estructura del nucleótido se altera fundamentalmente y que son más adecuados como reactivos terapéuticos o experimentales. Un ejemplo de un análogo de nucleótido es un ácido nucleico peptídico (PNA) en donde el esqueleto de fosfato de desoxirribosa (o ribosa) en ADN (o ARN) es reemplazado con un esqueleto poliamida, el cual es similar al encontrado en los péptidos. Los análogos de PNA han demostrado ser resistentes a la degradación por enzimas y tienen vidas extendidas in vivo e in vitro. Adicionalmente, los PNA han demostrado enlazarse más fuertemente a una secuencia de ADN complementaria que a una molécula de ADN. Esta observación se atribuye a la falta de repulsión de cargas entre la cadena de PNA y la cadena de ADN. Otras modificaciones que pueden hacerse a los oligonucleótidos incluyen esqueletos poliméricos, esqueletos morfolino poliméricos (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5.034.506), esqueletos cíclicos o esqueletos acíclicos, imitadores de azúcares y cualquier otra modificación incluyendo las que puedan mejorar las propiedades farmacodinámicas del oligonucleótido.

Las enzimas de ADN pueden ser utilizadas para hacer disminuir la expresión del ARNm objetivo, por ejemplo, PDGF o VEGF, las enzimas de ADN incorporan algunas de las características del mecanismo de las tecnologías de antisentido y ribozima. Las enzimas de ADN están diseñadas de tal manera que reconocen una secuencia de ácidos nucleicos objetivo particular así como un oligonucleótido antisentido, sin embargo, mucho más como una ribozima puesto que son catalíticas y específicamente escinden el ácido nucleico específico.

Hay actualmente dos tipos básicos de enzimas de ADN y ambas fueron identificadas por Santoro y Joyce (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6.110.462). La enzima de ADN 10-23 comprende una estructura de bucle que conecta a dos brazos. Los dos brazos proveen especificidad reconociendo la secuencia de ácidos nucleicos objetivo particular mientras que la estructura de bucle provee funciones catalíticas bajo condiciones fisiológicas.

En resumen, para diseñar una enzima de ADN que reconozca y escinda específicamente un ácido nucleico objetivo, una persona experimentada en la técnica debe identificar la secuencia objetivo única. Esto puede hacerse utilizando la misma metodología tal como se delineó para oligonucleótidos antisentido. En ciertos casos, la secuencia única o sustancialmente única es una secuencia rica en G/C de aproximadamente 18 a 22 nucleótidos. Un alto contenido de G/C ayuda a asegurar una interacción más fuerte entre la enzima de ADN y la secuencia objetivo.

Cuando se sintetiza la enzima de ADN, la secuencia de reconocimiento antisentido específica que apunta la enzima al mensaje es dividida de tal manera que comprende los dos brazos de la enzima de ADN, y el bucle de la enzima de ADN es colocado entre los dos brazos específicos.

Los métodos para hacer y administrar enzimas de ADN pueden encontrarse, por ejemplo en US 6110462. De la misma forma, los métodos para suministrar ribozimas de ADN in vitro o in vivo incluyen métodos para suministrar ribozima de ARN, tal como se delinea aquí. Adicionalmente, una persona experimentada en la técnica reconocerá que, al igual que en los oligonucleótidos antisentido, las enzimas de ADN pueden modificarse opcionalmente para mejorar la estabilidad y mejorar la resistencia a la degradación.

Antagonistas de ARNi

El siguiente capítulo sobre los antagonistas de ARNi se mantiene para propósitos ilustrativos.

Algunas realizaciones de la invención hacen usos de materiales y métodos para efectuar la represión de VEGF y PDGF por medio de interferencia con ARN (ARNi). El ARNi en un proceso de represión de genes posttranscripcional específico de una secuencia que puede ocurrir en células eucariotas. En general, este proceso involucra la

degradación de un ARNm de una secuencia particular inducida por ARN de cadena doble (ARNds) que es homólogo a esa secuencia. Por ejemplo, la expresión de un ARNds largo correspondiente a la secuencia de un ARNm de cadena sencilla particular (ARNm ss) hará lábil ese mensaje, "interferiendo" por lo tanto con la expresión del gen correspondiente. De acuerdo con lo anterior, un gen seleccionado puede ser reprimido introduciendo un ARNds que corresponde a toda o una parte sustancial del ARNm para ese gen. Parece que cuando se expresa un ARNds largo es procesado inicialmente por un ribonucleasa III en oligonucleótidos de ARNds más cortos de tan poco como 21 a 22 pares de bases en longitud. De acuerdo con lo anterior, la ARNi puede efectuarse por introducción o expresión de ARNds homólogos relativamente cortos. En efecto el uso de ARNds homólogos relativamente cortos puede tener ciertas ventajas como se discute más adelante.

Las células de los mamíferos tienen al menos dos rutas que son afectadas por los ARN de cadena doble (ARNds). En la ruta de ARNi (específica para la secuencia), el ARNds de iniciación es roto inicialmente en ARN (si) cortos de interferencia, como se describió más arriba. Los ARNsi tienen cadenas sentido y antisentido de aproximadamente 21 nucleótidos que forman aproximadamente 19 nucleótidos de ARNsi con sobrantes de dos nucleótidos en cada extremo 3'. Los ARN cortos de interferencia se cree que proveen la información de secuencia que permite que un ARN mensajero específico sea direccionado para la degradación. En contraste, la ruta no específica es disparada por ARNds de cualquier secuencia, en tanto tenga por lo menos 30 pares de bases de longitud. Los efectos no específicos se presentan porque el ARNds activa dos enzimas: la PKR (proteína quinasa activada por ARN de cadena doble), la cual en su forma activa fosforila el factor de iniciación de traducción eIF2 para cortar toda la síntesis de proteínas, y la 2', 5' oligoadenilato sintetasa (2', 5'-was), la cual sintetiza una molécula que activa la KNasa L, una enzima no específica que apunta a todos los ARNm. La ruta no específica puede representar una respuesta del huésped al estrés o a una infección viral, y en general, los efectos de la ruta no específica son minimizados en particular mediante métodos útiles de la presente invención. Significativamente, parece requerirse ARNds más largos para inducir la ruta no específica y, de acuerdo con esto, ARNds más cortos de aproximadamente 30 pares de bases son particularmente útiles para efectuar la represión del gen por ARNi (véase, por ejemplo, Hunter et al., (1975) *J. Biol. Chem.*, 250: 409 - 17; Manche et al., (1992) *Mol. Cell Biol.*, 12: 5239 - 48; Minks et al., (1979) *J. Biol. Chem.*, 254: 10180 - 3; y Elbashir et al., (2001) *Nature* 411: 494 - 8).

Ciertos oligonucleótidos de cadena doble utilizados para afectar la ARNi tienen menos de 30 pares de bases de longitud y pueden comprender aproximadamente 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, o 17 pares de bases de ácido ribonucleico. Opcionalmente, los oligonucleótidos de ARNds de la invención pueden incluir extremos sobrantes 3'. Extremos sobrantes 3' de 2-nucleótidos de ejemplos no limitantes pueden estar compuestos de residuos de ribonucleótidos de cualquier tipo y pueden incluso estar compuestos de residuos 2'-desoxitimidina lo que hace disminuir el coste de la síntesis del coste de ARN y puede potenciar la resistencia a la nucleasa de los ARNsi en el medio de cultivo celular y dentro de células transfectadas (véase Elbasir et al., (2001) *Nature* , 411: 494 - 8).

ARNds más largos de 50, 75, 100 o incluso 500 pares de bases o más pueden utilizarse también en ciertas realizaciones de la invención. Concentraciones de ejemplo de ARNds para efectuar ARNi son aproximadamente 0.05 nM, 0.1 nM, 0.5 nM, 1.0 nM, 1.5 nM, 25 nM o 100 nM, aunque pueden utilizarse otras concentraciones dependiendo de la naturaleza de las células tratadas, el gen objetivo y otros factores fácilmente discernibles por la persona experimentada en la técnica. ARNds de ejemplo puede sintetizarse químicamente o producirse in vitro o in vivo utilizando vectores de expresión apropiados. ARN sintético de ejemplo incluye ARN de 21 nucleótidos sintetizado químicamente utilizando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, fosforamiditas y timidina fosforamidita de ARN expedite (Prologo, Alemania)). Los oligonucleótidos sintéticos pueden ser desprotegidos y purificados por gel utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo Elbashir et al., (2001) *Genes Dev.*, 15: 188 - 200). Pueden transcribirse ARN más largos a través de promotores tales como promotores de polimerasa T7 de ARN, conocidos en la técnica. Un objetivo de ARN sencillo, colocado en ambas posibles orientaciones corriente abajo en un promotor in vitro, transcribirá ambas cadenas del objetivo para crear un oligonucleótidos de ARNds de la secuencia objetivo deseada.

La secuencia específica utilizada en el diseño de los oligonucleótidos puede ser cualquier secuencia contigua de nucleótidos contenida dentro del mensaje del gen expresado del objetivo (por ejemplo PDGF (por ejemplo, SEQ ID NO: 2) o VEGF (por ejemplo, SEQ ID NO: 4)). Pueden utilizarse programas y algoritmos, conocidos en la técnica, para seleccionar secuencias objetivo apropiadas. Además, pueden seleccionarse secuencias óptimas, tal como se describe adicionalmente más arriba, utilizando programas diseñados para predecir la estructura secundaria de una secuencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla especificada y permite la selección de aquellas secuencias que probablemente se presenten en regiones de cadena sencilla expuestas de un ARNm plegado. Los métodos y composiciones para diseñar oligonucleótidos apropiados pueden encontrarse, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 6.251.588. El ARNm se cree generalmente que es una molécula lineal que contiene la información para dirigir la síntesis de proteína dentro de la secuencia de ribonucleótidos. Sin embargo, estudios han demostrado que un cierto número de estructuras secundarias y terciarias existen en la mayor parte de los ARNm. Los elementos de estructura secundaria en ARN están formados principalmente por interacciones tipo Watson-Crick entre diferentes regiones de la misma molécula de ARN. Elementos estructurales secundarios importantes incluyen regiones de cadena doble intramolecular, bucles de horquilla, abultamientos en ARN dúplex y bucles internos. Elementos estructurales terciarios se forman cuando elementos estructurales secundarios entran en contacto uno

con otro o con regiones de cadena sencilla para producir una estructura tridimensional más compleja. Un cierto número de investigadores han medido las energías de enlazamiento de un gran número de estructuras dúplex de ARN y han derivado un conjunto de reglas que pueden ser utilizadas para predecir la estructura secundaria de ARN (véase, por ejemplo, Jaeger et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86: 7706, y Turner et al., (1988) Ann. Rev. Biophys. Chem., 17: 167). Las reglas son útiles en la identificación de elementos estructurales de ARN y, en particular, para identificar regiones de ARN de cadena sencilla, que pueden representar segmentos particularmente útiles del ARNm para direccionar el silenciamiento con tecnologías de ARNi, ribozima o antisentido. De acuerdo con lo anterior, segmentos particulares del ARNm objetivo pueden identificarse para diseñar los oligonucleótidos de ARNs para mediar ARNi así como para diseñar composiciones de ribozima y ribozima de cabeza de martillo apropiadas de la invención.

Los oligonucleótidos de ARNs pueden ser introducidos en la célula por transfección con un gen objetivo heterólogo utilizando composiciones tales como liposomas que son conocidos en la técnica, por ejemplo, Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Rockville, MD) tal como lo describe el fabricante para líneas celulares adherentes. La transfección de los oligonucleótidos de ARNs para apuntar a genes endógenos puede llevarse a cabo utilizando Oligofectamine (Life Technologies). La eficiencia de la transición puede verificarse utilizando microscopía de fluorescencia para líneas celulares de mamíferos después de la cotransfección de pAD3 que codifica hGFP (Kehlenback et al., (1998) J. Cell. Biol., 141: 863 - 74). La efectividad de la ARNi puede establecerse por cualquiera de un cierto número de ensayos posteriores a la introducción del ARNs. Incluyen, pero no se limitan a, análisis de inmunoprecipitación Western utilizando anticuerpos que reconocen el producto genético objetivo siguiendo un tiempo suficiente para el retorno de la reserva endógena después de que se reprime la nueva síntesis de proteína, y el análisis por inmunoprecipitación Northern para determinar el nivel del ARNm objetivo existente.

En las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6.278.039, 5.723.750 y 5.244.805 se proveen composiciones, métodos y aplicaciones aún adicionales de la tecnología de ARNi.

Antagonistas del receptor del inhibidor de tirosina quinasa

La presente invención se refiere en las reivindicaciones a un antagonista de PDGF que es un inhibidor específico de receptor de tirosina quinasa el cual se utilizan en un tratamiento en combinación con un antagonista de VEGF. Lo que sigue es una divulgación general de antagonistas del receptor del inhibidor de tirosina quinasa para propósitos ilustrativos.

Se incluyen en la invención el antagonista de tirosina quinasa imatinib (Gleevec®). Otros antagonistas de tirosina quinasa conocidos en la técnica y variantes y alternativas de los mismos pueden obtenerse utilizando la experiencia rutinaria en la técnica y las enseñanzas de la técnica. La señal extracelular de PDGF (y VEGF) se comunica a otras partes de la célula a través de un evento de fosforilación medido por tirosina quinasa afectado por el receptor de PDGF (y el receptor de VEGF) y que afecta las proteínas sustrato corriente debajo de la membrana celular, enlazando un complejo de señalización. De acuerdo con lo anterior, los antagonistas que actúan en la etapa de señalización del receptor de quinasa de PDGF (y/o VEGF) también son efectivos en el método de la invención.

Un cierto número de tipos de inhibidores de tirosina quinasa que son selectivos para las enzimas receptoras de tirosina quinasa tales como PDGFR o VEGFR, son conocidos (véase, por ejemplo, Spada and Myers ((1995) Exp Opin. Ther. Patents, 5: 805) y Bridges ((1995) Exp. Opin. Ther. Patents, 5: 1245). Adicionalmente Law y Lydon han resumido el potencial anticanceroso de los inhibidores de tirosina quinasa ((1996) Emerging Drugs: The Prospect For Improved Medicines, 241 - 260). Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6.528.526 describe compuestos de quinoxalina sustituidos que exhiben una actividad selectivamente inhibida de tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR). Los inhibidores conocidos de la actividad de tirosina quinasa de PDGFR incluyen inhibidores basados en quinona reportado por Maguire et al., ((1994) J. Med. Chem., 37: 2129), y por Dolle et al., ((1994) J. Med. Chem., 37: 2627). Una clase de inhibidores basados en fenilamino-pirimidina fue reportada recientemente por Traxler et al., en EP 564409 y por Zimmerman et al., ((1996) Biorg. Med. Chem. Lett., 6: 1221 - 1226) y por Buchdunger et al., ((1995) Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 92: 2558). Los derivados de quinazolina que son útiles en la inhibición de la actividad del receptor de tirosina quinasa de PDGF incluyen compuestos arilo bismono y bicíclicos y compuestos heteroarilo (véase, por ejemplo, WO 92/20642), derivados de quinoxalina (véase (1994) Cancer Res., 54: 6106 - 6114), derivados de pirimidina (Solicitud de Patente Japonesa Publicada No. 87834/94) y derivados de demotixiquinolina (véase Abstracts of the 116th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan (Kanazawa), (1996), 2, p. 275, 29(C2) 15 - 2).

Ejemplos de inhibidores de tirosina quinasa de VEGFR incluyen derivados de cinolina, por ejemplo, los descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 6.514.971.

Otros tales derivados de cinolina también son conocidos. Por ejemplo, (1995) J. Med Chem., 38: 3482.7 divulga 4-(3-bromoanilino)cinolina; (1968) J. Chem. Soc. C, (9): 1152 - 5 divulga 6-cloro-4-fenoxicinolina; (1984) J. Kamatak Univ., Sci., 29: 82 - 6 divulga ciertas 4-anilincinolininas; y (1973) Indjan J. Chem., 11: 211-13 divulga ciertas 4-feniltiocinolininas. Adicionalmente, (1973) J. Kamatak Univ., 18: 25-30 divulga ciertas 4-fenoxicinolininas, (1984) J.

Karnatak Univ., Sci., 29: 82-6 divulga dos compuestos: 4-(4. metoxi- anilino)-6,7-dimetoxicolina y 4-(3-cloroanilino)-6,7-dimetoxicolina. Adicionalmente, ciertas cinolinas con un anillo fenil o enlazado a través de un grupo seleccionado de -O-, -S-, -NH- y -CH₂- en la posición 4 están descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 5.017.579, Patente de los Estados Unidos No. 4.957.925, Patente de los Estados Unidos No. 4.994.474, y EP 0302793 A2.

Aún otros compuestos relacionados para la inhibición de VEGFR y/o PDGFR están disponibles mediante la selección de compuestos novedosos por su efecto sobre la actividad receptora de tirosina quinasa de interés utilizando un ensayo de convención. La inhibición efectiva por un inhibidor de molécula orgánica pequeña de PDGFR o VEGFR puede monitorearse utilizando un sistema de prueba basado en células así como otros sistemas de prueba conocidos en la técnica.

Por ejemplo, una prueba para la actividad contra el receptor de tirosina quinasa de VEGF es como sigue. La prueba se lleva a cabo utilizando el receptor de tirosina quinasa de VEGF Flt-1. El procedimiento detallado es como sigue: 30 µl de solución de quinasa (10 ng del dominio de quinasa de Flt-1) (véase Shibuya, et al., (1990) Oncogene, 5: 519 - 24) en Tris. HCl 20 mM pH 7.5, dicloruro de manganeso mM (MnCl₂), cloruro de magnesio 3 mM (MgCl₂), vanadato de sodio 10 µM, polietilén glicol 0.25 mg/ml (PEG) 20000, ditiotreitól 1 mM y 3 µg/µl poly(Glu,Tyr) 4:1 (Sigma, Buchs, Suiza), 8 µM [³²P]-ATP (0.2 uCi), sulfóxido de dimetilo al 1%, y 0 a 100 µM del compuesto que se va a probar se incuban juntos durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se termina mediante la adición de 10 µl de etilendiaminotetraacetato 0.25 M (EDTA) pH 7. Utilizando un dispensador de canal múltiple (LAB SYSTEMS, Estados Unidos) se aplica un alícuota de 20 µl a una membrana Immobilon P de PDVF (= difluoruro de polivinilo) (Millipore, Estados Unidos) a través de un distribuidor de filtros de microtitulación y conectado a un vacío. Después de la eliminación completa del líquido, la membrana se lava 4 veces sucesivamente en un baño que contiene ácido fosfórico al 0.5% (H₃ PO₄) y una vez con etanol se incuban durante 10 minutos cada vez con agitación, luego se monta en un Hewlett Packard TopCount Manifold y la radioactividad se mide después de la adición de 10 µl de Microscint.RTM (contador líquido de centelleo beta). Se determinan los valores IC₅₀ por análisis de regresión lineal de los porcentajes para la inhibición de cada compuesto en tres concentraciones (como regla 0.01 µmol, 0.1 µmol y 1 µmol). Los valores IC₅₀ de los compuestos inhibidores de la tirosina activa pueden estar en el rango de 0.01 µm a 100 µm.

Adicionalmente, la inhibición de una actividad de autofosforilación por tirosina quinasa de VEGFR inducida por VEGF puede confirmarse en un experimento adicional con células. En resumen, células CHO transfectadas, que expresan permanentemente el receptor de VEGF humano (VEGFR/KDR), se siembra en el medio del cultivo completo (con suero de ternera fetal al 10% (FCS)) en placas de cultivo de células de 6 pozos y se incuban a 37°C bajo CO₂ al 5% hasta que muestren aproximadamente 80% de confluencia. Los compuestos que se van a probar se diluyen entonces en medio de cultivo (sin FCS con 0.1% de albúmina de suero bovino) se agregan a las células. (Los controles comprenden medio sin los compuestos de prueba). Después de una incubación de 2 horas a 37°C, se agrega VEGF recombinante; la concentración final de VEGF es 20 ng/ml). Después de una incubación adicional de 5 minutos a 37°C, las células se lavan dos veces con PBS enfriado con hielo, y se someten inmediatamente a lisis en 100 µl de regulador de lisis por pozo. Los lisados son centrifugados entonces para eliminar los núcleos de las células y se determina las concentraciones de los sobrenadantes utilizando una prueba de proteína comercial (BIORAD). Los lisados pueden ser utilizados entonces inmediatamente o, si es necesario, almacenados a -200°C.

Se ejecuta entonces una ELISA en sándwich para medir la fosforilación del receptor de KDR: se inmoviliza un anticuerpo monoclonal de KDR en placas de ELISA negras (OptiPlaten™, HTRF-96 de Packard). Las placas luego se lavan y los sitios de enlazamiento de proteína libre restante se saturan con BSA al 1% en PBS. Los lisados de células (20 µg de proteína por pozo) se incuban entonces en estas placas durante la noche a 4°C junto con un anticuerpo antifosfotirosina acoplado con fosfatasa alcalina (por ejemplo, PY20:AP de Transduction Laboratories Lexington, KY). Las placas se lavan de nuevo y el enlazamiento del anticuerpo antifosfotirosina con el receptor fosforilado capturado se demuestra entonces utilizando un sustrato utilizando un sustrato luminiscente AP (CDP-Star, listo para el uso, con Emerald II; Applied-Biosystems TROPIX Bedford, MA). La luminiscencia se mide en un Packard Top Count Microplate Scintillation Counter. La diferencia entre la señal del control positivo (estimulada con VEGF o PDGF) y la de control negativo (no estimulado con VEGF o PDGF) corresponde a una fosforilación del receptor de KDR inducida por VEGF (= 100%). La actividad de la sustancias de prueba de calcular como porcentaje de inhibición de la fosforilación del receptor de KDR inducida por VEGF, en donde la concentración de la sustancia que induce la mitad de la inhibición máxima se define como el ED₅₀ (dosis efectiva para 50% de inhibición). Los compuestos inhibidores de tirosina activa tienen valores de ED₅₀ en el rango de 0.001 µm a 6 µm, típicamente de 0.005µm a 0.5 µm.

Formulaciones farmacéuticas y administración terapéutica

Los agentes anti-VEGF y anti-PDGF son útiles para el uso en el tratamiento de un trastorno neovascular ocular tal como degeneración macular o retinopatía diabética. De acuerdo con lo anterior, una vez que un paciente ha sido diagnosticado por estar en riesgo de desarrollar o tener un trastorno neovascular, el paciente es tratado mediante la administración de un antagonista de PDGF en combinación con un antagonista de VEGF con el fin de bloquear

respectivamente los efectos negativos de PDGF y VEGF, suprimiendo por lo tanto el desarrollo de un trastorno neovascular y aliviando los efectos nocivos asociados con la neovascularización. El uso de acuerdo con la presente invención no da como resultado un edema de la córnea.

5 La terapia de combinación con anti-PDGF y anti VEGF de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo sola o en
 conjunción con otra terapia y puede proveerse en casa, en el consultorio del médico, una clínica, un departamento
 de consulta externa de un hospital o un hospital. El tratamiento en general comienza en un hospital de tal manera
 10 que el doctor pueda observar los efectos de la terapia de manera cercana y hacer cualquier ajuste que sea
 necesario. La duración de la terapia de combinación depende del tipo de trastorno neovascular que está siendo
 tratado, la edad y condición del paciente, el estado y tipo de la enfermedad del paciente, y de cómo el paciente
 responde al tratamiento. Adicionalmente, una persona que tenga un riesgo mayor de desarrollar un trastorno
 neovascular (por ejemplo un paciente diabético) puede recibir tratamiento para inhibir o retardar la aparición de los
 15 síntomas. Una ventaja significativa provista por la presente invención es que la combinación de un antagonista de
 PDGF y un antagonista de VEGF para el tratamiento de un trastorno neovascular permite la administración de una
 dosis baja de cada antagonista y menos antagonista activo total, provyendo así una eficacia similar con menor
 toxicidad y efectos colaterales, y costes reducidos.

La administración de cada antagonista de la terapia de combinación puede hacerse por cualquier medio adecuado
 20 que de cómo resultado una concentración del antagonista que, en combinación con el otro antagonista, sea efectivo
 para el tratamiento de un trastorno neovascular. Cada antagonista, por ejemplo, puede ser mezclado con una
 sustancia portadora adecuada, y está generalmente presente una cantidad de 1 - 95% en peso del peso total de la
 composición. La composición puede ser provista en una forma de dosificación que sea adecuada para
 25 administración oftálmica, oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, subcutánea), rectal, transdérmica,
 en la sal, o por inhalación. De acuerdo con lo anterior, la composición puede estar en la forma de, por ejemplo,
 tabletas, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles incluyendo hidrogel,
 pastas, ungüentos, cremas, apósitos, dispositivos de administración, supositorios, enemas, inyectables, implantes,
 30 aspersiones o aerosoles. Las composiciones farmacéuticas que contienen un antagonista individual o dos o más
 antagonistas pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional (véase, por ejemplo,
 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (20th ed.) ed. A.R. Gennaro, 2000, Lippincott Williams & Wilkins,
 Philadelphia, PA. and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. eds., J. Swarbrick and J. C. Boilan, 1988 - 2002,
 Marcel Dekker, Nueva York).

Las combinaciones de los antagonistas de PDGF y VEGF son, en un aspecto útil, administrados parenteralmente
 35 (por ejemplo, por inyección o implante intramuscular, intraperitoneal, intravenoso, intraocular, intravítreo, retrobulbar,
 subconjuntiva, bajo la barbilla o subcutánea) o sistémicamente. Las formulaciones para administración parenteral o
 sistémica incluyen sus soluciones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Puede usarse una
 variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua regulada, solución salina y similares. Ejemplos de otros
 40 vehículos adecuados incluyen polipropilén glicol, polietilén glicol, aceites vegetales, gelatina, hidrogeles, naftalenos
 hidrogenados y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Tales formulaciones también pueden
 contener sustancias auxiliares, tales como agentes conservantes, humectantes, reguladores, emulsificantes y/o
 dispersante. Puede utilizarse copolímeros biocompatibles, polímeros de láctidos biodegradables, copolímeros de
 láctido/glicólido o copolímeros de polioxietilén polioxipropileno para controlar la liberación de los ingredientes activos.

Alternativamente, pueden administrarse combinaciones de antagonistas de PDGF y VEGF por ingestión oral. Las
 45 composiciones previstas para uso oral pueden prepararse en formas sólidas o líquidas de acuerdo con cualquier
 método conocido en la técnica para la manufactura de composiciones farmacéuticas.

Las formas de dosificación sólida para administración oral incluyen cápsulas, tabletas, píldoras, polvos y gránulos.
 50 En general estas preparaciones farmacéuticas contienen ingredientes activos (tales como antagonistas en moléculas
 orgánicas pequeñas de PDGF y antagonistas o moléculas orgánicas pequeñas de VEGF) mezcladas con
 excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptable. Estos pueden incluir, por ejemplo, diluyentes inertes, tales
 como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, celulosa, almidón, sustrato de
 calcio, fosfato de sodio, caolín y similares. También pueden utilizarse agentes de aglomeración, agentes reguladores
 55 y/o agentes lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio). Las tabletas y píldoras pueden ser preparadas
 adicionalmente con recubrimientos entéricos. Las composiciones pueden contener opcionalmente agentes
 endulzantes, saborizante, colorantes, de perfume y conservantes con el fin de proveer una preparación más
 fácilmente ingerible.

Por ejemplo, los antagonistas de PDGF y VEGF pueden administrarse por vía intraocular por inyección intravítreo en
 60 el ojo así como por inyecciones en subconjuntiva y bajo la barbilla. Otras rutas de administración incluyen la ruta
 transecleral; retrobulbar, intraperitoneal, intramuscular e intravenosa. Alternativamente, puede administrarse una
 combinación de antagonistas utilizando un dispositivo de administración de fármacos o un implante intraocular
 (véase más abajo).

65 Las formas de dosificación líquida para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y

cápsulas de gelatina blanda farmacéuticamente aceptables. Estas formas contienen diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica, tales como agua o un medio oleoso, y pueden influir también adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsificantes y agentes de suspensión.

5 En algunos casos, la combinación de los antagonistas de PDGF y VEGF también puede administrarse tópicamente, por ejemplo, mediante un parche o por aplicación directa a una región, tal como la epidermis o el ojo, susceptible de ser afectado por un trastorno neovascular, o por iontoforesis.

10 Las formulaciones para uso oftálmico incluyen tabletas que contienen los ingredientes activos en una mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o agentes de relleno inertes (por ejemplo, sacarosa y sorbitol), agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de zinc, ácido esteárico, sílicas, aceites vegetales hidrogenados o talco).

15 Los antagonistas de PDGF y VEGF pueden ser mezclados juntos en una tableta u otro vehículo o pueden ser divididos. En un ejemplo, el primer antagonista está contenido en el interior de la tableta y el segundo antagonista en su exterior, de tal manera que una parte sustancial del segundo antagonista es liberada antes que la liberación del primer antagonista. Si se desea, los antagonistas en una forma de tableta pueden ser administrados en utilizando un dispositivo de administración de fármacos (véase más abajo).

20 En general, cada uno de los antagonistas debería ser administrado en una cantidad suficiente para suprimir o reducir o eliminar un efecto nocivo o un síntoma de un trastorno neovascular. La cantidad de un ingrediente antagonista activo que se combina con los materiales portadores para producir una dosificación individual variará dependiente del sujeto que está siendo tratado y del modo particular de administración.

25 La dosificación de cada antagonista de las combinaciones reivindicadas depende de varios factores que incluyen la severidad de la condición, de si la condición va a ser tratada o prevenida y de la edad, peso y salud de la persona que se va a tratar. Adicionalmente, la información farmacogenómica (el efecto del gen o tipo sobre el perfil farmacocinético, farmacodinámico de eficacia de un agente terapéutico) acerca de un paciente particular puede afectar la dosificación usada. Adicionalmente, una persona experimentada en la técnica apreciará que las dosificaciones individuales exactas pueden ajustarse en algún grado dependiendo de una variedad de factores, incluyendo la combinación específica de antagonistas de PDGF y VEGF que está siendo administrada, el tiempo de administración, la ruta de administración, la naturaleza de la formulación, la rata de excreción, el trastorno neovascular particular que está siendo tratado, la severidad del trastorno, y la localización anatómica del trastorno neovascular (por ejemplo, el ojo versus la calidad corporal). Se esperan variaciones amplias en la dosificación necesaria a la vista de las diferentes eficiencias de las diversas rutas de administración. Por ejemplo, la administración oral en general requeriría según se espera niveles de dosificación más altos que la administración intravenosa o intravítreo. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse utilizando rutinas empíricas estándar para optimización, las cuales son bien conocidas en la técnica. Los niveles y patrones precisos de dosificación terapéuticamente efectiva se determinan típicamente por parte del médico responsable tal como un oftalmólogo en consideración de los factores anteriormente identificados.

45 En general, cuando se administran oralmente a un humano, la dosificación del antagonista de PDGF y del antagonista de VEGF es normalmente alrededor de 0.01 mg hasta aproximadamente 200 mg por día, deseablemente alrededor de 1 mg hasta 100 mg por día, y más deseablemente alrededor de 5 mg a aproximadamente 50 mg por día. Pueden ser necesarias dosificaciones de hasta aproximadamente 200 mg por día. Para la administración del antagonista de PDGF o del antagonista de VEGF por inyección, la dosificación oralmente es aproximadamente 0.1 mg hasta aproximadamente 250 mg por día, deseablemente alrededor de 1 mg hasta aproximadamente 20 mg por día, o alrededor de 3 mg hasta aproximadamente 5 mg por día. Las inyecciones pueden darse hasta aproximadamente 4 veces al día. En general, cuando se administra por vía parenteral o sistémica a un humano, la dosificación del antagonista de VEGF para uso en combinación con el antagonista de PDGF es normalmente alrededor de 0.1 mg hasta aproximadamente 1500 mg por día, o aproximadamente 0.5 mg hasta aproximadamente 10 mg por día, o aproximadamente 0.5 mg hasta aproximadamente 5 mg por día. Pueden ser necesarias dosificaciones de hasta aproximadamente 3000 mg por día.

55 Cuando se administra oftalmológicamente a un humano, la dosificación del antagonista de VEGF para uso en combinación con el antagonista de PDGF es nuevamente alrededor de 0.15 mg hasta aproximadamente hasta aproximadamente 3.0 mg por día, o alrededor de 0.3 mg hasta aproximadamente 3.0 mg por día, o aproximadamente 0.1 mg hasta 1.0 mg por día.

60 Por ejemplo, para usos oftálmicos, las sustancias farmacéuticas de aptámeros de PDGF-B y VEGF-A se formulan en solución salina de fosfato regulada a pH 5 - 7. Pueden agregarse hidróxido de sodio o ácido clorhídrico para ajuste del pH. En una formulación de trabajo, un aptámero de PDGF-B y un aptámero de VEGF-A, tal como EYE001, se formula individualmente en 3 concentraciones diferentes: 3 mg/100 μ l, 2 mg/100 μ l y 1 mg/100 μ l empacados en una jeringa de vidrio graduada tipo I según la USP, estéril de 1 ml dotada con una aguja estéril de calibre 27. El producto farmacéutico de combinación es libre de conservantes y está previsto para uso individual mediante inyección

65

intravenosa únicamente. Los ingredientes activos son las sustancias farmacéuticas PDGF-B y VEGF-A, a concentraciones de 30 mg/ml, 20 mg/ml y 10 mg/ml. Los excipientes son cloruro de sodio, USP; fosfato monobásico de sodio, monohidrato, USP; fosfatodibásico de sodio, heptahidrato, USP; hidróxido de sodio, USP; ácido clorhídrico, UPS; y agua para inyección USP. En esta forma los productos farmacéuticos de aptámeros de PDGF-B y VEGF-A están en una solución estéril lista para el uso provista en una jeringa de vidrio de uso individual. La jeringa es retirada del almacenamiento refrigerado aproximadamente 30 minutos (pero no más de 4 horas) antes del uso para permitir que la solución alcance la temperatura ambiente. La administración del contenido de la jeringa involucra conectar la barra pistón plástica enroscada al tapón de goma interior del cilindro de la jeringa. Se retira entonces la tapa de goma del extremo para permitir la administración del producto. Los aptámeros de PDGF-B y VEGF-A se administran como inyecciones intravítreas de 100 µl en tres ocasiones en intervalos de 28 días. Los pacientes reciben 3 mg/inyección por visita. La dosis es reducida a 2 mg o 1 mg, y adicionalmente a 0.1 mg si es necesario.

Las cantidades específicas de fármacos administrados dependen de la combinación específica de componentes. En una combinación de dosis deseada, la relación del antagonista de PDGF a antagonista de VEGF es aproximadamente 50:1 en peso, aproximadamente 20:1 en peso, aproximadamente 10:1 en peso, o aproximadamente 4:1, aproximadamente 2:1 o aproximadamente 1:1 en peso.

Una terapia de combinación incluye un antagonista de aptámero de PDGF-B y un antagonista de aptámero de VEGF-A. Los antagonistas se utilizan en combinación en un rango de relación de peso desde aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente 5.0 a aproximadamente 5.0 a 0.1 del antagonista de aptámero de PDGF-b con respecto al antagonista de aptámero VEGF-A. Un rango útil de estos dos antagonistas (antagonista PDGF-B a VEGF-A) es desde aproximadamente 0.5 hasta aproximadamente 2.0, o desde aproximadamente 2.0 a 0.5, mientras que otra relación útil es de aproximadamente 1.0 hasta aproximadamente 1.0, dependiendo finalmente de la selección del antagonista de aptámero de PDGF-B y de la antagonista de aptámero de VEGF-A.

La administración de cada fármaco en la terapia de combinación puede ser, independientemente, de una a cuatro veces al día durante un día hasta un año e incluso puede ser por la vida completa del paciente. La administración crónica a largo plazo se ve indicada en muchos casos. La dosificación puede ser administrada en una dosis individual o dividida en dosis múltiple. En general, la dosificación deseada será administrada en intervalos definidos durante un período prolongado, usualmente al menos durante varias semanas, aunque pueden ser necesarios períodos más largos de administración de varios meses o más.

Además de tratar trastornos neovasculares preexistente, la terapia de combinación que incluye un antagonista de PDGF y un antagonista de VEGF puede administrarse profilácticamente con el fin de prevenir o ralentizar la aparición de estos trastornos. En aplicaciones profilácticas, los antagonistas de PDGF y VEGF se administran a un paciente susceptible o de alguna otra manera en riesgo de un trastorno neovascular particular. De nuevo, la temporización precisa de la administración y las cantidades que se administran depende de factores diversos tales como el estado de salud del paciente, peso, etc.

En un ejemplo de trabajo, la combinación del antagonista de PDGF y del antagonista de VEGF se administra a un mamífero que requiere el tratamiento con los mismos, típicamente en la forma de una composición farmacéutica inyectable. En el aspecto de combinación, por ejemplo, puede administrarse un aptámero de PDGF-B y un aptámero de VEGF-A bien sea separadamente o en la composición farmacéutica que comprende a ambos. Se prefiere en general que tal administración sea por inyección utilizando un dispositivo de administración de fármacos. También es aceptable la administración parenteral, sistémica o transdérmica.

Como se discutió anteriormente, cuando el antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF se administran juntos, tal administración puede ser secuencial en tiempo o simultánea siendo el método secuencial un modo de administración. Cuando los antagonistas de PDGF y VEGF se administran secuencialmente, la administración de cada uno puede ser por el mismo o diferentes métodos. Para la administración secuencial, sin embargo, es útil que el método emplee la administración del antagonista de PDGF durante aproximadamente 5 segundos (hasta aproximadamente 3 inyecciones) seguido por administración sostenida cada 6 semanas por hasta aproximadamente 9 inyecciones por año de un antagonista de VEGF (el antagonista de PDGF puede ser administrado en el tiempo de cada inyección del antagonista de VEGF o puede ser dada con menos frecuencia, según lo determine el médico. La administración secuencial también incluye una combinación donde los antagonistas individuales pueden administrarse en tiempos diferentes o por rutas diferentes o ambos pero que actúan en combinación para proveer un efecto beneficioso, por ejemplo, para suprimir un trastorno neovascular. También cabe anotar que la administración por inyección es particularmente útil.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden formularse para liberar los antagonistas de PDGF y VEGF activos sustancialmente inmediatamente después de la administración en cualquier período de tiempo predeterminado después de la administración, utilizando formulaciones de liberación controlada. Por ejemplo, una composición farmacéutica que incluye al menos uno de cada uno de los antagonistas de PDGF y un antagonista de VEGF puede proveerse en composiciones de liberación sostenida. El uso de composiciones de liberación inmediata o sostenida depende de la naturaleza de la condición que está siendo tratada. Si la condición consiste de

un trastorno agudo o sobreagudo, se utilizará típicamente un tratamiento con una forma de liberación inmediata en lugar de una composición de liberación prolongada. Para ciertos tratamientos preventivos o de largo plazo, también puede ser apropiada una composición de liberación sostenida. La administración de cada uno de los antagonistas en formulaciones de liberación controladas es útil cuando el antagonista, bien sea solo o en combinación, tiene (i) un índice terapéutico estrecho (por ejemplo, la diferencia entre la concentración en plasma que lleva a efectos laterales o reacciones tóxicas nocivas y la concentración en plasma que lleva a un efecto terapéutico es pequeña; en general, el índice terapéutico TI, se define como la relación entre la dosis letal media (LD_{50}) con respecto a la dosis efectiva media (ED_{50})); (ii) una ventana de absorción estrecha en el tracto gastrointestinal; o (iii) una vida media biológica corta, de tal manera que se requiere una dosificación frecuente durante un día con el fin de sostener el nivel de plasma a un nivel terapéutico.

Pueden perseguirse muchas estrategias para obtener liberación controlada en la cual la rata de liberación sobrepase la rata de degradación o metabolismo del antagonista terapéutico. Por ejemplo, la liberación controlada puede obtenerse mediante la selección apropiada de parámetros en ingredientes de formulación, incluyendo, por ejemplo, composiciones y recubrimientos de liberación controlada apropiados. Ejemplos incluyen composiciones en tabletas o cápsulas unitarias sencillas o múltiple, soluciones oleosas, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, nanopartículas, parches y liposomas. Los métodos para preparar tales formulaciones de liberación sostenida o controlada son bien conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéutica incluyen un antagonista de PDGF y/o un antagonista de VEGF o ambos pueden administrarse también utilizando un dispositivo de administración de fármacos tales como un implante. Tales implantes pueden ser implantes biodegradables y/o biocompatibles, o pueden ser implantes no biodegradables. Los implantes pueden ser permeables o impermeables al agente activo. Los dispositivos de administración de fármacos oftálmicos pueden ser insertados en una cámara del ojo, tal como las cámaras anterior o posterior o pueden ser implantados en o sobre la esclera, el espacio coroidal, o una región no vascularizada exterior al vítreo. En una realización, el implante puede ser posicionado sobre una región avascular, tal como sobre la esclera, de tal manera que permita una difusión transclerar del fármaco al sitio deseado de tratamiento, por ejemplo, el espacio intraocular y la mácula del ojo. Adicionalmente, el sitio de difusión transclerar puede ser próximo a un sitio de neovascularización tal como un sitio próximo a la mácula.

Como se anotó anteriormente, la invención divulga la combinación de composiciones farmacéuticas separadas en un paquete farmacéutico. La composición de la invención puede ser provista como componentes de un paquete farmacéutico. Al menos dos antagonistas pueden ser formulados juntos o separadamente y en cantidades de dosificaciones individuales. Los antagonistas de la invención también son útiles cuando se formulan como sales. El paquete farmacéutico, en general, incluye (1) una cantidad del antagonista de PDGF, y un portador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en una primera forma de dosificación unitaria; (2) una cantidad de un antagonista de VEGF, y un portador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en una segunda forma de en una segunda forma de dosificación unitaria; y (3) un contenedor. El contenedor se utiliza para separar los componente y puede incluir, por ejemplo, una botella dividida o un paquete de lámina dividido. Las composiciones antagonistas separadas también pueden si se desea, estar contenidas dentro de un contenedor no dividido individual. El paquete farmacéutico también puede incluir instrucciones para la administración de los antagonistas de PDGF y VEGF separados. El paquete farmacéutico es particularmente ventajoso cuando los componentes separados se administran en diferentes niveles de dosificación, o cuando la titulación de los componentes individuales de la combinación es deseada por el médico prescriptor. En una realización, el paquete farmacéutico está diseñado para dispensar dosis de los antagonistas de PDGF y VEGF uno a la vez en el orden de su uso pretendido. En otro ejemplo, el paquete farmacéutico está diseñado para contener filas de un antagonista de PDGF y un antagonista de VEGF colocadas lado a lado en el paquete, con instrucciones en el paquete para instruir al usuario de que debe administrar uno de las parejas de antagonistas. Un paquete farmacéutico de ejemplo se denomina paquete de ampollas que es bien conocido en la industria de empaque farmacéutico.

La invención provee un antagonista de PDGF y VEGF para uso en métodos para tratar un paciente que así lo requiere que está diagnosticado con, o está en riesgo de desarrollar in trastorno neovascular ocular, administrando al paciente un antagonista d PDGF y una antagonista de VEGF, simultáneamente o durante 90 días uno entre otro, en cantidades suficientes para tratar el paciente. La invención involucra la administración del antagonista de PDGF y VEGF dentro de aproximadamente 10 días uno de otro. El antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF pueden administrarse 5 días distantes uno de otro. El antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF pueden administrarse 24 horas distantes uno de otro. El antagonista de PDGF y dicho antagonista de VEGF pueden administrarse simultáneamente.

Efectividad

La supresión de un trastorno neovascular se evalúa por cualquier método aceptado para medir si la angiogénesis se hace más lenta o disminuye. Esto incluye la observación directa y la evaluación indirecta tal como mediante la evaluación subjetiva de síntomas o indicadores fisiológicos objetivos. La eficacia del tratamiento, por ejemplo, puede evaluarse con base en la prevención o inversión de la neovascularización, microangiopatía, ruptura vascular o

edema vascular o cualquier combinación de los mismos. La eficacia del tratamiento para evaluar la supresión de un trastorno neovascular ocular también puede definirse en términos de estabilización o mejora de la agudeza visual. En la determinación de la efectividad de una terapia de combinación particular en el tratamiento o prevención de un trastorno neovascular ocular, los paciente también pueden ser evaluados clínicamente por un oftalmólogo varios días después de la inyección y al menos un mes después justo antes de la siguiente inyección. También se ejecuta mensualmente agudeza visual ETDRS, fotografía kodachrome y angiografía con fluoresceína durante los primeros 4 meses según lo requiera el oftalmólogo.

Por ejemplo, con el fin de establecer la efectividad de la terapia de combinación del antagonista PDGF y el antagonista VEGF para tratar la neovascularización ocular, se llevan a cabo estudios que involucran la administración bien sea de inyecciones intravítreas singulares o múltiples de un aptámero de PDGF-Ben combinación con un aptámero VEGF-A en pacientes que sufren de neovascularización coroidal subfoveal secundaria a la degeneración macular relacionada con la edad de acuerdo con métodos estándar bien conocidos en el arte oftalmológico. En un estudio de trabajo, pacientes con neovascularización coroidal subfoveal (CNV) secundaria con la degeneración macular relacionada con la edad (ARM) reciben una inyección intravítrea individual de un aptámero de PDGF-B y un aptámero VEGF-A. La efectividad de la combinación se monitorea, por ejemplo, mediante evaluación oftálmica. Los pacientes que muestran una visión estable o mejorada tres veces después del tratamiento, por ejemplo, que demuestran un mejoramiento en tres líneas o superior en la visión de la gráfica ETDRS, se toman como receptores de una combinación de dosificación efectiva del aptámero PDGF-B y del aptámero VEGF-A que suprime un trastorno neovascular ocular.

En un estudio de trabajo de ejemplo, los pacientes con CNV subfoveal secundaria a la generación macular relacionada con la edad y con una agudeza visual pero de 20/200 en la gráfica ETDRS reciben una inyección intravítrea individual del aptámero de PDGF-B y del aptámero de VEGF-A. La dosis de partida es 0.25 mg de cada antagonista inyectada una vez por vía intravítrea. Se prueban también dosificaciones de 0.5 mg, 1, 2 mg y 3 mg de cada antagonista. También se lleva a cabo un examen oftálmico completo con fotografía de fondo y angiografía con fluoresceína. El producto farmacéutico de combinación es una solución estéril lista para el uso, compuesta del aptámero PDGF-B y el aptámero VEGF-A disueltos en fosfato de sodio 10 mm e inyección de regulador de cloruro de sodio 0.9% en un cilindro de jeringa de cuerpo de vidrio de 1 cc libre de pirógenos, con un tapón recubierto unido a un pistón plástico y una tapa de goma final sobre la aguja de calibre 27 preconectada. Los aptámeros de PDGF-B y VEGF-A se suministran en concentraciones de fármaco de 1 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 10 mg/ml o 30 mg/ml para cada aptámero (expresado como contenido de oligonucleótidos) para proveer un volumen de administración de 100 µl. Aproximadamente 3 meses después de la inyección de los aptámeros de PDGF-B y VEGF-A, se llevan a cabo estudios de agudeza para evaluar la efectividad del tratamiento. Los pacientes que muestran visión estable o mejorada después del tratamiento, por ejemplo, aquellos que muestran un incremento de 3 líneas o mayor en visión sobre la gráfica ETDRS, se toman como receptores de una combinación de dosificación efectiva de los aptámeros de PDGF-B y VEGF-A que suprime un trastorno neovascular ocular.

Ejemplo

Los siguientes ejemplos ilustran ciertos modos de realizar y poner en práctica la presente invención

Ejemplo 1: neovascularización de la córnea (NV de la córnea)

La neovascularización de la córnea es un modelo animal ampliamente usado que permite clarificar la visualización de un crecimiento vascular anormal en el ojo. Los vasos que crecen en la córnea normalmente avascular pueden establecerse bien, haciendo este un modelo atractivo para estudiar la regresión de los vasos. Para inducir NV en córnea experimental, se anestesiaron ratones macho C57BL/6 (18 - 20 g; Charles River, Wilmington, MA) econ clorhidrato de cetamina intramuscular (25 mg/kg) y xilaxina (10 mg/kg). Se aplicó tópicamente NaOH (2 µl de 0.2 mM). Los epitelios de la córnea y del limbo fueron removidos aplicando un movimiento rotatorio paralelo al limbo utilizando una cuchilla #21 (Feather, Osaka, Japan). Después de 7 días, los ratones fueron tratados con inyecciones intraperitoneales de 25 mg/kg de pegaptanib sodio (Macugen™ (Eyetechnopharmaceuticals. New York, NY), y un agente anti-VEGF aptámero también conocido como EYE001) dos veces al día o por administración oral de 50 mg/kg de Gleevec® 4-[(4-metilpiperazina-1-il)metil]-N-[4-metil-3-[(4-piridina-3-ilpirimidina-2-il)amino]fenil]-benzamida (imatinib) ((también conocida como CGP57148B) un inhibidor de tirosina quinasa relacionado con 2-fenilaminopirimidina anti-PDGF de Novartis Pharma AG, Basel, Suiza) por ingestión dos veces al día o también durante 7 días. En el día 14 después de la inducción del NV de la córnea, los ratones recibieron 20 µg/g de concanavalina A lictina acoplada con fluoresceína-isotiocianato (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por vía intravenosa mientras se anestesiaban profundamente con clorhidrato de xilaxina y clorhidrato de cetamina. Treinta minutos después, fueron enucleados los ojos de los ratones y las córneas fueron montadas en disposición plana. Se visualizó la NV de la córnea utilizando microscopía de fluorescencia y se cuantificó utilizando el software Openlab. El porcentaje de córnea cubierta por vasos fue calculado como un porcentaje del área total de la córnea.

Se investigaron los efectos del pegaptanib sodio y Gleevec sodio sobre la neovascularización de la córnea después de la aplicación de NaOH y la lesión de la epitelia del limbus. Los animales tratados con pegaptanib sodio (Macugen)

mostraron un descenso de 19.6% ($p = 0.0014$) en el crecimiento de vasos en comparación con ojos no tratados y tratados con Gleevec (Figura 5). Los animales tratados con pegaptanib sodio y Gleevec (Mac + Glee) exhibieron significativamente menor crecimiento vascular sobre la córnea ($35.6\% p < 0.0001$) en comparación con los controles y animales tratados con Gleevec solo (Figura 5). El tratamiento por combinación también fue más efectivo que el

Los resultados de los experimentos de neovascularización en córnea representativo se muestran también en las Figuras 6 y 5. La Figura 6 (D) es una representación fotográfica de una imagen microscópica fluorescente que muestra la inhibición efectiva de la formación de nuevos vasos sanguíneos en córneas tratadas por combinación (Mac + Gleevec), en comparación con tratamientos individuales con Macugen (Figura 6 (C)) o Gleevec (Figura 6 (B)). La Figura 6 (A) es una representación fotográfica de una imagen microscópica con fluorescencia que muestra el grado de neovascularización en una córnea de control (tratada con PEG). La Figura 7 es una representación fotográfica de una imagen microscópica con fluorescencia que muestra que los tratamientos individual (7 (A) (tratados con la PBS) y Figura (B) (tratamiento con Gleevec)) y los tratamientos combinados (Figura 7 (C)) inhibieron solamente el crecimiento de vasos nuevos y no afectaron los vasos sanguíneos ya establecidos. La Figura 7 (D) es una representación fotográfica de una imagen microscópica con fluorescencia que muestra el grado de neovascularización en una córnea de control (tratada con PEG).

Ejemplo 2: neovascularización coroidal (CNV)

La CNV experimental se utiliza constantemente como modelo para degeneración macular relacionada con la edad (AMD). En este modelo, los vasos del corioide crecen a través de rupturas en la membrana de Bruch y en la retina, similares a lo que se observa en los pacientes con AMD. Para inducir CNV experimental, se anestesiaron C57BL/6 (18 - 20 g; Charles River, Wilmington, MA) con clorhidrato de cetamida intermuscular (25 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) y las pupilas se dilataron con tropicamida al 1%. Se generaron 4 quemaduras utilizando fotocoagulación por láser de diodos (tamaño de punto 75 μm , duración 0.1 segundos, 90 mW, láser Oculight SL, y IRIDEX, Mountain View, CA) y con una cubierta sostenida con la mano como lente de contacto. Quemaduras localizadas en las posiciones 3, 6, 9 y 12 horas del límite posterior de la retina. La producción de una burbuja en el momento del láser, lo que indica la ruptura de la membrana de Bruch es un factor importante en la obtención de la neovascularización coroidal, de tal manera que solo los ratones en los cuales se produjo burbuja para todas las cuatro quemaduras fueron incluidos en el estudio. Después de 7 días, los ratones tratados con inyecciones intraperitoneales de 25 mg/kg de pegaptanib sodio dos veces al día o 50 mg/kg de Gleevec®/STI57 (Novartis Pharma AG, Basilea, Suiza) por ingestión dos veces al día o ambos durante 7 días. En experimentos que utilizaban APB5 (un anticuerpo de PDGFRb (CD140b) antirratón (agente anti-PDGF) de eBioscience, San Diego, CA), 5 mg/kg de anticuerpo fueron administrados utilizando inyecciones intraperitoneales dos veces al día. El área de las lesiones coroidales NV fue medida en un corioide montaje plano teñido con PSAM. Los montajes en plano fueron examinados por microscopía con fluorescencia y cuantificados utilizando el software Openlab.

Los ojos tratados con pegaptanib sodio (Macugen™) mostraron un 24% ($p = 0.007$) de descenso en el área de CNV en comparación con los controles no tratado (Figura 8). En contraste, los ojos tratados con APBS no fueron significativamente diferentes de los controles (6.5% de descenso en el área de CNV en comparación con el control). Los ojos tratados tanto con pegaptanib sodio como con APB5 mostraron un área de CNV significativamente menos ($46\% p = 0.001$) en comparación con los ojos de control o con ojos tratados bien sea pegaptanib sodio ($22\% p = 0.0011$) o APB5 ($39.5\% p < 0.0001$) solos (Figura 8).

Se observó una tendencia similar cuando se utiliza el inhibidor PDGFR β . Los ojos tratados con Gleevec® no mostraron una diferencia significativa con los ojos de control (4.2%) (Figura 9). El área de CNV en ojos tratados con pegaptanib sodio (Macugen™), sin embargo, era significativamente diferentes a los de los controles (27% menos $p = 0.0034$). De forma importante, los animales tratados con pegaptanib sodio y Gleevec (Macugen + Gleevec) exhibieron la menor cantidad CNV ($46\% p < 0.0001$) en comparación con ojos de control y un descenso del 19% en el área de CNV en comparación con los ojos tratados solamente con pegaptanib sodio ($p = 0.0407$) (Figura 9).

Ejemplo 3: modelo de ratones neonatos

El efecto de administrar pegaptanib sodio (Macugen™) y ARC-127 (Archemix Corp., Cambridge, MA), se investigó un aptámero anti-PDGF PEGilado, que tiene la secuencia CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT (SEQ ID NO: 23, que corresponde a SEQ ID NO: 146 de la Patente de los Estados Unidos No. 6.582.918) que tiene 2'-fluoro-2'-desoxiuridina en las posiciones 6, 20 y 30, 2'-fluoro-2'-desoxicidina en las posiciones 8, 21, 28, y 29, 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina en las posiciones 9, 15, 17, y 31, 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina en la posición 22, "N" en las posiciones 10 y 23 de una hexaetilen glicol fosforamida, y una orientación invertida T (esto es, enlazada 3'-3') en la posición 32, o ambas sobre los vasos en desarrollo de la retina. Se inyectaron diariamente ratones neonatos C57BL/6 (en la cavidad intraperitoneal) con 100 μg de ARC-127 d 100 μg de Macugen o ambos, partiendo en el día postnatal 0 (PO). Los ojos de los ratones fueron enucleados en P4. Se visualizó la vasculatura retinal en retinas montadas en plano por inmunotinción con PECAM y NG-2 o por perfusión con ConA-FITC y se analizaron por microscopía de fluorescencia.

La inyección de ARC-127 bloqueó completamente el reclutamiento de células murales en los vasos en desarrollo de la retina. Además, se observó menos crecimiento de vasos en P4 en comparación con las retinas de control no tratadas. En contraste, el Macugen no interfirió con el desarrollo normal de los vasos sanguíneos. Sin embargo, los ratones tratados tanto con Macugen como con ARC-127 exhibieron efector similares pero significativamente más severos que los ratones tratados con ARC-127 solos.

Estos resultados, representados en la Figura 10, muestran que el Macugen no tiene efectos sobre los vasos sanguíneos de la retina en desarrollo. El antagonista de PDGFR-B ARC-127 afecta el crecimiento hacia fuera y la morfología de los vasos. Sin embargo, el Macugen en combinación con ARC-127 afecta los vasos sanguíneos más severamente que cualquiera de ellos solo.

Ejemplo 4: terapia de combinación con aptámero anti-PDGF y anticuerpo anti-VEGF

En este ejemplo, se demuestra la efectividad de una terapia de combinación utilizando aptámeros anti-PDGF y un anticuerpo anti-VEGF utilizando el modelo de neovascularización de córnea descrito anteriormente. Para inducir la NV en córnea experimental, se anestesiaron ratones machos C57BL/6 (18 - 20 g; Charles River, Wilmington, MA) con clorhidrato de cetamina intramuscular (25 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg), se aplicó NaOH (2 µl de 0.2 mM) tópicamente. Los epitelios de la córnea y del limbo se retiran aplicando un movimiento rotatorio paralelo al limbo utilizando cuchilla #21 (Feather, Osaka, Japón). Después de 7 días, los ratones se tratan con inyecciones intraperitoneales de 25 mg/kg de un aptámero anti-PDGF que tiene la estructura de 40 Kd PEG-5'-CAG-GCTACGCGTAG-AGCATCATGATCCTG(iT)-3' (en la cual iT representa que el nucleótido final está en la orientación invertida (enlazado 3'-3')) en combinación con 100 µg del anticuerpo anti-VEGF 2C3 descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 6.342.221. En el día 14 después de la inducción NV de la córnea los ratones recibieron 20 µg/g de concanavalina A lectina acopada con fluoresceína-isotiocianato (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por vía intravenosa mientras que se anestesiaron profundamente con clorhidrato de xilazina y clorhidrato de cetamina. Treinta minutos después, los ojos de los ratones fueron enucleados, y las córneas se montaron en plano. La NV de la córnea se visualiza utilizando microscopía de fluorescencia y se cuantifica utilizando el software Openlab. El porcentaje de córnea cubierto por vasos se calcula como porcentaje del área de córnea total. Los resultados demuestran la eficacia de la terapia de combinación sobre tratamientos individuales con el aptámero anti-PDGF o el anticuerpo anti-VEGF solos.

En experimentos separados, los efectos de los dos aptámeros anti-PDGF fueron probados en combinación con 100 µg del anticuerpo anti-VEGF 2C3 descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 6.342.221. Las versiones PEGiladas y no PEGiladas de los siguientes dos aptámeros anti-PDGF se prueban: (i) CAG-GCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT (SEQ ID NO: 23, la cual corresponde a SEQ ID NO: 146 de la Patente de los Estados Unidos No. 6.562.918) que tiene 2'-fluoro-2'-desoxiuridina en las posiciones 6, 20 y 30, 2'-fluoro-2'-desoxicitidina en las posiciones 8, 21, 28, y 29, 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina en las posiciones 9, 15, 17, y 31, 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina en la posición 22, "N" en las posiciones 10 y 23 de una hexaetilen glicol fosforamidita, y una orientación invertida T (esto es, enlazada 3'-3') en la posición 32; y (ii) CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT (véase SEQ ID NO: 87 de la Patente de los Estados Unidos No. 5.723.594) que tiene O-metil-2-desoxicitidina en C en la posición 8, 2-O-metil-2-desoxiguanosina en Gs en las posiciones 9, 17 y 31, 2-O-metil-2-desoxiadenina en A en la posición 22, 2-O-metil-2-desoxiuridina en la posición 30, 2-fluoro-2-desoxiuridina en U en las posiciones 6 y 20, 2-fluoro-2-desoxicitidina en C en las posiciones 21, 28 y 29, un espaciador de pentaetilen glicol fosforoamidita en N en las posiciones 10 y 23, y una orientación invertida T (esto es, enlazada 3'-3') en la posición 32. Se proveen controles adecuados para detectar en efecto antineovascular mejorado de la terapia de combinación sobre los tratamientos con el aptámero anti-PDGF o el anticuerpo anti-VEGF. Los resultados demuestran la eficacia de la terapia de combinación con respecto a los tratamientos individuales con el aptámero anti-PDGF o el anticuerpo anti-VEGF solos.

Ejemplo 5: la combinación del aptámero anti-PDGF y el aptámero anti-VEGF bloquea la neovascularización coroidal (CNV)

En este ejemplo, se demuestra la efectividad de una terapia de combinación que utiliza aptámeros anti-PDGF y aptámeros anti-VEGF en el bloqueo de la neovascularización coroidal usando el modelo de neovascularización coroidal descrito anteriormente. La CNV experimental se utiliza frecuentemente con un modelo para la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). En este modelo, los vasos del coroides crecen a través de rupturas en la membrana Bruch y hacia la retina, similar a lo que se observa en los pacientes con AMD. Para inducir CNV experimental, se anestesiaron ratones machos C37BL/6 (18 - 20 g; Charles River, Wilmington, MA) con clorhidrato de cetamina (25 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) intramusculares y las pupilas se dilatan con tropicamida al 1%. Se generan 4 quemaduras utilizando fotocoagulación por láser de diodos (tamaño de puntos 75 µm, duración 0.1 segundos, 90 mW, láser Oculight SL, IRIDEX, Mountain View, CA) y una cubierta sostenida con la mano como lente de contacto. Las quemaduras se localizaron en las posiciones 3, 6, 9 y 12 horas del límite posterior de la retina. De la producción de una burbuja en momento del láser, lo cual indica la ruptura de la membrana de Bruch, es un factor importante en la obtención de la neovascularización coroidal, de tal manera que solamente los ratones en los cuales se produjo una burbuja para todas las 4 quemaduras se incluyen en el estudio. Después de 7 días, los ratones se

tratan con inyecciones intraperitoneales de 25 mg/kg de pegaptinib sodio dos veces al día. En los experimentos que utilizaron el aptámero anti-PDGF, se coadministran 25 mg/kg del aptámero anti-PDGF que tiene la estructura de 40 Kd PEG-5'-CAGGCTACGCGTAGAGCATCATGATCCTG(iT)-3' (en la cual iT representa que el nucleótido final está en la orientación invertida (enlazado 3'-3')) con pegaptanib sodio. El área de las lesiones NV coroidales se mide en un corioide montado en plano teñido con PECAM. Los montajes en plano se examina por microscopía de fluorescencia y se cuantifican utilizando software Openlab. Los resultados demuestran que los ojos tratados con la terapia de combinación muestran significativamente menor área de CNV en comparación con los ojos de control o con ojos tratados con pegaptanib sodio o con el aptámero anti-PDGF solo.

En experimentos separados, se probaron los efectos de 2 aptámeros anti-PDGF relacionados en combinación con el tratamiento anti-VEGF por inyecciones intraperitoneales de 25 mg/kg de pegaptinib sodio dos veces al día. Se probaron versiones PEGiladas y no PEGiladas de los siguientes dos aptámeros anti-PDGF: (i) CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT (SEQ ID NO: 23, la cual corresponde a SEQ ID NO: 146 de la Patente de los Estados Unidos No. 6.582.918) que tiene 2'-fluoro-2'-desoxiuridina en las posiciones 6, 20 y 30, 2'-fluoro-2'-desoxicitidina en las posiciones 8, 21, 28, y 29, 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina en las posiciones 9, 15, 17, y 31, 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina en la posición 22, "N" en las posiciones 10 y 23 de una hexaetilen glicol fosforamidita, y una orientación invertida T (esto es, enlazada 3'-3') en la posición 32; y (ii) CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT (véase SEQ ID NO: 87 de la Patente de los Estados Unidos No. 5.723.594) que tiene O-metil-2-desoxicitidina en C en la posición 8, 2-O-metil-2-desoxiguanosina en Gs en las posiciones 9, 17 y 31, 2-O-metil-2-desoxiadenina en A en la posición 22, 2-O-metil-2-desoxiuridina en la posición 30, 2-fluoro-2-desoxiuridina en U en las posiciones 6 y 20, 2-fluoro-2-desoxicitidina en C en las posiciones 21, 28 y 29, un espaciador de pentaetilen glicol fosforamidita en N en las posiciones 10 y 23, y una orientación invertida T (esto es, enlazada 3'-3') en la posición 32. Se proveen controles apropiados para detectar el efecto antineovascular mejorado de la terapia de combinación sobre los tratamientos individuales con el aptámero anti-PDGF o aptámero anti-VEGF. Los resultados demuestran la eficacia de la terapia de combinación en el bloqueo de la neovascularización coroidal con respecto a los tratamientos individuales con cualesquiera de los aptámeros anti-PDGF o el aptámero anti-VEGF solos.

Ejemplo 6: Regresión de la neovascularización de la córnea (NV de córnea)

El modelo de NV de córnea del Ejemplo 1 fue usado para investigar la combinación de un aptámero anti-VEGF y un aptámero anti-PDGF. Después de 10 días, los ratones fueron tratados con inyecciones intraperitoneales de 25 mg/kg de pegaptanib sodio (Macugen™, Eyetech Pharmaceutical, New York, NY), un agente aptámero anti-VEGF, dos veces al día y/o de 50 mg/kg de ARC-127 (Archemix Corp., Cambridge, MA) un aptámero anti-PDGF que tiene la estructura de 40Kd PEG-5'-CAGGCTACGCGTAGAGCATCAT-GA-TCCTG(iT)-3' (en el cual iT representa que el nucleótido final está en la orientación invertida (enlazado 3'-3')) una vez al día durante 10 días. En el día 20 después de la inducción del NV de la córnea, se enuclearon los ojos, y las córneas se montaron en plano. El NV de córnea fue visualizado utilizando tinción CD31 (BD Biosciencie Pharmingen, San Diego, CA) y se cuantificó utilizando software Metamorph. El porcentaje de córnea recubierto por vasos fue calculado como porcentaje del área total de la córnea.

Los efectos del pegaptanib sodio y/o ARC-127 en la regresión de la neovascularización de la córnea después de la aplicación de NaOH y la lesión de las epiteilas del limbo y la córnea se presenta en las Figuras 11 y 12. Los animales tratados con ARC-127 no mostraron un descenso significativo en el crecimiento de vasos en comparación con el control en el día 20. Los controles en el día 20 mostraron un incremento del 12.92% en la neovascularización de la córnea en comparación con los controles a 10 días. Los animales tratados con pegaptanib sodio (Macugen) solo mostraron un 13.81% ($p \leq 0.016$) como descenso en el crecimiento de vasos en comparación con los controles a 20 días. Los animales tratados con pegaptanib sodio y ARC-127 exhibieron un crecimiento neovascular significativamente menor sobre la córnea (26.85%, $p \leq 0.002$) en comparación con el control.

Ejemplo 7: regresión de la neovascularización de la córnea (NV de córnea)

El modelo NV de córnea del Ejemplo 1 fue utilizado para investigar la combinación de un aptámero anti-VEGF y un anticuerpo contra el receptor PDGFB. Después de 14 días, los ratones fueron tratados con inyecciones intraperitoneales de 25 mg/kg de pegaptanib sodio (Macugen, como un agente aptámero anti-VEGF) dos veces al día y/o por administración oral de 50 mg/kg de APB5 (un anticuerpo policlonal contra el receptor de PDGFB) por ingestión dos veces al día durante 14 días. En el día 28 después de la inducción de NV de la córnea, los ratones recibieron 20 µg/g de concavalina A lectina acoplada con isotiocianato de fluoresceína (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por vía intravenosa mientras eran anestesiados profundamente con clorhidrato de xilazina y clorhidrato de cetamina. Treinta minutos después, los ojos de los ratones fueron enucleados, y las córneas se montaron en plano. El NV de córnea fue visualizado utilizando microscopía de fluorescencia y cuantificado utilizando el software Openlab. El porcentaje de córnea cubierto por vasos fue calculado como porcentaje del área de córnea total.

Los efectos del pegaptanib sodio y/o APB5 sobre la regresión de la neovascularización de la córnea después de la aplicación de NaOH y de la lesión a las epiteilas del limbo y la córnea se representan en la Figura 13. Los animales

tratados con pegaptanib sodio (Macugen) muestran un descenso de 8.3% en el crecimiento de vasos en comparación con los animales de control tratados con pegaptanib sodio en comparación con el control. Los animales tratados con pegaptanib sodio y APB5 exhibieron un crecimiento neovascular significativamente menor sobre la córnea (21.4%) en comparación con el control.

5

Ejemplo 8: regresión de la neovascularización en córnea (NV de córnea) (orden de adición del agente terapéutico)

El modelo NV de córnea del Ejemplo 1 fue utilizado para investigar el efecto del orden de adición de la terapia de combinación utilizando un aptámero anti-VEGF y un anticuerpo contra el receptor de PDGFB. Después de 14 días, los ratones fueron tratados con inyecciones intraperitoneales de 25 mg/kg de pegaptanib sodio (Macugen, un agente aptámero anti-VEGF) dos veces al día durante un día y/o por administración oral d 50 mg/kg de APB5 (eBioscience, San Diego, CA), un anticuerpo policlonal contra el receptor de PDGFB, por ingestión, dos veces al día durante 7 días en puntos de tiempo diferentes. En el día 28 después de la inducción de NV de la córnea, los ratones recibieron 20 µg/g de concavalina A lectina acoplada con isotiocianato de fluoresceína (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por vía intravenosa mientras eran anestesiados profundamente con clorhidrato de xilazina y clorhidrato de cetamina. Treinta minutos después, los ojos de los ratones fueron enucleados, y las córneas fueron montadas en plano. Se visualizó el NV de la córnea utilizando la microscopía de fluorescencia y se cuantificó utilizando el software Openlab. El porcentaje de córnea cubierto por vasos fue calculado como porcentaje del área total de córnea y los resultados se representan en la Figura 14.

10

15

20

Los efectos de pegaptanib sodio solo desde el día 21 - 28 o APB5 solo desde el día 14 - 21 seguidos por ausencia de tratamiento mostraron un efecto pequeño en comparación con el control sobre la regresión de la neovascularización de la córnea después de la aplicación de NaOH y la lesión a los epitelios del limbo y córnea. Los animales tratados con APB5 desde el día 14 - 21 y pegaptanib sodio desde el día 21 - 28 exhibieron menor crecimiento neovascular sobre la córnea (13.4%) en comparación con el control.

25

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de un antagonista de PDGF y un antagonista de VEGF para uso en un método para el tratamiento o prevención de un trastorno neovascular ocular, donde el antagonista de PDGF es 4-[(4-metilpiperazina-1-il)metil]-N-[4-metil-3-[(4-piridina-3-ilpirimidina-2-il)amino]fenil]benzamida (imatinib), y el antagonista de VEGF es pegaptanib o una sal del mismo, en donde el antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF son para administración simultánea o secuencial.
2. Una combinación de un antagonista de PDGF y un antagonista de VEGF para uso en un método para el tratamiento o prevención de un trastorno neovascular ocular, en donde el antagonista de PDGF es un anticuerpo anti-PDGF o un tratamiento de enlazamiento del mismo, y el antagonista de VEGF es pegaptanib o una sal del mismo, en donde el antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF son para administración simultánea o secuencial.
3. Una combinación de un antagonista de PDGF y un antagonista de VEGF para uso en un método para el tratamiento o prevención de un trastorno neovascular ocular, en donde el antagonista de PDGF es un aptámero anti-PDGF PEGilado o no PEGilado que tiene la secuencia CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT, en donde las posiciones 6, 20 y 30 son 2'-fluoro-2'-desoxiuridina, las posiciones 8, 21, 28 y 29 son 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, las posiciones 9, 15, 17 y 31 son 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina, la posición 22 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina, "N" en las posiciones 10 y 23 es de hexaetilen glicol fosforamidita y la posición 32 está enlazada 3'-3', o un aptámero anti-PDGF pegilado o no pegilado que tiene la secuencia CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT, en donde la posición 8 es O-metil-2-desoxicitidina, las posiciones 9, 17 y 31 son 2-O-metil-2-desoxiguanosina, la posición 22 es 2-O-metil-2-desoxiadenina, la posición 30 es 2-O-metil-2-desoxiuridina, las posiciones 6 y 20 son 2-fluoro-2-desoxiuridina, las posiciones 21, 28 y 29 son 2-fluoro-2-desoxicitidina, "N" en las posiciones 10 y 23 es un espaciador de pentaetilenglicol y la posición 32 está enlazada 3'-3', y el antagonista de VEGF es pegaptanib o una sal del mismo, en donde el antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF son para administración simultánea, separada o secuencial.
4. Una combinación de un antagonista de PDGF y un antagonista de VEGF para uso en un método para el tratamiento o prevención de un trastorno neovascular ocular, en donde el antagonista de PDGF es un aptámero anti-PDGF pegilado o no pegilado que tiene la secuencia CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT, en donde las posiciones 6, 20 y 30 son 2'-fluoro-2'-desoxyuridina, las posiciones 8, 21, 28 y 29 son 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, las posiciones 9, 15, 17 y 31 son 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina, la posición 22 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina, "N" en las posiciones 10 y 23 es de hexaetilen glicol fosforamidita y la posición 32 está enlazada 3'-3', o un aptámero anti-PDGF pegilado o no pegilado que tiene la secuencia CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT, en donde la posición 8 es O-metil-2-desoxicitidina, las posiciones 9, 17 y 31 son 2-O-metil-2-desoxiguanosina, la posición 22 es 2-O-metil-2-desoxiadenina, la posición 30 es 2-O-metil-2-desoxiuridina, las posiciones 6 y 20 son 2-fluoro-2-desoxiuridina, las posiciones 21, 28 y 29 son 2-fluoro-2-desoxicitidina, "N" en las posiciones 10 y 23 es un espaciador de pentaetilen glicol y la posición 32 está enlazada 3'-3', y el antagonista de VEGF es un anticuerpo o fragmento de enlazamiento del mismo, en donde el antagonista de PDGF y el antagonistas de VEGF son para administración simultánea, separada o secuencial.
5. Una combinación de un antagonista de PDGF y un antagonista de VEGF para uso en un método para el tratamiento o prevención de un trastorno neovascular ocular, en donde el antagonista de PDGF es un aptámero anti-PDGF peligado que tiene la secuencia CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT, en donde las posiciones 6, 20 y 30 son 2'-fluoro-2'-desoxiuridina, las posiciones 8, 21, 28 y 29 are 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, las posiciones 9, 15, 17 y 31 son 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina, la posición 22 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina, "N" en las posiciones 10 y 23 es de hexaetilenglicol fosforamidita y la posición 32 está enlazada 3'-3', y el antagonista de VEGF es un anticuerpo o fragmento de enlazamiento del mismo, el antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF son para administración simultánea, separada o secuencial.
6. La combinación del antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF para uso en un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 las cuales son formuladas separadamente como medicamentos, en donde los antagonistas se definen como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. La combinación del antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF para uso en un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 las cuales están formuladas en un medicamento individual, en donde los antagonistas son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
8. La combinación del antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF para uso en un método de cualquiera de las reivindicaciones 2, 6 o 7, en donde el antagonista de PDGF es un anticuerpo anti-PDGF-B o un fragmento de enlazamiento del mismo.

9. La combinación del antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF para uso en un método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde el antagonista de VEGF es un anticuerpo anti-VEGF-A o un fragmento de enlazamiento del mismo.
- 5 10. La combinación del antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF para uso en un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o 6 a 8, en donde el antagonista de VEGF es pegaptanib sodio.
- 10 11. La combinación del antagonista de PDGF y el antagonista de VEGF para uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el trastorno neovascular ocular es retinopatía esquémica, neovascularización del iris, neovascularización intraocular, degeneración macular relacionada con la edad, neovascularización de la córnea, neovascularización de la retina, neovascularización coroidal, isquemia retinal diabética o retinopatía diabética proliferativa.
- 15 12. Una combinación de un antagonista de PGF y un antagonista de VEGF para uso en un método para el tratamiento o prevención de un trastorno neovascular ocular, en donde el antagonista de PDGF es un anticuerpo o un fragmento de enlazamiento del mismo y el antagonista de VEGF es un anticuerpo o un fragmento de enlazamiento del mismo.

Figura 1 (A) Secuencia de ácido nucléico de PDGF-B (GenBank Accession No. X02811) (SEQ ID NO: 1)

1 CCCTGCCTGC CTCCTGCGC ACCCGCAGCC TCCCCGCTG CCTCCCTAGG GTCCCCCTCC
 61 GGCCGCCAGC GCCCATT TTTT CATTCCCTAG ATAGAGATAC TTTGCGGGCA CACACATACA
 121 TACGCGCGCA AAAAGGAAAA AAAAAAAAAA AAGCCCACCC TCCAGCCTCG CTGCAAAGAG
 181 AAAACCGGAG CAGCCGCAGC TCGCAGCTCG CAGCCCGCAG CCCGCAGAGG ACGCCCAGAG
 241 CGGCGAGCGG GCGGGCAGAC GGACCGACGG ACTCGCGCCG CGTCCACCTG TCGGCCGGGC
 301 CCAGCCGAGC GCGCAGCGGG CACGCCGCGC GCGCGGAGCA GCCGTGCCCG CCGCCCGGGC
 361 CCGCCGCCAG GCGGCACACG CTCCCGCCCC CCTACCCGGC CCGGGCGGGA GTTTGCACCT
 421 CTCCTGCCC GGGTGCTCGA GCTGCCGTTG CAAAGCCAAC TTTGGAAAAA GTTTTTTGGG
 481 GGAGACTTGG GCCTTGAGGT GCCCAGCTCC GCGCTTTCCG ATTTTGGGGG CCTTTCCAGA
 541 AAATGTTGCA AAAAAGCTAA GCCGGCGGGC AGAGGAAAAC GCCTGTAGCC GCGGAGTGAA
 601 GACGAACCAT CGACTGCCGT GTTCCTTTTC CTCTTGAGG TTGGAGTCCC CTGGGCGCCC
 661 CCACACGGCT AGACGCCTCG GCTGGTTCGC GACGCAGCCC CCCGGCCGTG GATGCTGCAC
 721 TCGGGCTCGG GATCCGCCA GGTAGCGGCC TCGGACCCAG GTCCTGCGCC CAGGTCTCC
 781 CCTGCCCCCC AGCGACGGAG CCGGGGCCGG GGGCGGCGGC GCCGGGGCA TCGGGTQAG
 841 CCGCGGCTGC AGAGGCCTGA GCGCCTGATC GCCGCGGACC CGAGCCGAGC CCACCCCCCT
 901 CCCCAGCCCC CCACCTGGC CGCGGGGGCG GCGCGCTCGA TCTACGCGTT CGGGGCCCCG
 961 CGGGGCCGGG CCCGGAGTCG GCATGAATCG CTGCTGGGCG CTCTTCTGT CTCTCTGCTG
 1021 CTACCTGCGT CTGGTCAGCG CCGAGGGGGA CCCCATTCCT GAGGAGCTTT ATGAGATGCT
 1081 GAGTGACCAC TCGATCCGCT CCTTTGATGA TCTCCAACGC CTGCTGCACG GAGACCCCGG
 1141 AGAGGAAGAT GGGGCCGAGT TGGACCTGAA CATGACCCGC TCCACTCTG GAGGCGAGCT
 1201 GGAGAGCTTG GCTCGTGAA GAAGGAGCCT GGGTTCCTG ACCATTGCTG AGCCGGCCAT
 1261 GATCGCCGAG TGCAAGACGC GCACCGAGGT GTTCGAGATC TCCCGGCGCC TCATAGACCG
 1321 CACCAACGCC AACTTCTTGG TGTGGCCGCC CTGTGTGGAG GTGCAGCGCT GCTCCGGCTG
 1381 CTGCAACAAC CGCAACGTGC AGTGCCGCCC CACCCAGGTG CAGCTGCGAC CTGTCCAGGT

1441 GAGAAAGATC GAGATTGTGC GGAAGAAGCC AATCTTTAAG AAGGCCACGG TGACGCTGGA
1501 AGACCACCTG GCATGCAAGT GTGAGACAGT GGCAGCTGCA CGGCCTGTGA CCCGAAGCCC
1561 GGGGGGTTCC CAGGAGCAGC GAGCCAAAAC GCCCCAAACT CGGGTGACCA TTCGGACGGT
1621 GCGAGTCCGC CGGCCCCCCA AGGGCAAGCA CCGGAAATTC AAGCACACGC ATGACAAGAC
1681 GGC ACTGAAG GAGACCCTTG GAGCCTAGGG GCATCGGCAG GAGAGTGTGT GGGCAGGGTT
1741 ATTTAATATG GTATTTGCTG TATTGCCCC ATGGGGCCTT GGAGTAGATA ATATTGTTTC
1801 CCTCGTCCGT CTGTCTCGAT GCCTGATTCG GACGGCCAAT GGTGCCTCCC CCACCCCTCC
1861 ACGTGTCCGT CCACCCCTCC ATCAGCGGGT CTCCTCCCAG CGGCCTCCGG CTCTTGCCCA
1921 GCAGCTCAAG AAGAAAAGA AGGACTGAAC TCCATCGCCA TCTTCTTCCC TTA ACTCAA
1981 GAACTGGGA TAAGAGTGTG AGAGAGACTG ATGGGGTCGC TCTTTGGGGG AACGGGTTTC
2041 CTTCCCTGC ACCTGGCCTG GGCCACACCT GAGCGCTGTG GACTGTCCTG AGGAGCCCTG
2101 AGGACCTCTC AGCATAGCCT GCCTGATCCC TGAACCC

Figura 1 (B) Secuencia de péptido de PGE-B (GenBank Accession No. CAA26579) (SEQ ID NO: 2)

1 MNRCWALFLS LCCYLRLVSA EGDPIPEELY EMLSDHSIRS FDDLQRLHGG DPGEDGAEL
61 DLNMTRSHSG GELESLARGR RSLGSLTIAE PAMIAECKTR TEVFEISRRL IDRTNANFLV
121 WPPCVEVQRC SGCCNRRNVQ CRPTQVQLRP VQVRKIEIVR KKPIFKKATV TLEDHLACKC
181 ETVAAARFVT RSPGGSQEQR AKTPQTRVTI RTVRVRRPPK GKHRKFKHTH DKTALKETLG
241 A

5

Figura 1(C) Secuencia de ácido nucleico de PDGF-A (GenBank Accession No. X06374) (SEQ ID NO: 11)

1 TTCTTGGGGC TGATGTCCGC AAATATGCAG AATTACCGGC CGGGTCGCTC CTGAAGCCAG
 61 CGCGGGGAGC GAGCGCGGCG GCGCCAGCA CCGGGAACGC ACCGAGGAAG AAGCCCAGCC
 121 CCCGCCCTCC GCCCCTCCG TCCCACCCC CTACCCGGCG GCCCAGGAGG CTCCCCGGCT
 181 GCGGCGCGCA CTCCTGTTT CTCCTCCTCC TGGCTGGCGC TGCCTGCCTC TCCGCACTCA
 241 CTGCTCGCCG GCGCCGTCC GCCAGCTCCG TGCTCCCCGC GCCACCCTCC TCCGGGCCGC
 301 GCTCCCTAAG GGATGGTACT GAATTCGCC GCCACAGGAG ACCGGCTGGA GCGCCCGCCC
 361 CGCGCCTCGC CTCTCCTCCG AGCAGCCAGC GCCTCGGGAC GCGATGAGGA CCTTGGCTTG
 421 CCTGCTGCTC CTCGGCTGCG GATACCTCGC CCATGTTCTG GCCGAGGAAG CCGAGATCCC
 481 CCGCGAGGTG ATCGAGAGGC TGGCCCCGAG TCAGATCCAC AGCATCCGGG ACCTCCAGCG
 541 ACTCCTGGAG ATAGACTCCG TAGGGAGTGA GGATTCTTTG GACACCAGCC TGAGAGCTCA
 601 CGGGGTCCAC GCCACTAAGC ATGTGCCCGA GAAGCGGCCC CTGCCCATTC GGAGGAAGAG
 661 AAGCATCGAG GAAGCTGTCC CCGTGTCTG CAAGACCAGG ACGGTCATTT ACGAGATTCC
 721 TCGGAGTCAG GTCGACCCCA CGTCCGCCAA CTTCTGATC TGGCCCCCGT GCGTGGAGGT
 781 GAAACGCTGC ACCGGCTGCT GCAACACGAG CAGTGTC AAG TGCCAGCCCT CCCGCGTCCA
 841 CCACCGCAGC GTCAAGGTGG CCAAGGTGGA ATACGTCAGG AAGAAGCCAA AATTAAAAGA
 901 AGTCCAGGTG AGGTTAGAGG AGCATTGGA GTGCGCCTGC GCGACCACAA GCCTGAATCC
 961 GGATTATCGG GAAGAGGACA CGGATGTGAG GTGAGGATGA GCCGCAGCCC TTTCCTGGGA
 1021 CATGGATGTA CATGGCGTGT TACATTCCTG AACCTACTAT GTACGGTGCT TTATTGCCAG
 1081 TGTGCGGTCT TTGTTCTCCT CCGTGAAAA CTGTGTCCGA GAACACTCGG GAGAACAAG

1141 AGACAGTGCA CATTGTGTTA ATGTGACATC AAAGCAAGTA TTGTAGCACT CGGTGAAGCA
 1201 GTAAGAAGCT TCCTTGTCOA AAAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAAAA CAAAACCACA
 1261 AATGACAAAA ACAAACGGGA CTCACAAAAA TATCTAAACT CGATGAGATG GAGGGTCGCC
 1321 CCGTGGGATG GAAGTGCAGA GGTCTCAGCA GACTGGATTT CTGTCCGGGT GGTCCACAGT
 1381 GCTTTTTTGC CGAGGATGCA GAGCCTGCTT TGGGAACGAC TCCAGAGGGG TGCTGGTGGG
 1441 CTCTGCAGGG CCCGCAGGAA GCAGGAATGT CTTGGAAACC GCCACGCGAA CTTTAGAAAC
 1501 CACACCTCCT CGCTGTAGTA TTTAAGCCCA TACAGAAACC TTCCTGAGAG CCTTAAGTGG
 1561 TTTTTTTTTT TGTPTTGTGTT TTGTTTTTTT TTTTTTTGTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT
 1621 TTACACCATA AAGTGATTAT TAAGCTTCCT TTTACTCTTT GGCTAGCTTT TTTTTTTTTT
 1681 TTTTTTTTTT TTTTTTTTAA TTATCTCTTG GATGACATTT ACACCGATAA CACACAGGCT
 1741 GCTGTAAC TG TCAGGACAGT GCGACGGTAT TTTTCCTAGC AAGATGCAAA CTAATGAGAT
 1801 GTATTAANAAT AAACATGGTA TACCTACCTA TGCATCATT CCTAAATGTT TCTGGCTTTG
 1861 TGTTTCTCCC TTACCCTGCT TTATTTGTTA ATTTAAGCCA TTTTGAAGA ACTATGCGTC
 1921 AACCAATCGT ACGCCGTCCC TGCGGCACCT GCCCCAGAGC CCGTTTGTGG CTGAGTGACA
 1981 ACTTGTTCCC CGCAGTGCAC ACCTAGAATG CTGTGTTCCC ACGCGGCACG TGAGATGCAT
 2041 TGCCGCTTCT GTCTGTGTTG TTGGTGTGCC CTGGTGCCGT GGTGGCGGTC ACTCCCTCTG
 2101 CTGCCAGTGT TTGGACAGAA CCCAAATCT TTATTTTTGG TAAGATATTG TGCTTTACCT
 2161 GTATTAACAG AAATGTGTGT GTGTGGTTG TTTTTTTGTA AAGGTGAAGT TTGTATGTTT
 2221 ACCTAATATT ACCTGTTTTG TATACCTGAG AGCCTGCTAT GTTCTTCTTT TGTTGATCCA
 2281 AABTTAAAAA AAAAATACCA CCAAC

Figura 1 (D) Secuencia de polipéptido de PDGF-A (GenBank Accession No. CAA29677) (SEQ ID NO: 12)

1 MRTLACL LLL GCGYLAHVLA EEAEIPREVI ERLARSQIHS IRDLQRLEI DSVGSEDSL D
61 TSLRAHGVHA TKHVPEKRPL PIRRKRSIEE AVPAVCKTRT VIYEIPRSQV DPTSANFLIW
121 PPCVEVKRCT GCCNTSSVKC QPSRVHRSV KVAKVEYVRK KPKLKEVQVR LEEHLECACA
181 TTSLNPDYRE EDTDVR

5

Figura 2 (A) Secuencia de ácido nucleico de *VEGF* (GenBank Accession No: NM_003376) (SEQ ID NO: 3)

1 TCGCGGAGGC TTGGGGCAGC CGGGTAGCTC GGAGGTCGTG GCGCTGGGGG CTAGCACCAG
 61 CGCTCTGTCG GGAGGCGCAG CGGTTAGGTG GACCGGTCAG CGGACTCACC GGCCAGGGCG
 121 CTCGGTGCTG GAATTTGATA TTCATTGATC CGGGTTTTAT CCCTCTTCTT TTTTCTTAAA
 181 CATT TTTTTTTT TAAAACTGTA TTGTTTCTCG TTTTAATTTA TTTTGTCTTG CCATTCCCCA
 241 CTTGAATCGG GCCGACGGCT TGGGGAGATT GCTCTACTTC CCCAAATCAC TGTGGATTTT
 301 GGAAACCAGC AGAAAGAGGA AAGAGGTAGC AAGAGCTCCA GAGAGAAGTC GAGGAAGAGA
 361 GAGACGGGGT CAGAGAGAGC GCGCGGGCGT GCGAGCAGCG AAAGCGACAG GGGCAAAGTG
 421 AGTGACCTGC TTTTGGGGGT GACCGCCGGA GCGCGGCGTG AGCCCTCCCC CTTGGGATCC
 481 CGCAGCTGAC CAGTCGCGCT GACGGACAGA CAGACAGACA CCGCCCCCAG CCCCAGCTAC
 541 CACCTCTCC CCGGCCGGCG GCGGACAGTG GACGCGGCGG CGAGCCGCGG GCAGGGGCCG
 601 GAGCCCGCGC CCGGAGGCGG GGTGGAGGGG GTCGGGGCTC GCGGCGTCGC ACTGAAACTT
 661 TTCGTCCAAC TTCTGGGCTG TTCTCGCTTC GGAGGAGCCG TGGTCCGCGC GGGGGAAAGCC
 721 GAGCCGAGCG GAGCCGCGAG AAGTGCTAGC TCGGGCCGGG AGGAGCCGCA GCCGGAGGAG
 781 GGGGAGGAGG AAGAAGAGAA GGAAGAGGAG AGGGGGCCGC AGTGGCGACT CGGCGCTCGG
 841 AAGCCGGGCT CATGGACGGG TGAGGCGGGC GTGTGCGCAG ACAGTGCTCC AGCCGCGCGC
 901 GCTCCCAGG CCCTGGCCCG GGCTCGGGC CGGGGAGGAA GAGTAGCTCG CCGAGGCGCC
 961 GAGGAGAGCG GGCCGCCCA CAGCCGAGC CGGAGAGGGA GCGCGAGCCG CGCCGGCCCC
 1021 GGTCGGGCTT CCGAAACCAT GAACTTTCTG CTGTCTTGGG TGCATTGGAG CCTTGCCTTG
 1081 CTGCTCTACC TCCACCATGC CAAGTGGTCC CAGGCTGCAC CCATGGCAGA AGGAGGAGGG
 1141 CAGAATCATC ACGAAGTGGT GAAGTTCATG GATGTCTATC AGCGCAGCTA CTGCCATCCA
 1201 ATCGAGACCC TGGTGGACAT CTTCCAGGAG TACCCTGATG AGATCGAGTA CATCTTCAAG
 1261 CCATCCTGTG TGCCCTGAT GCGATGCGGG GGCTGCTGCA ATGACGAGGG CCTGGAGTGT
 1321 GTGCCCACTG AGGAGTCCAA CATCACCATG CAGATTATGC GGATCAAACC TCACCAAGGC
 1381 CAGCACATAG GAGAGATGAG CTTCTACAG CACAACAAAT GTGAATGCAG ACCAAAGAAA

1441 GATAGAGCAA GACAAGAAA AAAATCAGTT CGAGGAAAGG GAAAGGGGCA AAAACGAAAG
1501 CGCAAGAAAT CCCGGTATAA GTCCTGGAGC GTTCCCTGTG GGCCTTGCTC AGAGCGGAGA
1561 AAGCATTGT TTGTACAAGA TCCGCAGACG TGTAATGTT CCTGCAAAAA CACAGACTCG
1621 CGTTGCAAGG CGAGGCAGCT TGAGTTAAAC GAACGTACTT GCAGATGTGA CAAGCCGAGG
1681 CGGTGAGCCG GGCAGGAGGA AGGAGCCTCC CTCAGGGTTT CGG

Figura 2 (B) Secuencia de polipéptido de VEGF (GenBank Accession No. NP_003367) (SEQ ID NO: 4)

1 MNFLLSWVHW SLALLLYLHH AKWSQAAPMA EGGGQNHHEV VKFMDVYQRS YCHPIETLVD
61 IFQEYPDEIE YIFKPSVPL MRCGGCCNDE GLECVPTES NITMQIMRIK PHGQHGEM
121 SFLQHNKCEC RPKKDRARQE KKSVRGKGG QKRKRKKSRY KWSVPCGPC SERRKHLFVQ
181 DPQTCKCCK NTDSRCKARQ LELNERTCRC DKPRR

5

Figura 3 (A) Secuencia de ácido nucleico de PDGFR- β (GenBank Accession No. NM 002609) (SEQ ID NO: 5)

1 GGCCCTCAG CCCTGCTGCC CAGCAGGAGC CTGTGCTCGC CCTGCCAAC GCAGACAGCC
 61 AGACCCAGGG CGGCCCTCT GCGGGCTCTG CTCCTCCCGA AGGATGCTTG GGGAGTGAGG
 121 CGAAGCTGGG CGCTCCTCTC CCCTACAGCA GCCCCCTTCC TCCATCCCTC TGTTCCTCTG
 181 AGCCTTCAGG AGCCTGCACC AGTCCTGCCT GTCCTTCTAC TCAGCTGTTA CCCACTCTGG
 241 GACCAGCAGT CTTTCTGATA ACTGGGAGAG GGCAGTAAGG AGGACTTCTT GGAGGGGGTG
 301 ACTGTCCAGA GCCTGGAAGT GTGCCACAC CAGAAGCCAT CAGCAGCAAG GACACCATGC
 361 GGCTTCCGGG TGCATGCCA GCTCTGGCCC TCAAAGGCGA GCTGCTGTTG CTGTCTCTCC
 421 TGTTACTTCT GGAACACAG ATCTCTCAGG GCCTGGTCGT CACACCCCGG GGGCCAGAGC
 481 TTGTCTCAA TGTCTCCAGC ACCTTCGTTT TGACCTGCTC GGGTTCAGCT CCGTGGTGT
 541 GGGAACGGAT GTCCAGGAG CCCCACAGG AAATGGCCAA GGCCAGGAT GGCACCTTCT
 601 CCAGCGTGCT CACTGACC AACCTCACTG GGCTAGACAC GGGAGAATAC TTTTGCACCC
 661 ACAATGACTC CCGTGGACTG GAGACCGATG AGCGGAAACG GCTCTACATC TTTGTGCCAG
 721 ATCCCACCGT GGGCTTCTC CTAATGATG CCGAGGAACT ATTCATCTTT CTCACGAAA
 781 TAACTGAGAT CACCATTCCA TGCCGAGTAA CAGACCCACA GCTGGTGGTG AACTGCACG
 841 AGAAGAAAGG GGACGTTGCA CTGCCTGTCC CCTATGATCA CCAACGTGGC TTTTCTGGTA
 901 TCTTTGAGGA CAGAAGCTAC ATCTGCAAAA CCACCATTGG GGACAGGGAG GTGGATTCTG
 961 ATGCCTACTA TGTCTACAGA CTCCAGGTGT CATCCATCAA CGTCTCTGTG AACGCAGTGC
 1021 AGACTGTGGT CCGCCAGGGT GAGAACATCA CCCTCATGTG CATTGTGATC GGAATGAGG
 1081 TGGTCAACTT CGAGTGACA TACCCCGCA AAGAAAGTGG GCGGCTGGTG GAGCCGGTGA
 1141 CTGACTTCCT CTTGGATATG CCTTACCACA TCCGCTCCAT CCTGCACATC CCCAGTGCCG
 1201 AGTTAGAAGA CTCGGGACC TACACCTGCA ATGTGACGGA GAGTGTGAAT GACCATCAGG
 1261 ATGAAAAGGC CATCAACATC ACCGTGGTTG AGAGCGGCTA CGTGCGGCTC CTGGGAGAGG
 1321 TGGGCACACT ACAATTGCT GAGCTGCATC GGAGCCGGAC ACTGCAGGTA GTGTTCGAGG
 1381 CCTACCCACC GCCCACTGTC CTGTGGTTCA AAGACAACCG CACCCTGGGC GACTCCAGCG

1441 CTGGCGAAAT CGCCCTGTCC ACGCGCAACG TGTCGGAGAC CCGGTATGTG TCAGAGCTGA
 1501 CACTGGTTCG CGTGAAGGTG GCAGAGGCTG GCCACTACAC CATGCGGGCC TTCCATGAGG
 1561 ATGCTGAGGT CCAGCTCTCC TTCCAGCTAC AGATCAATGT CCCTGTCCGA GTGCTGGAGC
 1621 TAAGTGAGAG CCACCCTGAC AGTGGGGAAC AGACAGTCCG CTGTCTGGC CGGGGCATGC
 1681 CCCAGCCGAA CATCATCTGG TCTGCCTGCA GAGACCTCAA AAGGTGTCCA CGTGAGCTGC
 1741 CGCCCACGCT GCTGGGGAAC AGTCCGAAG AGGAGAGCCA GCTGGAGACT AACGTGACGT
 1801 ACTGGGAGGA GGAGCAGGAG TTTGAGGTGG TGAGCACACT GCGTCTGCAG CACGTGGATC
 1861 GGCCACTGTC GGTGCGCTGC ACGCTGCGCA ACGCTGTGGG CCAGGACACG CAGGAGGTCA
 1921 TCGTGGTGCC ACACTCCTTG CCCTTTAAGG TGGTGGTGAT CTCAGCCATC CTGGCCCTGG
 1981 TGGTGCTCAC CATCATCTCC CTTATCATCC TCATCATGCT TTGGCAGAAG AAGCCACGTT
 2041 ACGAGATCCG ATGGAAGGTG ATTGAGTCTG TGAGCTCTGA CGGCCATGAG TACATCTACG
 2101 TGGACCCCAT GCAGCTGCCC TATGACTCCA CGTGGGAGCT GCCGCGGGAC CAGCTTGTGC
 2161 TGGGACGCAC CCTCGGCTCT GGGGCCTTTG GGCAGGTGGT GGAGGCCACG GCTCATGGCC
 2221 TGAGCCATTC TCAGGCCACG ATGAAAGTGG CCGTCAAGAT GCTTAAATCC ACAGCCCPCA
 2281 GCAGTGAGAA GCAAGCCCTT ATGTCGGAGC TGAAGATCAT GAGTCACCTT GGGCCCCACC
 2341 TGAACGTGGT CAACCTGTTG GGGGCCTGCA CCAAAGGAGG ACCCATCTAT ATCATCACTG
 2401 AGTACTGCCG CTACGGAGAC CTGGTGGACT ACCTGCACCG CAACAAACAC ACCTTCCTGC
 2461 AGCACCCTC CGACAAGCGC CGCCGCCCCA GCGCGGAGCT CTACAGCAAT GCTCTGCCCC
 2521 TTGGGCTCCC CCTGCCCAGC CATGTGTCTT TGACCGGGGA GAGCGACGGT GGCTACATGG
 2581 ACATGAGCAA GGACGAGTCG GTGGACTATG TGCCCATGCT GGACATGAAA GGAGACGTCA
 2641 AATATGCAGA CATCGAGTCC TCCAACCTACA TGGCCCCCTA CGATAACTAC GTTCCCTCTG
 2701 CCCCTGAGAG GACCTGCCGA GCAACTTTGA TCAACGAGTC TCCAGTGCTA AGCTACATGG
 2761 ACCTCGTGGG CPTCAGCTAC CAGGTGGCCA ATGGCATGGA GTTCTGGCC TCCAAGAACT
 2821 GCGTCCACAG AGACCTGGCG GCTAGGAACG TGCTCATCTG TGAAGGCAAG CTGGTCAAGA
 2881 TCTGTGACTT TGGCCTGGCT CGAGACATCA TGCGGGACTC GAATTACATC TCCAAGGCA

2941 GCACCTTTTT GCCTTTAAAG TGGATGGCTC CGGAGAGCAT CTTCAACAGC CTCTACACCA
 3001 CCCTGAGCGA CGTGTGGTCC TTCGGGATCC TGCTCTGGGA GATCTTCACC TTGGGTGGCA
 3061 CCCCTTACCC AGAGCTGCCC ATGAACGAGC AGTTCTACAA TGCCATCAAA CGGGGTACC
 3121 GCATGGCCCA GCCTGCCCAT GCCTCCGACG AGATCTATGA GATCATGCAG AAGTGCTGGG
 3181 AAGAGAAGTT TGAGATTTCGG CCCCCCTTCT CCCAGCTGGT GCTGCTTCTC GAGAGACTGT
 3241 TGGGCGAAGG TTACAAAAAG AAGTACCAGC AGGTGGATGA GGAGTTTCTG AGGAGTGACC
 3301 ACCCAGCCAT CCTTCGGTCC CAGGCCCGCT TGCCTGGGTT CCATGGCCTC CGATCTCCCC
 3361 TGGACACCAG CTCCGTCCCTC TATACTGCCG TGCAGCCCAA TGAGGGTGAC AACGACTATA
 3421 TCATCCCCCT GCCTGACCCC AAACCCGAGG TTGCTGACGA GGGCCCACTG GAGGGTTCCC
 3481 CCAGCCTAGC CAGCTCCACC CTGAATGAAG TCAACACCTC CTCAACCATC TCCTGTGACA
 3541 GCCCCCTGGA GCCCCAGGAC GAACCAGAGC CAGAGCCCA GCTTGAGCTC CAGGTGGAGC
 3601 CGGAGCCAGA GCTGGAACAG TTGCCGGATT CGGGGTGCCC TGCGCCTCGG GCGGAAGCAG
 3661 AGGATAGCTT CCTGTAGGGG GCTGGCCCTT ACCCTGCCCT GCCTGAAGCT CCCCCCTGC
 3721 CAGCACCCAG CATCTCCTGG CCTGGCCTGA CCGGGCTTCC TGTGAGCCAG GCTGCCCTTA
 3781 TCAGCTGTCC CCTTCTGGAA GCTTCTGCT CCTGACGTGT TGTGCCCAA ACCCTGGGGC
 3841 TGGCTTAGGA GGCAAGAAAA CTGCAGGGGC CGTGACCAGC CCTCTGCCTC CAGGGAGGCC
 3901 AACTGACTCT GAGCCAGGGT TCCCCAGGG AACTCAGTTT TCCCATATGT AAGATGGGAA
 3961 AGTTAGGCTT GATGACCAG AATCTAGGAT TCTCTCCCTG GCTGACAGGT GGGGAGACCG
 4021 AATCCCTCCC TGGGAAGATT CTTGGAGTTA CTGAGGTGGT AAATTAAGTT TTTTCTGTTC
 4081 AGCCAGCTAC CCCTCAAGGA ATCATAGCTC TCTCCTCGCA CTTTTATCC ACCCAGGAGC
 4141 TAGGGAAGAG ACCCTAGCCT CCCTGGCTGC TGGCTGAGCT AGGGCCTAGC CTTGAGCAGT
 4201 GTTGCCTCAT CCAGAAGAAA GCCAGTCTCC TCCCTATGAT GCCAGTCCCT GCGTTCCCTG
 4261 GCCCAGCTG GTCTGGGGCC ATTAGGCAGC CTAAATTAATG CTGGAGGCTG AGCCAAGTAC
 4321 AGGACACCCC CAGCCTGCAG CCCTTGCCCA GGGCACTGG AGCACACGCA GCCATAGCAA
 4381 GTGCCTGTGT CCCTGTCTT CAGGCCCATC AGTCCTGGGG CTTTTCTTT ATCACCTCA

4441 GTCTTAATCC ATCCACCAGA GTCTAGAAGG CCAGACGGGC CCCGCATCTG TGATGAGAAT
 4501 GTAAATGTGC CAGTGTGGAG TGGCCACGTG TGTGTGCCAG TATATGGCCC TGGCTCTGCA
 4561 TTGGACCTGC TATGAGGCTT TGGAGGAATC CCTCACCCTC TCTGGGCCTC AGTTTCCCCT
 4621 TCAAAAAATG AATAAGTCGG ACTTATTAAC TCTGAGTGCC TTGCCAGCAC TAACATTCTA
 4681 GAGTATTCCA GGTGGTTGCA CATTTGTCCA GATGAAGCAA GGCCATATAC CCTAAACTTC
 4741 CATCCTGGGG GTCAGCTGGG CTCCTGGGAG ATTCCAGATC ACACATCACA CTCTGGGGAC
 4801 TCAGGAACCA TGCCCTTCC CCAGGCCCCC AGCAAGTCTC AAGAACACAG CTGCACAGGC
 4861 CTTGACTTAG AGTGACAGCC GGTGTCTGG AAAGCCCCAA GCAGCTGCCC CAGGGACATG
 4921 GGAAGACCAC GGGACCTCTT TCACTACCCA CGATGACCTC CGGGGGTATC CTGGGCAAAA
 4981 GGGACAAAGA GGGCAAATGA GATCACCTCC TGCAGCCCAC CACTCCAGCA CCTGTGCCGA
 5041 GGTCTGCGTC GAAGACAGAA TGGACAGTGA GGACAGTTAT GTCTTGTAAG AGACAAGAAG
 5101 CTTCAGATGG TACCCCAAGA AGGATGTGAG AGGTGGCCGC TTGGAGTTG CCCCTCACCC
 5161 ACCAGCTGCC CCATCCCTGA GGCAGCGCTC CATGGGGGTA TGGTTTTGTC ACTGCCCAGA
 5221 CCTAGCAGTG ACATCTCATT GTCCCCAGCC CAGTGGGCAT TGGAGGTGCC AGGGGAGTCA
 5281 GGGTTGTAGC CAAGACGCCC CCGCACGGGG AGGGTTGGGA AGGGGGTGCA GGAAGCTCAA
 5341 CCCCTCTGGG CACCAACCCT GCATTGCAGG TTGGCACCTT ACTTCCCTGG GATCCCCAGA
 5401 GTTGGTCCAA GGAGGGAGAG TGGGTCTCA ATACGGTACC AAAGATATAA TCACCTAGGT
 5461 TTACAAATAT TTTTAGGACT CACGTAACT CACATTATA CAGCAGAAAT GCTATTTTGT
 5521 ATGCTGTAA GTTTTTCTAT CTGTGACTT TTTTTAAGG GAAAGATTTT AATATTAAC
 5581 CTGGTGCTTC TCACTCAC

Figura 3 (B) Secuencia de polipéptido de PDGER-B (GenBank Accession No. NP_002600) (SEQ ID NO: 6)

1 MRLPGAMPAL ALKGELLLS LLLLEPQIS QGLVVTTPGP ELVINVSTF VLTCSGSAPV
 61 VWERMSQEPP QEMAKAQDGT FSSVLTLTNL TGLDTGEYFC THNDSRGLET DERKRLYIFV
 121 PDPTVGFLPN DAEELFIFLT EITEITIPCR VTDPQLVVTL HEKKGQVALP VPYDHQRGFS
 181 GIFEDRSYIC KTTIGDREVD SOAYYVYRLQ VSSINVSUNA VQTVVRQGEN ITLMCIVIGN
 241 EVVNFWEYTP RKESGRLVEP VTDFLLDMPY HIRSILHIPS AELEDSGTYT CNVTESVNDH
 301 QDEKAINITV VESGYVRLG EVGTLQFAEL HRSRTLQVVF EAYPPPTVLW FKDNRTLGDG
 361 SAGEIALSTR NVSETRYVSE LTLVRVKVAE AGHYTMRAFH EDAEVQLSEF LQINVPVRVL
 421 ELSESHPDG EQTVRCRGRG MPQPNIWSA CRDLKRCPRE LPPTLLGNSS EEESQLETNV
 481 TYWEEEQEFE VVSTLRLQHV DRPLSVRCTL RNAVGQDTQE VIVVPHSLPF KVVVISAILA
 541 LVVLTIIISLI ILIMLWQKP RYEIRWKVIE SVSSDGHEYI YVDPMLQPYD STWELPRDQL
 601 VLGRTLGSAG FGQVVEATAH GLSHSQATMK VAVKMLKSTA RSSEKQALMS ELKIMSHLGP
 661 HLNVVNLLGA CTKGGPIYII TEYCRYGDLV DYLHRNKHTF LQHHSOKRRP PSAELYSNAL
 721 PVGLPLPSHV SLTGESDGGY MDMSKDESVD YVPLDMKGD VKYADIESSN YMAPYDNYVP
 781 SAPERTCRAT LINESPVLSY MDLVGFSYQV ANGMEFLASK NCVHRDLAAR NVLICEGKLV
 841 KICDFGLARD IMRDSNYISK GSTFLPLKWM APESIFNSLY TTLSDVWSFG ILLWEIFTLG
 901 GTPYPELPMN EQFYNAIKRG YRMAQPAHAS DEIYEIMQKC WEEKFEIRPP FSQVLVLLER
 961 LLGEGYKKKY QQVDEEFLRS DHPAILRSQA RLPGFHGLRS PLDTSSVLYT AVQPNEGDNQ
 1021 YIIPLPDPKP EVADEGPLEG SPSLASSTLN EVNTSSTISC DSPLEPQDEP EPEPQLELQV
 1081 EPEPELEQLP DSGCPAPRAE AEDSFL

Figura 3 (C) Secuencia de ácido nucleico de PDGER-A (GenBank Accession No. NM_006206) (SEQ ID NO: 13)

1 TTCTCCCCGC CCCCCAGTTG TTGTCGAAGT CTGGGGGTTG GGACTGGACC CCCTGATTGC
 61 GTAAGAGCAA AAAGCGAAGG CGCAATCTGG ACACTGGGAG ATTCGGAGCG CAGGGAGTTT
 121 GAGAGAAACT TTTATTTTGA AGAGACCAAG GTTGAGGGGG GGCTTATTTT CTGACAGCTA
 181 TTTACTTAGA GCAAATGATT AGTTTTAGAA GGATGGACTA TAACATTGAA TCAATTACAA
 241 AACGCGGTTT TTGAGCCCAT TACTGTTGGA GCTACAGGGA GAGAAACAGG AGGAGACTGC
 301 AAGAGATCAT TTGGGAAGGC CGTGGGCACG CTCTTTACTC CATGTGTGGG ACATTCATTG
 361 CGGAATAACA TCGGAGGAGA AGTTTCCCAG AGCTATGGGG ACTTCCCATC CGGCGTTCCT
 421 GGTCTTAGGC TGTCTTCTCA CAGGGCTGAG CCTAATCCTC TGCCAGCTTT CATTACCCTC
 481 TATCCTTCCA AATGAAAATG AAAAGGTTGT GCAGCTGAAT TCATCCTTTT CTCTGAGATG
 541 CTTTGGGGAG AGTGAAGTGA GCTGGCAGTA CCCCATGTCT GAAGAAGAGA GCTCCGATGT
 601 GGAAATCAGA AATGAAGAAA ACAACAGCGG CCTTTTGTG ACGGTCTTGG AAGTGAGCAG
 661 TGCCTCGGCG GCCCACACAG GGTGTGACAC TTGCTATTAC AACCACACTC AGACAGAAGA
 721 GAATGAGCTT GAAGGCAGGC ACATTTACAT CTATGTGCCA GACCCAGATG TAGCCTTTGT
 781 ACCTCTAGGA ATGACGGATT ATTTAGTCAT CGTGGAGGAT GATGATTCTG CCATTATACC
 841 TTGTGCACA ACTGATCCCG AACTCCTGT AACCTTACAC AACAGTGAGG GGGTGGTACC
 901 TGCCTCCTAC GACAGCAGAC AGGGCTTTAA TGGGACCTTC ACTGTAGGGC CCTATATCTG
 961 TGAGGCCACC GTCAAAGGAA AGAAGTTCCA GACCATCCCA TTTAATGTTT ATGCTTTAAA
 1021 AGCAACATCA GAGCTGGATC TAGAAATGGA AGCTCTTAAA ACCGTGTATA AGTCAGGGGA
 1081 AACGATTGTG GTCACCTGTG CTGTTTTTAA CAATGAGGTG GTTGACCTTC AATGGACTTA
 1141 CCCTGGAGAA GTGAAAGGCA AAGGCATCAC AATGCTGGAA GAAATCAAAG TCCCATCCAT
 1201 CAAATTGGTG TACACTTGA CGGTCCCCGA GGCCACGGTG AAAGACAGTG GAGATTACGA
 1261 ATGTGCTGCC CGCCAGGCTA CCAGGGAGGT CAAAGAAATG AAGAAAGTCA CTATTTCTGT
 1321 CCATGAGAAA GGTTCATTG AAATCAAACC CACCTTCAGC CAGTTGGAAG CTGTCAACCT

1381 GCATGAAGTC AAACATTTTG TTGTAGAGGT GCGGGCCTAC CCACCTCCCA GGATATCCTG
 1441 GCTGAAAAAC AATCTGACTC TGATTGAAAA TCTCACTGAG ATCACCCTG ATGTGGAAAA
 1501 GATTCAGGAA ATAAGGTATC GAAGCAAATT AAAGCTGATC CGTGCTAAGG AAGAAGACAG
 1561 TGGCCATTAT ACTATTGTAG CTCAAAATGA AGATGCTGTG AAGAGCTATA CTTTGAACCT
 1621 GTTAACTCAA GTTCCTTCAT CCATTCTGGA CTTGGTCGAT GATCACCATG GCTCAACTGG
 1681 GGGACAGACG GTGAGGTGCA CAGCTGAAGG CACGCCGCTT CCTGATATTG AGTGGATGAT
 1741 ATGCAAAGAT ATTAAGAAAT GTAATAATGA AACTTCCTGG ACTATTTTGG CCAACAATGT
 1801 CTCAAACATC ATCACGGAGA TCCACTCCCG AGACAGGAGT ACCGTGGAGG GCCGTGTGAC
 1861 TTTCGCCAAA GTGGAGGAGA CCATCGCCGT GCGATGCCTG GCTAAGAATC TCCTTGGAGC
 1921 TGAGAACCGA GAGCTGAAGC TGGTGGCTCC CACCCTGCGT TCTGAACTCA CGGTGGCTGC
 1981 TGCAGTCTTG GTGCTGTTGG TGATTGTGAT CATCTCACTT ATTGTCCTGG TTGTCATTTG
 2041 GAAACAGAAA CCGAGGTATG AAATTCGCTG GAGGGTCATT GAATCAATCA GCCCGGATGG
 2101 ACATGAATAT ATTTATGTGG ACCCGATGCA GCTGCCTTAT GACTCAAGAT GGGAGTTTCC
 2161 AAGAGATGGA CTAGTGCTTG GTCGGGTCTT GGGGTCTGGA GCGTTTGGGA AGGTGGTTGA
 2221 AGGAACAGCC TATGGATTAA GCCGGTCCCA ACCTGTCATG AAAGTTGCAG TGAAGATGCT
 2281 AAAACCCACG GCCAGATCCA GTGAAAACA AGCTCTCATG TCTGAACTGA AGATAATGAC
 2341 TCACCTGGGG CCACATTTGA ACATTGTAAA CTTGCTGGGA GCCTGCACCA AGTCAGGCCC
 2401 CATTACATC ATCACAGAGT ATTGCTTCTA TGGAGATTG GTCAACTATT TGCATAAGAA
 2461 TAGGGATAGC TTCCTGAGCC ACCACCCAGA GAAGCCAAAG AAAGAGCTGG ATATCTTTGG
 2521 ATTGAACCTT GCTGATGAAA GCACACGGAG CTATGTTATT TTATCTTTTG AAAACAATGG
 2581 TGACTIONATG GACATGAAGC AGGCTGATAC TACACAGTAT GTCCCCATGC TAGAAAGGAA
 2641 AGAGGTTTCT AAATATPCCG ACATCCAGAG ATCACTCTAT GATCGTCCAG CCTCATATAA
 2701 GAAGAAATCT ATGTTAGACT CAGAAGTCAA AAACCTCCTT TCAGATGATA ACTCAGAAGG
 2761 CCTTACTTTA TTGGATTTGT TGAGCTTCAC CTATCAAGTT GCCCGAGGAA TGGAGTTTTT
 2821 GGCTTCAAAA AATTGTGTCC ACCGTGATCT GGCTGCTCGC AACGTCTCTC TGGCACAAAG

2881 AAAAATTGTG AAGATCTGTG ACTTTGGCCT GGCCAGAGAC ATCATGCATG ATTCGAACTA
 2941 TGTGTCGAAA GGCAGTACCT TTCTGCCCGT GAAGTGGATG GCTCCTGAGA GCATCTTTGA
 3001 CAACCTCTAC ACCCACTGA GTGATGTCTG GTCTTATGGC ATTCTGCTCT GGGAGATCTT
 3061 TTCCCTTGGT GGCACCCCTT ACCCCGGCAT GATGGTGGAT TCTACTTTCT ACAATAAGAT
 3121 CAAGAGTGGG TACCGGATGG CCAAGCCTGA CCACGCTACC AGTGAAGTCT ACGAGATCAT
 3181 GGTGAAATGC TGGAACAGTG AGCCGGAGAA GAGACCCTCC TTTTACCACC TGAGTGAGAT
 3241 TGTGGAGAAT CTGCTGCCTG GACAAATATAA AAAGAGTTAT GAAAAAATTC ACCTGGACTT
 3301 CCTGAAGAGT GACCATCCTG CTGTGGCAGC CATGCGTGTG GACTCAGACA ATGCATACAT
 3361 TGGTGTCCACC TACAAAAACG AGGAAGACAA GCTGAAGGAC TGGGAGGGTG GTCTGGATGA
 3421 GCAGAGACTG AGCGCTGACA GTGGCTACAT CATTCTCTG CCTGACATTG ACCCTGTCCC
 3481 TGAGGAGGAG GACCTGGGCA AGAGGAACAG ACACAGCTCG CAGACCTCTG AAGAGAGTGC
 3541 CATTGAGACG GGTTCAGCA GTTCCACCTT CATCAAGAGA GAGGACGAGA CCATTGAAGA
 3601 CATCGACATG ATGGACGACA TCGGCATAGA CTCTTCAGAC CTGGTGGGAG ACAGCTTCCT
 3661 GTAACCTGGCG GATTCGAGGG GTTCTTCCA CTTCTGGGGC CACCTCTGGA TCCCGTTCAG
 3721 AAAACCACTT TATTGCAATG CGGAGGTTGA GAGGAGGACT TGGTTGATGT TAAAGAGAA
 3781 GTTCCCAGCC AAGGGCCTCG GGGAGCGTTC TAAATATGAA TGAATGGGAT ATTTTGAAT
 3841 GAACTTTGTC AGTGTTGCCT CTCGCAATGC CTCAGTAGCA TCTCAGTGGT GTGTGAAGTT
 3901 TGGAGATAGA TGGATAAGGG AATAATAGGC CACAGAAGGT GAACTTTGTG CTTCAAGGAC
 3961 ATTGGTGAGA GTCCAACAGA CACAATTTAT ACTGCGACAG AACTTCAGCA TTGTAATTAT
 4021 GTAAATAACT CTAACCAAGG CTGTGTTTAG ATTGTATTAA CTATCTTCTT TGGACTTCTG
 4081 AAGAGACCAC TCAATCCATC CATGTACTTC CCTCTTGAAA CCTGATGTCA GCTGCTGTTG
 4141 AACTTTTTTAA AGAAGTGCAT GAAAACCAT TTTTGAACCT TAAAAGGTAC TGGTACTATA
 4201 GCATTTTGCT ATCTTTTTTA GTGTTAAGAG ATAAAGAATA ATAATTAACC AACCTTGTTT
 4261 AATAGATTTG GGTGATTTAG AAGCCTGACA ACTCATTTTC ATATTGTAAT CTATGTTTAT
 4321 AATACTACTA CTGTTATCAG TAATGCTAAA TGTGTAATAA TGTAACATGA TTTCCCTCCA

4381 GAGAAAGCAC AATTTAAAAC AATCCTTACT AAGTAGGTGA TGAGTTTGAC AGTTTTTGAC
4441 ATTTATATTA AATAACATGT TTCTCTATAA AGTATGGTAA TAGCTTTAGT GAATTAAATT
4501 TAGTTGAGCA TAGAGAACAA AGTAAAAGTA GTGTTGTCCA GGAAGTCAGA ATTTTTAACT
4561 GTRACTGAATA GGTTCCCCAA TCCATCGTAT TAAAAACAA TTAAGTCCCC TCTGAAATAA
4621 TGGGATTAGA AACAAACAAA ACTCTTAAGT CCTAAAAGTT CTCAATGTAG AGGCATAAAC
4681 CTGTGCTGAA CATAACTTCT CATGTATATT ACCCAATGGA AAATATAATG ATCAGCAAAA
4741 AGACTGGATT TGCAGAAGTT TTTTTTTTTT TTCTTCATGC CTGATGAAAG CTTTGGCAAC
4801 CCCAATATAT GTATTTTTTG AATCTATGAA CCTGAAAAGG GTCAGAAGGA TGCCCAGACA
4861 TCAGCCTCCT TCTTTCACCC CTTACCCCAA AGAGAAAGAG TTTGAAACTC GAGACCATAA
4921 AGATATTCTT TAGTGGAGGC TGGATGTGCA TTAGCCTGGA TCCTCAGTTC TCAAATGTGT
4981 GTGGCAGCCA GGATGACTAG ATCCTGGGTT TCCATCCTTG AGATTCTGAA GTATGAAGTC
5041 TGAGGGAAAC CAGAGTCTGT ATTTTCTAA ACTCCCTGGC TGTTCTGATC GGCCAGTTTT
5101 CGGAAACACT GACTTAGGTT TCAGGAAGTT GCCATGGGAA ACAAATAATT TGAACTTTGG
5161 AACAGGGTTG GAATCAACC ACGCAGGAAG CCTACTATTT AAATCCTTGG CTTCAGGTTA
5221 GTGACATTTA ATGCCATCTA GCTAGCAATT GCGACCTTAA TTTAACTTTC CAGTCTTAGC
5281 TGAGGCTGAG AAAGCTAAAG TTTGGTTTTG ACAGGTTTTC CAAAAGTAAA GATGCTACTT
5341 CCCACTGTAT GGGGGAGATT GAACTTTCCC CGTCTCCCGT CTTCTGCCTC CCACTCCATA
5401 CCCCGCCAAG GAAAGGCATG TACAAAAATT ATGCAATTCA GTGTTCCAAG TCTCTGTGTA
5461 ACCAGCTCAG TGTTTTGGTG GAAAAACAT TTTAAGTTTT ACTGATAATT TGAGGTTAGA
5521 TGGGAGGATG AATTGTCACA TCTATCCACA CTGTCAAACA GGTGGGTGTG GGTTTCATTGG
5581 CATTCTTTGC AATACTGCTT AATTGCTGAT ACCATATGAA TGAAACATGG GCTGTGATTA
5641 CTGCAATCAC TGTGCTATCG GCAGATGATG CTTTGAAGA TGCAGAAGCA ATAATAAAGT
5701 ACTTGACTAC CTAAGGTTGT AATCTCAATG CAAGCCCAA CTTTCTTATC CAACTTTTTC
5761 ATAGTAAGTG CGAAGACTGA GCCAGATTGG CCAATTAAAA ACGAAAACCT GACTAGGTTC
5821 TGTAGAGCCA ATTAGACTTG AAATACGTTT GTGTTTCTAG AATCACAGCT CAAGCATTCT

5881 GTTTATCGCT CACTCTCCCT TGTACAGCCT TATTTTGTG GTGCTTTGCA TTTTGATATT
5941 GCTGTGAGCC TTGCATGACA TCATGAGGCC GGATGAAACT TCTCAGTCCA GCAGTTTCCA
6001 GTCCTAACAA ATGCTCCAC CTGAATTTGT ATATGACTGC ATTTGTGGGT GTGTGTGTGT
6061 TTTCAGCAA TTCCAGATTT GTTCCCTTTT GGCCCTCCTGC AAAGTCTCCA GAAGAAAATT
6121 TGCCAATCTT TCCTACTTTC TATTTTTATG ATGACAATCA AAGCCGGCCT GAGAAACACT
6181 ATTTGTGACT TTTTAAACGA TTAGTGATGT CCTTAAAATG TGGTCTGCCA ATCTGTACAA
6241 AATGGTCCTA TTTTGTGAA GAGGGACATA AGATAAAATG ATGTTATACA TCAATATGTA
6301 TATATGTATT TCTATATAGA CTTGGAGAAT ACTGCCAAAA CATTATGAC AAGCTGTATC
6361 ACTGCCTTCG TTTATATTTT TTTAACTGTG ATAATCCCA CAGGCACATT AACTGTTGCA
6421 CTTTTGAATG TCCAAAATTT ATATTTTAGA AATAATAAAA AGAAAGATAC TTACATGTTC
6481 CCAAACAAT GGTGTGGTGA ATGTGTGAGA AAACTAACT TGATAGGGTC TACCAATACA
6541 AAATGTATTA CGAATGCCCC TGTTCATGTT TTTGTTTTAA AACGTGTAAA TGAAGATCTT
6601 TATATTTCAA TAAATGATAT ATAATTTAAA GTT

Figura 3 (D) Secuencia de polipéptido de PDGFR-A humano**(GenBank Accession No. NP_006197) (SEQ ID NO: 14)**

1 MGTSHPAFLV LGCLLTGLSL ILCQLSLPSI LPNENEKVVQ LNSSFSLRCF GESEVSWQYP
 61 MSEEESDVE IRNEENNSGL FVTVLEVSSA SAAHTGLYTC YYNHTQTEEN ELEGRHIYYI
 121 VPDPAVAFVP LGMTDYLIVIV EDDDSAIIPC RTTDPETPVT LHNSEGVVPA SYDSRQGFNG
 181 TFTVGPYICE ATVKGKKFQT IPFNVYALKA TSELDLEMEA LKTVYKSGET IVVTCVAFNN
 241 EVVDLQWTYP GEVKGKGITM LEEIKVPSIK LVYTLTVPEA TVKDSGOYEC AARQATREVK
 301 EMKKVTISVH EKGFIKPT FSQLEAVNLH EVKHFVVEVR AYPPIRISWL KNNLTLIENL
 361 TEITTDVEKI QEIRYRSLK LIRAKEEDSG HYTIVAQNE AVKSYTFELL TQVPSSILD
 421 VDDHHGSTGG QTVRCTAEGT PLPDIEWMIC KDIKKCNET SWTILANNVS NIITEIHSRD
 481 RSTVEGRVTF AKVEETIAVR CLAKNLLGAE NRELKLVAPT LRSELTVAAL VLVLVIVII
 541 SLIVLVVIWK QKPRYEIRWR VIESISPDGH EYIYVDPMQL PYDSRWEFPR DGLVLGRVLG
 601 SGAFGKVEG TAYGLSRSQP VMKVAVKMLK PTARSSEKQA LMSLKIMTH LGPHLNIVNL
 661 LGACTKSGPI YIITEYCFYG DLVNYLHKNR DSFLSHHPEK PKKELDIFGL NPADESTRSY
 721 VILSFENNGD YMDMKQADTT QYVPMLEKE VSKYSIQRS LYDRPASYKK KSMLESEVKN
 781 LLSDDNSEGL TLLDLSFTY QVARGMEFLA SKNCVHRDLA ARNVLLAQGK IVKICDFGLA
 841 RDIMHDSNYV SKGSTFLPVK WMAPESIFDN LYTTLSDVWS YGILLWEIFS LGGTPYPGMM
 901 VDSTFYNKIK SGYRMAKPDH ATSEVYEIMV KCWNSEPEKR PSFYHLSEIV ENLLPGQYKK
 961 SYEKIHLDFL KSDHPAVARM RVDSDNAYIG VTYKNEEDKL KDWEGGLDEQ RLSADSGYII
 1021 PLPDIDPVPE EEDLGKRRH SSQTSEESAI ETGSSSSTFI KREDETIEDI DMMDDIGIDS
 1081 SDLVEDSFL

Figura 4 (A) Secuencia de ácido nucleico de VEGFR-1 (Fit-1)**(GenBank Accession No. AF063657) (SEQ ID NO: 7)**

1 ATGGTCAGCT ACTGGGACAC CGGGGTCCTG CTGTGCGCGC TGCTCAGCTG TCTGCTTCTC
 61 ACAGGATCTA GTTCAGGTTC AAAATTAATA GATCCTGAAC TGAGTTTAAA AGGCACCCAG
 121 CACATCATGC AAGCAGGCCA GACACTGCAT CTCCAATGCA GGGGGGAAGC AGCCCATAAA
 181 TGGTCTTTGC CTGAAATGGT GAGTAAGGAA AGCGAAAGGC TGAGCATAAC TAAATCTGCC
 241 TGTGGAAGAA ATGGCAAACA ATTCTGCAGT ACTTTAACCT TGAACACAGC TCAAGCAAAC
 301 CACACTGGCT TCTACAGCTG CAAATATCTA GCTGTACCTA CTTCAAAGAA GAAGGAAACA
 361 GAATCTGCAA TCTATATATT TATTAGTGAT ACAGGTAGAC CTTTCGTAGA GATGTACAGT
 421 GAAATCCCCG AAATTATACA CATGACTGAA GGAAGGGAGC TCGTCATTCC CTGCCGGGTT
 481 ACGTCACCTA ACATCACTGT TACTTTAAAA AAGTTTCCAC TTGACACTTT GATCCCTGAT
 541 GGAAAACGCA TAATCTGGGA CAGTAGAAAG GGCTTCATCA TATCAAATGC AACGTACAAA
 601 GAAATAGGGC TTCTGACCTG TGAAGCAACA GTCAATGGGC ATTTGTATAA GACAAACTAT
 661 CTCACACATC GACAAACCAA TACAATCATA GATGTCCAAA TAAGCACACC ACGCCCAGTC
 721 AAATTACTTA GAGGCCATAC TCTTGTCTC AATTGTAAGT CTACCACTCC CTGTAACACG
 781 AGAGTTCAAA TGACCTGGAG TTACCCTGAT GAAAAAATA AGAGAGCTTC CGTAAGGCGA
 841 CGAATTGACC AAAGCAATTC CCATGCCAAC ATATTCTACA GTGTTCTTAC TATTGACAAA
 901 ATGCAGAACA AAGACAAAGG ACTTTATACT TGTCGTGTAA GGAGTGGACC ATCATTCAAA
 961 TCTGTTAACA CCTCAGTGCA TATATATGAT AAAGCATTCA TCACTGTGAA ACATCGAAAA
 1021 CAGCAGGTGC TTGAAACCGT AGCTGGCAAG CGGTCTTACC GGCTCTCTAT GAAAGTGAAG
 1081 GCATTTCCCT CGCCGGAAGT TGTATGGTTA AAAGATGGGT TACCTGCGAC TGAGAAATCT
 1141 GCTCGCTATT TGACTCGTGG CTACTCGTTA ATTATCAAGG ACGTAACTGA AGAGGATGCA
 1201 GGGAATTATA CAATCTTGCT GAGCATAAAA CAGTCAAATG TGTTTAAAAA CCTCACTGCC
 1261 ACTCTAATTG TCAATGTGAA ACCCCAGATT TACGAAAAGG CCGTGTATC GTTTCCAGAC
 1321 CCGGCTCTCT ACCCACTGGG CAGCAGACAA ATCCTGACTT GTACCGCATA TGGTATCCCT

1381 CAACCTACAA TCAAGTGGTT CTGGCACCCC TGTAACCATA ATCATTCCGA AGCAAGGTGT
1441 GACTTTTGTT CCAATAATGA AGAGTCCTTT ATCCTGGATG CTGACAGCAA CATGGGAAAC
1501 AGAATTGAGA GCATCACTCA GCGCATGGCA ATAATAGAAG GAAAGAATAA GATGGCTAGC
1561 ACCTTGGTTG TGGCTGACTC TAGAATTTCT GGAATCTACA TTTGCATAGC TTCCAATAAA
1621 GTTGGGACTG TGGGAAGAAA CATAAGCTTT TATATCACAG ATGTGCCAAA TGGGTTTCAT
1681 GTTAACTTGG AAAAAATGCC GACGGAAGGA GAGGACCTGA AACTGTCTTG CACAGTTAAC
1741 AAGTTCTTAT ACAGAGACGT TACTTGGATT TTA CTGCGGA CAGTTAATAA CAGAACAATG
1801 CACTACAGTA TTAGCAAGCA AAAAAATGGCC ATCACTAAGG AGCACTCCAT CACTCTTAAT
1861 CTTACCATCA TGAATGTTTC CCTGCAAGAT TCAGGCACCT ATGCCTGCAG AGCCAGGAAT
1921 GTATACACAG GGGGAAGAAAT CCTCCAGAAG AAAGAAATTA CAATCAGAGA TCAGGAAGCA
1981 CCATACCTCC TGCGAAACCT CAGTGATEAC ACAGTGGCCA TCAGCAGTTC CACCACTTTA
2041 GACTGTCATG CTAATGGTGT CCCCAGCCT CAGATCACTT GGTTTAAAAA CAACCACAAA
2101 ATACAACAAG AGCCTGGAAT TATTTTAGGA CCAGGAAGCA GCACGCTGTT TATTGAAAGA
2161 GTCACAGAAG AGGATGAAGG TGCTATCAC TGCAAAGCCA CCAACCAGAA GGGCTCTGTG
2221 GAAAGTTCAG CATACCTCAC TGTTCAAGGA ACCTCGGACA AGTCTAATCT GGAGCTGATC
2281 ACTCTAACAT GCACCTGTGT GGCTGCGACT CTCTTCTGGC TCCTATTAAC CCTCTTTATC
2341 CGAAAAATGA AAAGGTCTTC TTCTGAAATA AAGACTGACT ACCTATCAAT TATAATGGAC
2401 CCAGATGAAG TTCCTTTGGA TGAGCAGTGT GAGCGGCTCC CTTATGATGC CAGCAAGTGG
2461 GAGTTTGCCC GGGAGAGACT TAAACTGGGC AAATCACTTG GAAGAGGGGC TTTTGGAAAA
2521 GTGGTTCAAG CATCAGCATT TGGCATTAAAG AAATCACCTA CGTGCCGGAC TGTGGCTGTG
2581 AAAATGCTGA AAGAGGGGGC CACGGCCAGC GAGTACAAAG CTCTGATGAC TGAGCTAAAA
2641 ATCTTGACCC ACATTGGCCA CCATCTGAAC GTGGTTAACC TGCTGGGAGC CTGCACCAAG
2701 CAAGGAGGGC CTCTGATGGT GATTGTTGAA TACTGCAAAT ATGGAAATCT CTCCA ACTAC
2761 CTCAAGAGCA AACGTGACTT ATTTTCTC AACAAAGGATG CAGCACTACA CATGGAGCCT
2821 AAGAAAGAAA AAATGGAGCC AGGCCTGGAA CAAGGCAAGA AACCAAGACT AGATAGCGTC

2881 ACCAGCAGCG AAAGCTTTGC GAGCTCCGGC TTTCAGGAAG ATAAAAGTCT GAGTGATGTT
 2941 GAGGAAGAGG AGGATTCTGA CGGTTTCTAC AAGGAGCCCA TCACTATGGA AGATCTGATT
 3001 TCTTACAGTT TTCAAGTGGC CAGAGGCATG GAGTTCCTGT CTTCCAGAAA GTGCATTTCAT
 3061 CGGGACCTGG CAGCGAGAAA CATTCTTTTA TCTGAGAACA ACGTGGTGAA GATTTGTGAT
 3121 TTTGGCCTTG CCCGGGATAT TTATAAGAAC CCCGATTATG TGAGAAAAGG AGATACTCGA
 3181 CTTCTCTGA AATGGATGGC TCCTGAATCT ATCTTTGACA AAATCTACAG CACCAAGAGC
 3241 GACGTGTGGT CTTACGGAGT ATTGCTGTGG GAAATCTTCT CCTTAGGTGG GTCTCCATAC
 3301 CCAGGAGTAC AAATGGATGA GGACTTTTGC AGTCGCCTGA GGAAGGCAT GAGGATGAGA
 3361 GCTCCTGAGT ACTCTACTCC TGAAATCTAT CAGATCATGC TGGACTGCTG GCACAGAGAC
 3421 CCAAAAAGAAA GGCCAAGATT TGCAGAACTT GTGGAAAAAC TAGGTGATTT GCTTCAAGCA
 3481 AATGTACAAC AGGATGGTAA AGACTACATC CCAATCAATG CCATACTGAC AGGAAATAGT
 3541 GGGTTTACAT ACTCAACTCC TGCCTTCTCT GAGGACTTCT TCAAGGAAAG TATTTAGCT
 3601 CCGAAGTTTA ATTCAGGAAG CTCTGATGAT GTCAGATATG TAAATGCTTT CAAGTTCATG
 3661 AGCCTGGAAA GAATCAAAAC CTTTGAAGAA CTTTACC GA ATGCCACCTC CATGTTTGAT
 3721 GACTACCAGG GCGACAGCAG CACTCTGTTG GCCTCTCCCA TGCTGAAGCG CTTACCTGG
 3781 ACTGACAGCA AACCCAAGGC CTCGCTCAAG ATTGACTTGA GAGTAACCAG TAAAAGTAAG
 3841 GAGTCGGGGC TGTCTGATGT CAGCAGGCC AGTTTCTGCC ATTCCAGCTG TGGGCACGTC
 3901 AGCGAAGGCA AGCGCAGGTT CACCTACGAC CACGCTGAGC TGGAAAGGAA AATCGCGTGC
 3961 TGCTCCCCGC CCCAGACTA CAACTCGGTG GTCCTGTACT CCACCCACC CATCTAG

Figura 4(B) Secuencia de polipéptido de VEGFR-1(Fc1-1) (GenBank Accession No.) (SEQ ID NO: 8)

1 MVSYWDTGVL LCALLSCLLL TGSSSGSKLK DPELSLKGTQ HIMQAGQTLH LQCRGEAAHK
 61 WSLPEMVSKE SERLSITKSA CGRNGKQFCS TLTNTAQAN HTGFYSCKYL AVPTSKKKET
 121 ESAIYIFIŠD TGRPFVEMYS EIPEIIHMT E GRELVIPCRV TSPNITVTLK KFPLDTLIPD
 181 GKRIIWDSRK GFIISNATYK EIGLLTCEAT VNGHLYKTN Y LTHRQTNTII DVQISTPRPV
 241 KLLRGHTLV L NCTATTPLNT RVQMTWSYPD EKNKRASVRR RIDQSN SHAN IFYSVLTIDK
 301 MQNKDKGLYT CRVRSGPSFK SVNTSVHIYD KAFITVKHRK QQVLETVAGK RSYRLSMKVK
 361 AFPSPEVVWL KDGLPATEKS ARYLTRGYSL IIKDVTEEDA GNYTILLSIK QSNVFKNLTA
 421 TLIVNVK PQI YEKAVSSFPD PALYPLGSRQ ILTCTAYGIP OPTIKWFVHP CNHNHSEARC
 481 DFCSNNEESF ILOADSNMGN RIESITQRMA IIEGKNKMAS TLVVADSRIS GIYICIASNK
 541 VGTVGRNISE YITDVPNGFH VNLEKMPTEG EDLKL SCTVN KFLYRDVTWI LLRTVNNRTM
 601 HYSISKQKMA ITKEHSITLN LTIMNVSLQD SGTYACRARN VYTGE EILQK KEITIRDQEA
 661 PYLLRNLS DH TVAISSSTTL DCHANGVPEP QITWFKNNHK IQQEPGIILG PGSSTLFIER
 721 VTEEDEGVYH CKATNQKGSV ESSAYLTVQG TSDKSNLELI TLTCTCVAAT LFWLLLTLFI
 781 RKMKRSSSEI KTDYLSIIMD PDEVPLDEQC ERLPYDASKW EFARERLKL G KSLGRGAFGK
 841 VVQASAFGIK KSPTCRTVAV KMLKEGATAS EYKALMTELK ILTHIGHHLN VVNL LGACTK
 901 QGGPLMVIVE YCKYGNLSNY LKSKRDLFFL NKDAALHMEP KKEKMEPGLE QGKKPRLDSV
 961 TSSSEFASSG FQEDKSLSDV EEEEDSDGFY KEPITMEDLI SYSFQVARGM EFLSSRKCIH
 1021 RDLAARNILL SENNVVKICD FGLARDIYKN PDYVRKGDTR LPLKWMAPES IFDKIYSTKS
 1081 DVWSYGVLLW EIFSLGGSPY PGVQMD EDFC SRLREGMRMR APEYSTPEIY QIMLDCWHRD
 1141 PKERPRFAEL VEKLGDLLQA NVQQDGKDYI PINAILTGNS GFTYSTPAFS EDDFKESISA
 1201 PKFNSGSSDD VRYVNAFKEM SLERIKTFEE LLPNATSMFD DYQGDSTLL ASPMLKRFTW
 1261 TDSKPKASLK IDLRVTSKSK ESGLSDVSRP SFCHSSCGHV SEGKRRFTYD HAELERKIAC
 1321 CSPPPDYN SV VLYSTPPI

Figura 4 (C) Secuencia de ácido nucleico de VEGFR-2 (KDR/Etk-1)**(GenBank Accession No. AF035121) (SEQ ID NO: 9)**

1 ACTGAGTCCC GGGACCCCGG GAGAGCGGTC AGTGTGTGGT CGCTGCGTTT CCTCTGCCTG
 61 CGCCGGGCAT CACTTGCGCG CCGCAGAAAG TCCGTCTGGC AGCCTGGATA TCCTCTCCTA
 121 CCGGCACCCG CAGACGCCCC TGCAGCCGCC GGTCGGCGCC CGGGCTCCCT AGCCCTGTGC
 181 GCTCAACTGT CCTGCGCTGC GGGGTGCCGC GAGTTCACC TCCGCGCCTC CTTCTCTAGA
 241 CAGGCGCTGG GAGAAAGAAC CGGCTCCCGA GTTCTGGGCA TTTCGCCCGG CTCGAGGTGC
 301 AGGATGCAGA GCAAGGTGCT GCTGGCCGTC GCCCTGTGGC TCTGCGTGGA GACCCGGGCC
 361 GCCTCTGTGG GTTTGCCTAG TGTTTCTCTT GATCTGCCCA GGCTCAGCAT ACAAAAAGAC
 421 ATACTTACAA TTAAGGCTAA TACAACCTT CAAATTACTT GCAGGGGACA GAGGGACTTG
 481 GACTGGCTTT GGCCCAATAA TCAGAGTGGC AGTGAGCAA GGGTGGAGGT GACTGAGTGC
 541 AGCGATGGCC TCTTCTGTAA GACACTCACA ATTCCAAAAG TGATCGGAAA TGACTGGA
 601 GCCTACAAGT GCTTCTACCG GGAAACTGAC TTGGCCTCGG TCATTTATGT CTATGTTCAA
 661 GATTACAGAT CTCCATTTAT TGCTTCTGTT AGTGACCAAC ATGGAGTCGT GTACATTACT
 721 GAGAACAAAA ACAAACTGT GGTGATTCCA TGTCTCGGGT CCATTTCAA TCTCAACGTG
 781 TCACTTTGTG CAAGATACCC AGAAAAGAGA TTTGTTCTG ATGGTAACAG AATTTCTGG
 841 GACAGCAAGA AGGGCTTTAC TATTCCAGC TACATGATCA GCTATGCTGG CATGGTCTTC
 901 TGTGAAGCAA AAATTAATGA TGAAAGTTAC CAGTCTATTA TGTACATAGT TGTCGTTGTA
 961 GGGTATAGGA TTTATGATGT GGTTCTGAGT CCGTCTCATG GAATTGAACT ATCTGTTGGA
 1021 GAAAAGCTTG TCTTAAATTG TACAGCAAGA ACTGAACTAA ATGTGGGGAT TGACTTCAAC
 1081 TGGGAATACC CTTCTTCGAA GCATCAGCAT AAGAACTTG TAAACCGAGA CCTAAAAACC
 1141 CAGTCTGGGA GTGAGATGAA GAAATTTTGG AGCACCTTAA CTATAGATGG TGTAACCCGG
 1201 AGTGACCAAG GATTGTACAC CTGTGCAGCA TCCAGTGGGC TGATGACCAA GAAGAACAGC
 1261 ACATTTGTCA GGGTCCATGA AAAACCTTTT GTTGCTTTTG GAAGTGGCAT GGAATCTCTG
 1321 GTGGAAGCCA CGGTGGGGGA GCGTGTGAGA ATCCCTGCGA AGTACCTTGG TTACCCACCC

1381 CCAGAAATAA AATGGTATAA AAATGGAATA CCCCTTGAGT CCAATCACAC AATTAAAGCG
 1441 GGGCATGTAC TGACGATTAT GGAAGTGAGT GAAAGAGACA CAGGAAATTA CACTGTCATC
 1501 CTTACCAATC CCATTTCAAA GGAGAAGCAG AGCCATGTGG TCTCTCTGGT TGTGTATGTC
 1561 CCACCCAGAG TTGGTGAGAA ATCTCTAATC TCTCCTGTGG ATTCCTACCA GTACGGCACC
 1621 ACTCAAACGC TGACATGTAC GGTCTATGCC ATTCCTCCCC CGCATCACAT CCACTGGTAT
 1681 TGGCAGTTGG AGGAAGAGTG CGCCAACGAG CCCAGCCAAG CTGTCTCAGT GACAAACCCA
 1741 TACCCTTGTG AAGAATGGAG AAGTGTGGAG GACTTCCAGG GAGGAAATAA AATTGAAGTT
 1801 AATAAAAATC AATTTGCTCT AATTGAAGGA AAAAACAAAA CTGTAAGTAC CCTTGTTATC
 1861 CAAGCGGCAA ATGTGTCAGC TTTGTACAAA TGTGAAGCGG TCAACAAAGT CGGGAGAGGA
 1921 GAGAGGGTGA TCTCCTTCCA CGTGACCAGG GGTCTGAAA TTACTIONTGA ACCTGACATG
 1981 CAGCCCACTG AGCAGGAGAG CGTGTCTTTG TGGTGCACTG CAGACAGATC TACGTTTGAG
 2041 AACCTCACAT GGTACAAGCT TGGCCACAG CCTCTGCCAA TCCATGTGGG AGAGTTGCCC
 2101 ACACCTGTTT GCAAGAACTT GGATACTCTT TGGAAATTGA ATGCCACCAT GTTCTCTAAT
 2161 AGCACAAATG ACATTTTGAT CATGGAGCTT AAGAATGCAT CCTTGCAGGA CCAAGGAGAC
 2221 TATGTCTGCC TTGCTCAAGA CAGGAAGACC AAGAAAAGAC ATTGCGTGGT CAGGCAGCTC
 2281 ACAGTCCTAG AGCGTGTGGC ACCCACGATC ACAGGAAACC TGGAGAATCA GACGACAAGT
 2341 ATTGGGGAAA GCATCGAAGT CTCATGCACG GCATCTGGGA ATCCCCCTCC ACAGATCATG
 2401 TGGTTTAAAG ATAATGAGAC CCTGTAGAAA GACTCAGGCA TTGTATTGAA GGATGGGAAC
 2461 CGGAACCTCA CTATCCGCAG AGTGAGGAAG GAGGACGAAG GCCTCTACAC CTGCCAGGCA
 2521 TGCAGTGTTT TTGGCTGTGC AAAAGTGGAG GCATTTTCA TAATAGAAGG TGCCCAGGAA
 2581 AAGACGAACT TGGAAATCAT TATTCTAGTA GGCACGGCGG TGATTGCCAT GTTCTTCTGG
 2641 CTACTIONTCTG TCATCATCCT ACGGACCGTT AAGCGGGCCA ATGGAGGGGA ACTGAAGACA
 2701 GGCTACTIONTGT CCATCGTCAT GGATCCAGAT GACTIONTCCAT TGGATGAACA TTGTGAACGA
 2761 CTGCCCTIONTATG ATGCCAGCAA ATGGGAATTC CCCAGAGACC GGCTGAAGCT AGGTAAGCCT
 2821 CTTGGCCGTTG GTGCCCTIONTGG CCAAGTGATT GAAGCAGATG CCTIONTGGAAAT TGACAAGACA

2881 GCAACTTGCA GGACAGTAGC AGTCAAAATG TTGAAAGAAG GAGCAACACA CAGTGAGCAT
 2941 CGAGCTCTCA TGTCTGAACT CAAGATCCTC ATTCATATTG GTCACCATCT CAATGTGGTC
 3001 AACCTTCTAG GTGCCTGTAC CAAGCCAGGA GGGCCACTCA TGGTGATTGT GGAATTCTGC
 3061 AAATTTGGAA ACCTGTCCAC TTACCTGAGG AGCAAGAGAA ATGAATTTGT CCCCTACAAG
 3121 ACCAAAGGGG CACGATTCCG TCAAGGGAAA GACTACGTTG GAGCAATCCC TGTGGATCTG
 3181 AAACGGCGCT TGGACAGCAT CACCAGTAGC CAGAGCTCAG CCAGCTCTGG ATTTGTGGAG
 3241 GAGAAGTCCC TCAGTGATGT AGAAGAAGAG GAAGCTCCTG AAGATCTGTA TAAGGACTTC
 3301 CTGACCTTGG AGCATCTCAT CTGTTACAGC TTCCAAGTGG CTAAGGGCAT GGAGTTCTTG
 3361 GCATCGCGAA AGTGTATCCA CAGGGACCTG GCGGCACGAA ATATCCTCTT ATCGGAGAAG
 3421 AACGTGGTTA AAATCTGTGA CTTTGGCTTG GCCCGGGATA TTTATAAAGA TCCAGATTAT
 3481 GTCAGAAAAG GAGATGCTCG CCTCCCTTTG AAATGGATGG CCCAGAAAC AATTTTTGAC
 3541 AGAGTGATCA CAATCCAGAG TGACGTCTGG TCTTTGGTG TTTGCTGTG GGAAATATTT
 3601 TCCTTAGGTG CTTCTCCATA TCCTGGGGTA AAGATTGATG AAGAATTTTG TAGGCGATTG
 3661 AAAGAAGGAA CTAGAATGAG GGCCCTGAT TATACTACAC CAGAAATGTA CCAGACCATG
 3721 CTGGACTGCT GGCACGGGA GCCCAGTCAG AGACCCACGT TTCAGAGTT GGTGGAACAT
 3781 TTGGGAAATC TCTTGCAAGC TAATGCTCAG CAGGATGGCA AAGACTACAT TGTTCCTCCG
 3841 ATATCAGAGA CTTTGAAGCAT GGAAGAGGAT TCTGGACTCT CTCTGCCTAC CTCACCTGTT
 3901 TCCTGTATGG AGGAGGAGGA AGTATGTGAC CCCAAATTCC ATTATGACAA CACAGCAGGA
 3961 ATCAGTCAGT ATCTGCAGAA CAGTAAGCGA AAGAGCCGGC CTGTGAGTGT AAAAACATTT
 4021 GAAGATATCC CGTTAGAAGA ACCAGAAGTA AAAGTAATCC CAGATGACAA CCAGACGGAC
 4081 AGTGGTATGG TTCTTGCCCTC AGAAGAGCTG AAACTTTGG AAGACAGAAC CAAATTATCT
 4141 CCATCTTTTG GTGGAATGGT GCCCAGCAAA AGCAGGGAGT CTGTGGCATC TGAAGGCTCA
 4201 AACCAGACAA GCGGCTACCA GTCCGGATAT CACTCCGATG ACACAGACAC CACCGTGTAC
 4261 TCCAGTGAGG AAGCAGAACT TTAAAGCTG ATAGAGATTG GAGTGCAAAC CGGTAGCACA
 4321 GCCCAGATTC TCCAGCCTGA CTCGGGGACC AACTGAGCT CTCCTCCTGT TTAAAAGGAA

4381 GCATCCACAC CCCAACTCCC GGACATCACA TGAGAGGTCT GCTCAGATTT TGAAGTGTG
 4441 TTCTTTCCAC CAGCAGGAAG TAGCCGCATT TGATTTTCAT TTCGACAACA GAAAAAGGAC
 4501 CTCGGACTGC AGGGAGCCAG TCTTCTAGGC ATATCCTGGA AGAGGCTTGT GACCCAAGAA
 4561 TGTGTCTGTG TCTTCTCCCA GTGTTGACCT GATCCTCTTT TTCATTCAT TTAAAAAGCA
 4621 TTATCATGCC CCTGCTGCGG GTCTCACCAT GGGTTTAGAA CAAAGAGCTT CAAGCAATGG
 4681 CCCCATCCTC AAAGAAGTAG CAGTACCTGG GGAGCTGACA CTTCTGTAAA ACTAGAAGAT
 4741 AAACCAGGCA ACGTAAGTGT TCGAGGTGTT GAAGATGGGA AGGATTTGCA GGGCTGAGTC
 4801 TATCCAAGAG GCTTTGTTTA GGACGTGGGT CCCAAGCCAA GCCTTAAGTG TGAATTTCGG
 4861 ATTGATAGAA AGGAAGACTA ACGTTACCTT GCTTTGGAGA GTRACTGGAGC CTGCAAATGC
 4921 ATTGTGTTTG CTCTGGTGGG GGTGGGCATG GGGTCTGTTC TGAAATGTAA AGGGTTCAGA
 4981 CGGGGTTTCT GGTTTTAGAA GGTTCGCTGT TCTTCGAGTT GGGCTAAAGT AGAGTTCGTT
 5041 GTGCTGTTTC TGACTCCTAA TGAGAGTTCC TTCCAGACCG TTAGCTGTCT CCTTGCCAAG
 5101 CCCCAGGAAG AAAATGATGC AGCTCTGGCT CTTTGTCTCC CAGGCTGATC CTTTATTCAG
 5161 AATACCACAA AGAAAGGACA TTCAGCTCAA GGCTCCCTGC CGTGTGAAG AGTTCGACT
 5221 GCACAAACCA GCTTCTGGTT TCTTCTGGAA TGAATACCCT CATATCTGTC CTGATGTGAT
 5281 ATGTCTGAGA CTGAATGCGG GAGGTTCAAT GTGAAGCTGT GTGTGGTGTG AAAGTTTCAG
 5341 GAAGGATTTT ACCCTTTTGT TCTTCCCCTT GTCCCAACC CACTCTCACC CCGCAACCCA
 5401 TCAGTATTTT AGTTATTTGG CCTCTACTCC AGTAAACCTG ATTGGGTTTG TTCACTCTCT
 5461 GAATGATTAT TAGCCAGACT TCAAAATTAT TTTATAGCCC AAATTATAAC ATCTATTGTA
 5521 TTATTTAGAC TTTTAACATA TAGAGCTATT TCTACTGATT TTTGCCCTTG TTCTGTCCTT
 5581 TTTTTCAAAA AAGAAAATGT GTTTTTTGTG TGGTACCATA GTGTGAAATG CTGGGAACAA
 5641 TGACTATAAG ACATGCTATG GCACATATAT TTATAGTCTG TTTATGTAGA AACAAATGTA
 5701 ATATATTTAA GCCTTATATA TAATGAACTT TGTACTATTC ACATTTTGTA TCAGTATTAT
 5761 GTAGCATAAC AAAGGTCATA ATGCTTTCAG CAATTGATGT CATTTTATTA AAGAACATTG
 5821 AAAAACTTGA

Figura 4 (D) Secuencia de polipéptido de VEGFR-2 (KDR/Fik-1)**(GenBank Accession No. AAB88005) (SEQ ID NO: 10)**

1 MQSKVLLAVA LWLCVETRAA SVGLPSVSLD LPRLSIQKDI LTIKANTTLQ ITCRGQRDL D
 61 WLWPNNQSGS EQRVEVTECS DGLFCKTLTI PKVIGNDTGA YKCFYRETDL ASVIYVYVQD
 121 YRSPFIASVS DQHGCVVYITE NKNKTVVIPC LGSISNLNVS LCARYPEKRF VPDGNRISWD
 181 SKKGFTIPSY MISYAGMVFC EAKINDESYQ SIMYIVVVVG YRIYDVVLS P SHGIELSVGE
 241 KLVLNCTART ELNVGIDFNW EYPSSKHQHK KLVNRDLKTQ SGSEMKKFLS TLTIDGVTRS
 301 DQGLYTCAAS SGLMTKKNST FVRVHEKPFV AFGSGMESLV EATVGERVRI PAKYLGYP P
 361 EIKWYKNGIP LESNHTIKAG HVLTIMEVSE RDTGNYTVIL TNPISKEKQS HVVSLVYVVP
 421 PQIGEKSLIS PVDSYQYGT T QTLTCTVYAI PPPHHIHWYW QLEEECANEP SQAVSVTNPY
 481 PCEEWRVVED FQGGNKIEVN KNQFALIEGK NKTVSTLVIQ AANVSALYKC EAVNKVGRGE
 541 RVISFHVTRG PEITLQPD MQ PTEQESVSLW CTADRSTFEN LTWYKLGQPQ LPIHVGELPT
 601 PVCKNLDTLW KLNATMFSNS TNDILIMELK NASLQDQGDY VCLAQDRKTK KRHCVV RQLT
 661 VLERVAPTIT GNLENQTTSI GESIEVSCTA SGNPPPQIMW FKDNETLVED SGIVLKDGNR
 721 NLTIRVRKE DEGLYTCQAC SVLGCAKVEA FFIIEGAQEK TNLEIILVG TAVIAMFFWL
 781 LLVIILRTVK RANGGELKTG YLSIVMDPDE LPLDEHCERL PYDASKWEFP RDRCLKGKPL
 841 GRGAFGQVIE ADAFGIDKTA TCRTVAVKML KEGATHSEHR ALMSELKILI HIGHHLNVVN
 901 LLGACTKPGG PLMVIVEFCK FGNLSTYLR S KRNEFVPHYKT KGARFRQGD YVGAIPVDLK
 961 RRLDSITSSQ SSASSGFVEE KSLSDVEEEE APEDLYKDFL TLEHLICYSF QVAKGMEFLA
 1021 SRKCIHRDLA ARNILLSEKN VVKICDFGLA RDIYKDPDYV RKG DARLPLK WMAPETIFDR
 1081 VYTIQSDVWS FGVLLWEIFS LGASPYPGVK IDEEFCRRLK EGTRMRAPDY TPEMYQTML
 1141 DCWHGEP SQR PTFSELVEHL GNLLQANAQQ DGKDYIVLPI SETLSMEEDS GLSLPTSPVS
 1201 CMEEEEVCDP KFHYDNTAGI SQYLQNSKRK SRPVSVKTFE DIPLEEPEVK VIPDDNQ TDS
 1261 GMVLASEELK TLEDRTKLSP SFGGMVPSKS RESVASEGSN QTSQYQSGYH SDDTDTTVYS
 1321 SEEAELKLI EIGVQTGSTA QILQPD SGTT LSSPPV

FIGURA 5
Efecto de bloqueo de señalización de PDGFRBeta y VEGF sobre neovascularización en córnea

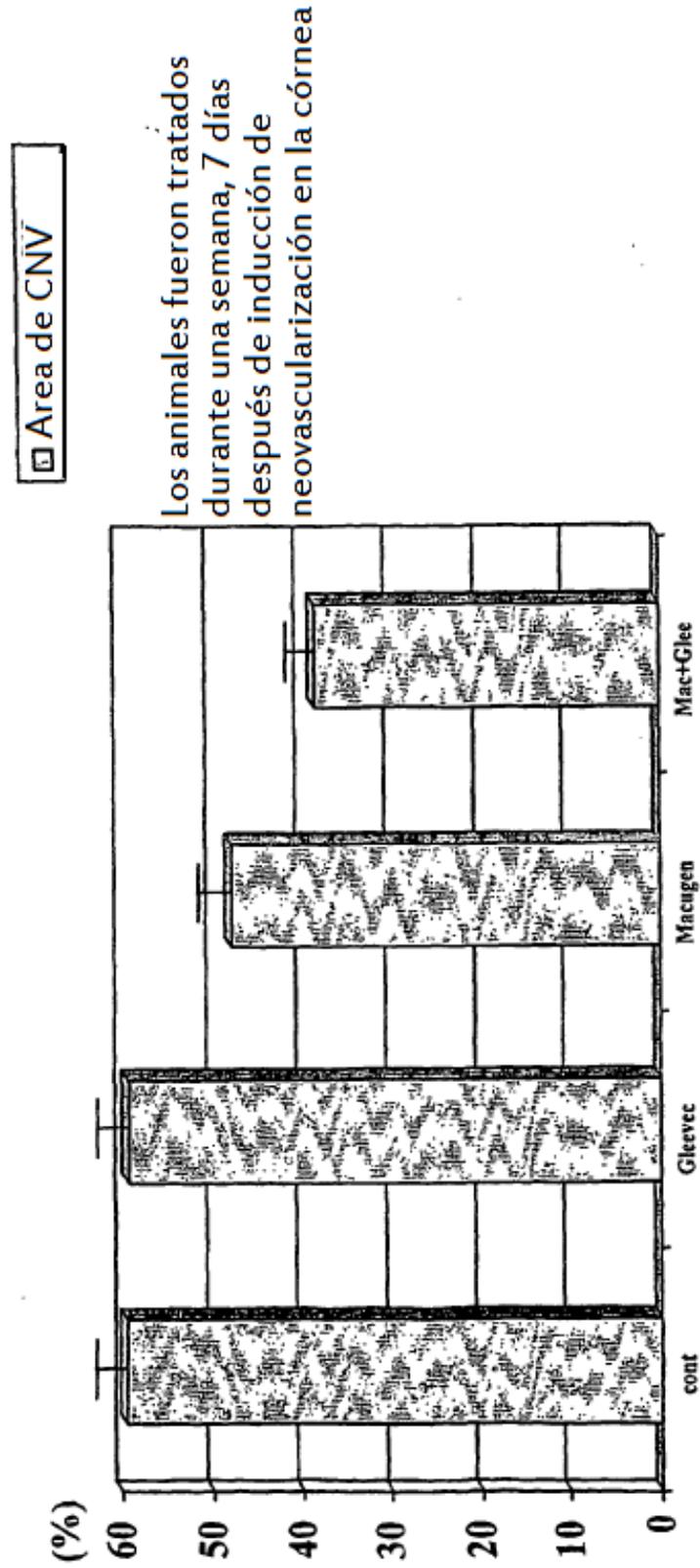


FIGURA 6

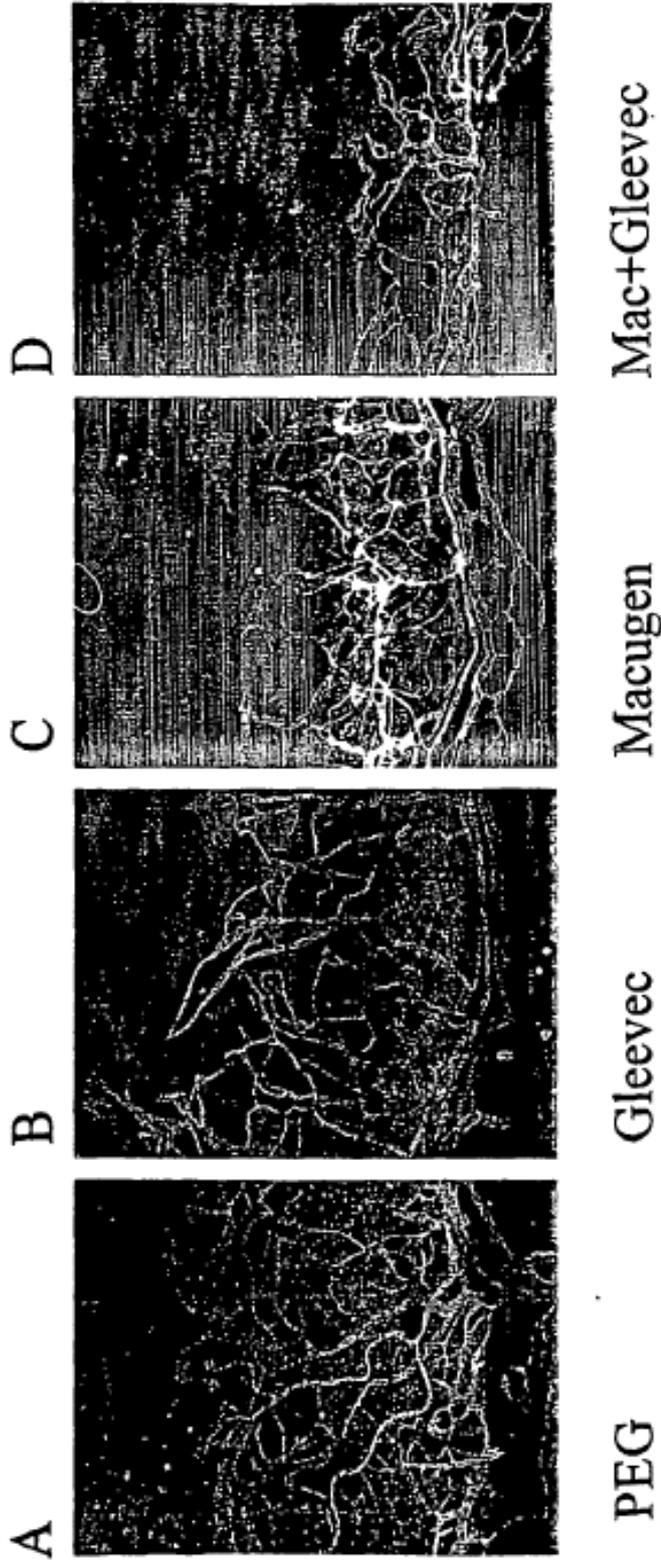


FIGURA 7 **Efecto de inhibidores de señalización de PDGFRBeta y VEGF** **sobre vasculatura normal**

La vasculatura de ojos de control no fue afectada por administración de Gleevec, APB5, PEG o Macugen, sugiriendo que el bloqueo de la señalización de PDGFRBeta o VEGF o de ambos apunta a vasos sanguíneos nuevos o establecidos

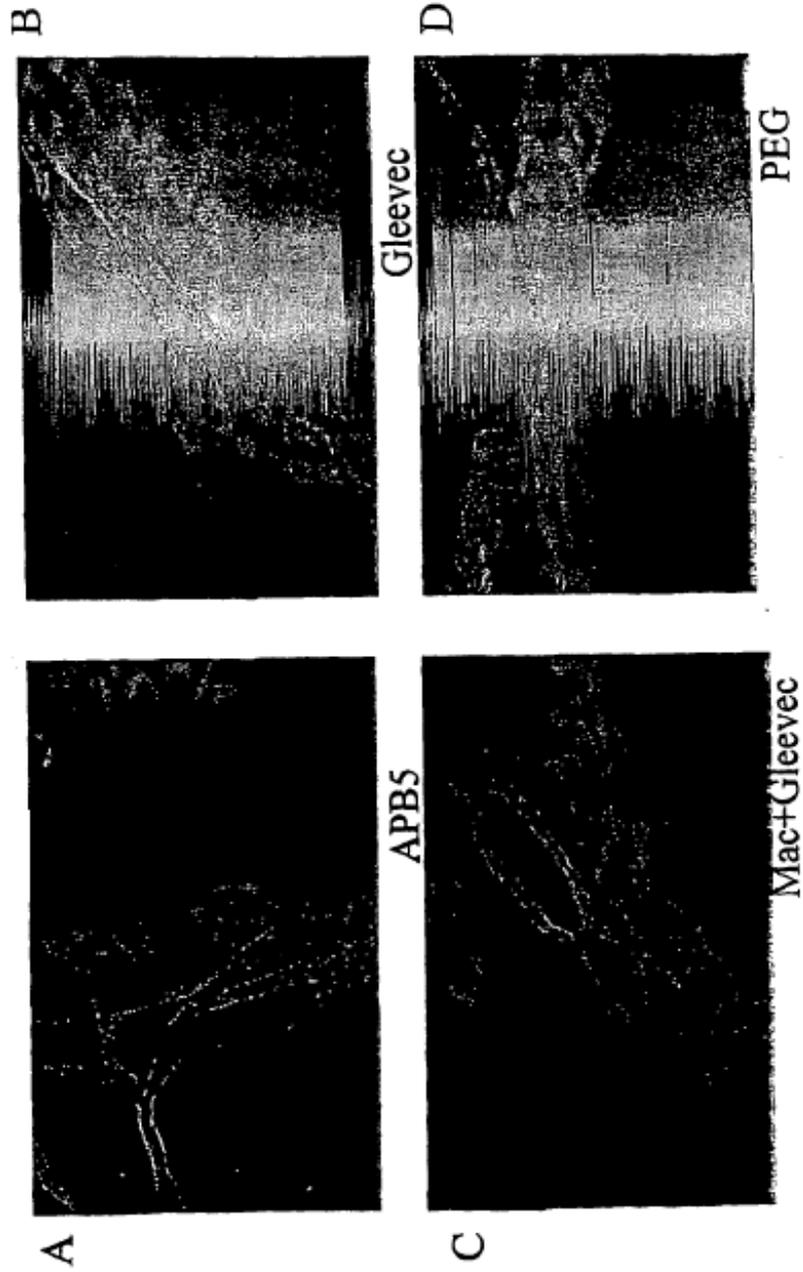


FIGURA 8
Area de neovascularización coroidal después de tratamiento con anticuerpo APB5 y Macugen

Todos los tratamientos duraron una semana, empezando en el día 7 después de que 25 mg/kg de Macugen y 5 mg/kg de APB5 quemados con láser fueron inyectados dos veces al día por IP

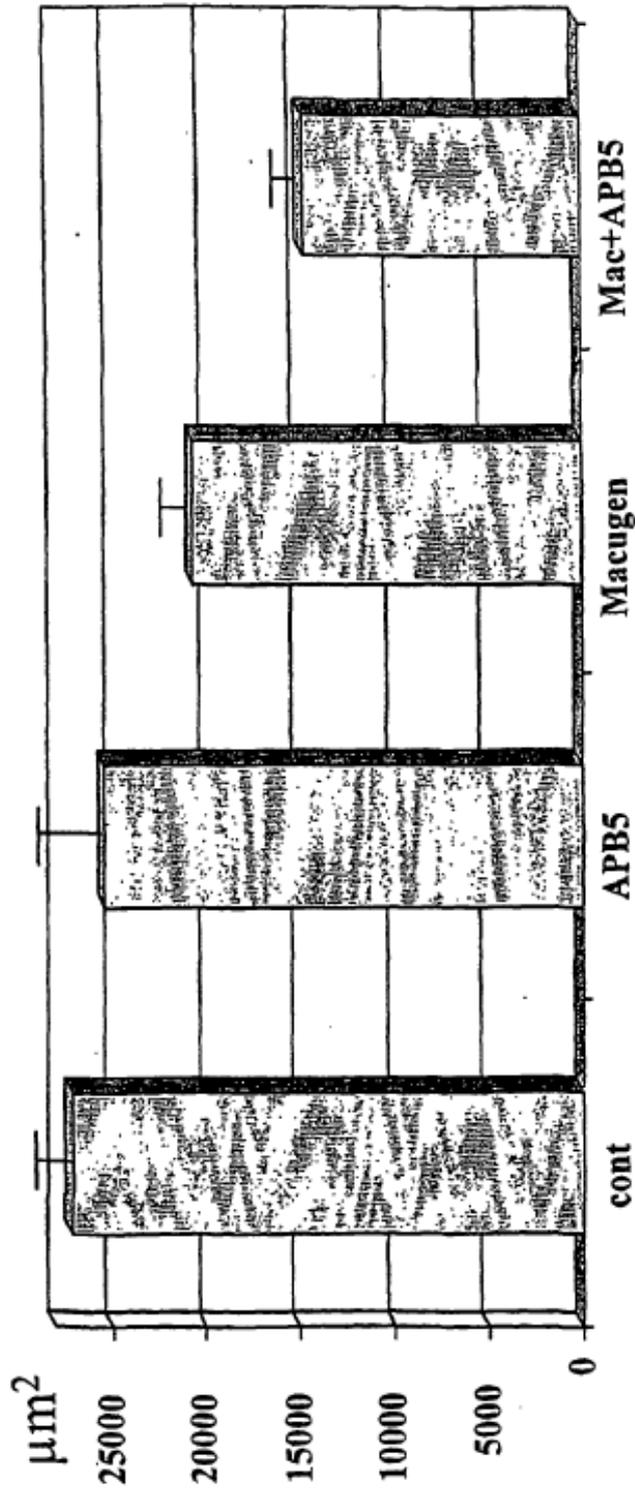


FIGURA 9
Area de neovascularización coroidal después de tratamiento con
Gleevec y Macugen

Todos los tratamiento duraron una semana, comenzando en el día 7 después de que 25 mg/kg de Macugen fueron inyectados dos veces al día por IP. Se administraron 50 mg/kg de Gleevec por ingestión dos veces al día.

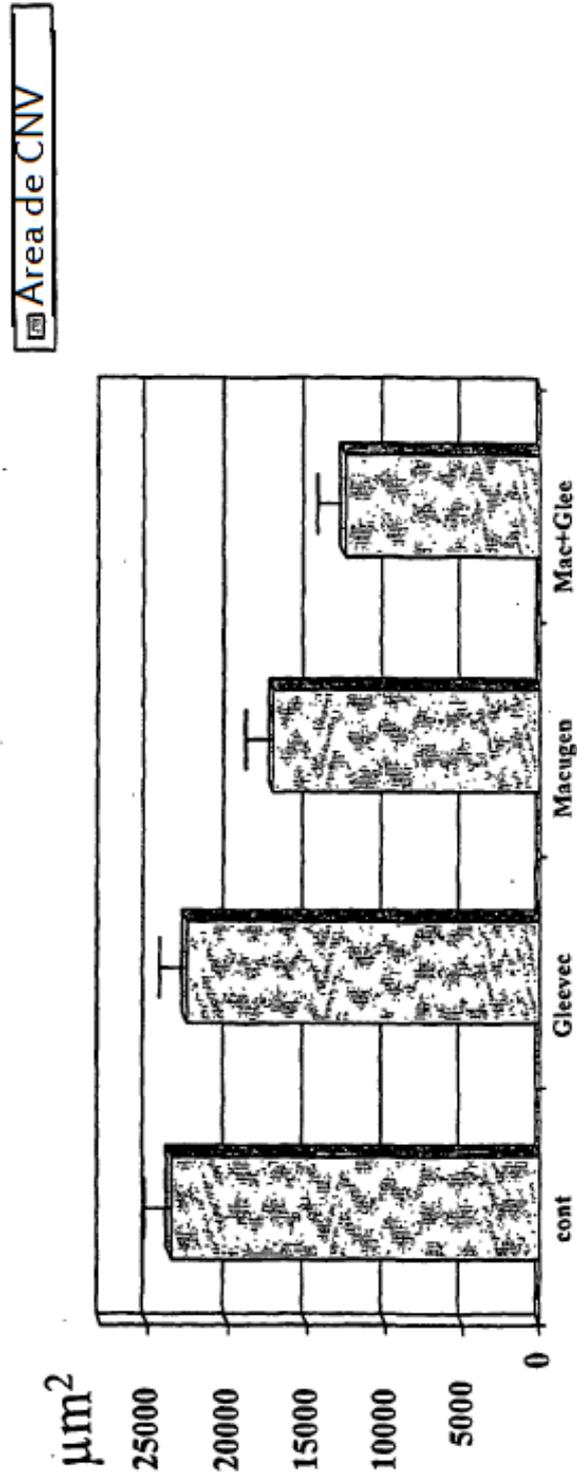


FIGURA 10

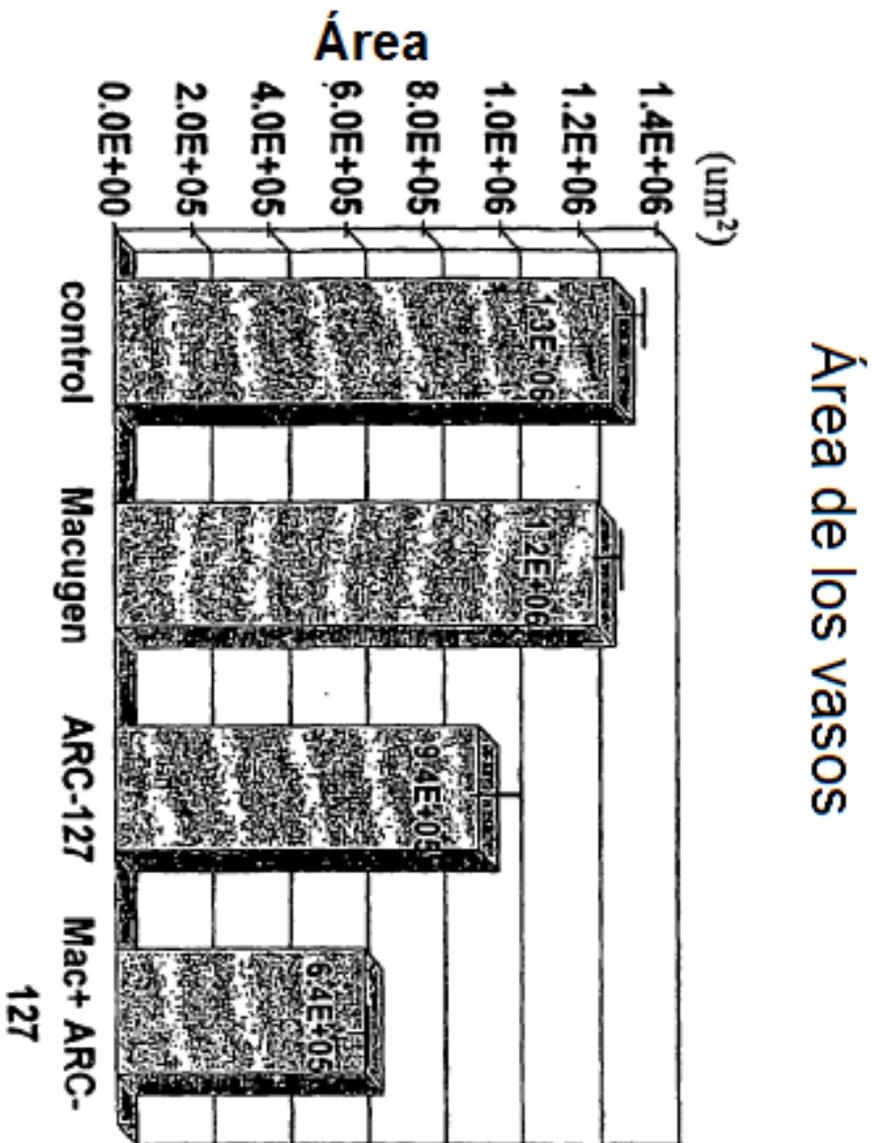


Figura 11

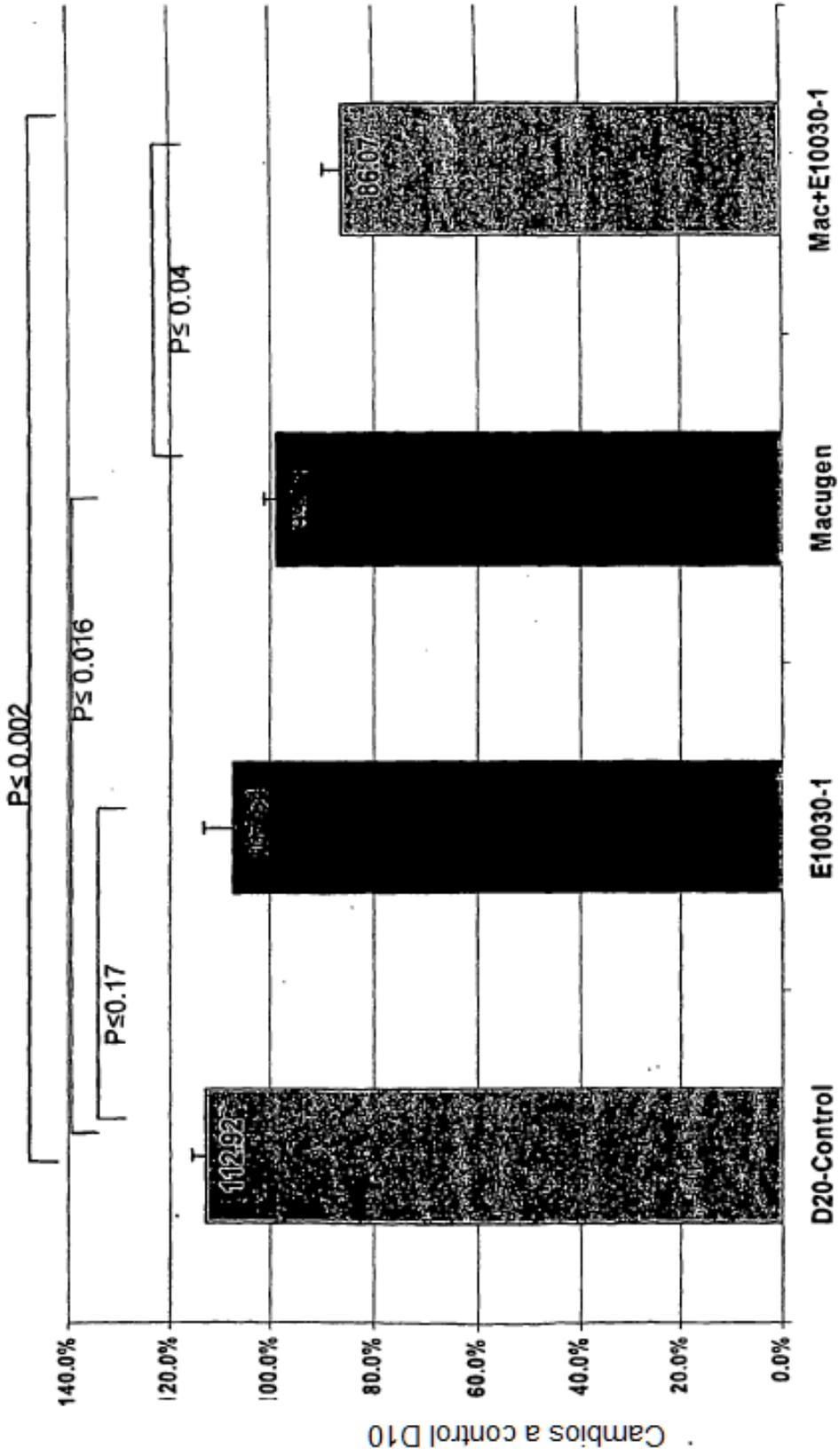


FIGURA 12

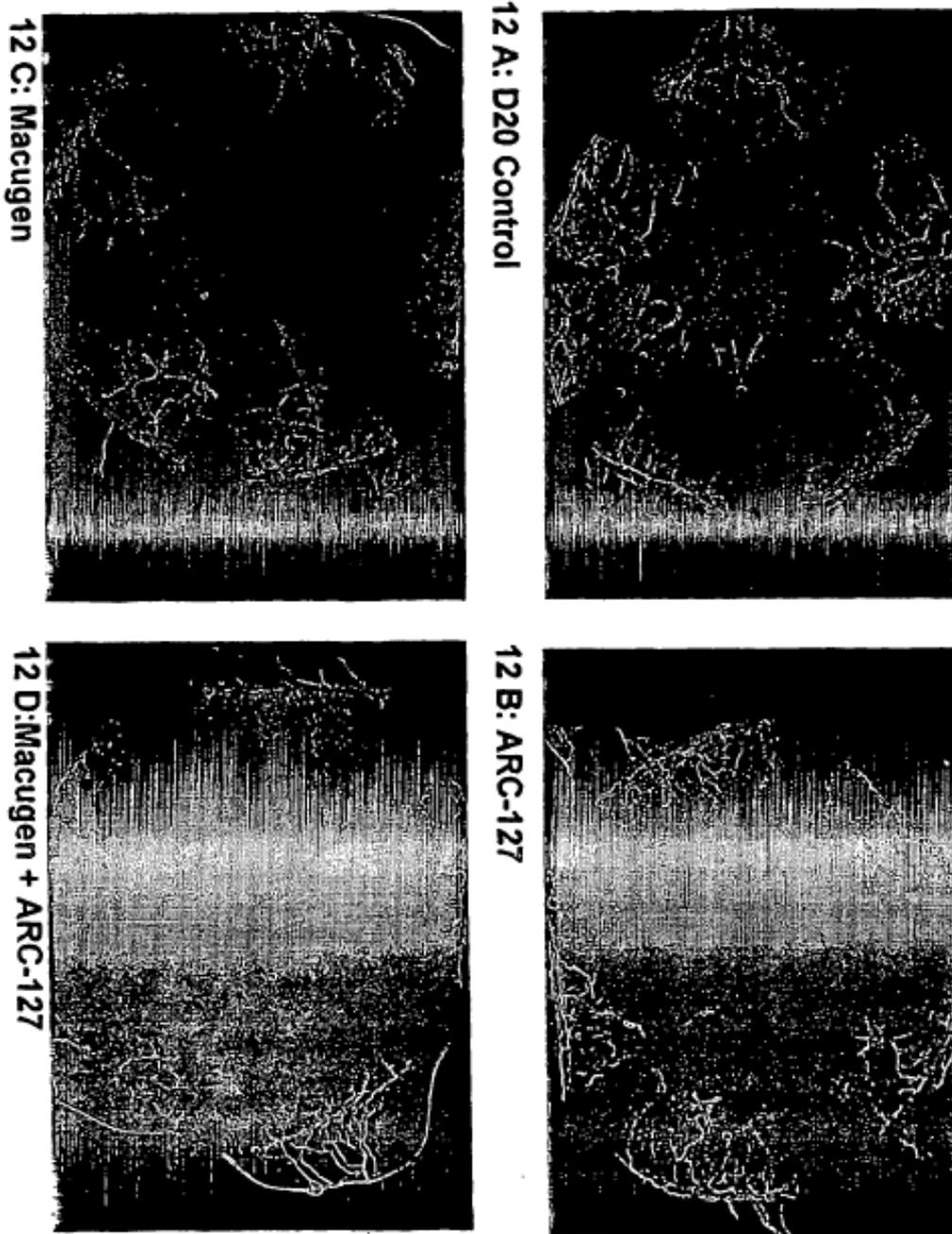


FIGURA 13

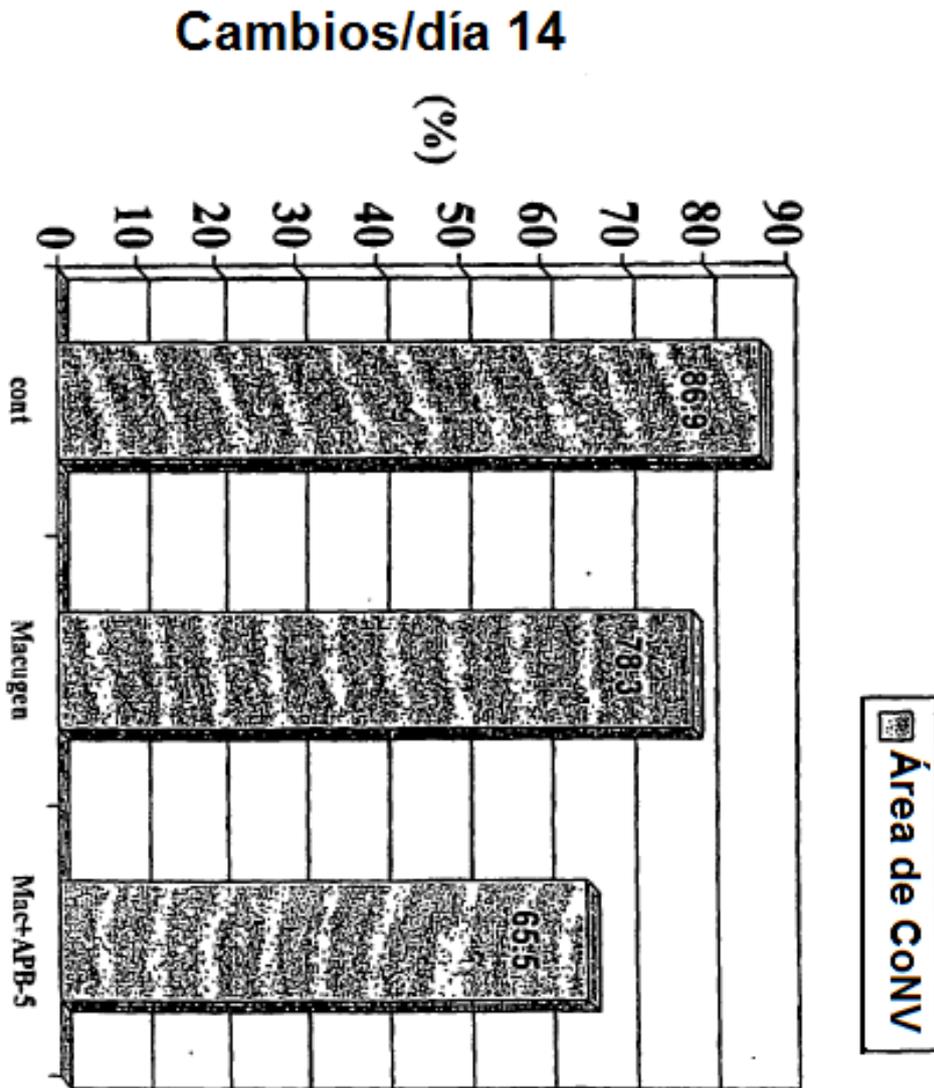


FIGURA 14
Cambios/día 14

