

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 440**

51 Int. Cl.:

A61K 8/64 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61P 17/16 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2007 E 10172193 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2012 EP 2272497**

54 Título: **Métodos de aumentar la función linfática**

30 Prioridad:

18.01.2006 US 760328 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.02.2013

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(100.0%)
55 Fruit Street
Boston, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

**DETMAR, MICHAEL y
KAJIYA, KENTARO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 396 440 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de aumentar la función linfática

5 **Antecedentes**

El sistema vascular linfático está compuesto de una densa red de capilares de paredes finas que drenan la linfa rica en proteínas del espacio extracelular. Sus principales papeles incluyen el mantenimiento de la homeostasis tisular de líquidos y la mediación de la respuesta inmune aferente (Oliver et al. (2002) Genes Dev. 16:773-83; Witte et al. (2001) Microsc. Res. Tech. 55:122-45). Una función conocida de los vasos linfáticos es el drenaje de líquido tisular de tejidos normales e inflamados (Kunstfeld et al. (2004) Blood 104:1048-57).

El documento WO 2005/097187 A2 divulga el tratamiento del daño en la piel inducido por UVB por medio de un anticuerpo anti-VEGF humanizado, en particular bevacizumab.

15 **Compendio**

Se describe que la irradiación con UVB tanto aguda como crónica de piel murina produce un agrandamiento importante de vasos linfáticos. Sorprendentemente, estos vasos linfáticos agrandados están funcionalmente deteriorados y son hiperpermeables, detectado mediante linfangiografía intravital. Los niveles de expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-A, pero no de los factores linfangiogénicos conocidos VEGF-C o -D aumentaron en epidermis irradiada con UVB. La sobreexpresión dirigida de VEGF-A en epidermis de ratones transgénicos produjo agrandamiento y fuga aumentados de los vasos linfáticos después de irradiación aguda con UVB, mientras que el bloqueo sistémico de la señalización de VEGF-A previno en gran parte anomalías en los vasos linfáticos y fotodaño inducido por UVB. En conjunto, estos descubrimientos indican que los vasos linfáticos son diana de fotodaño cutáneo inducido por UVB y que VEGF-A media el deterioro de la función de vasos linfáticos y por tanto contribuye a los efectos adversos de la irradiación de UVB sobre la piel.

La divulgación presenta métodos de reducir el daño en la piel inducido por UVB disminuyendo la actividad o los niveles de VEGF-A en la piel, por ejemplo, en la cara, pecho, cuello, manos u otras regiones del cuerpo. Estos métodos pueden incluir además aumentar la actividad o los niveles de un factor linfangiogénico, por ejemplo, VEGF-C o VEGF-D, en la piel.

A la luz de estos descubrimientos, la presente invención proporciona un agonista de VEGF-C seleccionado de i) una proteína que incluye un polipéptido VEGF-C y ii) un ácido nucleico que codifica un polipéptido VEGF-C, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene daño en la piel inducido por UVB.

En un aspecto, el agonista se puede usar en métodos de reducción del daño en la piel inducido por UVB, por ejemplo, en la cara, pecho, cuello, manos u otras regiones de cuerpo, fomentando la función linfática. El agonista también se puede usar en métodos de reducción del edema disminuyendo la actividad o los niveles de VEGF-A.

Un agonista de VEGF-C es un agente que directa o indirectamente aumenta la actividad de VEGF-C en el sujeto.

Muchos agonistas de VEGF-C aumentan la actividad de señalización de VEGFR. Los agonistas de VEGF-C de la invención incluyen una proteína que incluye un polipéptido VEGF-C (por ejemplo, modificado en su forma heterodimérica madura) o un ácido nucleico que codifica un VEGF-C. También se pueden usar otras proteínas y moléculas, por ejemplo, anticuerpos y moléculas pequeñas, para aumentar la actividad de VEGFR. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos que se unen a, y opcionalmente entrecruzan (por ejemplo, dimerizan) VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) para la actividad de VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3). Otros agonistas adicionales adecuados de VEGF-C incluyen moléculas pequeñas, productos naturales y extractos.

Los agonistas se pueden usar para tratar una afección en la que se desea una función de vasos linfáticos aumentada. Tales afecciones incluyen edema, por ejemplo, debido a la irradiación UVB. Otras afecciones en las que se desea función de vasos linfáticos aumentada incluyen piel envejecida o piel dañada, por ejemplo piel dañada por UVB. Aún otras afecciones incluyen las producidas en parte por un factor genético o medioambiental, por ejemplo radiación ultravioleta.

Más específicamente, la invención se puede usar en un método de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano. El método incluye (a) identificar un sujeto en riesgo de, o que tiene, edema o daño en la piel, por ejemplo, debido a exposición a radiación, por ejemplo, exposición crónica o aguda a UVB; y (b) administrar al sujeto un agonista descrito en el presente documento. Preferiblemente, el agonista se administra a la piel del sujeto, por ejemplo, por vía tópica. En un uso preferido, se previenen o reducen eritema, inflamación, edema, ampollas, hinchazón y/o quemaduras solares inducidas por UVB crónica o aguda. La exposición aguda a UVB significa exposición a al menos una MED de luz UVB, preferiblemente al menos 2, 3 o 5 MED. En un uso, el sujeto se expone a entre 3-8 MED, por ejemplo, 3-5, 5-7 o 7-8 MED. En algunos usos, el sujeto se expone, se expone o se ha expuesto al sol cuando el índice UV es de

moderado a extremo, por ejemplo, durante un tiempo suficiente para producir quemaduras. El sujeto puede mostrar uno o más síntomas de exposición aguda a UVB, por ejemplo inflamación, eritema, hinchazón, ampollas, dolor o edema en la piel. Típicamente, el sujeto tiene al menos 5 años de edad. Preferiblemente, el sujeto tiene al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 años de edad o más.

En un uso preferido, el agente se administra a través de un transportador liposómico, por ejemplo, un liposoma de lecitina o un liposoma de alquilfosfolípido. El agente se puede administrar en la cara, pecho, cuello, manos y otras regiones del cuerpo. El tratamiento puede implicar más de una administración, por ejemplo, al menos dos, tres o cuatro administraciones, del agente. El tratamiento también puede implicar la administración diaria del agente.

Además, el agonista de la invención se puede administrar en combinación con un protector solar, antibiótico, hidratante, un ácido retinoico, un derivado retinoide o un ácido alfa-hidroxi. En algunas formas de realización, el agonista se administra al sujeto en combinación con un dispositivo de liberación controlada, por ejemplo, un polímero, micropartícula o malla biocompatibles. El dispositivo puede reducir la degradación y controlar la liberación del agente.

El tratamiento médico también puede implicar evaluar el daño en la piel del sujeto. La evaluación se puede realizar antes, durante y/o después de la administración del agente. Por ejemplo, la evaluación se puede realizar al menos 4 horas, 8 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 4, 7, 14 o más días antes y/o después de la administración.

Se prefiere que la administración del agonista se realice: antes de la exposición a la luz UVB, por ejemplo, antes de la exposición al sol; cuando se advierte o diagnostica el daño en la piel (por ejemplo, quemadura solar, hinchazón, eritema y/o inflamación) inducido por UVB crónica o aguda; en el momento en que se empieza un tratamiento para un trastorno relacionado con daño en la piel o empieza a ejercer su efecto; o en general, según se necesite para mantener la salud de la piel.

El periodo durante el que se administra el agonista, o el periodo durante el que mantienen niveles clínicamente eficaces en el sujeto, puede ser a corto plazo, por ejemplo, durante un día, dos días, una semana, o a largo plazo, por ejemplo, durante seis meses o más o un año o más, o a corto plazo, durante menos de un año, seis meses, un mes, dos semanas o menos.

La identificación de un sujeto en necesidad de daño en la piel alterada puede ser realizada, por ejemplo, por el sujeto, por personal sanitario, por un suministrador de un tratamiento para el daño en la piel o por otra persona. El agente lo puede administrar, por ejemplo, el sujeto, personal sanitario, un suministrador de un tratamiento para el daño en la piel u otra persona. Asimismo, la evaluación del efecto en el daño en la piel la puede realizar, por ejemplo, el sujeto, personal sanitario, un suministrador de un tratamiento para el daño en la piel u otra persona.

Además, se pueden tratar sujetos con otros antagonistas de VEGF. Por tanto, el tratamiento es posible con anticuerpos anti-VEGF tales como bevacizumab; o antagonistas del receptor de VEGF, por ejemplo, anticuerpos anti-receptor de VEGF o inhibidores de molécula pequeña, compuestos que tienen un peso molecular de menos de 1500 dalton.

Los inhibidores y antagonistas del receptor de VEGF de ejemplo incluyen inhibidores de la actividad tirosina quinasa del receptor de VEGF. 4-[4-(1-Amino-1-metiletil)fenil]-2-[4-(2-morfolin-4-il-etil)fenilamino]pirimidin-5-carbonitrilo (JNJ-17029259) es uno de una clase estructural de 5-cianopirimidinas que son inhibidores disponibles por vía oral, selectivos, nanomolar del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR-2). Ejemplos adicionales incluyen: PTK-787/ZK222584 (Astra-Zeneca), SU5416, SU11248 (Pfizer) y ZD6474 ([N-(4-bromo-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[(1-metilpiperidin-4-il)metoxil]-quinazolin-4-amina]). Aún otros agentes que se pueden usar son inhibidores de tirosinas quinasa de amplia especificidad, por ejemplo SU6668. Véase, por ejemplo, Bergers, B. et al. (2003) J. Clin. Invest. 111, 1287-1295.

En otro uso médico preferido, VEGF-A o VEGFR-2 se inhiben disminuyendo el nivel de expresión de un gen endógeno de VEGF-A o VEGFR-2, por ejemplo, disminuyendo la transcripción del gen VEGF-A o VEGFR-2. En un uso médico preferido, la transcripción del gen VEGF-A o VEGFR-2 se puede disminuir por: alteración de las secuencias reguladoras del gen endógeno de VEGF-A o VEGFR-2, por ejemplo, mediante la adición de una secuencia reguladora negativa, tal como un sitio de unión a ADN para un represor transcripcional, o mediante la eliminación de una secuencia reguladora positiva, tal como un potenciador o un sitio de unión a ADN para un activador transcripcional. En otro uso médico preferido, el anticuerpo que se une a VEGF-A o VEGFR-2 es un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, un anticuerpo quimérico humanizado o monoclonal humano.

En un uso médico, se usa un agente que disminuye la expresión de VEGF es una molécula de ácido nucleico de VEGF-A o VEGFR-2 que se puede unir a una secuencia de ácido nucleico de VEGF-A o VEGFR-2 celular, por ejemplo ARNm, y puede inhibir la expresión de la proteína, por ejemplo un antisentido, una molécula de ARNip o una ribozima; un agente que disminuye la expresión del gen VEGF-A o VEGFR-2, por ejemplo, una molécula pequeña que se une al promotor de VEGF-A o VEGFR-2; o un extracto crudo o semipurificado, por ejemplo, un extracto botánico tal como un extracto de plantas, o un extracto de algas, por ejemplo, aceite de semillas de granadas o aceite de pepitas de uva.

El uso puede incluir además: aumentar la actividad de uno más factores linfogénicos, por ejemplo, aumentar la actividad de proteínas linfogénicas naturales tales como VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) en el sujeto. La actividad de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) se puede aumentar, por ejemplo, administrando un agente que aumente la actividad de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3). En una forma de realización preferida, un agente que aumenta la actividad de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) puede ser uno o más de los siguientes: un polipéptido VEGF-C o -D, o un fragmento o análogo biológicamente activo del mismo, por ejemplo, un polipéptido derivado de VEGF-C o -D o un polipéptido retroinverso de los mismos; un ácido nucleico que codifica un polipéptido VEGF-C o -D o un fragmento o análogo biológicamente activo del mismo; un agonista de VEGF-C o -D, por ejemplo, un anticuerpo o molécula pequeña que tiene o aumenta la actividad de VEGF-C o -D; o un agente que aumenta la expresión del ácido nucleico de VEGF-C o -D, por ejemplo, una molécula pequeña que se une a la región promotora de VEGF-C o -D y aumenta su expresión.

En un uso médico preferido, VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) se aumenta por un agente, por ejemplo, una molécula pequeña, que induce la expresión de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3). En usos preferidos, un agente que induce la expresión de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) se administra por vía tópica. En usos preferidos, el agente se administra a un sujeto lo suficientemente antes de la exposición a UVB, por ejemplo, exposición al sol, de modo que el efecto en linfogénesis está presente en la piel del sujeto en el momento de la exposición a UVB.

La actividad de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) también se puede aumentar mediante la administración controlada al sujeto de un ácido nucleico de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) o una proteína o fragmento o análogo de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3). Se puede administrar al sujeto un ácido nucleico, proteína, fragmento o análogo de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) en combinación con un dispositivo de liberación controlada, por ejemplo, un polímero, micropartícula o malla biocompatibles. El dispositivo puede reducir la degradación y controlar la liberación del ácido nucleico, proteína, fragmento o análogo de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3). Tal sistema biocompatible de liberación controlada de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) se puede administrar al sujeto, por ejemplo, mediante inyección o implantación, por ejemplo, por vía intramuscular, subcutánea, intravenosa o en un órgano, cavidad articular o en una lesión.

El nivel de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) también se puede aumentar aumentando la actividad endógena de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3). La actividad se puede aumentar aumentando el nivel de expresión del gen, por ejemplo aumentando la transcripción del gen VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3); aumentando la estabilidad del ARNm de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3), por ejemplo, alterando la estructura secundaria o terciaria del ARNm; aumentando la traducción del ARNm de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3); y/o aumentando la estabilidad de la proteína VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3). La transcripción del gen VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) se puede aumentar, por ejemplo, cambiando las secuencias reguladoras del gen VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) endógeno. En un uso, la secuencia reguladora se puede cambiar mediante: la adición de un elemento regulador positivo (tal como un potenciador o un sitio de unión a ADN para un activador transcripcional); la delección de un elemento regulador negativo (tal como un sitio de unión a ADN para un represor transcripcional) y/o sustitución de la secuencia reguladora endógena, o elementos en la misma, con la de otro gen, permitiendo de esta manera que se transcriba el gen de VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3) de forma más eficaz.

En otro uso, el agonista se usa en combinación con una molécula pequeña o un extracto crudo o semipurificado, por ejemplo un extracto botánico tal como un extracto de plantas, que induce VEGF-C o -D o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-3).

En otro aspecto, la invención presenta un kit para modular el daño a la piel de un sujeto que incluye una composición como se reivindica e instrucciones para su uso, por ejemplo, instrucciones para aplicar la composición en un área del cuerpo en necesidad de tratamiento para daño en la piel inducido por UVB aguda, por ejemplo, eritema, hinchazón, quemadura solar y/o inflamación. En una forma de realización preferida, la composición también tiene un ingrediente cosmético, por ejemplo, una fragancia o hidratante.

Se define una cantidad eficaz del agonista de la presente invención como la cantidad de una composición que, tras administración a un sujeto (por ejemplo, un ser humano), reduce el daño en la piel en el sujeto. La cantidad eficaz que se va a administrar a un sujeto típicamente se basa en una variedad de factores que incluyen la edad, sexo, área de superficie, peso y estado de la piel. El área de superficie corporal se puede determinar aproximadamente de la altura y el peso del paciente. Véase, por ejemplo, Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, Nueva York, 1970, 537. Las dosis eficaces variarán, como reconocen los expertos en la materia, dependiendo de la vía de administración, uso de excipientes y la posibilidad de co-uso con otros tratamientos tal como el uso de otros compuestos moduladores del daño en la piel.

En otro aspecto, la invención se puede usar en un método que incluye: aplicar, a una región de la piel de un sujeto humano (por ejemplo, antebrazos, piernas, espalda, torso, cabeza, cara, cuero cabelludo, una cantidad protectora de un

inhibidor de la señalización de VEGF; y exponer el sujeto a irradiación, por ejemplo, a la luz solar, por ejemplo luz solar directa o de alta intensidad, o a una luz UV, por ejemplo, como en un salón de bronceado. Una cantidad protectora es una cantidad suficiente para reducir el daño en la piel a un nivel detectable o estadísticamente significativo.

5 En otro aspecto, la invención se puede usar en métodos de seguimiento de un sujeto o células de un sujeto, por ejemplo células de la piel. Los métodos incluyen evaluar la expresión de uno o más de VEGF-A, -C y -D. Un aumento en los niveles de VEGF-A y un descenso en los niveles de VEGF-C o -D, relativos a una referencia (por ejemplo, células control o sin irradiar) puede indicar que el sujeto o las células del sujeto tienen riesgo de o han estado expuestas a condiciones de daño en la piel, por ejemplo irradiación, por ejemplo, irradiación UVB.

10

Como se usa en el presente documento, la exposición a radiación UVB significa exposición a luz solar natural o radiación UVB artificial (por ejemplo a una lámpara solar de UVB, por ejemplo, para el bronceado o para fototerapia, por ejemplo, para el tratamiento de psoriasis, dermatitis atópica o vitíligo) de al menos una MED.

15 Los detalles de una o más formas de realización de la invención se explican en las figuras acompañantes y la descripción posterior. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán aparentes a partir de la descripción y figuras y de las reivindicaciones.

Descripción de las figuras

20

Las figuras 1A-B son micrografías de muestras de tejido de piel teñidas con hematoxilina/eosina que muestran el agrandamiento de los vasos linfáticos después de irradiación de UVB crónica (figura 1B), pero no en piel con irradiación simulada (figura 1A). Barras de escala: 100 μm .

25 Las figuras 1C-D son micrografías de inmunofluorescencias para CD31 y LYVE-1 en muestras de tejido de piel irradiadas con UVB (figura 1D) o con irradiación simulada (figura 1C). Las muestras de piel irradiadas con UVB mostraron aumento moderado de vasos sanguíneos CD31+/LYVE-1- en piel irradiada con UVB (figura 1D). Los vasos linfáticos cutáneos positivos para LYVE-1 aumentaron mucho de tamaño, con formas irregulares y algunas veces recubrimiento celular endotelial incompleto, mientras que en los ratones con irradiación simulada solo se encontraron vasos linfáticos normales, colapsados (figura 1D). Barras de escala: 100 μm .

30

Las figuras 1E-G son gráficos de barras que representan análisis morfométricos de muestras de piel de ratones irradiados con UVB crónica y con irradiación simulada. La figura 1E muestra el área cubierta por vasos linfáticos en muestras de piel de ratones irradiados con UVB crónica y con irradiación simulada. La figura 1F muestra el tamaño medio de vasos linfáticos en muestras de piel de ratones irradiados con UVB crónica y con irradiación simulada. La figura 1G muestra la densidad de vasos linfáticos en muestras de piel de ratones irradiados con UVB crónica y con irradiación simulada. El área cubierta por vasos linfáticos (figura 1E) y el tamaño medio de los vasos linfáticos (figura 1F) aumentaron significativamente en piel irradiada con UVB comparada con piel con irradiación simulada (**, $p < 0,01$).

35

Las figuras 2A-F son fotografías de orejas de ratón con colorante azul de Evans inyectado por vía intradérmica. Las figuras 2A-C muestran ratones con irradiación simulada. Las figuras 2D-F muestran ratones irradiados crónicamente con UVB. Se muestra la diseminación del colorante 1 minuto (Figuras 2A y 2D), 3 minutos (figuras 2B y E) y 5 minutos (figuras 2C y 2F) después de la inyección. 1 y 3 minutos después de la inyección de la tinta, se visualizaron vasos linfáticos marcadamente dilatados en piel de ratón irradiada crónicamente con UVB (figuras 2D-E), comparado con ratones con irradiación simulada (figuras 2A-B). Después de 5 minutos, el colorante azul de Evans se había extravasado de los vasos linfáticos en piel irradiada crónicamente con UVB (figura 2F), mientras que no se observó tal fuga en ratones con irradiación simulada (figura 2C).

40

Las figuras 3A-C son gráficos de barras que muestran el análisis por RT-PCR en tiempo real cuantitativa de los ARN totales aislados de la epidermis de la piel de oreja 48 horas después de la irradiación con UVB crónica. La expresión del ARNm de VEGF-A (figura 3A) aumentó en epidermis irradiada con UVB, comparada con controles con irradiación simulada (***, $p < 0,01$). Por el contrario, los niveles de expresión del ARNm de VEGF-C (figura 3B) y VEGF-D (figura 3C) eran comparables en ambos grupos.

50

Las figuras 4A-I son fotografías de orejas de ratón con colorante azul de Evans inyectado por vía intradérmica. Las figuras 4A-C muestran ratones con irradiación simulada (0 mJ/cm^2). Las figuras 4D-F muestran ratones dos días después de una única dosis de 40 mJ/cm^2 de UVB (0,5 MED). Las figuras 4G-I muestran ratones dos días después de una única dosis de 80 mJ/cm^2 de UVB (1 MED). La diseminación del colorante se muestra 1 minuto (figuras 2A, 2D y 2G), 3 minutos (figuras 2B, 2E y 2H) y 5 minutos (figuras 2C, 2F y 2I) después de la inyección. La irradiación con una dosis de 80 mJ/cm^2 de UVB (1 MED) produjo agrandamiento de vasos linfáticos cutáneos (figuras 4G-H) y fuga pronunciada (figura 4I).

60

Las figuras 4J-L son micrografías de inmunofluorescencia para CD31 y LYVE-1 en muestra de piel irradiada con 0 mJ/cm^2 (figura 4J), 40 mJ/cm^2 (figura 4K) y 80 mJ/cm^2 (figura 4L). Los análisis de inmunofluorescencia diferencial de secciones de piel para LYVE-1 y CD31 revelaron agrandamiento marcado de vasos linfáticos LYVE-1+ después de

65

irradiación de UVB con 80 mJ/cm² (figura 4L). No se observaron tales cambios en piel no irradiada (figura 4J) o en piel irradiada con 40 mJ/cm² (figura 4K). Barra de escala: 100 µm.

Las figuras 5A-D son micrografías de inmunofluorescencia para CD31 y LYVE-1 en muestras de piel de ratones de tipo salvaje (figuras 5A y 5C) y transgénicos para VEGF (figuras 5B y 5D) irradiados con una única dosis de 40 mJ/cm² de UVB (figuras 5C-D) o con irradiación simulada (figuras 5A-B). Los ratones transgénicos para VEGF con irradiación simulada mostraron un ligero aumento en el tamaño de los vasos linfáticos (figura 5B), comparados con los ratones de tipo salvaje (figura 5A). Los vasos linfáticos aumentaron drásticamente en ratones transgénicos de VEGF irradiados con UVB (figura 5D), asociado con la formación de edema. Barras de escala: 100 µm.

Las figuras 5E-F son gráficos de barras que muestran análisis morfométricos de muestras de piel de ratones de tipo salvaje y transgénicos para VEGF irradiados con UVB crónica y con irradiación simulada. La figura 5E representa el tamaño medio de los vasos linfáticos en muestras de piel de ratones de tipo salvaje y transgénicos para VEGF irradiados con UVB crónica y con irradiación simulada. La figura 5F representa la densidad de vasos linfáticos en muestras de piel de ratones de tipo salvaje y transgénicos para VEGF irradiados con UVB crónica y con irradiación simulada. Los análisis morfométricos mostraron un aumento de 1,3 veces en el tamaño de vasos linfáticos en ratones transgénicos para VEGF con irradiación simulada comparados con ratones de tipo salvaje (*, p<0,05) y un aumento de 1,9 veces después de irradiación con UVB (**, p<0,01) (figura 5E). La densidad de los vasos linfáticos era comparable en todos los grupos (figura 5F).

Las figuras 6A-D son micrografías de inmunofluorescencia para CD31 y tinción de Hoechst (figuras 6A-B) o CD31 y LYVE-1 (figuras 6C-D) en muestras de piel de ratones irradiados con una única dosis de 54 mJ/cm² de irradiación UVB un día después de inyección intraperitoneal de un anticuerpo bloqueante contra VEGF-A (figuras 6B y 6D) o de IgG control (figuras 6A y 6C). Las tinciones de doble inmunofluorescencia para CD31 y LYVE-1, 2 días después de la irradiación con UVB revelan agrandamiento de los vasos linfáticos positivos para LYVE-1 (puntas de flecha), así como una dilatación moderada de vasos sanguíneos CD31+/LYVE-1- (flecha) en ratones tratados con IgG control (figuras 6A y 6C). El tratamiento con anti-VEGF-A previno el agrandamiento de vasos linfáticos y sanguíneos (figuras 6B y 6D). Barras de escala: 100 µm.

30 Descripción detallada

La irradiación ultravioleta B (UVB) de la piel induce eritema, degradación de las moléculas de la matriz extracelular y arrugas en la piel. Los vasos linfáticos desempeñan un papel importante en el mantenimiento del equilibrio líquido en piel normal. Se ha encontrado que la irradiación de UVB tanto aguda como crónica de piel murina produce un agrandamiento importante de los vasos linfáticos. Sorprendentemente, estos vasos linfáticos agrandados estaban funcionalmente deteriorados y eran hiperpermeables, detectado mediante linfangiografía intravital. Los niveles de expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-A, pero no de VEGF-C o -D estaban aumentados en epidermis irradiada con UVB. La sobreexpresión dirigida de VEGF-A en la epidermis de ratones transgénicos produjo un agrandamiento aumentado y, sorprendentemente, también fuga de vasos linfáticos después de irradiación de UVB aguda, mientras que el bloqueo sistémico de la señalización de VEGF-A previno en gran parte anomalías en los vasos linfáticos y también previno el fotodaño inducido por UVB. En conjunto, estos descubrimientos señalan a los vasos linfáticos como nuevas dianas para prevenir el fotodaño cutáneo inducido por UVB, y también sugieren que el fomento de la función linfática, por ejemplo, mediante factores linfoangiogénicos tales como VEGF-C, puede aliviar los efectos dañinos de la irradiación UVB –que están mediados en parte por VEGF-A– en la piel. Según esto, esta solicitud presenta métodos de tratamiento (por ejemplo, reducción, alivio o prevención) del daño en la piel (por ejemplo, inducido por UVB) disminuyendo los niveles o la actividad de VEGF-A o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2), por ejemplo, en la piel, de un sujeto.

VEGF y los receptores de VEGF se revisan, por ejemplo, en Shibuya y Claesson-Welsh (2006) Exp. Cell Res. 312:549-60; Byrne et al. (2005) J. Cell. Mol. Med. 9:777-94; y Coultas et al. (2005) Nature 438:937-45.

Daño por UVB

El índice UV (desarrollado por la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos) indica la intensidad de los rayos UV del sol en un día determinado. Hay cuatro categorías - moderado (el índice UV es menor de 3), alto (el índice UV es de 3 a 6), muy alto (el índice de UV es de 6 a 10) y extremo (el índice UV es mayor de 10). Un índice UV moderado significa que se necesitará más de una hora para que se quemé piel; un nivel extremo significa que se necesitarán menos de 15 minutos. El índice se incluye con frecuencia en la información meteorológica. Clínicamente, la exposición a UVB se mide en la dosis mínima de eritema (MED). Una MED es la cantidad de UV requerida para producir una quemadura solar en piel sensible. El daño en la piel de moderado a grave inducido por UVB aguda, por ejemplo, quemadura solar, se puede producir a 3-8 MED.

Agentes ejemplares

Se pueden usar una variedad de agentes como un modulador de VEGF (por ejemplo, VEGF-A, -C o -D) o VEGFR (por ejemplo, VEGFR-2 o -3) para tratar o prevenir daño en la piel. El agente puede ser cualquier tipo de compuesto que se puede administrar a un sujeto (por ejemplo, anticuerpos, proteínas, péptidos, glicoproteínas, glicopéptidos, glicolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control de la transcripción y la traducción, productos y extractos naturales, y similares). En una forma de realización, el modulador de VEGF/VEGFR es un compuesto biológico, por ejemplo, una proteína que tiene un peso molecular de entre 5-300 kDa.

Por ejemplo, un modulador de VEGF/VEGFR puede inhibir la unión de VEGF a un VEGFR o puede prevenir la transducción de señales mediada por VEGF, por ejemplo, transducida por la proteína VEGFR, por ejemplo, VEGFR-2. Un modulador de VEGF/VEGFR que se une a VEGF puede alterar la conformación de VEGF, impedir la unión de VEGF a VEGFR, o disminuir de otra manera la afinidad de VEGF por un VEGFR o prevenir la interacción entre VEGF y un VEGFR. De forma alternativa, un modulador de VEGF/VEGFR puede estimular la unión de VEGF a un VEGFR o puede inducir la transducción de señales de VEGFR activando el VEGFR en ausencia de un VEGF.

Un modulador VEGF/VEGFR (por ejemplo, un anticuerpo) se puede unir a VEGF o a un VEGFR con una K_d de menos de 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o 10^{-10} M. En un ejemplo, el modulador de VEGF/VEGFR se une a VEGF (es decir, a VEGF-A con una afinidad al menos, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 o 1000 mejor que su afinidad por una proteína diferente de VEGF-A, por ejemplo, VEGF-C o VEGF-D). Un modulador preferido de VEGF/VEGFR se une específicamente a VEGF o VEGFR, tal como un anticuerpo específico de VEGF o VEGFR.

Los moduladores ejemplares de VEGF/VEGFR incluyen anticuerpos que se unen a VEGF o VEGFR y formas solubles de VEGFR que compiten con VEGFR de la superficie celular para la unión a VEGF. Un ejemplo de una forma soluble de VEGFR es una proteína que incluye al menos una parte del dominio extracelular de un VEGFR (por ejemplo, un fragmento soluble de unión a VEGF de VEGFR-2 o VEGFR-3, por ejemplo, que incluye una parte que se une a VEGF).

Una forma soluble ejemplar de la proteína VEGFR incluye una región de la proteína VEGFR que se une a VEGF, por ejemplo, un dominio extracelular, por ejemplo, dominio en la región extracelular. Esta región puede estar físicamente asociada, por ejemplo, fusionada a otra secuencia de aminoácidos, por ejemplo, un dominio Fc, en su extremo N o C. La región de VEGFR puede estar separada por un enlazador de la secuencia heteróloga de aminoácidos. También se pueden usar otras formas solubles de VEGFR, por ejemplo, formas que no incluyen un dominio Fc.

Moduladores ejemplares de VEGF/VEGFR incluyen anticuerpos que se unen a VEGF y/o a VEGFR. En un ejemplo, el anticuerpo inhibe la interacción entre VEGF y un VEGFR, por ejemplo, bloqueando físicamente la interacción, disminuyendo la afinidad de VEGF y/o VEGFR por su equivalente, alterando o desestabilizando los complejos de VEGF, secuestrando VEGF o un VEGFR, o dirigiendo VEGF o VEGFR para degradación. En un ejemplo, el anticuerpo se puede unir a VEGF o VEGFR en un epítipo que incluye uno o más residuos de aminoácidos que participan en la interfaz de unión VEGF/VEGFR. Tales residuos de aminoácidos se pueden identificar, por ejemplo, mediante barrido de alanina. En otro ejemplo, el anticuerpo se puede unir a residuos que no participan en la unión VEGF/VEGFR. Por ejemplo, el anticuerpo puede alterar una conformación de VEGF o VEGFR y por tanto reducir la afinidad de unión, o el anticuerpo puede impedir estéricamente la unión VEGF/VEGFR.

Además de los anticuerpos que se unen a VEGF y/o VEGFR, se pueden usar otros anticuerpos. En un ejemplo, el anticuerpo puede prevenir la activación de un suceso o actividad mediada por VEGF/VEGFR.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que incluye al menos una región variable de inmunoglobulina, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que proporciona un dominio variable de inmunoglobulina o una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de la cadena pesada (H) (abreviada aquí como VH) y una región variable de la cadena ligera (L) (abreviada aquí como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de la cadena pesada (H) y dos regiones variables de la cadena ligera (L). El término "anticuerpo" abarca fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fd, fragmentos Fv y fragmentos dAb) así como anticuerpos completos, por ejemplo, inmunoglobulinas intactas y/o de longitud total de los tipos IgA, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgE, IgD, IgM (así como subtipos de las mismas). Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de los tipos kappa o lambda. En un ejemplo, el anticuerpo está glicosilado. Un anticuerpo puede ser funcional para citotoxicidad dependiente de anticuerpo y/o citotoxicidad mediada por complemento, o puede no ser funcional para una o ambas de estas actividades.

Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" ("CDR"), entremezcladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones marco" (FR). La extensión de las FR y CDR se ha definido con precisión (véase, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición*, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE UU, Publicación del NIH No. 91-3242; y Chothia, C. *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917). En el

presente documento se usan las definiciones de Kabat. Cada VH y VL típicamente está compuesta de tres CDR y cuatro FR, organizadas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

5 Un "dominio de inmunoglobulina" se refiere a un dominio de los dominios variable o constante de las moléculas de inmunoglobulina. Los dominios de inmunoglobulina típicamente contienen dos láminas β formadas de aproximadamente siete hebras β , y un puente disulfuro conservado ~~que~~ véase, por ejemplo, A.F. Williams y A.N. Barclay (1988) *Ann. Rev Immunol.* 6:381-405). Una "secuencia del dominio variable de inmunoglobulina" se refiere a una secuencia de aminoácidos que puede formar una estructura suficiente para poner las secuencias CDR en una conformación adecuada para la unión al antígeno. Por ejemplo, la secuencia puede incluir toda o parte de la secuencia de aminoácidos de un dominio variable natural. Por ejemplo, la secuencia puede omitir uno, dos o más aminoácidos N- o C-terminales, aminoácidos internos, puede incluir una o más inserciones o aminoácidos terminales adicionales o puede incluir otras alteraciones. En un ejemplo, un polipéptido que incluye una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina se puede asociar con otra secuencia del dominio variable de inmunoglobulina para formar una estructura de unión diana (o "sitio de unión al antígeno"), por ejemplo, una estructura que interacciona con VEGFR.

La cadena VH o VL del anticuerpo puede incluir además todo o parte de una región constante de cadena pesada o ligera, para formar de esta manera una cadena de inmunoglobulina pesada o ligera, respectivamente. En una forma de realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina. Las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas pueden estar unidas por puentes disulfuro. La región constante de la cadena pesada típicamente incluye tres dominios constantes, CH1, CH2 y CH3. La región constante de la cadena ligera típicamente incluye un dominio CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos típicamente median la unión del anticuerpo a tejidos o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

Una o más regiones de un anticuerpo pueden ser humanas, efectivamente humanas o humanizadas. Por ejemplo, una o más de las regiones variables pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, una o más de las CDR, por ejemplo HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3, pueden ser humanas. Cada una de las CDR de la cadena ligera puede ser humana. HC CDR3 puede ser humana. Una o más de las regiones marco pueden ser humanas, por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y FR4 de la HC o la LC. En un ejemplo, todas las regiones marco son humanas, por ejemplo, derivadas de una célula somática humana, por ejemplo, una célula hematopoyética que produce inmunoglobulinas o una célula no hematopoyética. En un ejemplo, las secuencias humanas son secuencias de la línea germinal, por ejemplo, codificadas por un ácido nucleico de la línea germinal. Una o más de las regiones constantes pueden ser humanas, efectivamente humanas o humanizadas. En otro ejemplo, al menos el 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 92, el 95 o el 98% de las regiones marco (por ejemplo, FR1, FR2 y FR3, colectivamente, o FR1, FR2, FR3 y FR4, colectivamente) o el anticuerpo entero puede ser humano, efectivamente humano o humanizado. Por ejemplo, FR1, FR2 y FR3, colectivamente pueden ser al menos el 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 92, el 95, el 98 o el 99% idénticas o completamente idénticas a una secuencia humana codificada por un segmento de línea germinal humana.

Una región variable de inmunoglobulina "efectivamente humana" es una región variable de inmunoglobulina que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos marco humanos de modo que la región variable de la inmunoglobulina no produzca una respuesta inmunogénica en un ser humano normal. Un anticuerpo "efectivamente humano" es un anticuerpo que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos humanos de modo que el anticuerpo no provoca una respuesta inmunogénica en un ser humano normal.

Una región variable de inmunoglobulina "humanizada" es una región variable de inmunoglobulina que se modifica de modo que la forma modificada provoca menos respuesta inmune en un ser humano de lo que lo hace la forma sin modificar, por ejemplo, se modifica para incluir un número suficiente de de posiciones de aminoácidos marco humanos de modo que la región variable no provoque una respuesta inmune en un ser humano normal. Las descripciones de inmunoglobulinas "humanizadas" incluyen, por ejemplo, las patentes en EE UU Nos. 6.407.213 y 5.693.762. En algunos casos, las inmunoglobulinas humanizadas pueden incluir un aminoácido no humano en una o más posiciones de aminoácidos marco.

55 Los anticuerpos que se unen a VEGF o VEGFR se pueden generar por varios medios, incluyendo inmunización, por ejemplo, usando un animal o métodos in vitro tal como presentación en fagos. Se puede usar todo o parte de VEGF o VEGFR como inmunógeno o como una diana para la selección. Por ejemplo, se puede usar como inmunógeno VEGF o un fragmento del mismo, VEGFR o un fragmento del mismo. En un ejemplo, el animal inmunizado contiene células productoras de inmunoglobulinas con loci de inmunoglobulinas naturales, humanas o parcialmente humanas. En un ejemplo, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, es posible manipular cepas de ratón deficientes en la producción de anticuerpos de ratón con grandes fragmentos de loci de Ig humanas. Según esto, usando la tecnología del hibridoma, se pueden producir y seleccionar anticuerpos monoclonales específicos de antígeno al menos parcialmente humanos, con la especificidad deseada. Véase, por ejemplo, XENOMOUSE™, Green *et al.* (1994) *Nat. Gen.* 7:13-21; documento US 2003-0070185; patente en EE UU No. 5.789.650 y documento WO 96/34096.

5 Los anticuerpos no humanos contra VEGF y VEGFR también se pueden producir, por ejemplo, en un roedor. El anticuerpo no humano se puede humanizar, por ejemplo, como se describe en el documento EP 239 400; patentes en EE UU Nos. 6.602.503; 5.693.761; y 6,407,213, desinmunizar o modificar de otra manera para hacerlos efectivamente humanos.

10 El documento EP 239 400 (Winter et al.) describe la alteración de anticuerpos mediante sustitución (dentro de una región variable determinada) de sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) para una especie con los de otra. Típicamente, se sustituyen las CDR de un anticuerpo no humano (por ejemplo, murino) en las regiones correspondientes en un anticuerpo humano usando tecnología de ácidos nucleicos recombinantes para producir secuencias que codifican el anticuerpo sustituido deseado. Se pueden añadir segmentos de genes de la región constante humana del isotipo deseado (normalmente gamma I para CH y kappa para CL) y los genes humanizados de las cadenas pesada y ligera se pueden coexpresar en células de mamífero para producir un anticuerpo humanizado soluble. También se pueden usar otros métodos para humanizar anticuerpos. Por ejemplo, otros métodos pueden representar la estructura tridimensional del anticuerpo, posiciones marco que están en proximidad tridimensional a determinantes de unión, y secuencias de péptidos inmunogénicos. Véase, por ejemplo, documento WO 90/07861; patentes en EE UU Nos. 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; y 5.530.101; Tempest et al. (1991) *Biotechnology* 9:266-271 y patente en EE UU No. 6.407.213.

20 Se pueden producir anticuerpos monoclonales completamente humanos que se unen a VEGF y VEGFR, por ejemplo, usando esplenocitos humanos cebados in vitro, como describen Boerner et al. (1991) *J. Immunol.* 147:86-95. Se pueden preparar mediante clonación de repertorio como describen Persson et al. (1991) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88:2432-2436 o Huang y Stollar (1991) *J. Immunol. Methods* 141:227-236; también la patente en EE UU No. 5.798.230. También se pueden usar grandes genotecas de presentación en fagos humanas no inmunizadas para aislar anticuerpos de alta afinidad que se pueden desarrollar como terapéuticos humanos usando tecnología estándar de fagos (véase, por ejemplo, Hoogenboom et al. (1998) *Immunotechnology* 4:1-20; Hoogenboom et al. (2000) *Immunol Today* 2:371-378; y documento US 2003-0232333).

30 Se pueden producir anticuerpos y otras proteínas descritas en el presente documento en células procariotas y eucariotas. En un ejemplo, los anticuerpos (por ejemplo, scFv) se expresan en una célula de levadura tal como *Pichia* (véase, por ejemplo, Powers et al. (2001) *J. Immunol. Methods* 251:123-35), *Hanseula*, o *Saccharomyces*.

35 Se pueden producir anticuerpos, en particular anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, en células de mamífero. Células huésped de mamífero de ejemplo para la expresión recombinante incluyen las de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO negativas para dihidrofolato reductasa, descritas en Urlaub y Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador de selección DHFR, por ejemplo, como se describe en Kaufman y Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), líneas celulares linfocíticas, por ejemplo, células de mieloma NS0 y células SP2, células COS, K562 y una célula de un animal transgénico, por ejemplo, un mamífero transgénico. Por ejemplo, la célula es una célula mamaria epitelial.

40 Además de la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de inmunoglobulina, los vectores recombinantes de expresión pueden tener secuencias adicionales de ácido nucleico, tales como, secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes de marcadores de selección. El gen del marcador seleccionable facilita la selección de las células huésped en las que se ha introducido el vector (véase, por ejemplo, las patentes en EE UU Nos. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Genes de marcadores seleccionables de ejemplo incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped *dhfr* con selección/amplificación con metotrexato) y el gen *neo* (para selección con G418).

50 En un sistema de ejemplo para la expresión recombinante de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa o una parte de unión al antígeno del mismo), se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo en células CHO *dhfr* por transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo están cada uno operativamente unidos a elementos reguladores potenciador/promotor (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tal como un elemento regulador potenciador de CMV/promotor de AdMLP o un elemento regulador potenciador de SV40/promotor de AdMLP) para dirigir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también lleva un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Se usan técnicas estándar de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, para transfectar las células huésped, para seleccionar los transformantes, para cultivar las células huésped y para recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Por ejemplo, algunos anticuerpos se pueden aislar mediante cromatografía de afinidad con una proteína A o proteína G.

65 Los anticuerpos (y fusiones de Fc) también pueden incluir modificaciones, por ejemplo, modificaciones que alteran la función de Fc, por ejemplo, para disminuir o eliminar la interacción con un receptor de Fc o con C1q o con ambos. Por

ejemplo, se puede mutar la región constante de la IgG1 humana en uno o más residuos, por ejemplo, uno o más de los residuos 234 y 237, según la numeración en la patente en EE UU No. 5.648.260. Otras modificaciones ejemplares incluyen las descritas en la patente en EE UU No. 5.648.260.

5 Para algunas proteínas que incluyen un dominio Fc, el sistema de producción de anticuerpo/proteína se puede diseñar para sintetizar anticuerpos u otras proteínas en las que la región Fc está glicosilada. Por ejemplo, el dominio Fc de las moléculas de IgG está glicosilado en la asparraguina 297 en el dominio CH2. El dominio Fc también puede incluir otras modificaciones postraduccionales eucariotas. En otros casos, la proteína se produce en una forma que no está glicosilada.

10 También se pueden producir anticuerpos y otras proteínas mediante un animal transgénico. Por ejemplo, la patente en EE UU No. 5.849.992 describe un método para expresar un anticuerpo en la glándula mamaria de un mamífero transgénico. Se construye un transgén que incluye un promotor específico de leche y las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo de interés, por ejemplo, un anticuerpo descrito en el presente documento, y una secuencia señal para secreción. La leche producida por las hembras de tales mamíferos transgénicos incluye, secretada en ella, la proteína de interés, por ejemplo, un anticuerpo o una proteína de fusión de Fc. La proteína se puede purificar de la leche, o para algunas aplicaciones, usar directamente.

15 Los métodos descritos en el contexto de anticuerpos se pueden adaptar a otras proteínas, por ejemplo, fusiones de Fc y fragmentos solubles de receptores.

20 En ciertas realizaciones, se usan antagonistas de ácidos nucleicos para disminuir la expresión de un gen endógeno que codifica VEGF o VEGFR. En un ejemplo, el antagonista ácido nucleico es un ARNip que se dirige al ARNm que codifica VEGF o un VEGFR. También se pueden usar otros tipos de ácidos nucleicos antagonísticos, por ejemplo un ARNbc, una ribozima, un formador de triple hélice o un ácido nucleico antisentido. En algunos ejemplos, los antagonistas de ácido nucleico se pueden dirigir a dianas efectoras posteriores de la activación de VEGFR.

25 Los ARNip son ARN bicatenarios (ARNbc) pequeños que opcionalmente incluyen salientes. Por ejemplo, la región dúplex de un ARNip tiene aproximadamente de 18 a 25 nucleótidos de longitud, por ejemplo, aproximadamente 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos de longitud. Típicamente, las secuencias ARNip son exactamente complementarias al ARNm diana. Se pueden usar los ARNbc y los ARNip en particular para silenciar la expresión génica en células de mamífero (por ejemplo, células humanas). Los ARNip también incluyen los ARN horquillados cortos (ARNhc) con tallos de 29 pares de bases y salientes 3' de 2 nucleótidos. Véase, por ejemplo, Clemens *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:6499-6503; Billy *et al.* (2001) *Proc. Natl. Sci. USA* 98:14428-14433; Elbashir *et al.* (2001) *Nature*. 411:494-8; Yang *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:9942-9947; Siolas *et al.* (2005), *Nat. Biotechnol.* 23(2):227-31; documentos 20040086884; U.S. 20030166282; 20030143204; 20040038278; y 20030224432.

30 Los agentes antisentido puede incluir, por ejemplo, desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 80 nucleobases (es decir, desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 80 nucleótidos), por ejemplo, desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 50 nucleobases, o desde aproximadamente 12 hasta aproximadamente 30 nucleobases. Los compuestos antisentido incluyen ribozimas, oligonucleótidos de secuencia externa de guía (EGS) (oligozimas) y otros ARN catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que hibridan con el ácido nucleico diana y modulan su expresión. Los compuestos anti-sentido pueden incluir un tramo de al menos ocho nucleobases consecutivas que son complementarias a una secuencia en el gen diana. Un oligonucleótido no necesita ser el 100% complementario a su secuencia diana de ácido nucleico para ser específicamente hibridable. Un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido a la diana interfiere con la función normal de la molécula diana para producir una pérdida de utilidad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del oligonucleótido a secuencias diferentes de la diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo o tratamiento terapéutico o, en el caso de ensayos in vitro, en condiciones en las que se realiza los ensayos.

35 La hibridación de oligonucleótidos antisentido con ARNm (por ejemplo, un ARNm que codifica VEGF o VEGFR) puede interferir con una o más de las funciones normales del ARNm. Las funciones del ARNm que se van a interferir incluyen todas las funciones clave tales como, por ejemplo, translocación del ARN al sitio de traducción de proteínas, traducción de la proteína a partir del ARN, ajuste del ARN para dar una o más especies de ARNm y actividad catalítica a la que se puede dedicar el ARN. También se puede interferir la unión de proteína(s) específica(s) al ARN mediante hibridación de oligonucleótidos antisentido con el ARN.

40 Los compuestos antisentido ejemplares incluyen secuencias de ADN o ARN que hibridan específicamente con el ácido nucleico diana, por ejemplo, el ARNm que codifica VEGF o VEGFR. La región complementaria se puede extender entre aproximadamente 8 hasta aproximadamente 80 nucleobases. Los compuestos pueden incluir una o más nucleobases modificadas. Las nucleobases modificadas pueden incluir, por ejemplo, pirimidinas 5'-sustituidas tales como 5-yodouracilo, 5-yodocitosina y C5-propinil pirimidinas tales como C5-propinilcitosina y C5-propiniluracilo. Otras nucleobases modificadas adecuadas incluyen N⁴-alquil(C₁-C₁₂)aminocitosinas y N⁴,N⁴-dialquil(C₁-C₁₂)aminocitosinas. Las nucleobases modificadas también pueden incluir 8-aza-7-deazapurinas 7-sustituidas y 7-deazapurinas 7-sustituidas,

tales como por ejemplo, 7-yodo-7-deazapurinas, 7-ciano-7-deazapurinas, 7-aminocarbonil-7-deazapurinas. Ejemplos de estas incluyen 6-amino-7-yodo-7-deazapurinas, 6-amino-7-ciano-7-deazapurinas, 6-amino-7-aminocarbonil-7-deazapurinas, 2-amino-6-hidroxi-7-yodo-7-deazapurinas, 2-amino-6-hidroxi-7-ciano-7-deazapurinas y 2-amino-6-hidroxi-7-aminocarbonil-7-deazapurinas. Además, N⁶-alquil(C₁-C₁₂)aminopurinas y N⁶,N⁶-dialquil(C₁-C₁₂)aminopurinas, incluyendo N⁶-metilaminoadenina y N⁶,N⁶-dimetilaminoadenina, también son nucleobases modificadas adecuadas. De forma similar, otras purinas 6-sustituídas incluyendo, por ejemplo, 6-tioguanina, pueden constituir nucleobases modificadas apropiadas. Otras nucleobases adecuadas incluyen 2-tiouracilo, 8-bromoadenina, 8-bromoguanina, 2-fluoroadenina y 2-fluoroguanina. Los derivados de cualquiera de las nucleobases modificadas mencionadas anteriormente también son apropiados. Los sustituyentes de cualquiera de los compuestos precedentes pueden incluir alquilo C₁-C₃₀, alquenilo C₂-C₃₀, alquinilo C₂-C₃₀, arilo, aralquilo, heteroarilo, halo, amino, amido, nitro, tio, sulfonilo, carboxilo, alcoxi, alquilcarbonilo, alcoxicarbonilo y similares.

Las descripciones de otros tipos de agentes de ácido nucleico también están disponibles. Véase, por ejemplo, las patentes en EE UU Nos. 4.987.071; 5.116.742; y 5.093.246; Woolf et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA*; *Antisense RNA and DNA*, D.A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988); 89:7305-9; Haselhoff y Gerlach (1988) *Nature* 334:585-59; Helene, C. (1991) *Anticancer Drug Des.* 6:569-84; Helene (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; y Maher (1992) *Bioassays* 14:807-15.

También se pueden usar factores de transcripción artificiales para regular la expresión de VEGF o un VEGFR. El factor de transcripción artificial se puede diseñar o seleccionar de una librería, por ejemplo, por la capacidad de unirse a una secuencia en un gen endógeno que codifica VEGF o VEGFR, por ejemplo, en una región reguladora, el promotor. Por ejemplo, el factor de transcripción artificial se puede preparar mediante selección in vitro (por ejemplo, usando presentación en fagos, patente en EE UU No. 6.534.261) o in vivo, o mediante diseño basado en un código de reconocimiento (véase, por ejemplo, el documento WO 00/42219 y la patente en EE UU No. 6.511.808). Véase, por ejemplo, Rebar et al. (1996) *Methods Enzymol* 267:129; Greisman y Pabo (1997) *Science* 275:657; Isalan et al. (2001) *Nat. Biotechnol* 19:656; y Wu et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:344 para, entre otras cosas, métodos para crear librerías de dominios de dedo de zinc variados.

Opcionalmente, se puede fusionar un factor de transcripción artificial a un dominio regulador transcripcional, por ejemplo, un dominio de activación para activar la transcripción o a un dominio de represión para reprimir la transcripción. En particular, se pueden usar dominios de represión para disminuir la expresión de genes endógenos que codifican VEGF o VEGFR. El factor de transcripción artificial puede estar codificado él mismo por un ácido nucleico heterólogo que se administra a una célula o la proteína misma se puede administrar a una célula (véase, por ejemplo, la patente en EE UU no. 6.534.261). El ácido nucleico heterólogo que incluye una secuencia que codifica el factor de transcripción artificial puede estar operativamente unido a un promotor inducible, por ejemplo, para permitir el control fino del nivel del factor de transcripción artificial en la célula, por ejemplo, una célula endotelial.

Administración

Se puede administrar un agonista descrito en el presente documento por vía sistémica o local, por ejemplo, por vía tópica. La administración tópica de un agente descrito en el presente documento es la vía preferida de administración. Para la aplicación tópica, las composiciones de la presente invención pueden incluir un medio compatible con una célula, explante o sujeto. Tales composiciones farmacéuticas tópicas pueden existir en muchas formas, por ejemplo, en forma de una solución, crema, pomada, gel, loción, champú, jabón o aerosol. Se pueden emplear una amplia variedad de materiales de soporte en la composición de esta invención tales como alcoholes, gel de aloe vera, alantoína, glicerina, aceites de vitamina A y E, aceites minerales y polietilenglicoles. Otros aditivos, por ejemplo, conservantes, fragancia, protector solar u otros ingredientes cosméticos, pueden estar presentes en la composición.

Un vehículo preferido para la administración tópica es liposomas. Se pueden usar los liposomas para que lleven y administren un agente, por ejemplo, un agente descrito en el presente documento, a una célula. Se pueden encontrar directrices detalladas en, por ejemplo, Yarosh et al. (2001) *Lancet* 357: 926 y Bouwstra et al. (2002) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 Suppl 1:S41.

Para la administración sistémica, el agente se puede administrar a través de la vía oral o la vía parenteral, incluyendo por vía subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa u otra vía. Para la administración local, se administran por vía tópica, transdérmica, transmucosa, intranasal u otra vía. Se puede poner en contacto una célula extracelular o intracelularmente con el agente, por ejemplo, mediante microinyección o transfección. El agonista se puede aplicar y eliminar inmediatamente, aplicar y no eliminar y/o aplicar repetidamente con frecuencia constante, creciente o decreciente y/o a dosis o concentraciones crecientes o decrecientes. Se puede usar simultáneamente más de una vía de administración, por ejemplo, administración tópica en asociación con administración oral. Los ejemplos de formas farmacéuticas parenterales incluyen soluciones acuosas del principio activo, en una solución salina isotónica, glucosa al 5% u otros excipientes farmacéuticamente aceptables bien conocidos. Se pueden utilizar agentes solubilizantes tales como ciclodextrinas u otros agentes solubilizantes que conocen los expertos en la materia, como excipientes farmacéuticos para la administración de la composición moduladora de pigmento.

La composición se puede suministrar como, por ejemplo, un cosmético, una medicación o un producto para el cuidado de la piel. La composición también se puede formular en formas farmacéuticas para otras vías de administración usando métodos convencionales. Se puede formular una composición farmacéutica, por ejemplo, en formas farmacéuticas para la administración oral como un polvo o gránulo, o en una cápsula, un comprimido (cada uno incluye formulaciones de liberación con el tiempo y liberación sostenida), o un sello de gel, con soportes farmacéuticos opcionales adecuados para preparar composiciones sólidas, tales como vehículos (por ejemplo, almidón, glucosa, azúcar de fruta, sacarosa, gelatina y similares), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio), disgregantes (por ejemplo, almidón y celulosa cristalina) y aglutinantes (por ejemplo, lactosa, manitol, almidón y goma arábiga). Cuando la composición es una inyección, por ejemplo, se pueden usar solventes (por ejemplo, agua destilada para inyección), estabilizantes (por ejemplo, edetato de sodio), agentes isotonzantes (por ejemplo, cloruro de sodio, glicerina y manitol), agentes para ajustar el pH (por ejemplo ácido clorhídrico, ácido cítrico e hidróxido de sodio), agentes suspensores (por ejemplo, metilcelulosa) y similares.

La composición puede contener otros ingredientes farmacéuticos, por ejemplo, un segundo tratamiento para la piel, por ejemplo, un hidratante, un protector solar.

Kits

Se puede proporcionar un agonista descrito en el presente documento en un kit. El kit incluye: (a) el agonista, por ejemplo, una composición que incluye el agonista, y (b) material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, instrucciones, comercial u otro material que se refiera a los métodos descritos en el presente documento y/o al uso del agonista para los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, el material informativo se refiere al daño en piel por UVB aguda, por ejemplo, quemadura solar.

En una forma de realización, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar el agonista descrito en el presente documento en una forma adecuada para realizar los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, en una dosis, forma farmacéutica, o forma de administración adecuadas (por ejemplo, una dosis, forma farmacéutica o forma de administración descritas en el presente documento). Las dosis, formas farmacéuticas y formas de administración preferidas son tópica y percutánea. En otra forma de realización, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar el agonista descrito en el presente documento a un sujeto adecuado, por ejemplo, un ser humano, por ejemplo un ser humano que tiene, o tiene riesgo a, daño por UVB aguda.

El material informativo de los kits no está limitado en su forma. En muchos casos, el material informativo, por ejemplo, instrucciones, se proporciona en materia impresa, por ejemplo, un texto, dibujo y/o fotografía impresos, por ejemplo una etiqueta u hoja impresa. Sin embargo, el material informativo también se puede proporcionar en otros formatos, tales como Braille, material legible por ordenador, grabación en video o grabación de audio. En otra forma de realización, el material informativo del kit es información de contacto, por ejemplo una dirección física, dirección de correo electrónico, página web o número de teléfono, donde el usuario del kit puede obtener información sustancial sobre el agonista y/o su uso en los métodos descritos en el presente documento. Por supuesto, el material informativo también se puede proporcionar en cualquier combinación de formatos.

Además del agonista descrito en el presente documento, la composición del kit puede incluir otros ingredientes, tales como un solvente o tampón, un estabilizante, un conservante, una fragancia u otro ingrediente cosmético, y/o un segundo agente para tratar una afección o trastorno descritos en el presente documento. De forma alternativa, los otros ingredientes pueden estar incluidos en el kit, pero en diferentes composiciones o envases que un agente descrito en el presente documento. En tales formas de realización, el kit puede incluir instrucciones para mezclar el agonista descrito en el presente documento y los otros ingredientes o para usar el agonista descrito en el presente documento junto con los otros ingredientes.

Se puede proporcionar el agonista descrito en el presente documento en cualquier forma, por ejemplo, forma líquida, seca o liofilizada. Se prefiere que el agonista descrito en el presente documento esté sustancialmente puro y/o estéril. Cuando se proporciona el agonista descrito en el presente documento en una solución líquida, la solución líquida preferiblemente es una solución acuosa, siendo preferida una solución acuosa estéril. Cuando se proporciona el agonista descrito en el presente documento como una forma seca, en general la reconstitución es mediante la adición de un solvente adecuado. El solvente, por ejemplo, agua o tampón estéril, opcionalmente se puede proporcionar en el kit.

El kit puede incluir uno o más envases para la composición que contiene un agente descrito en el presente documento. En algunas formas de realización, el kit contiene envases, separadores o compartimentos separados para la composición y el material informativo. Por ejemplo, la composición puede estar contenida en una botella, vial o jeringuilla, y el material informativo puede estar contenido en una funda o paquete de plástico. En otras formas de realización, los elementos separados del kit están contenidos en un envase único sin dividir. Por ejemplo, la composición está contenida en una botella, vial o jeringuilla que tiene adherida a la misma el material informativo en forma de una etiqueta. En algunas formas de realización, el kit incluye una pluralidad (por ejemplo, un paquete) de envases individuales, que cada uno contiene una o más formas farmacéuticas unitarias (por ejemplo, una forma

farmacéutica descrita en el presente documento) de un agente descrito en el presente documento. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringuillas, ampollas, paquetes de hojas metálicas o paquetes blíster, que contiene cada uno una única dosis unitaria de un agente descrito en el presente documento. Los envases de los kits pueden ser herméticos y/o impermeables.

El kit opcionalmente incluye un dispositivo adecuado para la administración de la composición, por ejemplo, una jeringuilla, inhalante, pipeta, pinzas, cuchara medidora, cuentagotas (por ejemplo, cuentagotas ocular), hisopo (por ejemplo, un hisopo de algodón o un hisopo de madera) o cualquier dispositivo de administración. En una forma de realización preferida, el dispositivo es un hisopo.

Ejemplos

Materiales y métodos

Pauta de irradiación con UVB

Se expusieron ratones hembra sin pelo Skh1 (8 semanas de edad) a irradiación con UVB como se describe, usando un banco de cuatro lámparas fluorescentes igualmente separadas (Southern New England Ultraviolet, Bradford, CN) (Kochevar et al. (1993) J. Invest. Dermatol. 100:186-93). Los ratones (n = 7 por grupo) se irradiaron simulados o se expusieron a irradiación con UVB tres veces a la semana durante 10 semanas con una dosis inicial de 40 mJ/cm² (0,5 dosis mínima de eritema; MED) y aumentos graduales en incrementos de 0,5 MED hasta una dosis máxima de 4,5 MED. La dosis acumulada total de UVB fue 5,46 J/cm². No se observaron reacciones agudas de quemaduras solares. En estudios adicionales, ratones hembras Skh1 de 8 semanas, ratones transgénicos FVB con sobreexpresión específica en la piel de VEGF164 murino bajo el control del promotor de K14 (Detmar et al. (1998) J. Invest. Dermatol. 111:1-6) o ratones FVB de tipo salvaje (n = 5 por grupo) se irradiaron con una única dosis de 40 mJ/cm² (0,5 MED) o 80 mJ/cm² (1 MED) de UVB. Además, se trataron ratones de tipo salvaje (n = 5/grupo) con 50 µg de anticuerpo neutralizante anti-VEGF de ratón (R&D Systems, Minneapolis, MN) o con 50 µg de IgG control mediante inyección intraperitoneal 24 horas antes de la exposición a 54 mJ/cm² de irradiación UVB como se ha descrito (Hirakawa et al. (2005) Blood 105:2392-9). Todos los estudios animales fueron aprobados por el subcomité sobre el cuidado animal en investigación del Massachusetts General Hospital.

Linfangiografía intravital

Se anestesiaron ratones (n = 7/grupo) usando avertina (0,4 g/kg, Sigma) y se inyectó por vía intradérmica 1 µl de una solución al 1% de colorante azul de Evans en NaCl al 0,9% en la superficie interna del borde de la oreja, usando una jeringuilla Hamilton de 10 µl para visualizar los vasos linfáticos. Las orejas de los ratones se fotografiaron 1, 3 y 5 minutos después de la inyección de colorante.

RT-PCR cuantitativa a tiempo real

Se aisló el ARN celular total de la piel completa del lomo de ratones 2 días después de la última irradiación con UVB (n = 7/grupo), usando el reactivo TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguido por tratamiento con DNasa RQ1, sin RNasa (Promega, Madison, WI). La piel completa se homogenizó usando Tissue Lyser (Qiagen GmbH, Alemania). Se investigaron los niveles de expresión del ARNm de VEGF-A, -C y -D mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, usando el sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA) como se ha descrito (Hong et al. (2004) Nat. Genet. 36:683-5). Los cebadores y sondas para VEGF-A, -C y -D murinos se han descrito previamente (Kunstfeld et al. (2004) Blood 104:1048-57). Cada reacción se multiplexó con cebadores (directo 5'-TCACTGGCATGGCCTTCC-3' (SEQ ID NO:1), inverso 5'-GGCGGGCACGTCAGATCCA-3' (SEQ ID NO:2)) y sonda (5'-JOE-TTCCTACCCCAATGTGTCCGTCG-TAMRA-3' (SEQ ID NO:3)) para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como un control interno.

Inmunotinción y análisis morfométrico de vasos asistido por ordenador

Los análisis de inmunofluorescencia se realizaron en secciones criostáticas de 6 µm de tejidos de ratón, usando anticuerpos policlonales contra LYVE-1 murino (Banerji et al. (1999) J. Cell Biol. 144:789-801), CD31 murina (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA) y los correspondientes anticuerpos secundarios marcados con ALEXA FLUOR® 488 o ALEXA FLUOR® 594 (Molecular Probes, Eugene, OR) (Kajija et al. (2005) EMBO J. 24:2885-95). Las secciones se examinaron mediante un microscopio Nikon E-600 (Nikon, Melville, NY) y las imágenes se capturaron con una cámara digital SPOT™ (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI). Los análisis morfométricos se realizaron usando software IPLAB™ (Scanalytics, Fairfax, VA) como se ha descrito (Hirakawa et al. (2005) Blood 105:2392-9). Se examinaron tres campos diferentes de cada sección y se determinaron el número de vasos por micrómetro cuadrado, el tamaño medio de los vasos y el área relativa de tejido ocupada por los vasos linfáticos en la dermis en un área a una distancia de 200 µm de la unión epidermis-dermis. Se usó la prueba de la t de Student para datos independientes para analizar diferencias en densidad y tamaño de microvasos. Además, se realizaron tinciones rutinarias de hematoxilina-eosina como se ha descrito previamente (Prophet, Arrington y Sobin (1992) *Laboratory Methods in Histotechnology*).

Ejemplo 1. La irradiación con UVB crónica produce agrandamiento de los vasos linfáticos cutáneos

5 Para investigar el efecto de la irradiación UVB en la vasculatura linfática, primero se realizó la irradiación con UVB crónica de ratones sin pelo Skh1 (Kligman (1996) Clin. Dermatol. 14:183-95) con una dosis acumulada de 5,46 J/cm² durante un periodo de 10 semanas. La irradiación con UVB crónica produjo formación pronunciada de arrugas como se ha descrito previamente (Yano et al. (2002) J. Invest. Dermatol. 118:800-5), mientras que no se detectaron tales cambios en ratones con irradiación simulada. El examen histológico reveló los signos típicos de daño por UVB crónica, incluyendo hiperplasia epidérmica, infiltración de células inflamatorias y formación de edema (figura 1A y B). Las tinciones de doble inmunofluorescencia para el marcador panvascular CD31 y para el receptor de ácido hialurónico linfático específico LYVE-1 revelaron un agrandamiento moderado de vasos sanguíneos CD31+/LYVE-1- (figura 1C y D), de acuerdo con estudios previos (Yano et al. (2005) Br. J. Dermatol. 152:115-21). Sorprendentemente, los vasos linfáticos cutáneos positivos para LYVE-1 aumentaron drásticamente de tamaño, con formas irregulares y algunas veces recubrimiento de células endoteliales incompleto de las paredes de los vasos, mientras que solo se encontraron vasos linfáticos normales, colapsados en ratones con irradiación simulada (figura 1C y D). Los análisis morfométricos ayudados por ordenador confirmaron que el área dérmica media ocupada por vasos linfáticos (un aumento de 2,5 veces sobre los ratones con irradiación simulada; P<0,01) y el tamaño medio de los vasos linfáticos dérmicos (un aumento de 2,1 veces; P<0,01) estaban significativamente aumentados en piel irradiada con UVB comparados con ratones con irradiación simulada (figura 1E y F). Por el contrario, la densidad de vasos linfáticos era comparable en ambos grupos (figura 1G).

Ejemplo 2. Función deteriorada y aumento de fuga de vasos linfáticos después de irradiación con UVB crónica

25 Para investigar más los efectos de irradiación con UVB crónica sobre la función de los vasos linfáticos cutáneos, se inyectó colorante azul de Evans por vía intradérmica en el borde de orejas de ratón. 1 y 3 minutos después de la inyección, se visualizaron vasos linfáticos marcadamente dilatados en piel de ratón crónicamente irradiada con UVB, comparado con ratones con irradiación simulada (figuras 2A, B, D, E). Después de 5 minutos, el colorante azul de Evans se había extravesado de los vasos linfáticos en la piel irradiada crónicamente con UVB, mientras que no se observó tal fuga en ratones con irradiación simulada (figuras 2C y F). Estos descubrimientos indican que los vasos linfáticos agrandados después de la irradiación con UV son permeables y están funcionalmente deteriorados.

Ejemplo 3. La irradiación con UVB crónica produce aumento de la expresión de VEGF-A, pero no de VEGF-C o -D

35 Para investigar si la irradiación con UVB crónica producía aumento de alguno de los factores linfangiogénicos conocidos, VEGF-A (Nagy et al. (2002) J. Exp. Med. 196:1497-506), VEGF-C o VEGF-D (Jussila et al. (2002) Physiol. Rev. 82:673-700) por queratinocitos epidérmicos, a continuación se aislaron los ARN totales de la epidermis de la piel de oreja, seguido por análisis cuantitativo por RT-PCR con TAQMAN™ a tiempo real de la expresión del ARNm. Se determinó un aumento de 2,2 veces de la expresión del ARNm de VEGF-A en epidermis irradiada con UVB comparado con controles con irradiación simulada (P<0,01; figura 3A). Por el contrario, los niveles de expresión de los ARNm de VEGF-C y VEGF-D eran comparables en ambos grupos (figura 3B y C). Se obtuvieron resultados comparables cuando se examinó el ARN total aislado de lisados de piel completa, incluyendo tanto epidermis como dermis.

Ejemplo 4. La irradiación de UVB aguda induce agrandamiento e hiperpermeabilidad de vasos linfáticos cutáneos

45 A continuación se investigó si una dosis única de irradiación con UVB aguda podría ser suficiente para deteriorar la función de vasos linfáticos. Dos días después de una dosis única de irradiación con UVB de 40 mJ/cm² (0,5 dosis mínima de eritema; MED), la visualización de los vasos linfáticos cutáneos mediante inyección intradérmica de colorante azul de Evans reveló que los vasos linfáticos eran indistinguibles de aquellos en piel no irradiada y que no eran hiperpermeables (figuras 4A-F). Por el contrario, la irradiación con una dosis de 80 mJ/cm² de UVB (1 MED) produjo agrandamiento de vasos linfáticos cutáneos (figuras 4G-H) y se observó permeabilidad pronunciada (figura 4I). Análisis diferenciales de inmunofluorescencia de secciones de piel revelaron un agrandamiento dramático de vasos linfáticos LYVE-1+, pero solo un aumento moderado de vasos sanguíneos CD31+/LYVE-1- después de irradiación con UVB con 80 mJ/cm² (figura 4L). Sin embargo, no se observaron tales cambios en la piel no irradiada o en la piel irradiada con una dosis de UVB de 40 mJ/cm² (figuras 4J, K).

Ejemplo 5. Agrandamiento aumentado de vasos linfáticos en ratones transgénicos para VEGF-A irradiados con UVB

60 Puesto que se encontró que la expresión del ARNm de VEGF-A estaba aumentada en queratinocitos epidérmicos después de irradiación con UVB, a continuación se investigó si el VEGF-A derivado de epidermis podría fomentar directamente el agrandamiento y permeabilidad de vasos linfáticos inducido por UVB. Por tanto, se expusieron ratones FVB transgénicos que sobreexpresan VEGF164 murino bajo el control del promotor de queratina 14 (Detmar et al. (1998) J. Invest. Dermatol. 111:1-6) y ratones FVB de tipo salvaje a una dosis única de 40 mJ/cm² de irradiación con

UVB o con irradiación simulada. Los análisis diferenciales de inmunofluorescencia de secciones de oreja 2 días después de la irradiación con UVB revelaron números y tamaños comparables de vasos sanguíneos CD31+/LYVE-1- y vasos linfáticos LYVE-1+ en ratones de tipo salvaje con irradiación simulada e irradiados con UVB (figuras 5A y C). Los ratones transgénicos para VEGF con irradiación simulada ya mostraron un ligero aumento en el tamaño de vasos linfáticos, comparados con los ratones de tipo salvaje (figura 5B). De forma importante, los vasos linfáticos aumentaron drásticamente después de la irradiación con UVB de ratones transgénicos para VEGF (figura 5D), asociado con el aumento del espesor de la oreja y formación de edema. Los análisis morfométricos ayudados por ordenador confirmaron un aumento de 1,3 veces del tamaño de los vasos linfáticos en ratones transgénicos para VEGF con irradiación simulada comparados con los ratones de tipo salvaje ($p < 0,05$) y un aumento adicional, significativo de 1,9 veces después de irradiación con UVB ($p < 0,01$; figura 5E). La densidad de vasos linfáticos era comparable en todos los grupos (figura 5F).

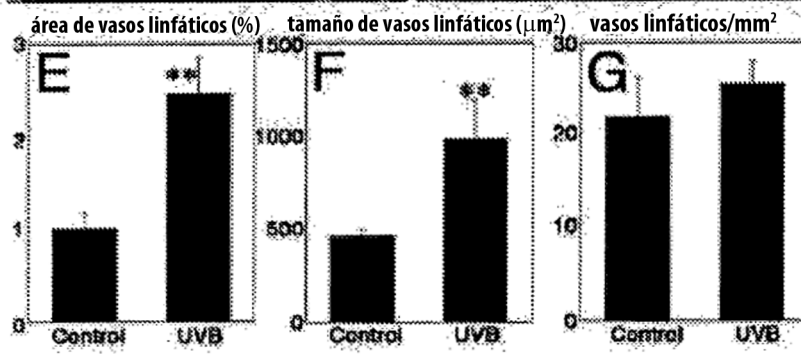
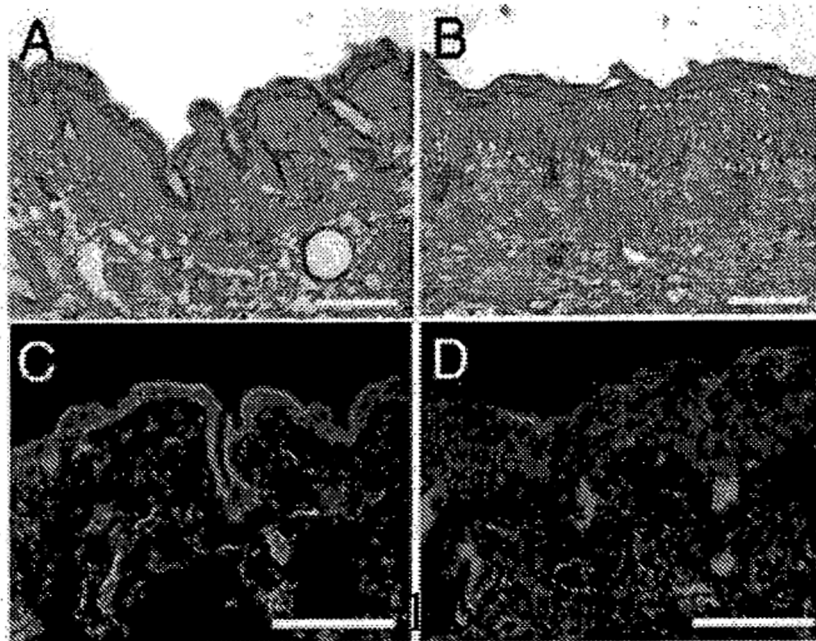
Ejemplo 6. El bloqueo sistemático de VEGF-A inhibe el agrandamiento de vasos linfáticos inducido por UVB

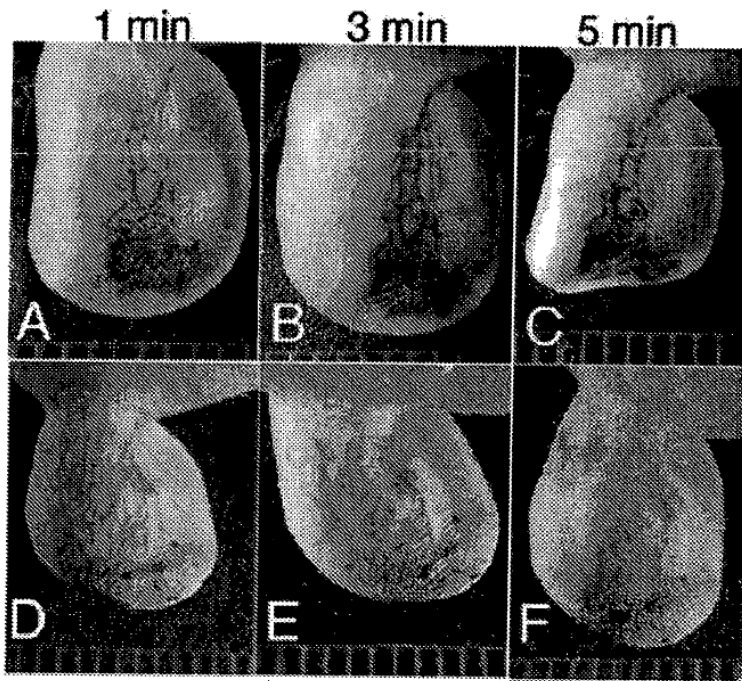
15 A continuación se investigó si el bloqueo sistémico de VEGF-A podría prevenir el agrandamiento de vasos linfáticos inducido por UVB. Se expusieron ratones FVB de tipo salvaje a una única dosis de 54 mJ/cm^2 de irradiación con UVB un día después de la inyección intraperitoneal de un anticuerpo bloqueante contra VEGF-A o una cantidad igual de IgG control. Las tinciones de doble inmunofluorescencia para CD31 y LYVE-1 dos días después de la irradiación con UVB demostraron un agrandamiento pronunciado de los vasos linfáticos positivos para LYVE-1, así como dilatación moderada de vasos sanguíneos CD31+/LYVE-1- en ratones tratados con IgG control (figuras 6A y C). Por el contrario, el tratamiento sistémico con un anticuerpo bloqueante de VEGF-A previno completamente el aumento de vasos linfáticos y sanguíneos (figuras 6B y D).

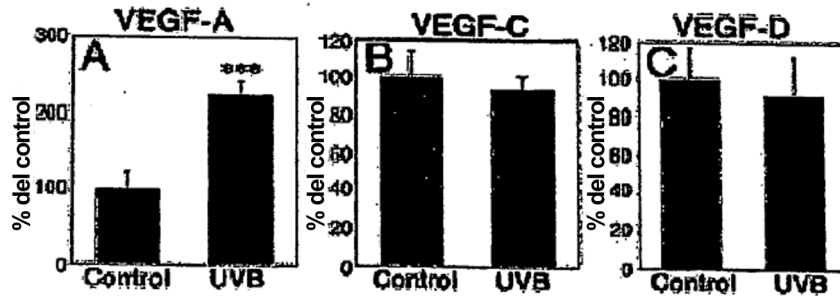
REIVINDICACIONES

1. Un agonista de VEGF-C seleccionado de
 - 5 i) una proteína que incluye un polipéptido VEGF-C y
 - ii) un ácido nucleico que codifica un polipéptido VEGF-C para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene daño en la piel inducido por UVB.
- 10 2. El agonista de VEGF-C para su uso de la reivindicación 1, en donde el agonista de VEGF-C es una proteína que incluye un polipéptido VEGF-C.
3. Uso de un agonista de VEGF-C seleccionado de
 - 15 i) una proteína que incluye un polipéptido VEGF-C y
 - ii) un ácido nucleico que codifica un polipéptido VEGF-C para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que tiene daño en la piel inducido por UVB.
- 20 4. El uso de la reivindicación 3, en donde el agonista de de VEGF-C es una proteína que incluye un polipéptido VEGF-C.
5. El agonista de VEGF-C para su uso de la reivindicación 1, en donde la proteína o el ácido nucleico se formula con un soporte.
- 25 6. El agonista de VEGF-C para su uso de la reivindicación 5, en donde el soporte es un soporte farmacéutico adecuado para la preparación de composiciones sólidas seleccionado de un vehículo, lubricante, disgregante o un aglutinante.
- 30 7. El agonista de VEGF-C para su uso de la reivindicación 5, en donde el soporte es un liposoma adecuado para la administración tópica.
8. El agonista de VEGF-C para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 5-7, en donde la proteína o el ácido nucleico se formula para la administración tópica.
- 35 9. El agonista de VEGF-C para su uso de la reivindicación 8, en donde la proteína o el ácido nucleico se formula para fines farmacéuticos como una solución, crema, pomada, gel, loción, espuma, champú, jabón o aerosol.
- 40 10. El agonista de VEGF-C para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 5-9, en donde la proteína o el ácido nucleico se formula con un conservante, fragancia o protector solar.
- 45 11. El agonista de VEGF-C para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 5-10, en donde la proteína o el ácido nucleico se formula en combinación con un dispositivo de liberación controlada.
12. El uso de la reivindicación 3, en donde la proteína o el ácido nucleico se formula con un soporte.
- 50 13. El uso de la reivindicación 12, en donde el soporte es un soporte farmacéutico adecuado para la preparación de composiciones sólidas seleccionado de un vehículo, lubricante, disgregante o un aglutinante.
14. El uso de la reivindicación 12, en donde el soporte es un liposoma adecuado para la administración tópica.
- 55 15. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 y 12-14, en donde la proteína o el ácido nucleico se formula para la administración tópica.
16. El uso de la reivindicación 15, en donde la proteína o el ácido nucleico se formula para fines farmacéuticos como una solución, crema, pomada, gel, loción, espuma, champú, jabón o aerosol.
- 60 17. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 y 12-16, en donde la proteína o el ácido nucleico se formula con un conservante, fragancia o protector solar.
18. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 y 12-17, en donde la proteína o el ácido nucleico se formula en combinación con un dispositivo de liberación controlada.
19. El agonista de VEGF-C para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 5-9, en donde la proteína o el ácido nucleico se formula con un hidratante farmacéutico o cosmético.

20. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 y 12-16, en donde la proteína o el ácido nucleico se formula con un hidratante farmacéutico o cosmético.







5

