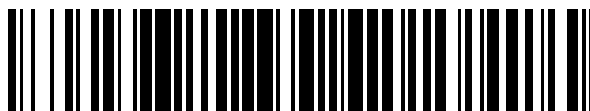


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 919**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2006 E 06844226 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 1948234**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para el tratamiento y prevención de afecciones fibróticas, inflamatorias y de neovascularización**

30 Prioridad:

**28.10.2005 US 261935**

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

**22.03.2013**

73 Titular/es:

**LPATH, INC. (100.0%)  
4025 Sorrento Valley Blvd.  
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**SABBADINI, ROGER, A.;  
GARLAND, WILLIAM, A. y  
STOLLER, GLENN, L.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 398 919 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para el tratamiento y prevención de afecciones fibróticas, inflamatorias y de neovascularización

### Campo de la técnica

- 5 En el presente documento se divulgan procedimientos de tratamientos para trastornos oculares usando restos derivados de inmunitarios que son reactivos contra moléculas lipídicas bioactivas que desempeñan un papel en la enfermedad humana y/o animal como moléculas de señalización. Una clase concreta de lípidos bioactivos de señalización considerados de acuerdo con la presente divulgación es la de los lisolípidos. Lisolípidos de señalización particularmente preferidos son la esfingosina-1-fosfato (S1P) y los diversos ácidos lisofosfatídicos (LPA). Los anticuerpos contra lípidos de señalización, y derivados y variantes de los mismos, se pueden usar en el tratamiento y/o prevención de enfermedades o trastornos oculares a través de la liberación de composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos, solos o en combinación con otros agentes terapéuticos y/o tratamientos.

### Antecedentes de la invención

#### I. Introducción

- 15 La descripción siguiente incluye información que puede ser útil para la comprensión de la presente invención. No es una admisión de que algo de esta información sea técnica anterior, o relevante a ella, de las invenciones reivindicadas en el presente documento, o que ninguna publicación a la que se haga referencia específica o implícitamente sea técnica anterior o incluso particularmente relevante a la invención reivindicada en el presente documento.

#### II. Antecedentes

La presente invención se refiere a procedimientos de disminución o atenuación de neovascularización aberrante, angiogénesis, fibrogénesis aberrante, fibrosis y cicatrización, e inflamación y respuestas inmunitarias. Estos procesos, por separado o juntos, están implicados en muchas enfermedades y afecciones. Estas enfermedades o afecciones pueden ser sistémicas o pueden estar relativamente localizadas, por ejemplo en la piel o el ojo.

#### A. Enfermedades y afecciones oculares

- La angiogénesis/neovascularización patológica o aberrante, el remodelado aberrante, la fibrosis y cicatrización y la inflamación se producen asociadas con enfermedades isquémicas retinianas y oculares tales como la degeneración macular relacionada con la edad (DME), la retinopatía diabética (RD) y la retinopatía de los prematuros (RDP) y otros trastornos del desarrollo [Eichler y col., (2006), Curr Pharm Des, vol 12: 2645-60] además de ser el resultado de infecciones y lesiones mecánicas en el ojo [Ciulla y col., (2001), Curr Opin Ophthalmol, vol 12: 442-9 y Dart y col., (2003), Eye, vol 17: 886-92].

- La angiogénesis ocular patológica es una causa principal de ceguera en diversas afecciones clínicas. La neovascularización coroidea (NVC) se produce en varias enfermedades oculares, siendo la más prevalente de ellas la forma exudativa o "húmeda" de la DME. Como resultado de una población cada vez más envejecida, la DME es una epidemia de estos días y la causa principal de ceguera en el mundo occidental en pacientes mayores de 60 años de edad. A pesar de la epidemia de pérdida de visión causada por la DME, sólo unas pocas terapias, principalmente a base de anti-VEGF, pueden ralentizar la progresión de la DME y todavía menos pueden invertir la pérdida de visión [Bylisma y Guymer (2005), Clin Exp Optom., vol 88: 322-34, Gryziewicz (2005), Adv Drug Deliv Rev, vol 57: 2092-8 y Liu y Regillo (2004), Curr Opin Ophthalmol, vol 15: 221-6.]. Por tanto, el descubrimiento de nuevos tratamientos para la neovascularización patológica es extremadamente importante.

- En el presente documento, la DME se usa únicamente con fines ilustrativos en la descripción de afecciones oculares relacionadas con angiogénesis/neovascularización aberrante, remodelado aberrante, fibrosis y cicatrización, e inflamación, afecciones que se encuentran en otras enfermedades y trastornos oculares como se divulga y reivindica en el presente documento. La DME implica cambios patológicos relacionados con la edad [Tezel, Bora y Kaplan (2004), Trends Mol Med, vol 10: 417-20 y Zarbin (2004), Arch Ophthalmol, 122: 598-614]. Existen múltiples teorías pero la etiología y patogenia exactas de la DME todavía no se conocen bien. El envejecimiento se asocia con lesiones oxidativas acumuladas, engrosamiento de la membrana de Bruch y formación de drusas. La tensión oxidativa tiene como resultado lesiones en las células epiteliales pigmentarias de la retina (EPR) y, en algunos casos, en la lámina coriocapilar [Zarbin (2004), Arch Ophthalmol, vol 122: 598-614 y Gorin y col., (1999), Mol Vis., vol 5: 29]. Probablemente, las lesiones en el EPR provoquen una respuesta inflamatoria crónica dentro de la membrana de Bruch y en la coroides [Johnson y col. (2000), Exp Eye Res., vol 70: 441-9]. Esta lesión e inflamación fomenta y potencia los daños en la retina al estimular NVC y atrofia [Zarbin (2004), Arch Ophthalmol, vol 122: 598-614 y Witmer y col., (2003), Prog Retin Eye Res, vol 22: 1-29]. La NVC tiene como resultado vasos sanguíneos (VS) defectuosos y con fugas que probablemente sean reconocidos como heridas [Kent y Sheridan (2003), Mol Vis, vol 9: 747-55]. La cicatrización de las heridas comienza en la coroides e invade el espacio subretiniano a través de la membrana de Bruch y el EPR. Las respuestas de cicatrización de heridas se caracterizan por una típica respuesta

de inflamación precoz, una prominente respuesta angiogénica y formación de tejido, seguidas de la maduración terminal de todos los elementos implicados. El remodelado de heridas puede comprometer de forma irreversible a los fotorreceptores y los EPR, justificando de este modo la necesidad de tratar la NVC con algo más que terapias antiangiogénicas [La Cour, Kiilgaard y Nissen (2002), *Drugs Aging*, vol 19: 101-33.12].

5 Las alteraciones en la arquitectura retiniana y subretiniana normal como resultado de fibrosis relacionada con NVC, edema e inflamación individualmente o de forma acumulada, conducen a pérdida de visión relacionada con la DME [Tezel y Kaplan (2004), *Trends Mol Med*, vol 10: 417-20 y Ambati y col., (2003), *Surv Ophthalmol*, vol 48: 257-93]. Las múltiples interacciones celulares y de las citocinas que están asociadas con la DME exudativa complican considerablemente la búsqueda de tratamientos eficaces. Aunque la NVC y el edema se pueden tratar en parte con terapéuticas anti-VEGF, no se han abordado adecuadamente los posibles tratamientos para mitigar la formación de cicatrices y la inflamación [Bylsma y Guymer (2005), *Clin Exp Optom*, vol 88: 322-34 y Pauleikhoff (2005), *Retina*, vol 25: 1065-84]. Siempre que el complejo neovascular permanezca intacto, como parece ser el caso en pacientes tratados con agentes anti-VEGF, el potencial de fibrosis subretiniana y futura pérdida de visión persiste.

15 Las terapias anti-VEGF-A representan un reciente avance significativo en el tratamiento de la DME exudativa. No obstante, en el ensayo de fase III VISION con PEGAPTANIB, un aptámero de alta afinidad que inhibe de forma selectiva la isoforma 165 de VEGFA, se demostró que el paciente medio sigue perdiendo visión y solo un pequeño porcentaje ha ganado visión [Gragoudas y col., (2004), *N Engl J Med*, vol 351: 2805-16]. La inhibición de todas las isoformas de VEGF-A (inhibición de pan-VEGF) con el fragmento de anticuerpo RANIBIZUMAB dio resultados mucho más impresionantes [Brown y col., *N Eng Med*, 2006 355:1432-44, Rosenfeld y col., *N Eng J Med* 2006355:1419-31]. En el ensayo de 2 años de duración MARINA y el ANCHOR de 1 año de duración se demostró que aproximadamente el 40 % de los pacientes alcanza alguna ganancia de visión. Aunque estos resultados representan un gran avance en nuestra capacidad para tratar la DME exudativa, también demuestran que en el 60 % de los pacientes no mejora la visión. Adicionalmente, estos pacientes tenían que cumplir unos criterios de inclusión y de exclusión estrictamente definidos. Los resultados en una población más amplia de pacientes pueden ser menos sólidos.

Todavía existe la necesidad bien definida de desarrollar otros agentes terapéuticos dirigidos a otras etapas en el desarrollo de la NVC y los procesos que conducen en última instancia a la destrucción de fotorreceptores. En primer lugar, el crecimiento de VS coroideos implica una interacción orquestada entre muchos mediadores, no solo el VEGF, lo que ofrece la oportunidad de modular o inhibir la totalidad del proceso [Gragoudas y col., (2004), *N Engl J Med*, vol 351: 2805-16]. En segundo lugar, la MDE comprende componentes vasculares y extravasculares. El componente vascular implica células endoteliales vasculares (CE), precursores de CE y pericitos. El componente extravascular, que aparece volumétricamente como el componente mayor, está compuesto por células epiteliales inflamatorias, gliales y pigmentarias de la retina (EPR) y fibroblastos. Los daños tisulares pueden ser resultado de cualquiera de estos componentes. Los actuales tratamientos anti-VEGF no abordan estos otros aspectos del proceso patológico. Dirigir elementos adicionales de la cascada angiogénica asociada con la DME podría proporcionar un enfoque más eficaz y sinérgico del tratamiento [Spaide RF (2006), *Am J Ophthalmol*, vol 141: 149-156].

### 1. Inflamación en la enfermedad ocular

40 Cada vez existen más pruebas de que la inflamación, específicamente los macrófagos y el sistema del complemento [Klein y col., (2005), *Science*, vol 308: 385-9 y Hageman y col., (2005), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol 102: 7227-32] desempeñan un papel importante en la patogenia de la DME exudativa. La histopatología de las membranas neovasculares coroideas extirpadas quirúrgicamente demuestra que los macrófagos están presentes de forma casi universal [Grossniklay col., (1994), *Ophthalmology*, vol 101: 1099-111 y Grossniklaus y col., (2002), *Mol Vis*, vol 8: 119-26]. Existen abundantes pruebas de que los macrófagos pueden desempeñar un papel activo en la mediación de la formación de NVC y su propagación [Grossniklaus y col., (2003), *Mol Vis*, vol 8: 119-26; Espinosa-Heidmann, y col., (2003), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol 44: 3586-92; Oh col., (1999), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol 40: 1891-8; Cousins y col., (2004), *Arch Ophthalmol*, vol 122: 1013-8; Forrester (2003), *Nat Med*, vol 9: 1350-1 y Tsutsumi y col., (2003), *J Leukoc Biol*, vol 74: 25-32] mediante múltiples efectos, que incluyen la secreción de enzimas que pueden dañar a las células y degradar la membrana de Bruch, así como la liberación de citocinas proangiogénicas [Otani y col., (1999), *Ophthalmol Vis Sci*, vol 40: 1912-20 y Amin, Puklin y Frank (1994), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol 35: 3178-88]. En el lugar de la lesión, los macrófagos exhiben signos micromorfológicos de activación, tal como desgranulación [Oh y col., (1999), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol 40: 1891-8 y Trautmann y col., (2000), *J Pathol*, vol 190: 100-6]. Por tanto, se cree que una molécula que limite la infiltración de macrófagos en el complejo neovascular coroideo puede ayudar a limitar la formación de NVC.

### 55 2. Neovascularización coroidea y maduración de vasos sanguíneos en la enfermedad ocular

La angiogénesis es un componente esencial de la cicatrización normal de heridas, ya que libera oxígeno y nutrientes a las células inflamatorias y ayuda a eliminar residuos [Lingen (2001), *Arch Pathol Lab Med*, vol 125: 67-71]. La angiogénesis progresiva está compuesta por dos procesos distintos: Etapa I: Migración de CE vasculares, en respuesta a estímulos cercanos, a los extremos de los capilares en los que proliferan y forman estructuras lumenares; y Etapa II: Poda de la red vascular y optimización de la vasculatura [Guo y col., (2003), *Am J Pathol*, vol

162: 1083-93].

Etapa I: Neovascularización. La angiogénesis suele ayudar a la cicatrización de heridas. No obstante, habitualmente los vasos nuevos, cuando no están controlados, son defectuosos y fomentan las fugas, hemorragias e inflamación. La reducción de VS disfuncionales y permeables mediante GF proangiogénicos dirigidos ha demostrado alguna capacidad para ralentizar la progresión de la DME [Pauleikhoff (2005), *Retina*, vol 25: 1065-84.14 y van Wijngaarden, Coster y Williams (2005), *JAMA*, vol 293: 1509-13].

Etapa II: Maduración de los vasos sanguíneos y desensibilización a fármacos. La inhibición de Pan-VEGF parece ejercer su efecto beneficioso principalmente a través de una acción de antipermeabilización que tienen como resultado la resolución del edema intra y subretiniano, ya que la lesión real de NVC no involuciona considerablemente [Presentación en Angiogenesis 2006 Meeting. 2006. Bascom Palmer Eye Institute Miami, Florida]. La ausencia de una involución marcada de la NVC puede deberse, en parte, a la maduración de los vasos recién formados debido a la cobertura con pericitos. Los pericitos desempeñan un papel crucial en el desarrollo y mantenimiento del tejido vascular. La presencia de pericitos parece conferir resistencia a los agentes anti-VEGF y compromete su capacidad para inhibir la angiogénesis [Bergers y Song (2005), *Neuro-oncol*, vol 7: 452-64; Yamagishi e Imaizumi (2005), *Int J Tissue React*, vol 27: 125-35; Armulik, Abramsson and Betsholtz (2005), *Circ Res*, vol 97: 512-23; Ishibashi y col., (1995), *Arch Ophthalmol*, vol 113: 227-31]. Es probable que un agente que tiene un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de pericitos rompa el ensamblaje de los canales vasculares y la maduración de los canales neovasculares coroides de modo que se perpetúa su sensibilidad a los agentes antiangiogénicos.

El remodelado de la red vascular implica ajustes en la densidad de los VS para satisfacer las necesidades nutricionales [Gariano y Gardner (2005), *Nature*, 438: 960-6]. Los periodos de inmadurez de los VS corresponden a los periodos en los que los vasos nuevos están funcionando pero que todavía no han adquirido un recubrimiento de pericitos [Benjamin, Hemo and Keshet (1998), *Development*, 125: 1591-8 y Gerhardt y Betsholtz (2003), *Cell Tissue Res*, 2003. 314: 15-23]. Este retraso es esencial para proporcionar una ventana de plasticidad para el ajuste fino del desarrollo de la vasculatura de acuerdo con las necesidades nutricionales de la retina o la coroides.

El lípido bioactivo esfingosina-1-fosfato (S1P), VEGF, PDGF, las angiopoyetinas (Ang) y otros factores de crecimiento (GF) aumentan el crecimiento de los vasos sanguíneos y reclutan células de músculo liso (CML) y pericitos para los vasos nuevos que estimularán el remodelado de los vasos emergentes [Allende y Proia (2002), *Biochim Biophys Acta*, vol 582: 222-7; Gariano y Gardner (2005), *Nature*, vol 438: 960-6; Grosskreutz y col., (1999), *Microvasc Res*, vol 58: 128-36; Nishishita, y Lin (2004), *J Cell Biochem*, vol 91: 584-93 y Erber y col., (2004), *FASEB J*, vol 18: 338-40.32]. Los pericitos, muy probablemente generados mediante diferenciación in situ de precursores mesenquimatosos en el momento del brote de las CE o por la migración y diferenciación de las células de músculo liso arterial, se asocian íntimamente y envuelven las CE, lo que tiene como resultado la madurez vascular global y la supervivencia [Benjamin, Hemo y Keshet (1998), *Development*, vol 125: 1591-8]. En estudios recientes se ha demostrado que la S1P y el receptor S1P1 están implicados en el tráfico en la superficie celular y la activación de la molécula de adhesión célula-célula N-cadherina [Paik y col., (2004), *Genes Dev*, vol 18: 2392-403]. La N-cadherina es esencial para las interacciones entre CE, pericitos y células murales que estimulan el desarrollo de un lecho vascular estable [Gerhardt y Betsholtz (2003), *Cell Tissue Res*, vol 314: 15-23]. La delección global del gen de S1P1 tiene como resultado el involucimiento de las células murales aberrantes de VS nacientes necesario para la estabilización de los VS durante el desarrollo embrionario [Allende y Proia (2002), *Biochim Biophys Acta*, vol 1582: 222-7]. La inyección local del ARNs en S1P1 suprime la estabilización vascular en modelos de xenoinjerto tumoral [Chae y col., (2004), *J Clin Invest*, vol 114: 1082-9]. En estudios con ratones transgénicos se ha demostrado que VEGF y PDGF-B estimulan la maduración y la estabilización de nuevos VS [Guo y col., (2003), *Am J Pathol*, 162: 1083-93 y Gariano y Gardner (2005), *Nature*, vol 438: 960-6.50]. El VEGF regula por aumento la Ang-1 (ARNm y proteína) [Asahara y col., (1998), *Circ Res*, vol 83: 233-40]. La Ang-1 desempeña un papel principal en el reclutamiento y sostén del soporte periendothelial por los pericitos [Asahara y col., (1998), *Circ Res*, vol 83: 233-40]. La inyección intraocular de VEGF aceleró la cobertura por pericitos del plexo de CE [Benjamin, Hemo and Keshet (1998), *Development*, vol 125: 1591-8]. Los embriones de ratón deficientes en PDGF-B carecen de pericitos microvasculares, lo que conduce a edema, microaneurismas y hemorragias letales [Lindahl y col., (1997), *Science*, vol 277: 242-5]. En estudios prenatales murinos se ha demostrado que se requieren señales adicionales para completar la estimulación por VEGF y PDGF de la maduración del lecho vascular. En base a la transactivación de la S1P indicada anteriormente, este factor podría ser la S1P [Erber y col., (2004), *FASEB J*, vol 18: 338-40]. La estabilización y maduración de los vasos se asocia con una pérdida de plasticidad y la ausencia de regresión la retirada de VEGF y otros GF y resistencia a terapias antiangiogénicas [Erber y col., (2004), *FASEB J*, vol 18: 338-40 y Hughes y Chan-Ling (2004), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol 45: 2795-806]. Los pericitos confieren resistencia de los VS a los inhibidores angiogénicos y estabilizan inicialmente los vasos maduros y los que son reclutados para vasos inmaduros tras el tratamiento [Erber y col., (2004), *FASEB J*, vol 18: 338-40]. Después de envolver las CE inmaduras, los pericitos expresan factores de supervivencia compensatorios (Ang-1 y PDGF-B) que protegen las CE de los agentes proapoptóticos.

### 3. Edema y permeabilidad vascular

Las membranas de la NVC están compuestas por CE vasculares fenestradas que tienden a perder sus contenidos

intravasculares hacia el espacio circundante, lo que tiene como resultado hemorragia subretiniana, exudados y acumulación de fluidos [Gerhardt y Betsholtz (2003), Cell Tissue Res, vol 14: 15-23]. Durante muchos años se ha implicado al propio tejido de NVC, y más recientemente la neovascularización intrarretiniana, como responsables de la disminución de la agudeza visual asociada con la DME. No obstante, ahora se piensa que el edema macular causado por un incremento de la permeabilidad vascular (PV) y la posterior rotura de la barrera hematorretiniana (BHR) desempeñan un papel importante en la pérdida de visión asociada con la DME y otras enfermedades oculares [Hughes y Chan-Ling (2004), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 45: 2795-806; Felinski y Antonetti (2005), Curr Eye Res, vol 30: 949-57; Jousssen y col., (2003), FASEB J, vol 17: 76-8 y Strom y col., (2005), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 46: 3855-8].

#### 10 4. Fibrosis, fibrogénesis y formación de cicatrices

La formación de fibrosis subretiniana conduce a daños irreversibles en los fotorreceptores y a una pérdida de visión permanente. Siempre que el complejo neovascular permanezca intacto, como parece ser el caso en pacientes tratados con agentes anti-VEGF, el potencial de fibrosis subretiniana y futura pérdida de visión persiste. En una actualización del estudio PRONTO de RANIBIZUMAB se ha descubierto que en los pacientes que pierden visión esta pérdida se debe a fibrosis subretiniana o de un desgarro en el EPR [Presentación en el Angiogenesis 2006 Meeting. 2006. Bascom Palmer Eye Institute Miami, Florida.]. Es probable que un agente que pueda disminuir el grado de infiltración de fibroblastos y de depósito de colágeno sea valioso.

Los fibroblastos, en particular los miofibroblastos, son elementos celulares clave en la formación de cicatrices en respuesta a las lesiones celulares y la inflamación [y col., (2002), Nat Rev Mol Cell Biol, vol 3: 349-63 y Virag and Murry (2003), Am J Pathol, vol 163: 2433-40]. La expresión génica de colágeno en miofibroblastos es un rasgo característico del remodelado y necesaria para la formación de cicatrices [Sun y Weber (2000), Cardiovasc Res, vol 46: 250-6 y Sun y Weber (1996), J Mol Cell Cardiol, vol 28: 851-8]. La S1P estimula la cicatrización de heridas a través de la activación de la migración y proliferación de fibroblastos al tiempo que incrementa la producción de colágeno [Sun y col., (1994), J Biol Chem, vol 269: 16512-7]. La S1P producida localmente por las células dañadas podría ser responsable de una cicatrización de heridas maladaptativa asociada con el remodelado y la formación de cicatrices. Por tanto, se cree que los inhibidores de la S1P son útiles en enfermedades o afecciones caracterizadas, al menos en parte, por fibrogénesis aberrante o fibrosis. En el presente documento, "fibrogénesis" se define como actividad o número excesivos de fibroblastos y "fibrosis" se define como actividad o número excesivos de fibroblastos que conduce a una producción de colágeno excesiva o inadecuada y cicatrización, destrucción de la estructura tisular fisiológica y/o una contracción inadecuada de la matriz que conduce a patologías tales como desprendimiento de retina u otros procesos que producen deterioro de la función orgánica.

#### B. Otras enfermedades o afecciones

El papel de los lípidos bioactivos de señalización, como S1P y LPA, no se limita a las enfermedades y afecciones oculares. Dada la implicación de la señalización de biolípidos en muchos procesos, incluidos neovascularización, angiogénesis, fibrogénesis aberrante, fibrosis y cicatrización, e inflamación y respuestas inmunitarias, se cree que los inhibidores a base de anticuerpos de estos lípidos bioactivos serán útiles en diversas enfermedades y afecciones asociadas con uno o más de estos procesos. Dichas enfermedades y afecciones pueden ser sistémicas (p. ej., esclerodermia sistémica) o se localizan en una o más partes u órganos específicos del cuerpo (p. ej., piel, pulmón u ojos).

#### 40 C. Lípidos bioactivos de señalización

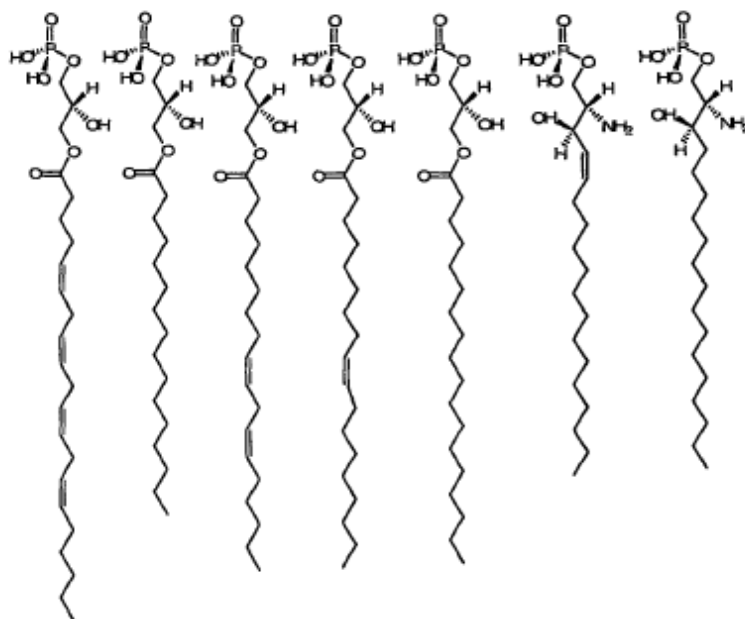
Actualmente los lípidos y sus derivados se reconocen como dianas importantes para investigación médica, no solo como simples elementos estructurales en las membranas celulares o como fuentes de energía para la  $\beta$ -oxidación, la glicólisis u otros procesos metabólicos. En concreto, ciertos lípidos bioactivos funcionan como importantes mediadores de la señalización en enfermedades animales y humanas. Aunque la mayoría de los lípidos de la membrana plasmática desempeñan un papel exclusivamente estructura, solo una pequeña proporción de ellos está implicada en la relajación de los estímulos extracelulares en las células. "La señalización de lípidos" se refiere a cualquiera de una serie de vías de transducción de la señal celular que usan lípidos de la membrana celular como segundos mensajeros, así como a la interacción directa de una molécula de señalización lipídica con su propio receptor específico. Las vías de señalización lipídica se activan mediante diversos estímulos extracelulares que varían desde factores de crecimiento a citocinas inflamatorias y regulan las decisiones sobre el destino de las células tales como apoptosis, diferenciación y proliferación. La investigación en la señalización de lípidos bioactivos es un área de intensa investigación científica porque cada vez se identifican más lípidos bioactivos y se caracterizan sus acciones.

Ejemplos de lípidos bioactivos incluyen los eicosanoides (incluidos cannabinoideos, leucotrienos, prostaglandinas, lipoxinas, ácidos epoxieicosatrienoicos e isoicosanoides), mediadores cannabinoideos no eicosanoides, fosfolípidos y sus derivados tales como ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilglicerol (PG), factor de activación de plaquetas (PAF) y cardiolipinas, así como lisofosfolípidos tales como lisofosfatidilcolina (LPC) y varios ácidos lisofosfatídicos (LPA). Los mediadores de lípidos bioactivos de señalización también incluyen los esfingolípidos, tales como esfingomielina, ceramida, ceramida-1-fosfato, esfingosina, esfingosilfosforilcolina, esfinganina, esfinganina-1-fosfato (dihidro-S1P) y

esfingosina-1-fosfato. Los esfingolípidos y sus derivados representan un grupo de moléculas de señalización extracelulares e intracelulares con efectos pleiotrópicos sobre importantes procesos celulares. Otros ejemplos de lípidos bioactivos de señalización incluyen fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PEA), diacilglicérido (DG), sulfatadas, gangliósidos y cerebrósidos.

#### 5 D. Lisolípidos

Los lisofosfolípidos (LPL), también conocidos como lisolípidos, son lípidos de bajo peso molecular (normalmente de menos de aproximadamente 500 dalton) que contienen una única estructura de hidrocarburo y un grupo principal polar que contiene un grupo fosfato. Algunos lisolípidos son lípidos de señalización bioactivos. Dos ejemplos concretos de lisolípidos bioactivos médicamente importantes son LPA (estructura de glicerol) y S1P (estructura esfingolípido). Las estructuras de LPA seleccionados, S1P y dihidro S1P se presentan más adelante.



LPA (20:4) LPA (16:0) LPA (18:2) LPA (18:1) LPA(18:0) S1P Dihidro-S1P

LPA no es una entidad molecular sencilla sino una colección de variantes estructurales endógenas con ácidos grasos de varias longitudes y grados de saturación (Fujiwara y col., (2005), J Biol Chem, vol. 280: 35038-35050). El esqueleto estructural de los LP deriva de fosfolípidos basados en glicerol tales como fosfatidilcolina (PC) o ácido fosfatídico (PA). En el caso de los lisoesfingolípidos, tales como S1P, falta el ácido graso del esqueleto de ceramida. El esqueleto estructural de S1P, dihidro-S1P (DHS1P) y esfingosilfosforilcolina (SPC) está basado en esfingosina, que deriva de la esfingomielina.

LPA y S1P regulan varias vías de señalización celular mediante la unión de la misma clase de múltiples receptores acopladas a proteína G con dominios transmembrana (GPCR) (Chun J, Rosen H (2006), Current Pharm Des, vol. 12: 161-171 y Moolenaar WH (1999), Experimental Cell Research, vol. 253: 230-238). Los receptores de S1P se denominan S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> y S1P<sub>5</sub> (anteriormente EDG-1, EDG-5/AGR16, EDG-3, EDG-6 y EDG-8) y los receptores de LPA se denominan LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub>, LPA<sub>3</sub> (anteriormente, EDG-2, EDG-4, y EDG-7). Un cuarto receptor de LPA de esta familia se ha identificado para LPA (LPA<sub>4</sub>) y también se han comunicado otros supuestos receptores para estos lisofosfolípidos.

#### E. Esfingosina-1-fosfato

La SP1 es un mediador de la proliferación celular y protege de la apoptosis a través de la activación de las vías de supervivencia (Maceyka y col., (2002), BBA, vol 1585): 192-201 y Spiegel S. y col., (2003), Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol 4: 397-407). Se ha propuesto que el equilibrio entre los niveles de ceramida/esfingosina (CER/SPH) y S1P proporciona un mecanismo reostático que decide si una célula es dirigida a la vía de la muerte o se la protege de la apoptosis. La enzima reguladora clave del mecanismo reostático es la esfingosina quinasa (SPHK) cuyo papel es convertir los lípidos de señalización bioactivos estimuladora de la muerte (CER/SPH) en la S1P estimuladora del crecimiento. La S1P tiene dos destinos: S1P se puede degradar por acción de la S1P liasa, una enzima que escinde la S1P en fosfoetanolamina y hexadecanal o, menos frecuente, es hidrolizada por la S1P fosfatasa en SPH. La S1P se genera de forma abundante y almacena en las plaquetas, que contienen niveles altos de SPHK y carece de las enzimas para la degradación de S1P. Cuando las plaquetas se activan se secreta S1P. Además, también se cree que otros tipos de células, por ejemplo, los mastocitos, son capaces de secretar S1P. Una

vez secretada, se piensa que la S1P se encuentra en concentraciones elevadas sobre las proteínas transportadoras tales como seroalbúmina y lipoproteínas. La S1P se encuentra en concentraciones elevadas en plasma, con concentraciones en el intervalo de 0,5 – 5 uM. Aunque también se han sugerido acciones principalmente extracelulares e intracelulares de la S1P (véase, por ejemplo, Spiegel S, Kolesnick R (2002), *Leukemia*, vol. 16: 1596-602; Suomalainen, y col., (2005), *Am J Pathol*, vol. 166: 773-81).

La amplia expresión de los receptores de S1P en la superficie celular permite que la S1P influya sobre un diverso espectro de respuestas celulares, incluidas proliferación, adhesión, contracción, motilidad, morfogénesis, diferenciación y supervivencia. Este espectro de respuesta parece depender del solapamiento o los claros patrones de expresión de los receptores de S1P dentro de los sistemas celulares y tisulares. Además, recientemente se ha demostrado el entrecruzamiento entre las vías de señalización de S1P y los factores de crecimiento, incluido el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento beta transformante ( $TGF\beta$ ) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) (véase, por ejemplo, Baudhuin, y col., (2004), *FASEB J*, vol. 18: 341-3). Dado que la regulación de varios procesos celulares que implican a la S1P tiene un impacto concreto sobre la señalización neuronal, el tono vascular, la cicatrización de heridas, el tráfico de células inmunitarias, la reproducción y la función cardiovascular, entre otros, se cree que las alteraciones de los niveles endógenos de S1P dentro de estos sistemas pueden tener efectos perjudiciales, provocando varias afecciones patofisiológicas, incluidas cáncer, insuficiencia cardíaca, enfermedad ocular y enfermedades infecciosas y autoinmunitarias. Los autores han propuesto que una estrategia potencialmente eficaz para tratar la NVC asociada con la DME es reducir los niveles extracelulares de S1P biológicamente disponibles. Los solicitantes han desarrollado un anticuerpo monoclonal murino (SPHINGOMAB™, mAb anti-S1P) que es específico de S1P. SPHINGOMAB representa el primer anticuerpo monoclonal creado con éxito contra un esfingolípido bioactivo diana de señalización. SPHINGOMAB actúa como una esponja molecular para absorber selectivamente la S1P del fluido extracelular, disminuyendo la concentración eficaz de S1P. Se une selectivamente a la S1P y la neutraliza con afinidad picomolar en matrices biológicas. Los autores proponen que SPHINGOMAB privaría a los fibroblastos, pericitos y células endoteliales, inflamatorias e inmunitarias en el ojo de importantes factores de crecimiento y de supervivencia, apuntando de este modo a las múltiples etapas maladaptativas de la DME lo que tiene como resultado la pérdida de fotorreceptores y de agudeza visual. Una terapéutica dirigida simultáneamente a múltiples componentes de la respuesta neovascular coroidea tiene el potencial de ser una terapéutica más potente que las terapéuticas con “una única diana”.

Como se usa en el presente documento, “esfingosina-1-fosfato” o “S1P” se refiere a la esfingosina-1-fosfato [efingeno-1-fosfato; D-eritro-esfingosina-1-fosfato; esfing-4-enina-1-fosfato; ácido (E,2S,3R)-2-amino-3-hidroxi-octadec-4-enoxi] fosfónico; CAS 26993-30-6] y sus variantes, S1P y DHS1P (dihidro esfingosina-1-fosfato [esfinganina-1-fosfato; ácido [(2S,3R)-2-amino-3-hidroxi-octadecoxi]fosfónico; D-Eritro-dihidro-D-esfingosina-1-fosfato; CAS 19794-97-9] e esfingosilfosforilcolina. “Variantes” de S1P y LPA, como se usan en el presente documento, incluye análogos y derivados de S1P y LPA, respectivamente, que funcionan de un modo similar, o cabría esperar que funcionaran de un modo similar, a la molécula parental.

Cada vez más pruebas sugieren que la S1P podría contribuir a las etapas tempranas y tardías del remodelado retiniano maladaptativo asociado con la DME exudativa. La S1P tiene un pronunciado efecto proangiogénico no dependiente de VEGF. La S1P también estimula la migración, proliferación y supervivencia de múltiples tipos de células, incluidos fibroblastos, CE, pericitos y células inflamatorias, las mismas células que participan en los múltiples procesos maladaptativos de la DME exudativa. La S1P está ligada a la producción y activación de VEGF, bFGF, PDGF y otros factores de crecimiento (GF) implicados en la patogenia de la DME exudativa. Por último, la S1P puede modular la maduración de la vasculatura nueva, un proceso que conduce a una pérdida de sensibilidad a agentes antiangiogénicos. Inhibir la acción de la S1P podría ser un tratamiento terapéutico eficaz para la DME exudativa que puede ofrecer significativas ventajas sobre los abordajes exclusivamente anti-VEGF o puede actuar de forma sinérgica con ellos para abordar los procesos complejos y las múltiples etapas que, en última instancia, conducen a la pérdida de visión asociada con la DME.

Cada vez hay más pruebas de que la S1P es un mediador importante de los acontecimientos inflamatorios [Olivera and Rivera (2005), *J Immunol.*, vol 174: 1153-8]. Las plaquetas activadas, neutrófilos, macrófagos y mastocitos sirven como fuentes ricas de S1P tras la coagulación y los acontecimientos inflamatorios [Yatomi y col., (2000) *Blood*, vol 96: 3431-8]. Dado que estas células son importantes componentes en la respuesta de inflamación y la pérdida de tejido, la S1P puede regular estos acontecimientos mediante el control de la función de las células inflamatorias [Tezel (2004), *Trends Mol Med*, vol 10: 417-20]. La S1P liberada de los mastocitos es responsable de muchas de las respuestas en modelos animales experimentales de inflamación [Jolly y col., (2004), *J Exp Med.*, vol 199: 959-70 y Jolly y col., (2005), *Blood*, vol 105: 4736-42]. La neutralización de la S1P con SPHINGOMAB podría proporcionar un nuevo y eficaz medio de limitar la respuesta inflamatoria perjudicial que exacerba los daños en el tejido ocular de NVC asociada con la DME.

Varias líneas de evidencia sugieren que la S1P, y el complemento de los receptores de la S1P, pueden desempeñar un papel regulador fundamental en el proceso angiogénico [Allende y Proia 2002), *Biochim Biophys Acta.*, vol 1582: 222-7; Spiegel (1993), *J. Lipid Med.*, vol 8: 169-175 y Argraves y col., (2004), *J Biol Chem*, vol 279: 50580-90]. En primer lugar, la S1P estimula la síntesis de ADN y la motilidad quimiotáctica de las CE vasculares locales y derivadas de la médula ósea en los sitios de vascularización, al tiempo que induce la diferenciación de estructuras

multicelulares consistentes con la formación precoz de VS [Lee y col., (1999), *Biochem Biophys Res Commun*, vol 264: 743-325 y Annabi, y col., (2003), *Exp Hematology*, vol 31: 640-649]. En segundo lugar, la S1P estimula la formación y el mantenimiento del ensamblaje de las CE vasculares y la integridad activando tanto S1P<sub>1</sub> como S1P<sub>3</sub>, y el ensamblaje de la unión adherente de las CE inducida por S1P. (2004), *Genes Dev*, vol 18: 2392-403 y Lee y col., (1999), *Cell*, vol 99: 301-12]. Los oligonucleótidos antisentido contra estos receptores de S1P disminuyen el ensamblaje de las CE vasculares inducido por S1P y la integridad de la barrera celular [English, y col., (1999), *J Hematother Stem Cell Res*, vol 8: 627-34 y Lee y col., (2001), *Mol Cell*, vol 8: 693-704]. En tercer lugar se ha demostrado que la formación de tubos capilares inducida por S1P es un estímulo proangiogénico más potente que bFGF o VEGF [Wang y col., (1999), *J. Biol. Chem.*, vol 274: 35343-50 y Lee y col., (1999), *Biochem Biophys Res Commun*, vol 264: 743-325]. Por último, se ha demostrado que la S1P produce un efecto sinérgico con VEGF, EGF, PDGF, bFGF y IL-8 para estimular el desarrollo de redes vasculares in vivo [Wang y col., (1999), *J Biol. Chem.*, vol 274: 35343-50]. La S1P transactiva los receptores EGF y VEGF2 [Tanimoto, Jin y Berk (2002), *J Biol Chem*, vol 277: 42997-3001] y VEGF regula por aumento los receptores de S1P [Igarashi y col., (2003), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol 100: 10664-9]. El tratamiento de las CE vasculares con VEGF induce marcadamente la regulación por aumento de la expresión de S1P<sub>1</sub> y potencia las vías de señalización mediadas por S1P que conducen a la activación de la isoforma endotelial de la óxido nítrico sintasa (eNOS) [Lee y col., (2001), *Mol Cell*, vol 8: 693-704 y Tanimoto, Jin y Berk (2002), *J Biol Chem*, vol 277: 42997-3001 y Igarashi y Michel (2001), *J Biol Chem*, vol 276: 36281-8]. La actividad de la eNOS desempeña un papel crucial en diferentes respuestas celulares y funciones vasculares esenciales, incluida la inhibición de la apoptosis, la inhibición de la agregación plaquetaria y la angiogénesis [Kwon y col. (2001), *J Biol Chem*, vol 276: 10627-33; Huang (2003), *Curr Hypertens Rep*, vol 5: 473-80; Dantas, Igarashi Michel (2003), *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol 284: H2045-52; Rkitake y col., (2002), *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol 22: 08-114 y Kimura y Esumi (2003), *Acta Biochim Pol*, vol 50: 49-59]. Las estructuras vasculares resultantes de la exposición a bFGF y S1P eran más diferenciadas que las obtenidas de la exposición a bFGF solo, lo que sugiere que la S1P puede ser necesaria para la actividad completa de bFGF y VEGF [English y col., (2000), *FASEB J*, vol 14: 2255-65.].

Por tanto, SPHINGOMAB puede mitigar el crecimiento aberrante de VS neutralizando los GF proangiogénicos sinérgicos y, posiblemente, la S1P producida en exceso durante la tensión metabólica en las células inflamatorias asociadas con la NVC. SPHINGOMAB no solo inhibe la migración/infiltración de CE inducida por S1P y la formación de VS sino que también neutraliza la vascularización inducida por bFGF y VEGF a través de su efecto sobre S1P. SPHINGOMAB tiene una posible ventaja sobre las terapéuticas "de una única diana" por su capacidad para neutralizar la S1P, lo que tiene como resultado la neutralización de múltiples GF mediante los efectos pleiotrópicos de la S1P.

La neutralización directa de S1P y una neutralización indirecta de VEGF y PDGF-B mediante SPHINGOMAB podría evitar el reclutamiento de pericitos, la maduración de VS y ralentizar el desarrollo de resistencias a fármacos antiangiogénicos. Apuntar a los pericitos, en un esfuerzo de extender o aumentar la vulnerabilidad a agentes antiangiogénicos, representa un atractivo abordaje a largo plazo en el tratamiento de pacientes que presentan lesiones NVC activas y podrían estimular la involución de complejos vasculares [Erber y col. (2004), *FASEB J*, vol 18: 338-40].

La S1P ayuda en la organización de la actina en anillos corticales y refuerza la adherencia intracelular y a la matriz celular [McVerry y Garcia (2005), *Cell Signal*, vol 17: 131-9 and McVerry y Garcia (2004), *J Cell Biochem*, vol 92: 1075-85]. Estos cambios estructurales se correlacionan con una menor permeabilidad vascular [Hla (2004), *Semin Cell Dev Biol*, vol 15: 513-20]. Se ha demostrado que bloqueando la función de S1P aumentó la permeabilidad vascular en riñones, el sistema pulmonar y tumores [LaMontagne y col., (2006), *Cancer Res*, vol 66: 221-31; Sanchez et al. (2003), *J Biol Chem*, vol 278: 47281-90 y Awad y col., (2006), *Am J Physiol Renal Physiol*, vol 290: F1516-24]. No obstante, se sabe poco acerca de los efectos sobre la permeabilidad de S1P en diferentes sistemas orgánicos, tales como el cerebro y los ojos. Las CE en el cerebro, y probablemente en los ojos, forman barreras más estrechas y menos permeables a los fluidos y solutos que las CE de las arterias pulmonares [Schnitzer y col., (1994), *Biochem Biophys Res Commun*, vol 199: 11-19] y muy probablemente que las del riñón y los tumores también. Las funciones de barrera diferencial se han atribuido a una población significativamente mayor de complejos de adhesión focal [Schnitzer y col., (1994), *Biochem Biophys Res Commun*, vol 199: 11-19]. A la luz de estas diferencias, las alteraciones inducidas por S1P en la permeabilidad vascular ocular pueden ser menos influyentes.

VEGF y PDGF pueden comprometer la integridad de la barrera hematorretiniana (BHR): La capacidad de SPHINGOMAB para neutralizar la transactivación de S1P de VEGF y PDGF podría ser eficaz en la mitigación del edema macular asociado con DME [Sanchez y col., (2003), *J Biol Chem*, vol 278: 47281-90; Saishin y col., (2003), *J Cell Physiol*, vol 195: 241-8 y Viores y col., (2000), *Gen Pharmacol*, vol 35: 233-9]. Los ratones transgénicos que sobreexpresan VEGF demuestran una degradación de la BHR que se produce en el área de la NVC similar a la observada en la DME y las retinopatías diabéticas [Viores y col., (2000), *Adv Exp Med Biol*, vol 476: 129-38]. Los inhibidores de la PDGF receptor quinasa disminuyeron las fugas causadas por la degradación inducida de las prostaglandinas de la BHR [Lindhahl y col., (1997), *Science*, vol 277: 242-5]. Por último, SPHINGOMAB mitiga los efectos de bFGF and VEGF in vivo, tal como se ve en un ensayo en un modelo murino de tapón de Matrigel como se describe en los ejemplos de esta solicitud.



S1P y la proliferación de fibroblastos y protección frente a la muerte celular: Los fibroblastos responden al tratamiento con S1P mediante un incremento en la síntesis de ADN; los fibroblastos transfectados con esfingosina quinasa 1 (sphK1) exhiben un incremento de la proliferación celular [Hammer y col., (2004), *J Cell Biochem*, vol 91: 840-51]. Similar a los efectos de la S1P sobre otros varios tipos de fibroblastos (Swiss 3T3, pulmonar y cardíacos), la S1P puede estimular la proliferación de fibroblastos oculares (y la posterior diferenciación). Los fibroblastos están protegidos directamente de la apoptosis mediante la adición de S1P y los inhibidores de sphK1 potencian la apoptosis [Olivera y col., (1999), *J Cell Biol*, vol 147: 545-58]. La S1P bloquea la liberación del citocromo C y la posterior activación de la caspasa [Olivera y col., (1999), *J Cell Biol*, vol 147: 545-58 and Kang y col., (2004), *Cell Death Differ*, vol 11: 1287-98]. Se ha establecido que sphK1 regula por aumento la Akt, de modo que regula los miembros de la familia Bcl-2 [Limaye y col., (2005), *Blood*, vol 105: 3169-77] y protege a los fibroblastos de la apoptosis.

S1P y migración de fibroblastos: La S1P activa los sistemas de señalización, incluido Rho, lo que tiene como resultado el ensamblaje de los filamentos de actina contráctiles controlado por el sistema Rho/Rac/Cdc42 y conduce a efectos sustanciales sobre la migración celular [Radeff-Huang y col., (2004), *J Cell Biochem*, Vol 92: 949-66]. La activación de Rho y de las Rho GTPasas por la S1P puede ser responsable de la migración de los fibroblastos oculares a la herida y, de este modo, contribuye a la fibrosis.

S1P y expresión de colágeno en fibroblastos. La S1P estimula la diferenciación de los fibroblastos quiescentes en miofibroblastos activos que exhiben una expresión potenciada del colágeno durante la formación de cicatrices [Urata y col., (2005), *Kobe J Med Sci*, vol 51: 17-27]. Junto con la proliferación y migración de los fibroblastos a la zona de cicatrización, los miofibroblastos depositan una red granular temporal que consiste principalmente en osteopontina y fibronectina [Sun y Weber (2000), *Cardiovasc Res*, vol 46: 250-6]. A medida que procede el remodelado, se absorbe la matriz temporal y se establece una red de colágeno [Sun y Weber (2000), *Cardiovasc Res*, vol 46: 250-6]. Los autores han demostrado que la S1P estimula la producción de colágeno por los miofibroblastos. Se ha demostrado que el TGF $\beta$ , un bien conocido mediador de la fibrosis, regula por aumento varias proteínas profibróticas, convierte los fibroblastos en miofibroblastos y estimula la expresión de proteínas inflamatorias posiblemente a través de la acción de S1P [y col., (2005), *J Mol Cell Cardiol*, vol 39: 699-707 and Butt, Laurent y Bishop (1995), *Eur J Cell Biol*, vol 68: 330-5]. La regulación por aumento de TIMP1, una molécula de señalización implicada en la diferenciación estimulada por TGF $\beta$  de los fibroblastos en miofibroblastos, se bloquea mediante ARNs contra sphK1 [Yamanaka y col., *J Biol Chem*. 2004 Dec 24;279(52):53994-4001, lo que sugiere que SPHINGOMAB podría mitigar los efectos profibróticos de TGF $\beta$  así como mitigar los efectos fibrogénicos de la propia S1P. La minimización de la formación de cicatrices maladaptativas mediante neutralización de la S1P podría ser beneficiosa y prevenir pérdidas irreversibles de la agudeza visual limitando la extensión de la fibrosis subretiniana y el posterior daño en los fotorreceptores.

#### F. Ácidos lisofosfáticos (LPA)

Los LPA se conocen desde hace tiempo como precursores de la biosíntesis de los fosfolípidos en células tanto eucarióticas como procarióticas, pero ha sido recientemente cuando los LPA han surgido como moléculas de señalización que se producen y liberan rápidamente por células activadas, principalmente plaquetas, para influir sobre las células diana actuando sobre receptores específicos de la superficie celular (véase, por ejemplo, Moolenaar y col., (2004), *BioEssays*, vol. 26: 870-881 and van Leewen y col., (2003), *Biochem Soc Trans*, vol 31: 1209-1212). Además de ser sintetizados y procesados en fosfolípidos más complejos en el retículo endoplásmico, los LPA se pueden generar a través de la hidrólisis de fosfolípidos preexistentes tras la activación celular; por ejemplo, en la posición sn-2 normalmente falta un residuo de ácido graso debido a la desacetilación, dejando solo el hidroxilo en sn-3 esterificado en un ácido graso. Además, una enzima clave en la producción de LPA, la autotaxina (lisoPLD/NPP2), puede ser el producto de un oncogén, ya que muchos tipos de tumor regulan por aumento al autotaxina [Brindley (2004), *J Cell Biochem*, vol. 92: 900-12]. Se han notificado las concentraciones de LPA en plasma y suero humano, incluidas las determinaciones realizadas usando procedimientos de CL/EM sensibles y específicos [Baker y col., (2001), *Anal Biochem*, vol 292: 287-295]. Por ejemplo, en suero humano recién preparado dejado reposar a 25 °C durante una hora, se ha estimado que las concentraciones de LPA son de aproximadamente 1,2  $\mu$ M siendo los análogos de LPA 16:0, 18:1, 18:2, y 20:4 la especie predominante. De un modo similar, en plasma humano recién preparado dejado reposar a 25 °C durante una hora, se ha estimado que las concentraciones de LPA son de aproximadamente 0,7  $\mu$ M siendo los análogos de LPA 16:0, 18:1 y 18:2 la especie predominante.

Los LPA influyen sobre una amplia gama de respuestas biológicas, incluida la inducción de proliferación celular, la estimulación de la migración celular y la retracción de neuritas, el cierre de uniones comunicantes [Goetzl. y col., (2002), *Scientific World Journal*, vol 2: 324-338]. El volumen de conocimientos sobre la biología de los LPA sigue creciendo a medida que se analiza la capacidad de respuesta de los LPA en más y más sistemas celulares. Por ejemplo, ahora se sabe que, además de estimular el crecimiento y la proliferación celulares, los LPA estimulan la tensión celular y la unión de la fibronectina a la superficie celular, que son importantes acontecimientos en la reparación y regeneración de heridas [Moolenaar y col., (2004), *BioEssays*, vol. 26: 870-881]. Recientemente también se ha atribuido actividad antiapoptótica a los LPA y recientemente se ha notificado que el receptor de la proliferación de peroxisomas gamma es un receptor/diana para los LPA [Simon y col., (2005), *J Biol Chem*, vol 280: 14656-14662].

Recientemente, los solicitantes han desarrollado varios anticuerpos monoclonales contra los LPA. Como el anticuerpo anti-S1P, los anticuerpos anti-LPA pueden neutralizar varios LPA y mitigar su acción biológica y farmacológica. Para aplicación en enfermedades y afecciones oculares, cabría esperar que los anticuerpos anti-LPA actuaran sobre los procesos siguientes para un beneficio terapéutico.

5 NVC y maduración de los VS: La autotaxina, una lisofosfolipasa D secretada responsable de producir LPA, es esencial para la formación de vasos sanguíneos durante el desarrollo [van Meeteren y col., (2006), *Mol Cell Biol*, vol 26: 5015-22]. Además, los LPA insaturados se identificaron como principales contribuyentes a la inducción de la desdiferenciación de las células de músculo liso vascular. (2001), *Circ Res*, vol 89: 251-8].

10 Edema y permeabilidad vascular: Los LPA inducen exudación plasmática y liberación de histamina en ratones [Hashimoto y col., (2006), *J Pharmacol Sci*, vol 100: 82-7].

15 Inflamación: LPA actúa como mediador inflamatorio en las células epiteliales corneanas humanas [Zhang y col., (2006), *Am J Physiol*, June 7]. El LPA participa en la cicatrización de heridas en la córnea [Liliom K y col., (1998), *Am. J. Physiol*, vol 274: C1065-C1074] y estimula la liberación de ROS en el tejido del cristalino [Rao y col., (2004), *Molecular Visions*, vol 10: 112-121]. Los LPA también pueden reactivar el VSH-1 en córnea de conejos [Martin y col., (1999), *Molecular Visions*, vol 5: 36-42].

Fibrosis y formación de cicatrices: El LPA inhibe la estimulación mediada por la estabilidad del ARNm del colágeno de tipo I por una vía dependiente de ERK en los fibroblastos dérmicos [Sato y col., (2004), *Matrix Biol*, vol 23: 353-61]. Además, los LPA tienen algunos efectos fibrogenéticos directos mediante la estimulación de la expresión del gen del colágeno y la proliferación de fibroblastos [Chen, y col., (2006) *FEBS Lett.* 580(19):4737-45.

20 3. Definiciones.

Antes de describir la presente invención con detalle se definirán varios términos usados en el contexto de la presente invención. Además de estos términos, otros se definen en otros puntos de la memoria, según sea necesario. A menos que se defina expresamente en el presente documento, los términos de la técnica usados en esta memoria tendrán sus significados reconocidos en la técnica.

25 Un "resto derivado inmunitario" se refiere a cualquier anticuerpo policlonal o monoclonal o fragmento, variante o derivado de anticuerpo.

Un "anticuerpo anti-S1P" o un "resto derivado inmunitario reactivo contra la S1P" se refiere a cualquier anticuerpo o molécula derivada de anticuerpo que se une a la S1P.

30 Un "anticuerpo anti-LPA" o un "resto derivado inmunitario reactivo contra LPA" se refiere a cualquier anticuerpo o molécula derivada de anticuerpo que se une a todos o a uno o más de los LAP.

35 Un "lípidio bioactivo" se refiere a una molécula lipídica de señalización. En general, un lípidio bioactivo no reside en una membrana biológica cuando ejerce sus efectos de señalización, que significa que aunque dicha especie lipídica puede existir en algún punto en una membrana biológica (por ejemplo, una membrana celular, una membrana de un orgánulo celular etc.), cuando se asocia con una membrana biológica no es un "lípidio bioactivo" sino que en su lugar es una molécula "lípidio estructural". Los lípidos bioactivos se distinguen de los lípidos estructurales (p. ej., los fosfolípidos unidos a la membrana) en que participan en la señalización extracelular y/o intracelular y, por tanto, están implicados en el control de la función de muchos tipos de células modulando la diferenciación, migración, proliferación, secreción, supervivencia y otros procesos. In vivo, los lípidos bioactivos se pueden encontrar en fluidos extracelulares, donde pueden formar complejos con otras moléculas, por ejemplo proteínas séricas tales como albúmina y lipoproteínas, o en forma "libre", es decir no formando complejos con otras especies moleculares. Como mediadores extracelulares, algunos lípidos bioactivos alteran la señalización celular activando los canales iónicos unidos a la membrana o los receptores acoplados a proteína G que, a su vez, activan los sistemas de señalización complejos que tienen como resultado cambios en la función o la supervivencia celular. Como mediadores intracelulares, los lípidos bioactivos pueden ejercer sus acciones interaccionando directamente con componentes intracelulares tales como enzimas y canales iónicos. Ejemplos representativos de lípidos bioactivos incluyen LPA y S1P.

40 El documento WO 2006/078336 divulga el uso de un anticuerpo murino inhibidor depositado contra S1P para tratar el cáncer, la degeneración macular relacionada con la edad o la NVC.

50 Thoreson y col., (*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2002, Vol. 43, 2450-2461) informan de que se sospecha que el LPA desempeña un papel en la vitreoretinopatía proliferativa.

Lebrun-Julien y col., (*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2005, Vol. 46, E-Abstract 1319) informan sobre la distribución de un receptor concreto de LPA, el LPA1, en ciertos tejidos oculares.

Anliker y Chun (*JBC*, 2004, Vol. 279(20), 20555-558) revisan los receptores acoplados a proteína G de lisofosfolípidos que se unen a miembros de la familia de ligandos de LPA y S1P y se sospecha que desempeñan un

papel en la migración celular, la formación del SNC, la cicatrización de heridas y/o la aterosclerosis y se encuentran en varias líneas de células cancerosas, células endoteliales vasculares y en el corazón.

El documento WO 02/17899 divulga anticuerpos dirigidos contra EDG-1, que es un receptor de S1P y su uso para la inhibición de la angiogénesis.

- 5 Pyne y Pyne (Biochem. J., 2002, Vol. 349, 385-402) revisan el papel de la S1P en enfermedades y menciona cáncer, angiogénesis, alérgicas e inflamación. Se mencionan varias entidades inhibitoras.

La expresión "agente terapéutico" significa un agente que mitiga la angiogénesis y/o la neovascularización, por ejemplo NVC y la maduración de los VS, el edema, la permeabilidad vascular y la fibrosis, la fibrogénesis y la cicatrización asociada con, o parte de la patología subyacente de, enfermedades y afecciones oculares.

- 10 La expresión "terapia de combinación" se refiere a un régimen terapéutico que implica la administración de al menos dos terapias distintas para alcanzar un efecto terapéutico indicado. Por ejemplo, una terapia de combinación puede implicar la administración de dos o más ingredientes activos químicamente distintos, por ejemplo un anticuerpo anti-LPA y un anticuerpo anti-S1P. Como alternativa, una terapia de combinación puede implicar la administración de un resto derivado inmunitario reactivo contra un lípido bioactivo y la administración de uno o más agentes quimioterapéuticos. La terapia de combinación puede, como alternativa, implicar la administración de un anticuerpo anti-lípidos junto con la liberación de otro tratamiento, tal como radioterapia y/o cirugía. Además, una terapia de combinación puede implicar la administración de un anticuerpo anti-lípidos junto con uno o más de otros agentes biológicos (p. ej., un agente anti-VEGF, TGF $\beta$ , PDGF, o bFGF), agentes quimioterapéuticos y otro tratamiento, tal como radiación y/o cirugía. En el contexto de la terapia de combinación usando dos o más ingredientes activos químicamente distintos, se entiende que los ingredientes activos se pueden administrar como parte de la misma composición o como composiciones diferentes. Cuando se administran como composiciones separadas, las composiciones que comprenden los diferentes ingredientes activos se pueden administrar al mismo tiempo o a tiempos diferentes, por la misma vía o por vías diferentes, usando los mismos o diferentes regímenes de dosificación, todo cuando el contexto concreto lo requiera y según lo determine el médico encargado de la atención.
- 15 20 25 De un modo similar, cuando uno o más especies de anticuerpos anti-lípidos, por ejemplo un anticuerpo anti-LPA, solo o junto con uno o más agentes quimioterapéuticos, se combinan con, por ejemplo, radiación y/o cirugía, el o los fármacos se pueden liberar antes o después de la cirugía o del tratamiento con radiación.

"Monoterapia" se refiere a un régimen de tratamiento basado en la liberación de un compuesto terapéuticamente eficaz se administre como una única dosis o como varias dosis en el tiempo.

- 30 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de los agentes y compuestos de la presente invención y que no son indeseables biológicamente ni de otro modo. En muchos casos, los agentes y compuestos de la presente invención son capaces de formar sales de ácido y/o de base en virtud de la presencia de grupos cargados, por ejemplo grupos amino y/o carboxilo similares o grupos similares. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos, mientras que las sales de adición de base se pueden preparar a partir de bases inorgánicas y orgánicas. Para una revisión de sales farmacéuticamente aceptables (véase, Berge, y col., (1977) J. Pharm. Sci., vol. 66, 1-19).
- 35

- 40 Los términos "separado", "purificado", "aislado" y similares significan que uno o más componentes de una muestra contenida en un vaso de contención de muestra se eliminan o han sido eliminados físicamente o diluido en presencia de uno o más de otros componentes de la muestra presentes en el vaso. Los componentes de la muestra que se pueden eliminar o diluir durante una etapa de separación o de purificación incluyen productos de reacción química, sustancias químicas sin reaccionar, proteínas, hidratos de carbono, lípidos y moléculas no unidas.

- 45 El término "especie" se usa en el presente documento en varios contextos, por ejemplo una especie concreta de agente quimioterapéutico. En cada contexto, el término se refiere a una población de moléculas indistinguibles químicamente unas de otras, del tipo al que se hace referencia en el contexto concreto.

"Específicamente asociados" y "asociación específica" y similares hacen referencia a una interacción específica no aleatoria entre dos moléculas, interacción que depende de la presencia de características estructurales, hidrofóbicas/hidrofílicas y/o electrostáticas que permitan interacciones químicas o moleculares adecuadas entre las moléculas.

- 50 En el presente documento, "estable" se refiere a una interacción entre dos moléculas (p. ej., la unión de un anticuerpo anti-LPA o anti-S1P a su lípido bioactivo diana) que es lo bastante fuerte como para que las moléculas se puedan mantener para el fin o manipulación deseados.

- 55 Un "sujeto" o "paciente" se refiere a un animal en el que se pueda efectuar el tratamiento con moléculas de la invención. El animal puede tener, estar en riesgo de, o creer que tiene o que está en riesgo de sufrir una enfermedad o afección que se puede tratar con las composiciones y/o procedimientos de la presente invención. Los animales que se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen vertebrados, siendo ejemplos particularmente preferidos mamíferos tales como bovinos, caninos, equinos, felinos, ovinos, porcinos y primates (incluidos primates

humanos y no humanos).

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" (o "cantidad eficaz") se refiere a una cantidad de un ingrediente activo, por ejemplo un agente de acuerdo con la invención, suficiente para efectuar el tratamiento cuando se administra a un sujeto o paciente. De acuerdo con lo anterior, un experto en la técnica puede determinar fácilmente lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de acuerdo con la invención en el contexto de terapia ocular, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una que produce un cambio medido objetivamente en uno o más parámetros asociados con el tratamiento de la enfermedad o afección ocular, incluido un incremento o una disminución en la expresión de uno o más genes correlacionados con la enfermedad o afección ocular, inducción de apoptosis u otras vías de muerte celular, mejora clínica de los síntomas, una disminución de la neovascularización aberrante o de la inflamación etc. Por supuesto, la cantidad terapéuticamente eficaz variará en función del sujeto concreto y la afección a tratar, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la enfermedad o afección, el compuesto concreto elegido, el régimen de dosificación a seguir, el momento de la administración, el modo de administración y similares, todos los cuales pueden ser determinados fácilmente por un experto en la técnica. Se apreciará que en el contexto de la terapia de combinación que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz de un ingrediente activo concreto puede diferir de lo que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo cuando se administra en monoterapia (es decir, un régimen terapéutico que solo usa una entidad química como ingrediente activo).

El término "tratamiento" o "tratar" una enfermedad o trastorno incluye prevenir o proteger contra la enfermedad o trastorno (es decir, que hace que los síntomas clínicos no se desarrollen); inhibir la enfermedad o trastorno (es decir, detener o suprimir el desarrollo de los síntomas clínicos); y/o aliviar la enfermedad o trastorno (es decir, que causa la regresión de los síntomas clínicos). Como se apreciará, no siempre es posible distinguir entre "prevenir" y "suprimir" una enfermedad o trastorno dado que el acontecimiento o acontecimientos inductivos últimos pueden ser desconocidos o latentes. De acuerdo con lo anterior, se entenderá que el término "profilaxis" constituye un tipo de "tratamiento" que abarca tanto "prevenir" como "suprimir". Por tanto, el término "tratamiento" incluye "profilaxis".

La expresión "régimen terapéutico" significa cualquier tratamiento de una enfermedad o trastorno usando fármacos quimioterapéuticos, radioterapia, cirugía, terapia génica, vacunas y terapia de ADN, terapias basadas en antisentido incluida la terapia con ARNsi, terapia antiangiogénica, inmunoterapia, transplantes de médula ósea, aptámeros y otros productos biológicos tales como anticuerpos y variantes de anticuerpos, señuelos de receptores y otras terapéuticas basadas en proteínas.

### **Sumario de la invención**

La invención se refiere a un anticuerpo monoclonal humanizado, o un fragmento, variante o derivado del mismo, que se une y neutraliza un lípido bioactivo o precursor o metabolito de lípido bioactivo, en el que el lípido bioactivo, el precursor o metabolito de lípido bioactivo es esfingosina-1-fosfato (S1P) o un precursor o metabolito de S1P, para usar en un procedimiento para disminuir la concentración eficaz de dicho lípido bioactivo en un ojo de un animal con el fin de (i) tratar o prevenir la fibrogénesis aberrante, la fibrosis o la cicatrización en el ojo.

(ii) modular las respuestas de cicatrización de heridas quirúrgica o traumática en el ojo,

(iii) disminuir o prevenir la inflamación en el ojo,

(iv) disminuir o prevenir la neovascularización aberrante del ojo,

(v) atenuar una respuesta inmunitaria ocular en el ojo, o

(vi) disminuir la concentración ocular eficaz o la actividad del lípido bioactivo, el precursor o metabolito del lípido bioactivo con el fin de tratar o prevenir una enfermedad o afección ocular que se caracteriza, al menos en parte, por fibrogénesis aberrante, fibrosis, cicatrización, inflamación, neovascularización aberrante o una respuesta inmunitaria en el ojo.

También se divulgan procedimientos para tratar enfermedades o afecciones oculares mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende un resto derivado inmunitario (p. ej., un anticuerpo) reactivo contra un lípido bioactivo, con el fin de disminuir la concentración eficaz de modo que inhibe que el lípido bioactivo, todo o en parte, produzca sus efectos indeseados. En algunas realizaciones, el resto derivado inmunitario es un anticuerpo monoclonal o un fragmento, variante o derivado del mismo. En algunas realizaciones, el resto derivado inmunitario es reactivo contra un lisolípido, tal como S1P o LPA. También se proporcionan procedimientos para disminuir o prevenir la fibrogénesis aberrante, la fibrosis o la cicatrización; la inflamación o la neovascularización aberrante; modular las respuestas de cicatrización de heridas quirúrgica y traumática del ojo; o para atenuar una respuesta inmunitaria ocular. También se proporcionan procedimientos para disminuir la concentración ocular eficaz o la actividad del lípido bioactivo. También se proporcionan procedimientos de tratar la esclerodermia usando un resto derivado inmunitario reactivo contra un lípido bioactivo, tal como los lisolípidos S1P o LPA. Lípidos bioactivos representativos incluyen esfingolípidos y variantes de los mismos tales como esfingosina-1-fosfato (S1P), esfingosina, esfingosilfosforilcolina, dihidroesfingosina. Otros lípidos bioactivos incluyen ácidos lisofosfatídicos (LPA) y variantes de los mismos.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas o veterinarias, incluidas aquéllas para administración ocular, que comprenden un vehículo y un resto derivado inmunitario aislado, por ejemplo un

anticuerpo monoclonal o fragmento, variante o derivado de anticuerpo reactivo contra un lípido bioactivo. Vehículos preferidos incluyen aquéllos que son farmacéuticamente aceptables, particularmente cuando la composición es para uso terapéutico en seres humanos. Para aplicaciones terapéuticas no humanas (p. ej., en el tratamiento de animales de compañía, ganado, peces o aves) se pueden usar vehículos veterinariamente aceptables.

- 5 Vías de administración de ejemplo de un resto derivado inmunitario de acuerdo con la invención, preferentemente como parte de una composición terapéutica, incluyen la administración sistémica, la administración parenteral (p. ej., mediante inyección por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea), liberación transdérmica, intradérmica o transmucosa, inyección intraocular o periocular, administración mucosa o tópica o mediante inhalación.

Estos y otros aspectos y realizaciones se tratan con mayor detalle en las secciones siguientes.

## 10 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1: SPHINGOMAB redujo la NVC y la formación de cicatriz en lesiones oculares. Se trató a los ratones con SPHINGOMAB o un mAb inespecífico del mismo isotipo. Se indujeron lesiones NVC mediante rotura por láser de la membrana de Bruchs. Se muestran gráficas e imágenes representativas de lesiones de cada grupo de tratamiento teñido con aglutinina I de *R. communis* conjugada con rodamina para la vascularización (A) o tricromo de Masson para la formación de cicatrices en colágeno (B). La **Figura 1a** muestra que SPHINGOMAB atenúa espectacularmente la neovascularización coroidea 14 y 28 días después de la rotura inducida por láser de la membrana de Bruch. La **Figura 1b** muestra que SPHINGOMAB reduce significativamente la fibrosis asociada con la formación de lesiones de NVC 28 días después de la rotura inducida por láser de la membrana de Bruch.

20 **Figura 2:** S1P estimula la neovascularización mediante la inducción de formación de tubos HUVEC y la migración y es reducida por SPHINGOMAB. Panel A: Micrografías de HUVEC sembradas en Matrigel e incubadas durante 6 horas para evaluar la formación de tubos. Panel B: Las HUVEC se trataron con S1P  $1 \mu\text{M} \pm$  SPHINGOMAB ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) durante 6 horas en una cámara de invasión en Matrigel. El número de las células que migraron a la membrana Matrigel se contaron en 5 campos independientes.

25 **Figura 3.** SPHINGOMAB neutraliza la neovascularización inducida por S1P, VEGF y bFGF. A: VS representativos teñidos con FITC de secciones de tapones de Matrigel  $\pm$  GF. B: S1P estimula la infiltración de CE. C: Cuantificación de la fluorescencia relativa de los tapones de Matrigel estimulados con VEGF o bFGF como indicador de neovascularización. Los efectos de S1P, VEGF y bFGF se inhibieron cuando los ratones fueron tratados sistémicamente con 1 o 25 mg/kg de SPHINGOMAB.

30 **Figura 4.** SPHINGOMAB neutralizó la formación de cicatrices estimulada por S1P. Los fibroblastos se dejaron en suero y después se trataron con S1P 0, 0,1, 0,5 o  $1 \mu\text{M} \pm 1 \mu\text{g/ml}$  de SPHINGOMAB durante 12-24 horas. S1P estimuló la proliferación de fibroblastos Swiss 3T3 medida mediante la incorporación de 3H-timidina (A), la migración de fibroblastos cardíacos murinos en un ensayo de raspado (B) la expresión génica de colágeno (fluorescencia relativa) en fibroblastos cardíacos aislados de ratones transgénicos que expresan colágeno-GFP (C) y diferenciación de células WI-38 en miofibroblastos medida por la disminución de la proliferación celular y el incremento de la expresión de  $\alpha$ -SMA (D) SPHINGOMAB neutralizó cada uno de los efectos de la S1P. SPHINGOMAB redujo la fibrosis perivascular in vivo en un modelo murino de infarto de miocardio permanente (E).

40 **Figure 5.** S1P estimula la transformación de células epiteliales oculares en miofibroblastos productores de tejido cicatricial. Se examinaron los efectos de la S1P sobre la transformación de los miofibroblastos de varias líneas celulares oculares humanas. Se descubrió que la S1P estimulaba la producción de actina de músculo liso  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA; un marcador de miofibroblastos) en células epiteliales pigmentarias retinianas humanas (Figura 5A) y fibroblastos de la conjuntiva humana (Figura 5B). Estos datos demuestran por primera vez que la S1P está entre los factores que estimulan la transformación de las células epiteliales oculares y los fibroblastos en miofibroblastos productores de tejido cicatricial. Los efectos de la S1P sobre la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) en los fibroblastos de la conjuntiva humana también se examinaron. El incremento de la expresión de PAI-1 se correlaciona con una disminución de la degradación proteolítica de tejido conjuntivo y está regulado por aumento en asociación con varias enfermedades fibróticas que implican un incremento de la cicatrización. Como se muestra en la Figura 5C, la S1P estimula la expresión de PAI-1 de un modo dependiente de la dosis.

50 **Figura 6.** SPHINGOMAB redujo la infiltración in vivo de células inmunitarias en la herida. Se sometió a los ratones a IM, se trataron con solución salina o 25 mg/kg de SPHINGOMAB 48 horas después de la cirugía y después fueron sacrificados el día 4. SPHINGOMAB redujo la infiltración de macrófagos (A) y de mastocitos (B) en la herida. Los datos se representan como las veces que disminuyen los valores tratados con solución salina.

55 **Figura 7.** SPHINGOMAB es altamente específico de S1P. Un gráfico basado en un ELISA competitivo demuestra la especificidad de SPHINGOMAB por la S1P en comparación con otros lípidos bioactivos. SPHINGOMAB no demostró reactividad cruzada con esfingosina (SPH), el precursor metabólico inmediato de

S1P o de ácido lisofosfatídico (LPA), una importante molécula de señalización extracelular que es estructural y funcionalmente similar a la S1P. SPHINGOMAB no reconoció otros lípidos y metabolitos estructuralmente similares, incluidos ceramida-1-fosfato (C1P), dihidroesfingosina (DH-SPH), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) o esfingomielina (SM). SPHINGOMAB sí produjo reacción cruzada con dihidroesfingosina-1-fosfato (DH-S1P) y, en menor medida, con esfingosilforilcolina (SPC). La afinidad (Kd) de SPHINGOMAB por S1P es < 100 pM, mucho mayor que la de la mayoría de los anticuerpos terapéuticos, en particular otras esponjas moleculares.

### **Descripción detallada de la invención**

#### **1. Compuestos**

El término "resto derivado inmunitario", que incluye anticuerpos (Ab) o inmunoglobulinas (Ig), se refiere a cualquier forma de un péptido, polipéptido derivado del mismo, modelado después o codificado por, un gen de inmunoglobulina, o un fragmento de dicho péptido o polipéptido que es capaz de unirse a un antígeno o epítipo [véase, por ejemplo, Immunobiology, 5ª Edición, Janeway, Travers, Walport, Shlomchik. (editores), Garland Publishing (2001)]. En la presente invención, el antígeno es una molécula de lípido bioactivo. Las moléculas de anticuerpo o inmunoglobulinas son grandes moléculas glicoproteicas con un peso molecular de aproximadamente 150 kDa, normalmente compuestas por dos tipos diferentes de cadena polipeptídica. Una cadena polipeptídica, denominada la cadena "pesada" (H) es de aproximadamente 50 kDa. El otro polipéptido, denominado la cadena "ligera" (L) es de aproximadamente 25 kDa. Cada molécula de inmunoglobulina normalmente consta de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por puentes disulfuro, cuyo número varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un puente disulfuro covalente. En cualquier molécula de anticuerpo natural dada, las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras son idénticas, alojan dos sitios de unión a antígeno idénticos y, por tanto, se dice que son divalentes, es decir que tienen la capacidad de unirse de forma simultánea a dos moléculas idénticas.

Las cadenas "ligeras" de las moléculas de anticuerpo de cualquier especie de vertebrados se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, Kappa ( $\kappa$ ) y Lambda ( $\lambda$ ) en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. La proporción de los dos tipos de cadena ligera varía de una especie a otra. A modo de ejemplo, la proporción media entre  $\kappa$  y  $\lambda$  es de 20:1 en ratones, mientras que en seres humanos es de 2:1 y en ganado vacuno es de 1:20.

Las cadenas "pesadas" de las moléculas de anticuerpo de cualquier especie de vertebrados se pueden asignar a uno de cinco tipos claramente distintos, denominados isotipos, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Algunos isotipos tienen varios subtipos. Las cinco clases principales de inmunoglobulina son inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA), e inmunoglobulina E (IgE). La IgG es el isotipo más abundante y tiene varias subclases (IgG1, 2, 3 y 4 en seres humanos). El fragmento Fc y las regiones bisagra difieren en los anticuerpos de diferentes isotipos, de modo que determina sus propiedades funcionales. No obstante, la organización global de los dominios es similar en todos los isotipos.

La expresión "región variable" se refiere a la porción N-terminal de la molécula de anticuerpo o un fragmento de la misma. En general, cada una de las cuatro cadenas tiene una región variable (V) en su porción amino terminal que contribuye al sitio de unión a antígeno y una región constante (C) que determina el isotipo. Las cadenas ligeras están unidas a las cadenas pesadas por muchas interacciones no covalentes y por puentes disulfuro y las regiones V del par de cadenas pesada y ligera en cada brazo de la molécula de anticuerpo para generar dos sitios de unión a antígeno idénticos. Se cree que algunos residuos de aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada [véase Kabat y col., (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, Md. y Clothia y col., (1985), J. Mol. Biol., vol 186: 651].

Es importante indicar que la variabilidad no se distribuye de forma uniforme a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos, sino que se concentra en tres segmentos denominados "regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o "regiones hipervariables" en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se denominan "regiones estructurales" (FR). Cada dominio variable de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprende cuatro regiones FR conectadas por tres CDR. Las CDR en cada cadena se mantienen en estrecha proximidad por las regiones FR y con las CDR de las otras cadenas forman el sitio de unión al antígeno de los anticuerpos [véase Kabat y col., (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, Md]. En conjunto, las 6 CDR contribuyen a las propiedades de unión de la molécula de anticuerpo por el antígeno. No obstante, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv, que solo comprende tres CDR específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno [véase Pluckthun (1994), en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, pág. 269-315].

La expresión "dominio constante" se refiere a la región en C-terminal de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo. En general, los dominios constantes no están implicados directamente en las propiedades de unión de una molécula

de anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo. En el presente documento, "funciones efectoras" se refiere a los diferentes efectos fisiológicos de los anticuerpos (p. ej., opsonización, lisis celular, desgranulación de mastocitos, basófilos y eosinófilos, y otros procesos) mediados por el reclutamiento de células inmunitarias por la interacción molecular entre el dominio Fc y las proteínas del sistema inmunitario. El isotipo de la cadena pesada determina las propiedades funcionales del anticuerpo. Sus propiedades funcionales distintivas son conferidas por las porciones en el carboxi terminal de las cadenas pesadas, cuando no están asociadas con las cadenas ligeras.

Como se usa en el presente documento, "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto que incluye el sitio de unión a antígeno o las regiones variables de un anticuerpo intacto, en el que la porción puede carecer de los dominios constantes de la cadena pesada (p. ej., CH2, CH3, y CH4) de la región Fc del anticuerpo intacto. Como alternativa, las porciones de los dominios constantes de la cadena pesada (p. ej., CH2, CH3, y CH4) se pueden incluir en el "fragmento de anticuerpo". Ejemplos de fragmentos de anticuerpos son aquellos que conservan la unión a antígeno e incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, diacuerpos, triacuerpos, moléculas de anticuerpo monocatenarias (sc-Fv), minicuerpos, nanocuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. A modo de ejemplo, un fragmento Fab también contiene el dominio constante de una cadena ligera el primer dominio constante (CH1) de una cadena pesada.

El término "variante" se refiere a una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos nativa de un anticuerpo en al menos un residuo de aminoácido o modificación. Una secuencia de aminoácidos nativa o parental o silvestre se refiere a la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo encontrado en la naturaleza. "Variante" de la molécula de anticuerpo incluye, entre otros, cambios dentro de una región variable o una región constante de una cadena ligera y/o una cadena pesada, incluyendo la región hipervariable o CDR, la región Fc, la región Fab, el dominio CH1, el dominio CH2, el dominio CH3 y la región bisagra.

El término "específico" se refiere a la unión selectiva de un anticuerpo a su epítipo diana. Las moléculas de anticuerpo se pueden analizar por su especificidad de unión comparando la unión del anticuerpo al antígeno deseado a la unión del anticuerpo con antígeno no relacionado o un antígeno análogo o una mezcla de antígenos en un conjunto dado de condiciones. Preferentemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención carecerá de unión significativa a antígenos no relacionados, o incluso análogos del antígeno diana. En el presente documento, el término "antígeno" se refiere a una molécula reconocida y unida por una molécula de anticuerpo o resto derivado inmunitario que se une al antígeno. La porción específica de un antígeno que se une a un anticuerpo se denomina "epítipo". Un "hapteno" se refiere a una molécula pequeña que puede, en la mayoría de las circunstancias, producir una respuesta inmunitaria (es decir, actuar como antígeno) únicamente cuando está unido a una molécula vehículo, por ejemplo una proteína, polietilenglicol (PGE), oro coloidal, perlas de silicona y similares. El vehículo puede ser uno que tampoco produce una respuesta inmunitaria por sí solo.

El término "anticuerpo" se usa en el más amplio sentido de la palabra y abarca anticuerpos monoclonales, policlonales, multiespecíficos (p. ej., biespecíficos, en el que cada brazo del anticuerpo es reactivo con un epítipo diferente o el mismo antígeno o uno diferente), minicuerpos, heteroconjugados, diacuerpos, triacuerpos, quiméricos y sintéticos, así como fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a un antígeno con una propiedad de unión deseada y/o actividad biológica.

La expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a un anticuerpo, o población de anticuerpos similares, obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden fabricar mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein (1975), *Nature*, vol 256: 495-497, o mediante procedimientos de ADN recombinante.

La expresión anticuerpo "quimérico" (o inmunoglobulina) se refiere a una molécula que comprende una cadena pesada y/o ligera que es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos concretos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada [Cabilly y col., (1984), *infra*; Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6851].

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos), así como anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado puede incluir sustituciones conservadoras de aminoácidos o residuos no naturales de la misma especie o de una diferente que no alteran significativamente su unión y/o la actividad biológica. Dichos anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulinas no humanas. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, camello, bovino, cabra o conejo que tenga las propiedades deseadas. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o las secuencias estructurales. Estas modificaciones se efectúan para perfeccionar y

optimizar adicionalmente el funcionamiento de los anticuerpos. Por tanto, en general, un anticuerpo humanizado comprenderá todos o al menos uno, y, en un aspecto dos, dominios variables en los que todas o todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc) o de una inmunoglobulina humana. Véase, por ejemplo, Cabilly y col., Patente de EE.UU. N° 4,816,567; Cabilly y col., Patente europea N° 0,125,023 B1; Boss y col., Patente de EE.UU. N° 4,816,397; Boss y col., Patente europea N° 0,120,694 B1; Neuberger, M. S. y col., documento WO 86/01533; Neuberger, M. S. y col., Patente europea N° 0,194,276 B1; Winter; Patente de EE.UU. N° 5,225,539; Winter, Patente europea N° 0,239,400 B1; Padlan, E. A. y col., solicitud de patente europea N° 0,519,596 A1; Queen y col., (1989) Proc. Nat' l Acad. Sci. USA, vol 86:10029-10033).

La expresión "anticuerpo biespecífico" puede hacer referencia a un anticuerpo, o un anticuerpo monoclonal, que tiene propiedades de unión para al menos dos epítomos diferentes. En una realización, los epítomos proceden del mismo antígeno. En otra realización, los epítomos proceden de dos antígenos diferentes. En la técnica se conocen procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden producir de forma recombinante usando la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina. Como alternativa, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar usando unión química. Los anticuerpos biespecíficos incluyen fragmentos de anticuerpos biespecíficos.

La expresión "anticuerpo heteroconjugado" puede hacer referencia a dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se pueden preparar usando procedimientos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluido el uso de agentes de reticulación. Como se usa en el presente documento, el término "conjugado" se refiere a moléculas formadas por la unión covalente de uno o más fragmento(s) de anticuerpos o restos de unión a una o más molécula(s) de polímero.

La expresión "biológicamente activo" se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse al epítomo deseado y, de algún modo, de ejercer un efecto biológico. Los efectos biológicos incluyen, entre otros, la modulación de una señal de crecimiento, la modulación de una señal antiapoptótica, la modulación de una señal apoptóticas, la modulación de la cascada de funciones efectoras y la modulación de otras interacciones con ligando.

La expresión "ADN recombinante" se refiere a ácidos nucleicos y productos génicos expresados a partir de ellos que se han sometido a ingeniería, creado o modificado por el hombre. Los polipéptidos o proteínas "recombinantes" son polipéptidos o proteínas producidos por técnicas de ADN recombinante, por ejemplo a partir de células transformadas por un constructor de ADN exógeno que codifica el polipéptido o proteína deseado. Polipéptidos o proteínas "sintéticos" son los que se preparan mediante síntesis química.

La expresión "casete de expresión" se refiere a una molécula nucleotídica capaz de afectar a la expresión de un gen estructural (es decir, una secuencia de codificación de proteína, tal como un anticuerpo de la invención) en un huésped compatible con dichas secuencias. Los casetes de expresión incluyen al menos un promotor unido operablemente a la secuencia que codifica el polipéptido y, opcionalmente, a otras secuencias, por ejemplo señales de terminación de la transcripción. Elementos reguladores adicionales necesarios o útiles para efectuar la expresión también se pueden usar, por ejemplo potenciadores. Por tanto, los casetes de expresión incluyen plásmidos, vectores de expresión virus recombinantes, cualquier forma de vector de "ADN desnudo" recombinante y similares.

## 2. Aplicaciones

En el presente documento se divulgan composiciones y procedimientos para tratar o prevenir enfermedades y afecciones oculares usando uno o más agentes terapéuticos que alteran la actividad o la concentración de uno o más lípidos bioactivos indeseados o precursores o metabolitos de los mismos. Los procedimientos terapéuticos y composiciones actúan cambiando la concentración eficaz, es decir la concentración absoluta, relativa, efectiva y/o disponible y/o las actividades de ciertos lípidos bioactivos indeseados. Se puede decir que la disminución de la concentración eficaz del lípido bioactivo "neutraliza" el lípido diana o sus efectos indeseados, incluidos los efectos cadena abajo. En el presente documento, "indeseado" se refiere a un lípido bioactivo que no se desea debido a su implicación en un proceso patológico, por ejemplo una molécula de señalización, o a una cantidad no deseada de un lípido bioactivo que contribuye a la enfermedad cuando está presente en exceso.

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría concreta, se cree que las concentraciones inadecuadas de lípidos, tal como S1P y/o LPA y/o sus metabolitos o efectores cadena abajo pueden causar o contribuir al desarrollo de varias enfermedades y trastornos oculares. Como tales, las composiciones y procedimientos se pueden usar para tratar las enfermedades y trastornos oculares, en particular disminuyendo la concentración eficaz in vivo de un lípido diana concreto, por ejemplo S1P y/o LPA. En concreto, se cree que las composiciones y procedimientos de la invención son útiles en el tratamiento de enfermedades oculares caracterizadas, al menos en parte, por neovascularización aberrante, fibrogénesis, fibrosis, cicatrización, inflamación y respuesta inmunitaria.

Ejemplos de varias clases de enfermedades oculares que se pueden tratar de acuerdo con la invención se describen más adelante. Se apreciará que muchas enfermedades y afecciones se caracterizan, al menos en parte, por múltiples procesos patológicos (por ejemplo, neovascularización patológica y cicatrización) y que las clasificaciones



proporcionadas en el presente documento son por comodidad descriptiva y no limitan la invención.

Retinopatías isquémicas asociadas con neovascularización patológica y enfermedades caracterizadas por formación de membrana epirretiniana y o subretiniana.

5 Las retinopatías isquémicas (RI) son un grupo diverso de trastornos que se caracterizan por un flujo sanguíneo retiniano comprometido. Ejemplos de RI incluyen retinopatía diabética (RD), retinopatía del prematuro (RDP),  
retinopatía por drepanocitosis y enfermedad venooclusiva retiniana. Todos estos trastornos se pueden asociar con  
una proliferación dirigida por VEGF de neovascularización retiniana patológica que, en última instancia, puede  
10 conducir a hemorragias intraoculares, formación de membrana epirretiniana y desprendimiento de retina por  
tracción. Las membranas epirretinianas idiopáticas (MER), también denominadas arruga macular o retinopatía en  
celofán, pueden producir una reducción de la visión secundaria a la distorsión de la arquitectura retiniana. En  
ocasiones estas membranas recurren a pesar de la eliminación quirúrgica y a veces se asocian con isquemia  
retiniana. VEGF y sus receptores se localizan en las MER. La presencia de VEGF en las membranas asociadas con  
15 retinopatía diabética proliferativa, vitreoretinopatía proliferativa y arruga macular sugiere además que esta citocina  
desempeña un papel importante en la angiogénesis en la enfermedad retiniana isquémica y el crecimiento de la  
membrana en los trastornos vitreoretinianos proliferativos. Además, los receptores de VEGF, VEGFR1 y VEGFR2  
también se identifican en las células en las MER. Estos datos muestran que el VEGF puede ser un estimulador  
autocrino y/o paracrino que puede contribuir a la progresión de las MER vasculares y avasculares. PDGF y sus  
20 receptores [Robbins y col., (1994), Invest Ophthalmol Vis Sci; vol 35: 3649-3663] se ha descrito en los ojos con  
enfermedades retinianas proliferativas [Cassidy y col., (1998), Br J Ophthalmol; vol 82: 181-85 y Freyberger y col.,  
(2000), Exp Clin Endocrinol Diabetes, vol 108:106-109]. Estos hallazgos sugieren que los ligandos de PDGF y sus  
receptores están extendidos en las membranas retinianas proliferativas de origen diferente y sugieren que la  
estimulación autocrina y paracrina con PDGF puede estar implicada en la patogenia de las MER. El factor  
25 transformante  $\beta$  de crecimiento (TGF- $\beta$ ) está implicado en la formación de MER [Poumaras y col., (1998), Klin  
Monatsbl Augenheilkd, vol 212: 356-358] como se demuestra mediante la tinción de TGF e inmunorreactividad.  
Además, el receptor II de TGF- $\beta$  se expresa en miofibroblastos de MER de membranas diabéticas y de VRP. Estos  
resultados sugieren que el TGF- $\beta$  producido en múltiples tipos celulares en la retina y MER es una diana atractiva  
para el tratamiento de la VRP, MER diabética y secundaria. Se ha comunicado que la interleucina 6 (IL-6) está  
30 aumentada en el cuerpo vítreo humano en la retinopatía diabética proliferativa (PDR) [La Heij y col., (2002), Am J  
Ophthalmol, 134: 367-375] y en un estudio, el 100 % de las MER diabéticas expresaban la proteína IL-6 [Yamamoto y  
col., (2001) Am J Ophthalmol, vol 132: 369-377].

Se ha mostrado que la administración exógena del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) induce  
proliferación endotelial y expresión de VEGF [Stavri y col., (1995), Circulation, vol 92: 11-14]. Consistente con estas  
observaciones, la concentración de bFGF está aumentada en muestras de cuerpo vítreo de pacientes con PDR  
35 [Sivalingam y col., (1990), Arch Ophthalmol, vol 108: 869-872 y Boulton y col., (1997), Br J Ophthalmol, vol 81: 228-  
233]. El bFGF también está implicado en la formación de MER [Hueber y col., (1996), Int. Ophthalmol, vol 20: 345-  
350] demostraron bFGF en 8 de 10 membranas de PDR estudiadas. Además, estos trabajadores encontraron tinción  
positiva para el correspondiente receptor, FGFR1. También se ha demostrado inmunorreactividad para bFGF en  
MER idiopáticas no vasculares. Estos resultados implican bFGF en la formación de MER vascular y avascular.  
40 [Harada y col., (2006), Prog in Retinal and Eye Res, vol 25; 149-164]. El bFGF elevado también se ha detectado en  
el suero de pacientes con ROP [Becerril y col., (2005), Ophthalmology, vol 112, 2238].

Dados los efectos pleotrópicos conocidos de S1P y sus interacciones con VEGF, bFGF, PDGF, TGF- $\beta$  and IL-6, se  
cree que un agente que se une, antagoniza, inhibe los efectos o la producción de S1P serán eficaces en la  
supresión de la neovascularización retiniana patológica en las retinopatías isquémicas y las posteriores  
45 enfermedades del segmento caracterizadas por formación de MER vascular o avascular. Otras afecciones oculares  
caracterizadas, al menos en parte, por neovascularización aberrante o angiogénesis, incluyen degeneración macular  
relacionada con la edad, rechazo de injerto corneado, glaucoma neovascular, desgaste del cristalino por contacto,  
infecciones de la córnea, incluido el herpes simple, el herpes zoster e infecciones protozoicas, pterigión, uveítis  
infecciosa, desprendimiento de retina crónico, lesión por láser, retinopatía por drepanocitosis, enfermedad  
50 veooclusiva, neovascularización coroidea, proliferación angiomasosa retiniana y vasculopatía coroidea polipoidal  
idiopática.

Vitreoretinopatía proliferativa (VRP)

La VRP se observa tras el desprendimiento retiniano regmatógeno espontáneo y tras el desprendimiento traumático  
de la retina. Es una causa principal de cirugía fallida por desprendimiento retiniano. Se caracteriza por el crecimiento  
y contracción de las membranas celulares en ambos lados de la retina, en la superficie vítrea posterior y en la base  
55 vítrea. Este desarrollo de tejido cicatricial excesivo en el ojo puede conducir al desarrollo de desprendimiento de  
retina por tracción y, por tanto, los tratamientos dirigidos a la prevención o inhibición de la vitreoretinopatía  
proliferativa (VRP) son un principio lógico del tratamiento del desprendimiento de retina. Histológicamente, la VRP se  
caracteriza por un exceso en la producción de colágeno, contracción y proliferación celular [Michels, Retinal  
Detachment 2ª Edición. Wilkinsin CP, Rice TA Eds, Complicated types of retinal detachment, pág. 641-771, Mosby  
60 St Louis 1997]. Los tipos de célula identificados en las membranas de VRP incluyen, principalmente, células  
epiteliales pigmentarias retinianas, fibroblastos, macrófagos y células endoteliales vasculares [Jerdan JA y col.,

(1989), *Ophthalmology*, vol 96: 801-10 and Vidinova y col., (2005), *Klin Monatsbl Augenheilkd*; vol 222:568-571]. La fisiopatología de esta reacción de cicatrización excesiva parece estar mediada por una serie de citocinas que incluyen el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante (TGF) beta, el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), la interleucina 6 (IL-6) y la interleucina 8 (IL-8) [Naginei y col., (2005), *J Cell Physiol*, vol 203: 35-43; La Heij y col., (2002), *Am J Ophthalmol*, 134: 367-75; Planck y col., (1992), *Curr Eye Res*; vol 11: 1031-9; Canataroglu y col., (2005) *Ocul Immunol Inflamm*; vol 13: 375-81 y Andrews y col., (1999) *Ophthalmol Vis Sci*; vol 40: 2683-9]. La inhibición de estas citocinas puede ayudar a prevenir el desarrollo de VRP si se administra en el momento adecuado o limitar su gravedad [Akiyama y col., (2006), *J Cell Physiol*, vol 207:407-12 y Zheng Y y col., (2003), *Jpn J Ophthalmol*, vol 47:158-65].

10 La esfingosina-1-fosfato (S1P) es un lípido bioactivo con efectos pleotrópicos. Es proangiogénico, proinflamatorio (estimula el reclutamiento de macrófagos y mastocitos) y profibrótico (estimula la formación de cicatrices). La S1P generalmente estimula la proliferación y migración de células y es anti-apoptótica. La S1P alcanza estas biológicamente diversas funciones a través de sus interacciones con numerosas citocinas y factores de crecimiento. Se ha demostrado que la inhibición de S1P a través de un anticuerpo monoclonal (SPHINGOMAB) bloquea las funciones del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), bFGF, IL-6 y IL-8 [Visentin B y col., (2006), *Cancer Cell*, vol 9: 1-14]. La unión de S1P al receptor de S1P puede también incrementar la producción de PDGF; por tanto, cabría esperar que un agente que se une a S1P disminuyera la producción de PDGF [Milstien y Spiegel (2006), *Cancer Cell*, vol 9:148-150]. Como se muestra en los Ejemplos siguientes, ahora se ha demostrado que la S1P, in vitro, transforma las células del EPR humano en células de fenotipo similar al de los miofibroblastos similar al tipo observado en la VRP. Dada la fisiopatología que, en última instancia, tiene como resultado cicatrización excesiva observada en la VRP y los efectos conocidos de la S1P en estos mismos mediadores clave, se cree que un agente que se une, antagoniza o inhibe los efectos de la producción de S1P será eficaz en la eliminación o minimización del desarrollo de VRP y sus efectos que dañan gravemente el ojo.

#### *Uveítis*

25 La uveítis es un trastorno inflamatorio del tracto uveal del ojo. Puede afectar a la parte frontal (anterior) o trasera (posterior) del ojo o a ambas. Puede ser de etiología idiopática o infecciosa y puede amenazar a la visión. La uveítis idiopática se ha asociado con un incremento de la expresión de CD4+ en la cámara anterior. [Calder y col., (1999), *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol 40: 2019-24]. Los datos también sugieren un papel patológico de los linfocitos T y su IP-10 quimioatrayente en la patogenia de la uveítis [Abu El-Asrar (2004), *Am J Ophthalmol*, vol 138: 401-11]. Otras quimioquinas en la uveítis anterior aguda incluyen proteínas inflamatorias de macrófagos, la proteína 1 quimioatrayente de monocitos y la IL-8. Estas citocinas probablemente desempeñen un papel crítico en el reclutamiento de leucocitos en la uveítis anterior aguda. [Verma y col., (1997), *Curr Eye Res*; vol 16; 1202-8]. Dados los profundos efectos pleiotrópicos de la cascada de señalización de la S1P, se cree que SPHINGOMAB y otros restos inmunitarios que reducen la concentración eficaz de los lípidos bioactivos serviría como procedimiento eficaz de reducir o modular la inflamación intraocular asociada con la uveítis.

#### *Cirugía refractiva*

La respuesta de cicatrización de heridas corneanas es de particular importancia para los procedimientos quirúrgicos refractivos, ya que es un principal determinante de la seguridad y la eficacia. Estos procedimientos se realizan para el tratamiento de la miopía, la hiperopía y el astigmatismo. La queratomileusis situ asistida por láser (LASIK) y la queratectomía fotorefractiva (PRK) son los procedimientos refractivos más habituales, aunque se han desarrollado otros en un intento de superar las complicaciones. Estas complicaciones incluyen sobrecorrección, subcorrección, regresión y opacificación estromal, entre otras. Una serie de complicaciones frecuentes están relacionadas con la respuesta de cicatrización y tienen sus raíces en la respuesta biológica a la cirugía. Uno de los mayores retos en la biología corneana es estimular la reparación tisular a través de la regeneración en lugar de la fibrosis. Se cree que la elección entre la regeneración y la fibrosis reside en el control de la activación de los fibroblastos. [Stramer y col., (2003), *Invest Ophthalmol Vis Sci*; vol 44: 4237-4246 y Fini (1999) *Prog Retin Eye Res*, vol 18: 529-551]. Las células denominadas miofibroblastos pueden aparecer en el estroma subepitelial 1-2 semanas después de la cirugía o lesión. Los miofibroblastos derivan probablemente de queratocitos bajo la influencia de TGF- $\beta$  [Jester y col., (2003) *Exp Eye Res*, vol 77: 581-592]. La neblina corneana y la cicatrización estromal se caracterizan por reducción de la transparencia corneana y se pueden asociar con generación de fibroblastos y miofibroblastos. En estudios in situ e in vitro se ha sugerido que TGF- $\beta$  and PDGF son importantes en la estimulación de la diferenciación de los miofibroblastos [Folger y col., (2001), *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 42: 2534-2541]. La neblina se puede observar en la interfaz central tras LASIK en determinadas circunstancias, Estas incluyen queratitis lamelar difusa, colgajos con forma de donut y retención de residuos epiteliales en la interfaz. Es probable que cada uno de estos se asocie con un incremento del acceso de TGF- $\beta$  de las células epiteliales a los queratocitos activados. [Netto y col., (2005), *Cornea*, vol 24: 509-522]. La regresión se debe, muy probablemente, a las interacciones de cicatrización de heridas epiteliales-estromales potenciadas, tal como el incremento de la producción de factores de crecimiento de modulación del epitelio por los fibroblastos corneanos y/o los miofibroblastos [Netto y col., (2005), *Cornea*, vol 24: 509-522]. Se ha mostrado que la inhibición de la unión de TGF- $\beta$  a los receptores con el anticuerpo anti-TGF- $\beta$  tópico reduce la neblina inducida por PRK [Jester y col., (1997), *Cornea*, vol 16: 177-187]. Dados los efectos conocidos de los anticuerpos anti-lípidos bioactivos en el proceso fibrótico y TGF- $\beta$ , los autores creen que puede

ayudar a tratar algunas complicaciones de la cirugía refractiva, tales como la neblina, la cicatrización estromal y la regresión.

#### Modulación de la cirugía de filtración del glaucoma

5 Clásicamente se piensa que el glaucoma es una enfermedad en la que la elevada presión intraocular produce daños en el nervio óptico y, en última instancia, compromete el campo de visión y/o la agudeza visual. Existen otras formas de glaucoma en las que se pueden producir daños en el nervio óptico dentro de una situación de presión normal o el denominado "glaucoma de tensión normal". Para muchos pacientes los medicamentos pueden controlar su enfermedad, pero para otros se necesita cirugía de filtración para el glaucoma, en la que quirúrgicamente se crea una fistula en el ojo para permitir el drenaje del fluido. Esto se puede conseguir mediante trabeculectomía, 10 implantación de un dispositivo médico u otros procedimientos de intervención quirúrgica. La cirugía de filtración para el glaucoma falla debido a un proceso de cicatrización de heridas que se caracteriza por la proliferación de fibroblastos y, en última instancia, cicatrización. Los anti-metabolitos, como el 5-fluorouracilo y la mitomicina C, pueden reducir la posterior cicatrización; no obstante, incluso con el uso de estos fármacos, el seguimiento a largo plazo muestra que el fallo de la cirugía sigue siendo un problema clínico serio. [Mutsch y Grehn (2000), Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol; vol 238: 884-91 y Fontana y col., (2006), Ophthalmology, vol 113: 930-936]. En los estudios de fibroblastos de la cápsula de Tenon humanos se demuestra que tienen la capacidad de sintetizar bFGF and PDGF y TGF- $\beta$  y que estos factores de crecimiento están implicados en el proceso de reparación tisular tras la cirugía de filtración del glaucoma y contribuye al fallo del procedimiento. [Trpathi y col., (1996), Exp Eye Res, vol 63: 339-46]. En estudios adicionales se ha implicado a estos factores de crecimiento en la respuesta de las heridas posterior a la 20 filtración [Denk y col., (2003), Curr Eye Res; vol 27: 35-44] concluyeron que diferentes isoformas de PDGF son estimuladores principales de la proliferación de los fibroblastos de la cápsula de Tenon tras cirugía de filtración del glaucoma, mientras que el TGF $\beta$  es esencial para la transformación de los fibroblastos de la cápsula de Tenon en miofibroblastos. Los inventores han demostrado que la S1P está presente en los fibroblastos de la cápsula de Tenon/conjuntiva y que la S1P se expresa fuertemente en la respuesta de cicatrización de heridas. La S1P también estimula la función profibrótica de múltiples tipos de células de fibroblastos y la transformación en el fenotipo de miofibroblasto y la producción de colágeno. Dados los efectos pleotrópicos específicos de la S1P y sus interacciones conocidas con bFGF, PDGF y TGF-beta, se cree que un agente que se une, antagoniza, inhibe los efectos o la producción de S1P, o quizá de otros lípidos bioactivos tales como LPA, será eficaz en la modulación de la cicatrización de heridas y/o la respuesta fibrótica que conduce a fallos de la cirugía de glaucoma y será un método terapéutico eficaz de potenciar resultados quirúrgicos con éxito. Se ha previsto que el agente se pueda administrar, por ejemplo mediante inyección intravítrea o subconjuntival o tópicamente.

#### Transplante de córnea

El transplante de córnea (queratoplastia penetrante (PK)) es el procedimiento de transplante de tejido con mayor éxito en seres humanos. A pesar de los 47.000 transplantes de córnea que se realizan anualmente en EE.UU. el rechazo del aloinjerto de córnea sigue siendo la principal causa de fallo del injerto de córnea. [Ing JJ y col., (1998), Ophthalmology, vol 105: 1855-1865]. En la actualidad no tenemos suficiente capacidad para evitar el rechazo de aloinjerto, aunque la inmunosupresión y la inmunomodulación pueden ser un prometedor enfoque. Recientemente se ha descubierto que los linfocitos T CD4(+) funcionan directamente como células efectoras y no como células colaboradoras en el rechazo de los aloinjertos corneanos. [Hegde S y col., (2005), Transplantation, vol 79: 23-31]. 40 En estudios murinos se ha demostrado un incremento de la cifra de neutrófilos, macrófagos y mastocitos en el estroma de las córneas que son rechazadas. Los macrófagos eran el principal tipo de célula infiltrante, seguida de los linfocitos T, los mastocitos y los neutrófilos. La expresión temprana de quimiocinas en el transplante de córnea de alto riesgo será el homólogo de la IL-8 en ratón (proteína 2 inflamatoria de macrófagos) y la proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) [Yamagami S y col., (2005), Mol Vis, vol 11, 632-40].

45 FTY720 (FTY) es un nuevo fármaco inmunosupresor que actúa alterando el tráfico de linfocitos; lo que tiene como resultado linfopenia en sangre e incremento del recuento de linfocitos en los ganglios linfáticos. FTY participa en sus efectos moduladores del sistema inmunitario uniéndose a algunos de los receptores de SIP expresados en los linfocitos. [Bohler T y col. (2005), Transplantation, vol 79: 492-5]. El fármaco se administra por vía oral y una única dosis oral redujo los recuentos de linfocitos periféricos en 30-70 %. FTY redujo la subpoblación de linfocitos T, células CD4(+) más que las células CD8(+). [Bohler et al. (2004), Nephrol Dial Transplant, vol 19: 702-13]. Los ratones tratados con FTY mostraron una prolongación significativa de la supervivencia del injerto corneano ortotópico cuando se administra por vía oral [Zhang y col., (2003), Transplantation, vol 76: 1511-3]. El tratamiento con FTY oral también retrasó de forma significativa el rechazo y disminuyó su gravedad en un modelo de rata a ratón de xenotransplante corneano [Sedlakova y col., (2005), Transplantation, vol 79, 297-303]. Dada la patogenia conocida del rechazo del aloinjerto combinado con los datos que sugieren que la modulación de los efectos de la señalización de S1P puede mejorar la supervivencia del injerto corneano, se cree que los restos inmunitarios que disminuyen la concentración eficaz de lípidos bioactivos, por ejemplo SPHINGOMAB, también son útiles en el tratamiento de afecciones inmunológicas tales como el rechazo del aloinjerto, por ejemplo atenuando la respuesta inmunitaria, y, por tanto, probablemente mejorará la supervivencia del injerto corneano tras PK. El fármaco pueden también tener la ventaja añadida de que, además de la administración sistémica, la administración local, por ejemplo 60 por vía periocular tópica o intraocular, puede ser posible.

Otras enfermedades oculares con un componente inflamatorio o inmunitario incluyen uveítis crónica, infecciones, incluidas las infecciones por herpes simple, herpes zoster y protozoicas, y la histoplasmosis ocular.

Enfermedades del segmento anterior caracterizadas por cicatrización

5 El tratamiento con un anticuerpo dirigido a lípidos bioactivos también se cree que beneficia varias afecciones caracterizadas por cicatrización de la porción anterior del ojo. Éstas incluyen los siguientes

Traumatismo

10 La córnea, como la estructura más anterior del ojo, está expuesta a varios riesgos que van desde residuos transmitidos por el aire a traumatismos contusos que pueden tener como resultado un traumatismo mecánico. La córnea y la superficie anterior del ojo se pueden exponer también a otras formas de traumatismo por cirugía y lesiones químicas, tales como bases y ácidos. Los resultados de estos tipos de lesiones pueden ser devastadores, y a menudo conducen a cicatrización en la córnea y en la conjuntiva y formación de simbléferon. Además, se puede producir neovascularización corneana. Se produce acumulación de neutrófilos, su liberación de leucotrienos y la presencia de interleucina 1 y de interleucina 6 sirven para reclutar olas sucesivas de células inflamatorias [Sotozono y col., (1997), Curr Eye Res, vol 19: 670-676] que infiltran la córnea y liberan enzimas proteolíticas que conducen a  
15 daños adicionales y rotura del tejido corneal y una fusión de la córnea. Además, los fibroblastos corneanos y de la conjuntiva se activan e invaden para producir depósitos de colágeno y fibrosis. Los efectos indeseables de una inflamación excesiva y cicatrización son estimulados por TGF- $\beta$ . [Saika S y col., (2006), Am J Pathol vol 168, 1848-60]. Este proceso conduce a pérdida de transparencia corneana y alteración de la visión. La reducción de la inflamación, incluida la disminución de los infiltrados de neutrófilos y la reducción de la fibrosis tuvo como resultado  
20 una curación más rápida y más completa en un modelo murino de córneas quemadas con álcali [Ueno y col., (2005), Ophthalmol Vis Sci, vol 46: 4097-106].

Penfigoide cicatricial ocular (PCO)

25 El PCO es una enfermedad autoinmunitaria cicatrizante (de formación de cicatrices) crónica que afecta principalmente a la conjuntiva. La enfermedad es invariablemente progresiva y el pronóstico es bastante malo. En sus etapas finales, la cicatrización de la conjuntiva y la queratopatía asociada conducen a ceguera bilateral. Histológicamente, la conjuntiva muestra cicatrización de la submucosa e inflamación crónica en la que la participación de mastocitos es sorprendentemente grande [Yao L y col., (2003), Ocul Immunol Inflamm, vol 11: 211-222]. Los autoantígenos conducen a la formación de autoanticuerpos. La unión del autoanticuerpos al autoantígenos  
30 inicia una compleja serie de acontecimientos con infiltración de linfocitos T en la que los linfocitos CD4 (colaboradores) superan con mucho a los linfocitos CD8 (supresores). También se produce infiltración de macrófagos y mastocitos, así como la liberación de citocinas proinflamatorias y profibróticas. Las citocinas inducen proliferación y activación de fibroblastos de la conjuntiva, con la fibrosis subepitelial resultante (véanse los ejemplos más adelante en el presente documento). En los estudios se ha demostrado un papel de TGF- $\beta$  and IL-1 en la fibrosis conjuntiva en pacientes con PCO [Razzaque MS y col., (2004), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 45: 1174-81].

35 Síndrome de Stevens Johnson (SJS) y necrólisis epidérmica tóxica (NET)

El SJS y el NET son reacciones adversas potencialmente mortales a los medicamentos. Las secuelas oculares de estas dos afecciones relacionadas pueden ser graves e implicar cambios patológicos de la conjuntiva palpebral y bulbar, los párpados y la córnea. Los fármacos y las infecciones son los factores más desencadenantes. Los hallazgos crónicos en el ojo incluyen cicatrización, formación de simbléferon y cicatrización de la conjuntiva como  
40 resultado del proceso inflamatorio inicial. Esto conduce a formación de entropión, triquiasis e inestabilidad de la película lagrimal. La rotura de la superficie ocular conduce a cicatrización corneana, neovascularización y, en los casos graves, queratinización. Como en el PCO, se produce fibrosis subepitelial de la conjuntiva. Se cree que una enérgica respuesta autoinmunitaria de linfocitos a un fármaco o infección desempeña un papel en el desarrollo de SJS/NET. [Harilaos y col., (2005), Erythema Multiforme, Stevens Johnson Syndrome, and Toxic Epidermal Necrolysis, en Cornea 2ª edición. Krachmer, Mannis, Holland eds. Elsevier Mosby Philadelphia]. La población de células infiltrantes en el SJS incluye macrófagos, linfocitos T positivos para CD4 y linfocitos T positivos para CD8. Esta población celular es similar a las observadas en las lesiones químicas. [Kawasaki y col., (2000), J Ophthalmol, vol 84: 1191-3].

Pterigión

50 Clínicamente un pterigión aparece como una masa vascular carnosa que se produce en la fisura interpalpebral. El cuerpo del pterigión es una masa fibrovascular carnosa. El pterigión activo se caracteriza por una marcada congestión vascular y crecimiento progresivo. Se adhiere firmemente al globo. En los casos avanzados, el pterigión llega a la córnea y puede producir pérdida de visión secundaria a la pérdida de transparencia de la córnea dentro del eje visual o astigmatismo irregular. Sintomáticamente, los pacientes pueden experimentar sensación de cuerpo extraño, lagrimeo y visión borrosa. La histopatología demuestra hialinización del tejido conjuntivo subepitelial de la sustancia propia, aumento del número de fibroblastos e incremento de los mastocitos. [Butrus y col., (1995), Am J Ophthalmol, vol 119: 236-237]. El tratamiento del pterigión sigue siendo un problema. Aunque a menudo se realiza escisión quirúrgica, las tasas de recurrencia son altas. (Krag y col., (1992), Acta Ophthalmol, vol 70: 530]. Con el fin

de ayudar a disminuir la tasa de recurrencia del pterigión se han usado varios adyuvantes farmacológicos tales como mitomicina C y daunorubicina. Aunque estos pueden ser útiles, los datos a largo plazo son limitados y se pueden asociar con adelgazamiento de la esclerótica y fusión corneana. Dougherty y col. y Lee y col., [Dougherty y col., (1996), Cornea, vol 15: 537-540 y Lee y col., (2001), Cornea, vol 20: 238-42] fueron los primeros en demostrar que el VEGF puede desempeñar un papel importante en el desarrollo del pterigión y en la identificación del VEGF y el óxido nítrico en el epitelio del pterigión. Estos trabajadores postularon la hipótesis de que estos, además de otras citocinas, son responsables del enterramiento fibrovascular característico del pterigión. Se ha demostrado la presencia de FGF y TGF-beta 1 básicos en el pterigión primario y recurrente [Kira y col., (1998), Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, vol 236: 702-8] y las pruebas morfométricas e inmunohistoquímicas publicadas avalan adicionalmente la idea de que la angiogénesis puede desempeñar un papel en la formación del pterigión [Marcovich y col., (2002), Curr Eye Res, vol 25:17-22]. En otros estudios se ha implicado a la IL-6 y la IL-8, así como el VEGF, como mediadores que pueden ser relevantes para el desarrollo de pterigión [Di Girolamo y col., (2006), Invest Ophthalmol Vis Sci, vol 47: 2430-7]. Un agente eficaz contra la formación y crecimiento del pterigión puede disminuir la necesidad de intervención quirúrgica o reducir las tasas de recurrencia.

Otras enfermedades y afecciones oculares con un componente de fibrogénesis, fibrosis o cicatrización incluyen DME, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, retinopatía por drepanocitosis, retinopatía isquémica, enfermedad vebooclusiva retiniana y sobredestraste por lentes de contacto.

En resumen, la cicatrización excesiva es un componente subyacente de la fisiopatología de muchas enfermedades y afecciones oculares y no oculares. Los lípidos bioactivos como S1P y LPA desempeñan un papel en este proceso y un tratamiento relacionado con anticuerpos para disminuir las concentraciones de estos agentes probablemente conduzcan a un beneficio terapéutico para los pacientes que están recibiendo el tratamiento. En una realización, se cree que los inhibidores de lípidos bioactivos, en particular anticuerpos monoclonales dirigidos contra S1P y/o LPA son útiles en la modulación de las respuestas de cicatrización de heridas quirúrgicas y traumáticas.

#### Anticuerpos anti-S1P y anti-LPA para el tratamiento de la esclerodermia

Las composiciones y procedimientos divulgados en el presente documento serán útiles en el tratamiento de trastornos y enfermedades caracterizadas, al menos en parte, por neovascularización aberrante, fibrogénesis, fibrosis, cicatrización, inflamación y respuesta inmunitaria. Una de estas enfermedades es la esclerodermia, que también se denomina esclerosis sistémica.

La esclerodermia es una enfermedad autoinmunitaria que produce cicatrización o engrosamiento de la piel y en ocasiones afecta a otras zonas del cuerpo, incluidos los pulmones, el corazón y/o los riñones. La esclerodermia se caracteriza por la formación de tejido cicatricial (fibrosis) en la piel y los órganos del cuerpo, que puede conducir a engrosamiento y firmeza de las áreas implicadas, con la consiguiente reducción de la función. Hoy en día, aproximadamente 300.000 americanos tienen esclerodermia de acuerdo con la Scleroderma Foundation. Un tercio o menos de los afectados tienen la enfermedad extendida, mientras que los dos tercios restante tienen principalmente síntomas cutáneos. Cuando la enfermedad afecta a los pulmones y produce cicatrización, la respiración puede estar restringida porque los pulmones ya no pueden expandirse como deberían. Para medir la capacidad respiratoria, los médicos usan un dispositivo que evalúa la capacidad vital forzada (CVF). En personas con una CVF menor al 50 por ciento de la lectura esperada, la tasa de mortalidad a 10 años por enfermedad pulmonar relacionada con esclerodermia es de aproximadamente el 42 por ciento. Un motivo por el cual la tasa de mortalidad es tan alta es que actualmente no se dispone de un tratamiento eficaz.

Como se ha descrito en los ejemplos de esta solicitud, las pruebas existentes indican que la S1P y los LPA son factores de crecimiento profibróticos que pueden contribuir a la activación y proliferación de fibroblastos y el resultante incremento de la actividad de los fibroblastos asociada a cicatrización y remodelado maladaptativo. Además, se han demostrado los posibles papeles para S1P y LPA en la actividad de la piel y otros tipos de fibroblastos. Por ejemplo, se ha mostrado que los LPA estimulan la migración de fibroblastos cutáneos murinos (Hama, y col., J Biol Chem. 2004 Apr 23;279(17):17634-9), y los fibroblastos cutáneos humanos expresan varios subtipos de receptores de S1P (Zhang y col., Blood. 1999 May 1;93(9):2984-90). Además de los muchos efectos directos de la S1P sobre la actividad de los fibroblastos, la S1P también puede tener muchos posibles efectos indirectos sobre la actividad de los fibroblastos. Por ejemplo, la S1P puede facilitar la acción de otros factores profibróticos bien conocidos, como el TGF- $\beta$  y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). El TGF- $\beta$  es uno de los contribuyentes más ampliamente estudiados y reconocidos de la fibrosis (Desmouliere, y col., J Cell Biol 122: 103-111, 1993). El TGF- $\beta$  regula por aumento la expresión de SphK1 y la actividad que conduce a un incremento de la expresión de inhibidores tisulares de las metaloproteinasas 1 (TIMP-1), una proteína que inhibe la degradación de la ECM (Yamanaka, y col., J Biol Chem 279: 53994-54001, 2004). El incremento de la expresión de TIMP-1 está vinculado a fibrosis intersticial y disfunción diastólica en pacientes con insuficiencia cardíaca (Heymans, y col., Am J Pathol 166: 15-25, 2005). Por el contrario, la S1P estimula la expresión y la liberación de TGF- $\beta$  (Norata, y col., Circulation 111: 2805-2811, 2005). Existen también distintas pruebas de interferencias entre S1P y PDGF. La S1P estimula directamente la expresión de PDGF (Usui, y col., J Biol Chem 279: 12300-12311, 2004). Además, el receptor S1P<sub>1</sub> y el receptor de PDGF se unen uno a otro y su asociación es necesaria para la activación de PDGF de la señalización cadena abajo que contribuye a la proliferación y migración de varios tipos celulares (Long, y col., Prostaglandins Other Lipid Mediat 80: 74-80, 2006; Baudhuin y col., Faseb J 18: 341-343, 2004). Como tal, los

efectos de TGF- $\beta$  y PDGF sobre la fibrosis se pueden deber, en parte, a las interferencias con la vía de señalización de la S1P. Como tales, las composiciones y procedimientos de la invención se pueden usar para tratar la esclerodermia, en particular disminuyendo la concentración eficaz in vivo de un lípido diana concreto, por ejemplo S1P y/o LPA.

- 5 Se piensa que la esclerodermia sistémica está exacerbada por los autoanticuerpos estimuladores contra receptores del PDGF (Baroni, y col., N Engl J Med. 2006 v354(25):2667-76), y los receptores del PDGF están regulados por aumento en respuesta al TGF- $\beta$  (Yamakage, y col., J Exp Med. 1992 May 1;175(5):1227-34). Dada la sustancial interferencia entre los sistemas de señalización de S1P, PDGF and TGF- $\beta$ , el bloqueo de la bioactividad de la S1P con el agente anti-S1p (p. ej., un mAb anti-S1P) podría mitigar indirectamente los efectos proescleróticos de PDGF and TGF- $\beta$ . Además, el tratamiento con este agente anti-S1P podría beneficiar a los pacientes de esclerodermia mitigando los efectos directos de la S1P sobre la piel y otras formas de fibroblastos que contribuyen a la progresión de la enfermedad.

### 3. Procedimientos de administración

- 15 El tratamiento de enfermedades y afecciones tales como los ejemplos proporcionados anteriormente se puede administrar por varias vías usando diferentes formulaciones y dispositivos. En la técnica se conocen bien diluyentes, vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables. Un experto en la técnica apreciará que las cantidades que se van a administrar para un protocolo de tratamiento concreto se pueden determinar fácilmente. Podría esperarse que las cantidades adecuadas entren dentro del intervalo de 10  $\mu$ g/dosis a 10 g/dosis, preferentemente dentro del de 10 mg/dosis a 1 g/dosis.

- 20 Las sustancias farmacológicas se pueden administrar mediante técnicas conocidas en la materia, incluyendo, entre otras, administración sistémica, subcutánea, intradérmica, mucosa, incluida inhalación, y tópica. La mucosa se refiere al tejido epitelial que reviste las cavidades internas del cuerpo. Por ejemplo, la mucosa comprende el canal de alimentación, incluyendo la boca, el esófago, el estómago, los intestinos y el ano; el tracto respiratorio, incluyendo los pasajes nasales, la tráquea, los bronquios y los pulmones; y los genitales. Para los fines de esta memoria, la mucosa también incluirá la superficie externa del ojo, es decir, la córnea y la conjuntiva. La administración local (en posición a la administración sistémica) puede ser ventajosa porque este enfoque puede limitar los posibles efectos secundarios sistémicos, pero permite un efecto terapéutico.

- 25 Las composiciones farmacéuticas usadas de acuerdo con la presente divulgación incluyen, entre otras, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una variedad de componentes que incluyen, entre otros, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes.

- 30 Las formulaciones farmacéuticas usadas en el presente documento se pueden presentar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en contacto los ingredientes activos con el(los) vehículo(s) farmacéutico(s) o excipiente(s). Vehículos preferidos incluyen aquéllos que son farmacéuticamente aceptables, particularmente cuando la composición es para uso terapéutico en seres humanos. Para aplicaciones terapéuticas no humanas (p. ej., en el tratamiento de animales de compañía, ganado, peces o aves) se pueden usar vehículos veterinariamente aceptables. En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto de forma uniforme y estrecha los ingredientes activos con vehículos de líquidos o transportadores sólidos finamente divididos o con ambos y, después, en caso necesario, dando forma al producto.

- 35 Las composiciones divulgadas en el presente documento pueden formularse en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles, tales como, entre otros, comprimidos, cápsulas, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también se pueden formular en forma de suspensiones en medio acuoso, no acuoso o mixto. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, incluidas, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

40 En una realización, las composiciones farmacéuticas se pueden formular y usar como espumas. Las espumas farmacéuticas incluyen formulaciones tales como, entre otras, emulsiones, microemulsiones, cremas, gelatinas y liposomas.

- 45 Aunque de naturaleza básicamente similar, estas formulaciones varían en los componentes y la consistencia del producto final. Los conocimientos sobre la preparación de dichas composiciones y formulaciones suele ser conocido para los expertos en la técnica farmacéutica y de formulación y se pueden aplicar a la formulación de las composiciones de la presente invención.

- 50 En una realización se puede liberar en el ojo un resto derivado inmunitario mediante, por ejemplo, gotas o pomadas tópicas, inyección periocular, intracraneal en la cámara anterior o el cuerpo vítreo, mediante un depot implantado o sistémicamente mediante inyección o administración oral. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad de anticuerpo usado.

55 Los enfoques tradicionales a la liberación de terapéuticas en el ojo incluyen aplicación tópica, redistribución en el ojo

tras administración sistémica o inyecciones intraoculares/perioculares directas [Sultana y col., (2006), *Current Drug Delivery*, vol 3: 207-217; Ghate and Edelhauser (2006), *Expert Opinion*, vol 3: 275-287 y Kaur and Kanwar (2002), *Drug Develop Industrial Pharmacy*, vol 28: 473-493]. Probablemente, las terapéuticas con anti-S1P, anti-LPA u otros anticuerpos anti-lípidos bioactivos se usen con cualquiera de estos enfoques aunque todos tienen ciertas ventajas y desventajas que se perciben. Las gotas tópicas son cómodas, pero se eliminan principalmente porque el drenaje nasolacrimal a menudo libera menos del 5 % del fármaco aplicado en la sección anterior del ojo y una fracción incluso menor que la dosis del segmento posterior del globo. Además de gotas, los pulverizadores proporcionan otro modo de administración tópica. Un tercer modo lo constituyen las pomadas o emulsiones oftálmicas que se pueden usar para prolongar el tiempo de contacto de la formulación con la superficie ocular, aunque la visión borrosa y la inflamación de los párpados pueden ser molestos. Dichos enfoques tópicos todavía son preferibles, ya que la administración sistémica de terapéuticas para tratar trastornos oculares expone todo el cuerpo a la potencial toxicidad del fármaco.

EL tratamiento del segmento posterior del ojo es médicamente importante porque la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética, la uveítis posterior y el glaucoma son causas principales de pérdida de visión en EE.UU. y otros países desarrollados. [Myles y col., (2005), *Adv Drug Deliv Rev*; 57: 2063-79]. El modo más eficiente de liberación de fármaco en el segmento posterior es la inyección intravítrea a través de la pars plana. No obstante, las inyecciones directas requieren un profesional médico para efectuar la liberación y pueden causar ansiedad limitante del tratamiento en muchos pacientes. Las inyecciones perioculares, un enfoque que incluye inyecciones retrobulbares, peribulbares y en el subtenon posterior son algo menos invasivas que las inyecciones intravítreas. Repetidas inyecciones intravítreas a largo plazo pueden producir complicaciones, tales como hemorragia vítrea, desprendimiento de retina o endoftalmitis.

El tratamiento con anticuerpos anti-lípidos bioactivos también se podría administrar usando uno de los sistemas de liberación ocular más recientes [Sultana y col., (2006), *Current Drug Delivery*, vol 3: 207-217 y Ghate y Edelhauser (2006), *Expert Opinion*, vol 3: 275-287], incluidos los sistemas de liberación sostenida o controlada tales como (a) insertos oculares (solubles, erosionables, no-erosionables o basados en hidrogel), escudos corneanos, por ejemplo bandas a base de colágeno y lentes de contacto que proporcionan una liberación controlada del fármaco en el ojo, (b) sistemas de gelificación in vitro que proporcionan facilidad de administración como gotas que se convierten en gel en el ojo, proporcionando de este modo algún efecto sostenido del fármaco en el ojo, (c) sistemas vesiculares tales como liposomas, niosomas/discomas etc., que ofrecen ventajas de liberación dirigida, biocompatibilidad y libertad de la visión borrosa, (d) sistemas mucoadhesivos que proporcionan una mejor retención en el ojo, (e) profármacos (f) potenciadores de la penetración, (g) sistemas de vehículos liofilizados, (h) partículas, (i) emulsiones submicrométricas, (j) iontoforesis, (k) dendrímeros, (l) microesferas, incluidas microesferas bioadhesivas, (m) nanoesferas y otras nanopartículas, (n) colosomas y (o) sistemas de liberación de fármacos que combinan uno o más de los sistemas indicados anteriormente para proporcionar un efecto beneficioso adicional, o incluso sinérgico. La mayoría de estos abordajes están dirigidos al segmento anterior del ojo y pueden ser beneficiosos para tratar la enfermedad del segmento anterior. No obstante, uno o más de estos abordajes pueden seguir siendo útiles afectando a las concentraciones de lípidos bioactivos en la región posterior del ojo porque los pesos moleculares relativamente bajos de los lípidos probablemente permitan un movimiento considerable de los lípidos en el interior del ojo. Además, el anticuerpo introducido en la región anterior del ojo puede ser capaz de migrar por el ojo, especialmente si se fabrica en una variante del anticuerpo de peso molecular más bajo, como un fragmento Fab. También podrían usarse sistemas de liberación sostenida de fármacos para el segmento posterior, como los aprobados o en fase de desarrollo (véase las referencias en lo que antecede).

Como se ha mencionado anteriormente, el tratamiento de la enfermedad de la retina posterior, la coroides y la mácula es médicamente muy importante. A este respecto, la iontopresos transescleral [Eljarrat-Binstock and Domb (2006), *Control Release*, 110: 479-89] es un avance importante y puede ofrecer un modo eficaz de liberar anticuerpos en el segmento posterior del ojo.

También se podían añadir al anticuerpo formulado varios excipientes para mejorar el funcionamiento de la terapia, hacer la terapia más cómoda o garantizar claramente que el anticuerpo formulado solo se usa para el fin previsto para el que está aprobado. Ejemplos de excipientes incluyen sustancias químicas para controlar el pH, agentes antimicrobianos, conservantes para prevenir la pérdida de potencia del anticuerpo, pigmentos para identificar la formulación para uso ocular exclusivamente, agentes de solubilización para aumentar la concentración del anticuerpo en la formulación, potenciadores de la penetración y el uso de agentes para ajustar la isotonicidad y/o la viscosidad. Los inhibidores de, por ejemplo, proteasas se podían añadir para prolongar la semivida del anticuerpo. En una realización, el anticuerpo se libera en el ojo mediante inyección intravítrea en una solución que comprende solución salina tamponada con fosfato a un pH adecuado para el ojo.

El anticuerpo también podrían modificarse químicamente para dar un profármaco que se administra en una de las formulaciones o dispositivos descritos anteriormente en el presente documento. La forma activa del anticuerpo se libera después mediante acción de una enzima endógena. Posibles enzimas oculares que se han de considerar en la presente solicitud son los diversos citocromos p450, aldehído reductasas, cetona reductasas, esterasas o N-acetil- $\beta$ -glucosamidasa. Otras modificaciones químicas realizadas en el anticuerpo podrían aumentar su peso molecular y, como resultado, incrementar el tiempo de residencia del anticuerpo en el ojo. Un ejemplo de tal modificación química es la pegilación [Harris y Chess (2003), Nat Rev Drug Discov; 2: 214-21], un procedimiento que puede ser general o específico de un grupo funcional, tal como disulfuro [Shaunak y col., (2006), Nat Chem Biol ; 2:312-3] o un tiol [Doherty y col., (2005), Bioconjug Chem; 16: 1291-8].

## 10 Ejemplos

La invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos detallados. Estos ejemplos no se deben considerar de ningún modo como limitantes del ámbito de la invención.

Para los datos descritos más adelante se realizaron estudios in vitro por triplicado y se repitieron al menos tres veces y se realizaron estudios in vivo en al menos 5 ratones. En todos los estudios se realizaron análisis estadísticos usando la prueba T de Student o ANOVA usando el software GraphPad. Cuando proceda, los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM y el \* representa  $p \leq 0,05$ .

### 15 Ejemplo 1. SPHINGOMAB redujo significativamente la NVC y la formación de cicatrices en un modelo murino de NVC

Se sometió a ratones C57BL6/J hembra a rotura inducida por láser de la membrana de Bruch y se administró 0,5  $\mu$ g de Sphingomab o de un anticuerpo inespecífico (IN) del mismo isotipo diluido en 2  $\mu$ l de solución fisiológica salina. Se sacrificó a los ratones 14 y 28 días después de la rotura con láser.

Para inducir las lesiones de NVC se dilataron las pupilas con tropicamida oftálmica (al 0,5 %) y fenilefrina (al 2,5 %). Sobre el ojo se colocó un cubreobjetos. Oculight GL 532 nm (Iridex Corporation, Mountain View, CA) acoplado a una lámpara de hendidura fijada para liberar un pulso de 100 ms a 150 mW con un tamaño de mancha de 50  $\mu$ m se usó para romper la membrana de Bruch en tres cuadrantes del ojo derecho localizados aproximadamente a 50  $\mu$ m de la papila óptica en las posiciones relativas de las 9, las 12 y las 3 de un reloj. El ojo izquierdo sirvió como control sin daños en todos los casos. Cualquier lesión no asociada con una burbuja de vapor o las lesiones que se hicieron confluentes se excluyeron de análisis.

Para medir el tamaño de la lesión de NVC se prepararon montajes horizontales coroideos del complejo esclerótica-coroideas-EPR y se tiñeron para ver la vasculatura (R. communis aglutinina I; rojo) y pericitos (CD140b; verde). Se capturaron imágenes digitales usando una cámara digital de alta resolución con epifluorescencia Zeiss Axioplan 2 RGB Spot y microscopía confocal láser de barrido (BioRad MRC 1024, BioRad Corporation, Temecula, CA). Para los análisis volumétricos se usó captura de serie z y la suma del área de lesión a lo largo de la serie z se multiplicó por el espesor z (4  $\mu$ m) para obtener el volumen de la lesión.

Para evaluar el depósito de colágeno se tiñó el complejo esclerótica-coroideas-EPR con tricromo de Masson. El complejo esclerótica-coroideas-EPR se incluyó en parafina y después se seccionó en serie a un espesor de 6 micrómetros. Se evaluaron aproximadamente 30 secciones por lesión. La cuantificación del volumen del depósito de colágeno se calculó del mismo modo que se ha descrito para el volumen de la lesión de NVC.

Las imágenes digitales capturadas se evaluaron morfológicamente usando el software ImageJ (Research Services Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD). La Figura 1A muestra que SPHINGOMAB atenúa espectacularmente la neovascularización coroidea 14 y 28 días después de la rotura de la membrana de Bruch inducida por láser. La Figura 1B muestra que SPHINGOMAB reduce significativamente la fibrosis asociada con la formación de lesiones de NVC 28 días después de la rotura de la membrana de Bruch inducida por láser.

### 45 Ejemplo 2. SPHINGOMAB inhibe la neovascularización a través de múltiples mecanismos, incluida la inhibición de la migración de células endoteliales y la formación de tubos.

La S1P estimula la migración de las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y, en Matrigel y otros ensayos, la formación de la formación de VS de novo in vitro [112]; SPHINGOMAB puede neutralizar estos efectos de la S1P. Se realizaron experimentos como describen Visentin y col. (Cancer Cell 2006 Mar;9(3):225-38). Los datos de la Figura 2A sugieren que las HUVEC sembradas sobre Matrigel reducido con GF formaban múltiples estructuras de tipo capilares en presencia de S1P y no formaron estructuras de tipo capilares en ausencia de S1P o cuando se incuban junto con SPHINGOMAB y S1P. Los datos de la Figura 2B demuestran la potente capacidad de S1P 0,1 – 1  $\mu$ M para estimular la migración de HUVEC 2 – 2,5 veces la de las HUVEC no tratadas o las HUVEC incubadas junto con SPHINGOMAB en un ensayo de quimioinvasión en Matrigel. Combinados, estos estudios demuestran que SPHINGOMAB pueden mitigar de forma eficiente los efectos proangiogénicos de S1P sobre las CE.



**Ejemplo 3. SPHINGOMAB inhibe la neovascularización a través de múltiples mecanismos, incluida la mitigación de los efectos de SP1, VEGF y bFGF in vivo.**

En base a los estudios in vivo que muestran que S1P aumentaba el crecimiento de capilares endoteliales en tapones de Matrigel implantados por vía subcutánea [54], los inventores han especulado que SPHINGOMAB podría reducir la formación de novo de VS in vivo. Para investigar esto, los inventores han usado el ensayo de Matrigel Plug in vivo para determinar la neovascularización. En un conjunto de experimentos, Matrigel se suplementó con S1P 1  $\mu$ M, bFGF 0,5  $\mu$ g/ml o VEGF 1  $\mu$ g/ml y, después, se inyectó IP en ratones (n= 4). Tras 10 días, se heparinizó a los ratones y se les inyectó lectinas fluorescente, isolectina B4-FITC, que se une a las moléculas de adhesión expresadas por las CE vasculares que forman los VS en crecimiento. Después, se fragmentaron los tapones, se congelaron en OCT, se seccionaron y se observaron para detectar VS teñidos con FITC. Los datos de la Figura 3A sugieren que S1P es un estimulador más potente de la neovascularización in vivo que bFGF o VEGF [Lee, y col., (1999), *Biochem Biophys Res Commun.*, vol 264: 743-50], como pone de manifiesto la gran cantidad de VS teñidos con FITC en los tapones que contienen S1P en comparación con los tapones que contienen bFGF o VEGF.

Después, se tiñeron las secciones con hematoxilina y eosina para evaluar la infiltración de CE (Figura 3B). La infiltración de CE es una etapa crítica en la neovascularización. Los tapones que contenían S1P tenían un incremento por tres de la infiltración de CE en comparación con los tapones que solo contenían Matrigel. Se supone que la infiltración de células es de CE, aunque los autores reconocen que otros tipos de células, como las células inmunitarias, también se pueden teñir. Los ratones a los que se administra sistémicamente SPHINGOMAB cada 48 horas (iniciado 1 día antes de la implantación de los tapones) mostraron una cantidad menor de infiltración de CE, incluso cuando se añadió S1P a los tapones de Matrigel. Estos resultados demuestran la capacidad de SPHINGOMAB para inhibir la infiltración de CE in vivo.

La S1P endógena de la sangre y el tejido circundante podría suministrar a una herida estímulos proangiogénicos. Se investigó la capacidad de SPHINGOMAB para reducir la S1P endógena en una herida. Los tapones estimulados óptimamente (Matrigel suplementado con 0,5  $\mu$ g/ml de bFGF o 10 mg/ml de VEGF) se implantaron en los ratones. Los ratones recibieron inyecciones I.P. de 25 mg/kg de SPHINGOMAB o solución salina cada 48 horas comenzando el día 1 antes de la implantación de Matrigel. Cada grupo de tratamiento (Matrigel, Matrigel plus GF o Matrigel plus GF y SPHINGOMAB administrado) estaba constituido por un mínimo de 6 ratones. Tras 10 días, se trató a los ratones con heparina, se les inyectó Isolectina B4-FITC, se escindieron los tapones, se incluyeron en medio de congelación OCR y se fragmentaron. Se accedió cualitativamente a la densidad microvascular mediante vasos teñidos con lectinas-FITC como se muestra en la Figura 3C. La tinción de VS fue esporádica en los tapones control (sin tratar), mientras que los tapones que contenían bFGF o VEGF mostraron pruebas significativas de vascularización. Los tapones de los ratones tratados con SPHINGOMAB mostraron una reducción significativa de la formación de VS en comparación con los tapones de bFGF o VEGF de los ratones tratados con solución salina. La cuantificación de los vasos sanguíneos teñidos reveló una disminución de 5 a 8,5 veces la neovascularización de los tapones que contienen VEGF o bFGF, respectivamente, de animales tratados con SPHINGOMAB en comparación con los animales tratados con solución salina (Figura 3C). Esta Evaluación demuestra además la capacidad de la SP1 sérica endógena y tisular para potenciar la microvascularización, así como la capacidad de SPHINGOMAB para neutralizar los efectos proangiogénicos de la S1P endógena.

**Ejemplo 4. SPHINGOMAB inhibe la formación de cicatrices in vivo**

La S1P realiza contribuciones profundas a la cicatrización de heridas a través de la activación de la migración y proliferación de fibroblastos y producción de colágeno; SPHINGOMAB neutraliza estos efectos. En varios estudios que usan múltiples tipos de fibroblastos se confirma la capacidad de la S1P para estimular la cicatrización de heridas: 1) La S1P aumentó la proliferación de fibroblastos Swiss-3T3 medida mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina usando procedimientos estándar (Figura 4A); 2) la S1P estimuló la migración de fibroblastos cardíacos en un ensayo de cicatrización de heridas de raspado estándar. (Figura 4B); 3) la S1P estimuló la expresión de colágeno por los fibroblastos cardíacos aislados de ratones transgénicos que poseían el indicador de colágeno la GFP, como se indica mediante microscopía inmunofluorescente (Figura 4C); y 4) la S1P indujo la diferenciación de fibroblastos de pulmón WI-38 en miofibroblastos, las células que son activas en el remodelado de las cicatrices, como se indica el incremento de la expresión de la proteína marcadora de miofibroblastos, la  $\alpha$ -actina de músculo liso, usando análisis de inmunotransferencia (Figura 4D). En cada uno de estos ensayos, SPHINGOMAB neutralizó las S1P. se ha previsto que los fibroblastos oculares respondan de un modo similar a la S1P y a SPHINGOMAB. Se han observado similitudes entre la enfermedad cardiovascular y las lesiones neovasculares de la DME, incluido el remodelado de cicatrices y la posterior formación de tejido fibrosos maladaptativo; [Vine et al. (2005), *Ophthalmology.*, vol 112: 2076-80 y Seddon y Chen (2004), *Int Ophthalmol Clin.*, vol 44: 17-39]; por tanto, se cree que SPHINGOMAB tendría efectos sobre la neovascularización ocular y la cicatrización similares a los que se han demostrado en los sistemas cardiovasculares. En los estudios en Lpath se evaluó la eficacia de SPHINGOMAB para reducir la formación de cicatrices cardíacas tras un infarto de miocardio (IM) permanente mediante la ligadura de la arteria coronaria descendente izquierda en ratones. La administración sistémica de 25 mg/kg de SPHINGOMAB o solución salina se inició 48 horas después de la cirugía. Se escogió la administración de anticuerpos a las 48 horas para permitir la formación normal de cicatrices reparadoras durante la primera fase del remodelado y permitir que se produzca una angiogénesis beneficiosa estimulada por SLOP inmediatamente después del IM. Dos semanas

después del infarto se sacrificó a los ratones y se accedió a la fibrosis mediante tinción con tricromo de Masson del tejido cardíaco. Los animales que han recibido tratamientos con SPHINGOMAB exhibieron una anulación caso completa de la fibrosis perivascolar (Figura 4E). Como control para cualquier respuesta de cicatrización de heridas no específica, los animales en simulación sufrieron una toracotomía sin ligadura de arterias coronarias.

#### 5 **Ejemplo 5: La S1P estimula la transformación de células epiteliales oculares y fibroblastos en miofibroblastos contráctiles productores de tejido cicatricial.**

La fibrosis tisular patológica (formación de cicatrices) es un factor contribuyente primario en una serie de trastornos oculares, incluidos: degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, vitreoretinopatía proliferativa y consecuencias de la cirugía de glaucoma.

10 En muchos de estos casos, los factores de crecimiento y las quimiocinas en circulación estimulan la transformación de células oculares normales en células fibrocontráctiles productoras de tejido cicatricial que se han denominado "miofibroblastos". Normalmente, los miofibroblastos son responsables de la reparación de tejido como parte de la respuesta de cicatrización de heridas tras la lesión. No obstante, el número y la función alteradas de los miofibroblastos están implicados en enfermedades caracterizadas por formación de tejido cicatricial patológico en el hígado, la piel, los pulmones, los riñones, el corazón y los ojos. En el ojo, la transformación de las células epiteliales pigmentarias de la retina (EPR) en una de fenotipo de miofibroblasto está ligada a la formación de membranas fibrocontráctiles que producen desprendimiento de retina y la posterior alteración de la visión. Además, la transformación en miofibroblastos de los fibroblastos oculares puede tener como resultado producción de tejido cicatricial anormal tras una lesión ocular que conduce a la posterior pérdida de visión. Aunque se han identificado muchos de los factores proteicos en circulación en el ojo que estimulan la formación de miofibroblastos, no se sabe nada sobre el papel de los lisofosfolípidos como la S1P en este proceso. Por tanto, los autores examinaron los efectos de la S1P sobre la transformación de los miofibroblastos de varias líneas celulares oculares humanas. Como se muestra en la Figura 5, la S1P estimulaba la producción de actina de músculo liso  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA; un marcador de miofibroblastos) en células epiteliales pigmentarias retinianas humanas (Figura 5A) y fibroblastos de la conjuntiva humana (Figura 5B). Estos datos demuestran por primera vez que la S1P está entre los medios de factores químicos circulantes que estimulan la transformación de las células epiteliales oculares y los fibroblastos en miofibroblastos contráctiles productores de tejido cicatricial que pueden contribuir a desprendimiento de retina, fibrosis ocular y la posterior alteración de la visión.

30 En estos experimentos, la capacidad de la S1P para estimular la expresión de  $\alpha$ -SMA difería de un modo dependiente de la concentración entre las células epiteliales pigmentarias retinianas y los fibroblastos de la conjuntiva. Como se ha mostrado se observó un incremento significativo de la expresión de  $\alpha$ -SMA a la concentración de 0,001  $\mu$ M en las células epiteliales que disminuyó después hasta los niveles basales a la concentración de 10  $\mu$ M. Por el contrario, únicamente se observó un incremento significativo en la expresión de  $\alpha$ -SMA a la concentración de 10  $\mu$ M en los fibroblastos de la conjuntiva. Se cree que esta diferencia es el resultado de un incremento de la expresión del receptor de S1P en las células epiteliales en comparación con los fibroblastos. Los autores han hipotetizado que, debido al incremento de los niveles de expresión del receptor de S1P, es probable que las células epiteliales pigmentarias retinianas sean más sensibles a la S1P a concentraciones bajas. Por el contrario a niveles elevados de S1P, los receptores se sensibilizaron, o posiblemente incluso se internalizaron, para conducir a una disminución de la estimulación por S1P.

40 El colágeno es una de las proteínas estructurales principales que soportan todos los tejidos del organismo y es uno de los componentes principales del tejido cicatricial. En el contexto no patológico, el contenido total de colágeno dentro del tejido se mantiene mediante un equilibrio entre la producción de colágeno por los fibroblastos y la degradación de ciertas enzimas. Una serie de trastornos que implican niveles aumentados de tejido cicatricial son el resultado de, en parte, procesos fisiológicos y moleculares que inhiben la degradación de colágeno que es necesaria para la formación de cicatrices. Los autores ha hipotetizado que la capacidad de S1P para estimular la formación de tejido cicatricial puede ser el resultado de su capacidad para inhibir la degradación de colágeno, de modo que se producen incrementos netos del tejido cicatricial dentro de los órganos. Por tanto, los autores examinaron los efectos de la S1P sobre la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) en los fibroblastos de la conjuntiva humana. El incremento de la expresión de PAI-1 se correlaciona con una disminución de la degradación proteolítica de tejido conjuntivo y está regulado por aumento en asociación con varias enfermedades fibróticas que implican un incremento de la cicatrización. Como se muestra en la Figura 5C, la S1P estimula la expresión de PAI-1 de un modo dependiente de la dosis. Estos datos sugiere que también se puede estimular la formación de tejido cicatricial estimulando la expresión de proteínas que inhiben su degradación, lo que sugiere que la S1P funciona a través de múltiples vías mecánicas para estimular y mantener la cicatrización patológica asociada con las enfermedades oculares.

#### 60 **Ejemplo 6: SPHINGOMAB inhibe la infiltración de células inflamatorias e inmunitarias**

La inflamación es la primera respuesta en el proceso de remodelado [7]. Es desencadenada tanto por isquemia como por daños celulares y tiene como resultado la regulación por aumento de la expresión de citocinas que estimula la migración de macrófagos y neutrófilos al área dañada para la fagocitosis de las células muertas y para regular por aumento también la respuesta inflamatoria [Jordan y col., (1999), Cardiovasc Res., vol 43: 860-78]. Los

mastocitos también son importantes mediadores celulares de la respuesta inflamatoria. La S1P liberada de los mastocitos es responsable de muchas de las respuestas adversas observadas en modelos animales experimentales de inflamación [Jolly y col., (2004), J Exp Med., vol 199: 959-70 y Jolly y col., (2005), Blood., vol 105: 4736-42].

5 En base a las similitudes de las respuestas inmunitarias e inflamatorias en la NVC y la CVD, se evaluó la eficacia de SPHINGOMAB para mitigar la infiltración de células inmunitarias en una herida en un modelo de infarto murino como indicación de los posibles efectos de SPHINGOMAB en la mitigación de estos daños durante la DME [Vine y col., (2005), Ophthalmology., vol 112: 2076-80 y Seddon y Chen (2004), Int Ophthalmol Clin., vol 44: 17-39]. Cuatro días después del IM se evaluó la infiltración de macrófagos y mastocitos usando los anticuerpos MAC-1 y MCG35 respectivamente dentro del área en riesgo. SPHINGOMAB atenuó espectacularmente la densidad de los macrófagos inflamatorios (Figura 6A) y los mastocitos (Figura 6B), lo que sugiere que SPHINGOMAB puede neutralizar los daños inmunitarios e inflamatorios durante la DME.

#### **Ejemplo 7: SPHINGOMAB es altamente específico de S1P.**

15 En un ELISA competitivo demuestra la especificidad de SPHINGOMAB por la S1P en comparación con otros lípidos bioactivos. SPHINGOMAB no demostró reactividad cruzada con esfingosina (SPEH), el precursor metabólico inmediato de S1P o de ácido lisofosfatídico (LPA), una importante molécula de señalización extracelular que es estructural y funcionalmente similar a la S1P. SPHINGOMAB no reconoció otros lípidos y metabolitos estructuralmente similares, incluidos ceramida-1-fosfato (C1P), dihidroesfingosina (DH-SPH), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE) o esfingomielina (SM). SPHINGOMAB sí produjo reacción cruzada con dihidroesfingosina-1-fosfato (DH-S1P) y, en menor medida, con esfingosilforilcolina (SPC) (Figura 7).

#### **Ejemplo 8: Desarrollo de mAb anti-LPA**

25 El objetivo global de estos experimentos es generar y desarrollar mAb específicos de LPA para desarrollar una terapia a base de anticuerpos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con LPA, en particular estas enfermedades que pueden implicar una fibrosis excesiva. Por ejemplo, los LPA pueden tener algunos efectos fibrogenéticos directos mediante la estimulación de la expresión del gen del colágeno y la proliferación de fibroblastos [Chen, y col., (2006) FEBS Lett. 580(19):4737-45]. Por tanto, un mAb anti-LPA puede ser útil en el tratamiento de la fibrosis y las enfermedades caracterizadas por un exceso de actividad de los fibroblastos. Estas enfermedades incluyen, entre otros, varios trastornos oculares, remodelado cardíaco e insuficiencia cardíaca y esclerodermia. Los anticuerpos dirigidos contra el lípido bioactivo, LPA, que demuestran buenas características de funcionamiento en ensayos tanto in vitro como in vivo serían muy útiles en aplicaciones terapéuticas y diagnósticas.

30 Con el fin de generar anticuerpos monoclonales (mAb) contra LPA, se inmunizó a 80 ratones con un derivado de ácido lisofosfatídico (LPA, 1-acil-2-liso-sn-glicero-3-fosfato). La presencia de anticuerpos anti-LPA se determinó analizando los sueros de los ratones inmunizados mediante ELISA en 3 puntos de tiempo tras la inmunización. La respuesta inmunitaria varió considerablemente entre ratones individuales, tanto con respecto al tiempo de respuesta del anticuerpo como a los niveles obtenidos. En general se observó una respuesta inmunológica significativa (título > 125.000) en al menos la mitad de los ratones. Se seleccionó a cinco ratones con el título de anticuerpos más elevado para iniciar el desarrollo de una línea celular de hibridoma. Tras la selección inicial de más de 2.000 células de hibridoma generados de estas 5 fusiones, un total de 29 líneas celulares de hibridoma secretoras de anti-LPA exhibieron unión a LPA. De estos clones, 24 se subclonaron adicionalmente y caracterizaron en un panel de ensayos de ELISA. De los 14 clones que permanecieron positivos, se escogió a seis clones para su caracterización posterior. El isotipo del mAb fue IgG1 para la mayoría de los anticuerpos.

35 En una selección inicial, todos los mAb se compararon según sus propiedades de unión a 12:0 de LPA y S1P. De 26 mAb, 5 clones presentaron reacción cruzada con S1P. Ocho mAb anti-LPA con unión superior a 12:0 y 18:0 de LPA se caracterizó adicionalmente según su especificidad y propiedades de unión.

45 Los mAb de 6 líneas celulares individuales se caracterizaron completamente por su especificidad mediante ELISA competitivo usando una serie de análogos y por su potencia en un panel de ensayos in Vitro (Tabla 1). La mayoría de los mAb exhibieron especificidad por isoformas de LPA. Se estimó que la afinidad de los anticuerpos estaba en el rango picomolar. Otros ensayos en modelos animales determinará si estos mAb pueden proporcionar la base de terapias prometedoras para enfermedades relacionadas con LPA.

50 Usando resonancia de plasmón superficial se midieron las afinidades y la cinética de 6 mAb (Tabla 2). Los seis mAb se unieron a LPA con valores de  $K_D$  similares (que varían de 0,34 a 3,8 pM) y similares parámetros cinéticos. Para muchas de estas interacciones, la  $k_d$  se fijó en  $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  en el programa de ajuste, ya que los complejos se disociaron muy despacio. La tabla 1 también representa la unión de estos 6 mAb a 18:0 y 12:0 LPA unido a los pocillos de la placa de ELISA a concentraciones crecientes. La concentración de mAb que representa el 50 % de la concentración eficaz ( $CE_{50}$ ) y la unión máxima (UN) se determinaron usando 18:0 y 12:0 LPA como antígeno de recubrimiento. Los valores de  $CE_{50}$  fueron, en general, inferiores para 18:0 LPA. Cabe observar que el mAb B3 mostró una preferencia de unión mayor a 18:0 LPA que a 12:0 LPA en comparación con los otros mAb.

55 La especificidad de los mAb anti-LPA se evaluó determinando la unión a un conjunto de variantes de LPA y lípidos relacionados, tales como ácido diestearoil-fosfatídico, lisofosfatidilcolina, S1P, ceramida y ceramida-1-

- fosfato. La CI50 y la reactividad cruzada de los 6 mAb seleccionados más dos mAb adicionales (504B58-3F8 and 504B 104) dirigidos contra diferentes compuestos relacionados con LPA se resumen en la Tabla 3. Todos los mAb discriminaron entre los LPA 12:0 (lauroílo), 14:0 (miristoílo), 16:0 (palmitoílo), 18:1 (oleoílo), 18:2 (linoleoílo) y 20:4 (araquidonoílo) (Tabla 3), mientras que ninguno de ellos mostró reactividad cruzada con diestearoílo PA y LPC, el precursor metabólico inmediato del LPA. Además, el efecto de inhibición de otros lípidos analizados, tales como S1P, ceramida y ceramida-1-fosfato fue insignificante. Estos hallazgos muestran claramente que los mAb anti-LPA no reconocían estos lípidos de estructura similar, incluyendo los lípidos precursores, lo que demuestra la elevada especificidad de los anticuerpos por los ácidos lisofosfatídicos. El orden de la CE<sub>50</sub> fue para los lípidos insaturados 18:2> 18:1>20:4 y los saturados 14:0>16:0>18:0.
- Es interesante el hecho de que la competición con 18:1 LPA reveló un comportamiento diferente para los 6 mAb. Entre los 6 mAb, 504B3 exhibió la menor CI<sub>50</sub> (50 % de inhibición de la unión). La unión directa del mAb 504B3 a 18:1 LPA inmovilizado se bloqueó de forma eficaz en presencia de 18:1 LPA añadido con valores de CI<sub>50</sub> de 287 nM. Sorprendentemente, ninguno de los valores de CI<sub>50</sub> fue próximo a sus respectivos valores de K<sub>d</sub> para la unión a LPA. El valor de CI<sub>50</sub> fue al menos 100 mayor que su K<sub>d</sub> (rango nM frente a rango pM). 5 mAb exhibieron especificidad a 18:1 LPA como se muestra en el ensayo de competición. 18:1 LPA no compitió con el mAb 63 unido a 18:1 LPA inmovilizado, aunque se unió a LPA con valores de K<sub>d</sub> en el rango picomolar. Por tanto, aunque los seis mAb se unieron con afinidades similares a LPA, cinco de seis mAb exhibieron unión eficaz y específica a LPA 18: 1.

**Tabla 1. Cinética de la unión directa**

- Se analizaron cantidades crecientes de mAb (hasta 40 ng/100 µl de la mezcla de reacción) para determinar la unión a 12:0 LPA o 18:0 LPA (0,1 µM) como antígeno de recubrimiento.

CE<sub>50</sub> concentración eficaz de anticuerpo que da el 50 % de la unión máxima.

UM: unión máxima (expresada como DO450).

	LPA-C12							
	B3	B7	B58	B58-3F8	B104	D22-1	A63-1	B3A6-1
HMC(nM)	2,42	0,413	0,554	0,463	0,559	1,307	0,28	0,344
Máx (DO450)	0,809	1,395	1,352	1,404	1,402	0,449	1,269	1,316
	LPA-C18							
	B3	B7	B58	B58-3F8	B104	D22-1	A63-1	B3A6-1
HMC(nM)	1,067	0,274	0,245	0,187	0,313	0,176	0,298	0,469
Máx(DO450)	1,264	0,973	0,847	1,000	1,016	0,353	1,302	1,027

**Tabla 2. Afinidad de unión de los mAb anti-LPA de ratón.**

- El LPA se inmovilizó en el chip sensor a densidades variables de 150 unidades de resonancia. Las diluciones de cada mAb se pasaron sobre el LPA inmovilizado y se obtuvieron las constantes de cinética mediante regresión no lineal de las fases de asociación/disociación. Los errores se proporcionan como la desviación estándar usando al menos tres determinaciones por duplicado. Las afinidades aparentes se determinaron mediante  $K_D = k_d/k_a$

k<sub>a</sub> = constante de la velocidad de asociación en M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>

K<sub>d</sub> = constante de la velocidad de disociación en s<sup>-1</sup>

Moléculas de anticuerpo	k <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (pM)
A63	4,4 ± 1,0 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>-6</sup>	2,3 ± 0,5
B3	7,0 ± 1,5 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>-6</sup>	1,4 ± 0,3
B7	6,2 ± 0,1 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>-6</sup>	1,6 ± 0,1
D22	3,0 ± 0,9 x 10 <sup>4</sup>	1 x 10 <sup>-6</sup>	33 ± 10
B3A6	1,2 ± 0,9 x 10 <sup>5</sup>	1,9 ± 0,4 x 10 <sup>-5</sup>	16 ± 1,2
B58	2,9 ± 1,6 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>-6</sup>	0,34 ± 0,019

**Tabla 3: Competición de la unión y la actividad de LPA**

18:0 LPA se capturó en placas de ELISA. Cada lípido competidor (hasta 10  $\mu$ M) se diluyó en serie en BSA (1 mg/ml)-PBS y después se incubó con los mAb (3 nM). Después, las mezclas se transfirieron a pocillos recubiertos con LPA y la cantidad de anticuerpo unido se midió con un anticuerpo secundario. Los datos se normalizaron a una señal máxima ( $A_{450}$ ) y se expresan como el porcentaje de inhibición. Los ensayos se realizaron por triplicado para analizar los parámetros.

	14:0 LPA		16:0 LPA		18:1 LPA		18:2 LPA		20:4 LPA	
	CI <sub>50</sub>	IM	CI <sub>50</sub>	IM	CI <sub>50</sub>	IM	CI <sub>50</sub>	IM	CI <sub>50</sub>	IM
	$\mu$ M	%	$\mu$ M	%	$\mu$ M	%	$\mu$ M	%	$\mu$ M	%
<b>504B3</b>	0,02	72,3	0,05	70,3	0,287	83	0,064	72,5	0,02	67,1
<b>504B7</b>	0,105	61,3	0,483	62,9	>2,0	100	1,487	100	0,161	67
<b>504B58</b>	0,179	66,7	3,061	>100	1,606	72,8	1,278	94,6	0,22	63,6
<b>504B58-3F8</b>	0,26	63,9	5,698	>100	1,5	79,3	1,24	92,6	0,304	79,8
<b>504B104</b>	0,32	23,1	1,557	26,5	28,648	>100	1,591	36	0,32	20,1
<b>504D22-1</b>	0,164	34,9	0,543	31	1,489	47,7	0,331	31,4	0,164	29,5
<b>504A63-1</b>	1,147	31,9	5,994	45,7	--	--	--	--	0,119	14,5
<b>504B3A6-1</b>	0,108	59,9	1,151	81,1	1,897	87,6	--	--	0,131	44,9

CI<sub>50</sub>: Concentración máxima a la que se produce la mitad de la inhibición

IM: Inhibición máxima (% de unión en ausencia de inhibidor)

---: no estimado por una inhibición débil

#### Materiales y procedimientos

##### Reactivos de biolípidos:

Todos los biolípidos se adquirieron de Avanti Polar Lipids con la identidad confirmada mediante HPLC y espectrometría de masas. Los derivados de LPA se sintetizaron en el Department of Chemistry (San Diego State University). Todos los demás reactivos se obtuvieron de Fisher a menos que se indique lo contrario.

DLPC: 1-Palmitoil-2-miristoil-sn-glicero-3-fosfolina.

DASA: 1,2-Distearoil- sn -glicero-3-fosfato ;

14:0 LPA: 1-Miristoil-2-hidroxi-sn -glicero-3-fosfato

16:0 LPA: 1-Palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfato

18:0 LPA: 1-estearoil-2-hidroxi-sn -glicero-3-fosfato

18:1 LPA: 1-Oleoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfato

18:2 LPA: 1-linoleoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfato

20:4 LPA: 1-araquidonoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfato

S1P: D-eritro-esfingosina-1-fosfato

##### ELISA cuantitativa.

Placas de ELISA de microtitulación (Costar, n° cat. 3361) se revistieron con el fragmento F(ab')<sub>2</sub> específico de anticuerpo IgG de conejo anti-ratón (Jackson, 315-005-047) diluido en tampón carbonato 1M (pH 9,5) a 37 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron con PBS y se bloquearon con PBSBSA/Tween-20 durante 1 hora a 37 °C. Para la incubación primaria se añadieron a los pocillos diluciones de IgG de ratón no específica o de IgG humana, toda la molécula (usada para la curva de calibración) (y las muestras a medir. Las placas se lavaron y se incubaron con 100 ml por pocillo de anti-ratón de cabra conjugado con HRP (H+L) diluido 1:40.000 (Jackson, n° cat. 115-035-

146) durante 1 hora a 37 °C. Después de lavar, la reacción enzimática se detectó con tetrametilbencidina (Sigma, n° cat. T0440) y se detuvo añadiendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. La densidad óptica (DO) se midió a 450 nm usando un Thermo Multiskan EX. Los datos brutos se transfirieron a un software GraphPad para análisis.

ELISA directo:

- 5 Las placas de ELISA de microtitulación (Costar, Cat No. 3361) se revistieron con LPA-BSA diluido en tampón carbonato 1M (pH 9,5) a 37 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM, pH 7,4) y se bloquearon con PBSBSA/Tween-20 durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C. Las muestras a analizar se diluyeron a 0,4 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,0125 µg/ml y 0 µg/ml, y se añadieron 100 µl a cada pocillo. Las placas se lavaron y se incubaron con 100 µl por pocillo de anti-ratón de cabra conjugado con HRP (dilución 1:20.000) (Jackson, n° cat. 115-035-003) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, la reacción enzimática se detectó con tetrametilbencidina (Sigma, n° cat. T0440) y se paró añadiendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. La densidad óptica (DO) se midió a 450 nm usando un Thermo Multiskan EX. Los datos brutos se transfirieron a un software GraphPad para análisis.

Ensayo de competición:

- 15 La especificidad de los mAb se analizó en los ensayos de ELISA. Las placas de ELISA de microtitulación (Costar, Cat No. 3361) se revistieron con L18:0 PA-BSA diluido en tampón carbonato 1M (pH 9,5) a 37 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM, pH 7,4) y se bloquearon con PBSBSA/Tween-20 durante 1 hora a 37 °C o durante la noche temperatura ambiente o. Para la incubación primaria, a los pocillos de las placas ELISA se añadieron 0,4 µg/l de mAb anti-LPA y cantidades designadas de LPA (14:0, 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 y 20:4), DSPA, LPC 18:1 (lisofosfatidilcolina), S1P, ceramida y ceramida-1-fosfato y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron y se incubaron con 100 µl por pocillo de anti-ratón de cabra conjugado con HRP (dilución 1:20.000) (Jackson, n° cat. 115-035-003) o anti-humano de cabra conjugado con HRP (H+L) diluido a 1:50.000 (Jackson, n° cat. 109-035-003) a 37 °C durante 1 hora. Después de lavar, la reacción enzimática se detectó con tetrametilbencidina y se paró añadiendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. La densidad óptica (DO) se midió a 450 nm usando un Thermo Multiskan EX. Los datos brutos se transfirieron a un software GraphPad para análisis.

Purificación de anticuerpos:

- Los anticuerpos monoclonales se purificaron de sobrenadantes de cultivo pasando los sobrenadantes de cultivo sobre columnas A/G de proteínas (Pierce, n° cat. 53133) a 0,5 ml/min. Las fases móviles consistieron en tampón de unión de IgG de PIERCE (N° cat. 210001) y glicina 0,1M a pH 2,7 (Pierce, Tampón de elución, n° cat. 21004). Las recolecciones de anticuerpos en glicina 0,1M se diluyeron al 10 % (v/v) con tampón fosfato 1M, a pH 8,0, para neutralizar el pH. Las recolecciones de IgG<sub>1</sub> se combinaron y dializaron exhaustivamente contra 1X PBS (Pierce Slide-A-Lyzer Cassette, 3,500 MWCO, n° cat. 66382). Los eluatos se concentraron usando Centricon YM-3(10,000 MWCO Amicon n° cat. 4203) mediante centrifugación durante 1 hora a 2,500 rpm. La concentración del anticuerpo se determinó mediante ELISA cuantitativo como se ha descrito anteriormente usando una solución madre de IgG<sub>1</sub> de mieloma comercial como patrón. Los tipos de cadena pesada de los mAb se determinaron mediante ELISA usando el kit de isotipado de anticuerpos monoclonales (Sigma, ISO-2).

**Ejemplo 9: Anticuerpo monoclonal anti-S1P humanizado - SPHINGOMAB**

- 40 Este ejemplo describe un anticuerpo monoclonal humanizado particularmente preferido específicamente reactivo con S1P denominado LT1009. En comparación con el anticuerpo anti-s1P murino del que procedió el LT1009, la forma humanizado exhibe una afinidad de unión a S1P en el rango picomolar, así como una estabilidad superior y eficacia *in vivo*.

- 45 Como con los anticuerpos de origen natural, LT1009 incluye tres regiones determinantes de la complementariedad (cada una "CDR") en cada uno de los polipéptidos de la cadena ligera y cada uno de los polipéptidos de la cadena pesada que comprenden cada molécula de anticuerpo. Las secuencias de aminoácidos para cada una de estas seis CDR se proporciona a continuación ("VL" designa la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina, mientras que "VH" designa la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina):

- 50 CDR1 VL: ITTTDIDDDMN [SEC ID N° 1]  
 CDR2 VL: EGNILRP [SEC ID N° 2]  
 CDR3 VL: LQSDNLPFT [SEC ID N° 3]  
 CDR1 VH: DHTIH [SEC ID N° 4]  
 CDR3 VH: GGFYGSTIWFDF [SEC ID N° 5]  
 CDR2 VH: AISPRHDITKYNEMFRG [SEC ID N° 6]

- 55 Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los polipéptidos de las cadenas pesada y ligera de LT1009 se enumeran a continuación:

Secuencia nucleotídica de LT1009 HC [SEC ID N° 7]:

1 aagettgccg ccaccatgga atggagetgg gtgttcoctgt tttttctgtc  
51 cgtgaccaca ggcggtgcatt ctgaggtgca gctgggtgcag tctggagcag  
101 aggtgaaaaa gcccggggag tctctgaaga tctcctgtca gagttttgga  
151 tacatcttta togaccatac tattcaactgg atgegocaga tgccccgggca  
201 aggcctggag tggatggggg ctatttetec cagacatgat attactaaat  
251 acaatgagat gttcaggggc caggteacca tctcagccga caagtccagc  
301 agcaccgcct acttgcaagt gagcagcctg aaggcctcgg acaccgccat  
351 gtatctctgt gcgagagggg ggttctacgg tagtactatc tggtttgact  
401 tttggggcca agggacaatg gtcaccgtct ctccagcctc caccaagggc  
451 ccatcgggtct tccccctggc accctectec aagagcacct ctggggggcac  
501 agcgggcctg ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccgggtgacgg  
551 tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggct  
601 gtccctadagt cctcaggact ctactcctc agcagcgtgg tgaccgtgcc  
651 ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc  
701 ccagcaaacac caaggtggac aagagagttg gtgagaggcc agcacagggg  
751 gggaggggtgt ctgctggaag ccaggctcag cgtctctgcc tggacgcctc  
801 ccggetatgc agtcccagtc cagggcagca aggcaggccc cgtctgcctc  
851 ttcacccgga ggctctctgc cgcctcctc atgctcaggg agagggctct  
901 ctggcttttt cccaggtctc tgggcaggca caggetaggt gccctaac  
951 cagggcctgc acacaaaggg gcagggtgctg ggctcagacc tgccaagagc  
1001 catatccggg aggacctgc cctgacctc agccccccc aaaggccaaa  
1051 ctctccaact cctcagctcg gacacctct ctctcccag attccagtaa  
1101 ctcccaatct tctctctgca gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca  
1151 tgccccccgt gccaggtaa gccagcccag gctctgccc ctagctcaag  
1201 gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag gccccagccg  
1251 ggtgctgaca cgtccacctc catctctctc tcagcacctg aactcctggg  
1301 gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga  
1351 tetccccgac cctgaggte acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa  
1401 gacctgagg tcaagttcaa ctggtagctg gacggcgtgg aggtgcataa  
1451 tgccaagaca aagccggggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg  
1501 tcagcgtcct caccgtctc caccaggact ggctgaatgg caaggagtac  
1551 aagtgcaagg tetccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacct  
1601 ctccaaagcc aaaggtggga cccgtggggg gcgagggcca catggacaga  
1651 ggccggctcg gccaccctc tgccctgaga gtgaccgctg tacciaacctc  
1701 tgtccctaca gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat  
1751 cccgggagga gatgaccaag aaccaggtea gctgacctg cctggtcaaa  
1801 ggcttctatc ccagcgacat cgcctgggag tgggagagca atgggcagcc

ES 2 398 919 T3

1851 ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct  
1901 tcttcctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg  
1951 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac  
2001 gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atag

Secuencia de aminoácidos de LT1009 HC [SEC ID N° 8]:

1 mewswvflff lsvttgvhse vqlvqsgaev kkpgeslkis cqsfgyifid  
51 htihwmrqpmp gqglewmgai sprhditkyn emfrgqvttis adkssstayl  
101 qwsslkasdt amyfcarggf ygstiwfdfw gqgtmvtvss astkgpsvfp  
151 lapsskstsg gtaalgclvk dyfpepvtvs wnsgaltsgv htfpavlqss  
201 glyslssvvt vpssslgtqt yicnvnhkps ntkvdkrvap ellggpsvfl  
251 fppkpkdtlm isrtpevtcv vvdvshedpe vkfnwyvdgv evhnaktkpr  
301 eeqynstyrv vsvltvlhqd wlngkeykck vsnkalpapi ektiskakgq  
351 prepqvytlp psreemtknq vsltclvkqf ypsdiavewe sngqpennyk  
401 ttppvldsdg sfflyskltv dksrwqqgnv fscsvmheal hnhytqksls  
451 lspgk

Secuencia nucleotídica de LT1009 LC [SEC ID N° 9]:

1 aagcttgccg ccaccatgtc tgtgectacc caggtgctgg gactgctgct  
51 gctgtggctg acagacgcc cctgtgaaac gacagtgacg cagtctccat  
101 ccttcctgtc tgcattctgta ggagacagag tcaccatcac ttgcataacc  
151 accactgata ttgatgatga tatgaactgg ttccagcagg aaccagggaa  
201 agcccctaag ctctgatct ccgaaggcaa tattcttcgt cctggggctc  
251 catcaagatt cagcagcagt ggatatggca cagatttcac tctcaccatc  
301 agcaaattgc agcctgaaga ttttgcaact tattactggt tgcagagtga  
351 taacttacca ttcactttcg gcccaaggac caagctggag atcaaacgta  
401 cgggtggctgc accatctgtc ttcattcttc cgccatctga tgagcagttg  
451 aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag  
501 agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctcaa tcgggtaact  
551 cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc  
601 agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta  
651 cgctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct  
701 tcaacagggg agagtgttag

5

Secuencia de aminoácidos de LT1009 LC [SEC ID N° 10]:



1 msvptqvlgl lllwltarc ettvtqspfs lsasvgdrvt itcitttdid  
 51 ddmnwfqgqp gkapkllise gnrlrpgvps rfsssgygtf ftltisklqp  
 101 edfatyyclq sdnlpftfgg gtkleikrtv aapsvfifpp sdeqlksgta  
 151 svvcllnnfy preakvqkv dnalqsgnsq esvteqdskd styslsstlt  
 201 lskadyekhk vyacevthgg lsspvtksfn rgec

Listado de secuencias

5 <110> LPATH, INC.  
 <120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE  
 AFECIONES FIBRÓTICAS, INFLAMATORIAS Y DE NEOVASCULARIZACIÓN  
 10 <130> LPT-3100-PC3  
 <140>  
 <141>  
 15 <150> 11/261.935  
 <151> 28-10-2005  
 <160> 10  
 20 <170> PatentIn Ver. 3.3  
 <210> 1  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Anticuerpo de ratón humanizado artificial  
 30 <400> 1  
 Ile Thr Thr Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met Asn  
 1 5 10  
 <210> 2  
 <211> 7  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Anticuerpo de ratón humanizado artificial  
 40 <400> 2  
 Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro  
 1 5  
 45 <210> 3  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Anticuerpo de ratón humanizado artificial  
 <400> 3

ES 2 398 919 T3

Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Phe Thr  
1 5

5 <210> 4  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Anticuerpo de ratón humanizado artificial  
<400> 4

Asp His Thr Ile His  
1 5

15 <210> 5  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Anticuerpo de ratón humanizado artificial  
<400> 5

25 Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Thr Ile Trp Phe Asp Phe  
1 5 10

30 <210> 6  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Anticuerpo de ratón humanizado artificial  
<400> 6

Ala Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe Arg  
1 5 10 15

Gly

40 <210> 7  
<211> 2034  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Anticuerpo de ratón humanizado artificial  
<400> 7

```

aagcttgccg ccaccatgga atggagctgg gtgttcctgt tctttctgtc cgtgaccaca 60
ggcgtgcatt ctgaggtgca gctgggtgcag tctggagcag aggtgaaaaa gcccggggag 120
tctctgaaga tctcctgtca gagttttgga tacatcttta tcgaccatac tattcactgg 180
atgcgccaga tgcccgggca aggcctggag tggatggggg ctatctctcc cagacatgat 240
attactaaat acaatgagat gttcaggggc caggtcacca tctcagccga caagtccagc 300
agcaccgcct acttgagctg gagcagcctg aaggcctcgg acaccgccat gtatctctgt 360
gcgagagggg ggttctacgg tagtactatc tggtttgact tttggggcca agggacaatg 420
gtcaccgtct cttcagcctc caccaagggc ccacgcgtct tcccctggc accctcctcc 480
aagagcacct ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 540
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgct 600
gtcctacagt cctcaggact ctactcctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 660
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaaag ccagcaacac caaggtggac 720
aagagagttg gtgagaggcc agcacaggga gggaggggtg ctgctggaag ccaggctcag 780
cgctcctgcc tggacgcctc cgggctatgc agtcccagtc cagggcagca aggcaggccc 840
cgtctgcctc ttcacccgga ggctctctcc cgccccactc atgctcaggg agagggctct 900
ctggcttttt ccccaggctc tgggcaggca caggctaggt gcccctaacc caggccctgc 960
acacaaaggg gcaggtgctg ggctcagacc tgccaagagc catatccggg aggaccctgc 1020
ccctgacctc agcccacccc aaaggccaaa ctctccactc cctcagctcg gacaccttct 1080
ctcctcccag attccagtaa ctcccattct tctctctgca gagcccaaat cttgtgacaa 1140
aactcacaca tgcccaccgt gccaggtaa gccagcccag gcctcgccct ccagctcaag 1200
gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag gcccagccg ggtgctgaca 1260
cgtccacctc catctcttcc tcagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct 1320
tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg 1380
tggtggacgt gagccaagaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtagctg gacggcgtgg 1440
aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg 1500
tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgaagg 1560
tctccaacaa agccctcca gcccccactc agaaaaccat ctccaaagcc aaaggtggga 1620
cccgtggggg gcgagggcca catggacaga ggccggctcg gccaccctc tgccctgaga 1680
gtgaccgctg taccaacctc tgtccctaca gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1740
ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gctgacctg cctggtcaaa 1800
ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1860
tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctc tagcaagctc 1920
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1980
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atag 2034

```

<210> 8

<211> 455

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Anticuerpo de ratón humanizado artificial

10

<400> 8

```

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1                               5                               10                               15
Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
                20                               25                               30
Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Ser Phe Gly Tyr Ile Phe
          35                               40                               45

```

ES 2 398 919 T3

Ile Asp His Thr Ile His Trp Met Arg Gln Met Pro Gly Gln Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Met Gly Ala Ile Ser Pro Arg His Asp Ile Thr Lys Tyr Asn  
65 70 75 80

Glu Met Phe Arg Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ser Ser  
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met  
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Phe Tyr Gly Ser Thr Ile Trp Phe Asp  
115 120 125

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
145 150 155 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Ala Pro  
225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
340 345 350

ES 2 398 919 T3

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
 355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
 420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455

5 <210> 9  
 <211> 720  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Anticuerpo de ratón humanizado artificial

<400> 9

aagcttgccg ccaccatgtc tgtgcctacc caggtgctgg gactgctgct gctgtggctg 60  
 acagacgccc gctgtgaaac gacagtgacg cagtctccat ccttcctgtc tgcactctgta 120  
 ggagacagag tcaccatcac ttgcataaacc accactgata ttgatgatga tatgaactgg 180  
 ttccagcagg aaccagggaa agcccctaag ctctctgatct ccgaaggcaa tattcttcgt 240  
 cctgggggtcc catcaagatt cagcagcagt ggatatggca cagatttcac tctcaccatc 300  
 agcaaattgc agcctgaaga ttttgcaact tattactggt tgcagagtga taacttacca 360  
 ttcaactttcg gccaaaggac caagctggag atcaaacgta cggtaggctgc accatctgtc 420  
 ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgectg 480  
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 540  
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600  
 agcagcacc tgcagctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctcgaa 660  
 gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720

15 <210> 10  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Anticuerpo de ratón humanizado artificial

<400> 10

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr  
 1 5 10 15

25

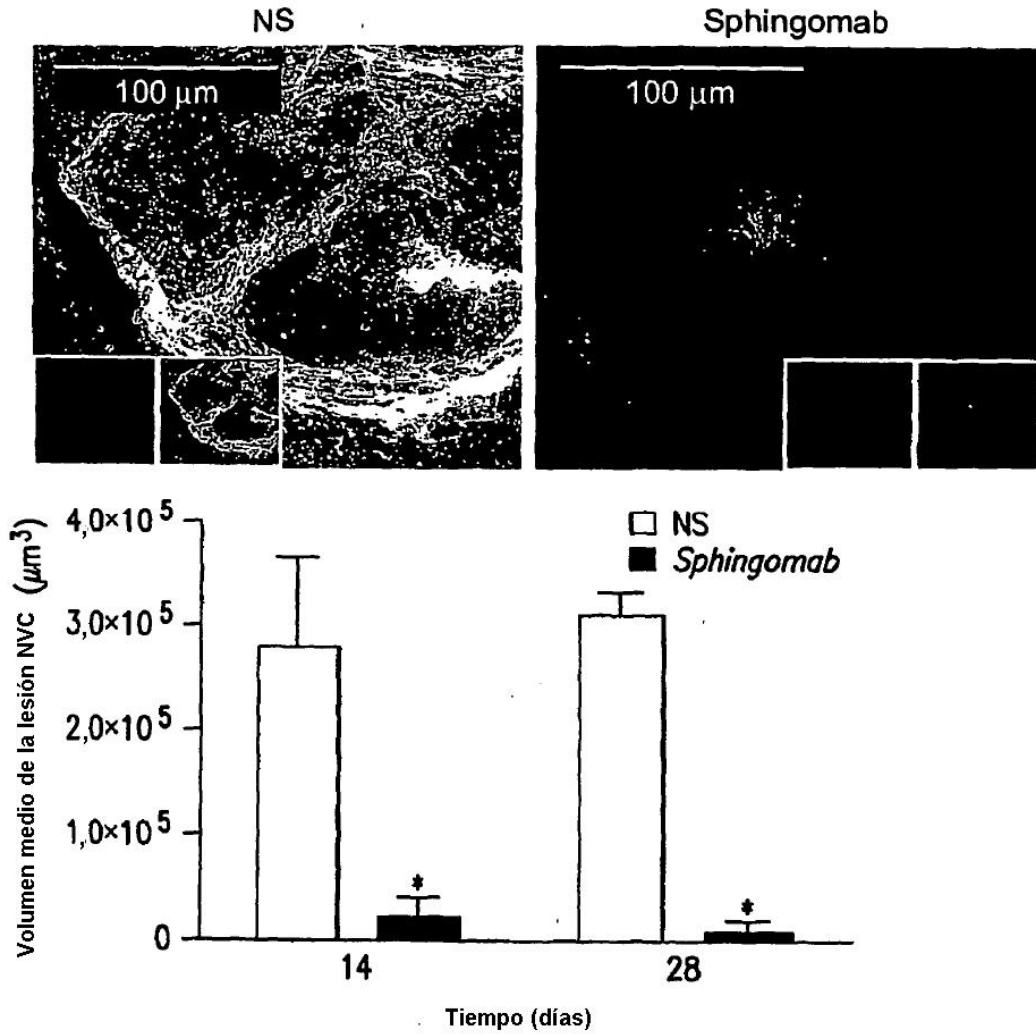
ES 2 398 919 T3

Asp Ala Arg Cys Glu Thr Thr Val Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser  
 20 25 30  
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ile Thr Thr Thr Asp  
 35 40 45  
 Ile Asp Asp Asp Met Asn Trp Phe Gln Gln Glu Pro Gly Lys Ala Pro  
 50 55 60  
 Lys Leu Leu Ile Ser Glu Gly Asn Ile Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser  
 65 70 75 80  
 Arg Phe Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 85 90 95  
 Lys Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Asp  
 100 105 110  
 Asn Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 115 120 125  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 165 170 175  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal humanizado, o un fragmento, variante o derivado del mismo, que se une y neutraliza un lípido bioactivo o precursor o metabolito de lípido bioactivo, en el que el lípido bioactivo, el precursor o metabolito de lípido bioactivo es esfingosina-1-fosfato (S1P) o un precursor o metabolito de S1P, para usar en un procedimiento para disminuir la concentración eficaz de dicho lípido bioactivo en un ojo de un animal con el fin de
- 10 (i) tratar o prevenir la fibrogénesis aberrante, fibrosis o cicatrización en el ojo,  
(ii) modular las respuestas de cicatrización de heridas quirúrgica o traumática en el ojo,  
(iii) disminuir o prevenir la inflamación en el ojo,  
(iv) disminuir o prevenir la neovascularización aberrante del ojo,  
(v) atenuar una respuesta inmunitaria ocular en el ojo, o  
(vi) disminuir la concentración ocular eficaz o la actividad del lípido bioactivo, el precursor o metabolito del lípido bioactivo con el fin de tratar o prevenir una enfermedad o afección ocular que se caracteriza, al menos en parte, por fibrogénesis aberrante, fibrosis, cicatrización, inflamación, neovascularización aberrante o una respuesta inmunitaria en el ojo.
- 15 2. Un anticuerpo monoclonal humanizado, o un fragmento, variante o derivado del mismo, como se define en la reivindicación 1, en el que el animal es un ser humano.
- 20 3. Un anticuerpo monoclonal humanizado, o fragmento, variante o derivado del mismo como se define en la reivindicación 1 para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en el que (i) la enfermedad o afección ocular caracterizada, al menos en parte, por neovascularización aberrante se selecciona del grupo que consiste en degeneración macula relacionada con la edad, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, rechazo de injerto corneano, glaucoma neovascular, sobredesgaste por lentes de contacto, infecciones de la córnea, incluida la infección por herpes simple, infección por herpes zoster e infección por protozoos; pterigión, retinopatía isquémica, enfermedad venooclusiva retiniana, uveítis infecciosa, desprendimiento crónico de retina, lesión por láser, retinopatía por drepanocitosis, enfermedad venooclusiva, neovascularización coroidea, proliferación angiomasosa retiniana y vasculopatía coroidea polipoidal idiopática; o (ii) la enfermedad o afección ocular caracterizada, al menos en parte, por fibrogénesis o fibrosis o cicatrización aberrante se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, retinopatía por drepanocitosis, retinopatías isquémicas, enfermedad venooclusiva retiniana, arruga macular, retinopatía en celofán, formación de MER, sobredesgaste por lente de contacto, desprendimiento de retina por tracción, vitreoretinoptía proliferativa, lesión traumática, penfigoide cicatricial ocular, síndrome de Stevens Johnson, necrólisis epidérmica tóxica, pterigión y consecuencias de la cirugía ocular, incluida la cirugía refractaria, vitrectomía y cirugía de glaucoma.
- 25 4. Un anticuerpo monoclonal humanizado, o fragmento, variante o derivado del mismo como se define en la reivindicación 1 para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la enfermedad o afección ocular es una afección inflamatoria o inmunológica, opcionalmente una afección inflamatoria o inmunológica seleccionada del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad, uveítis, vitritis, infecciones, incluida la infección por herpes simple, infección por herpes zoster e infección por protozoos; rechazo de injerto corneado e histoplasmosis ocular.
- 30 5. Un anticuerpo monoclonal humanizado, o fragmento, variante o derivado del mismo como se define en la reivindicación 1 para usar de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo monoclonal humanizado, o fragmento, variante o derivado de un anticuerpo monoclonal es para administrar sistémicamente, tópicamente, mediante inyección intravítrea o periocular, iontoforesis, pulverización o gotas, o como parte de un gel in situ, inserto ocular, escudo corneano o lentes de contacto, liposoma, niosoma/discoma, sistema mucoadhesivo, sistema de vehículo liofilizado, partículas, emulsión en submicrómetros, dendrímero, microesfera, nanoesfera o colosoma, o combinación de los mismos.
- 35 6. Un anticuerpo monoclonal humanizado, o fragmento, variante o derivado del mismo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo monoclonal humanizado, o fragmento, variante o derivado de un anticuerpo monoclonal está modificado, no está modificado o es proporcionado como profármaco, con o sin potenciadores y/o potenciadores de la penetración.
- 40 7. Un anticuerpo monoclonal humanizado, o fragmento, variante o derivado del mismo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo monoclonal humanizado, o fragmento, variante o derivado de un anticuerpo monoclonal está combinado con un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o solución salina tamponada con fosfato.
- 45 50

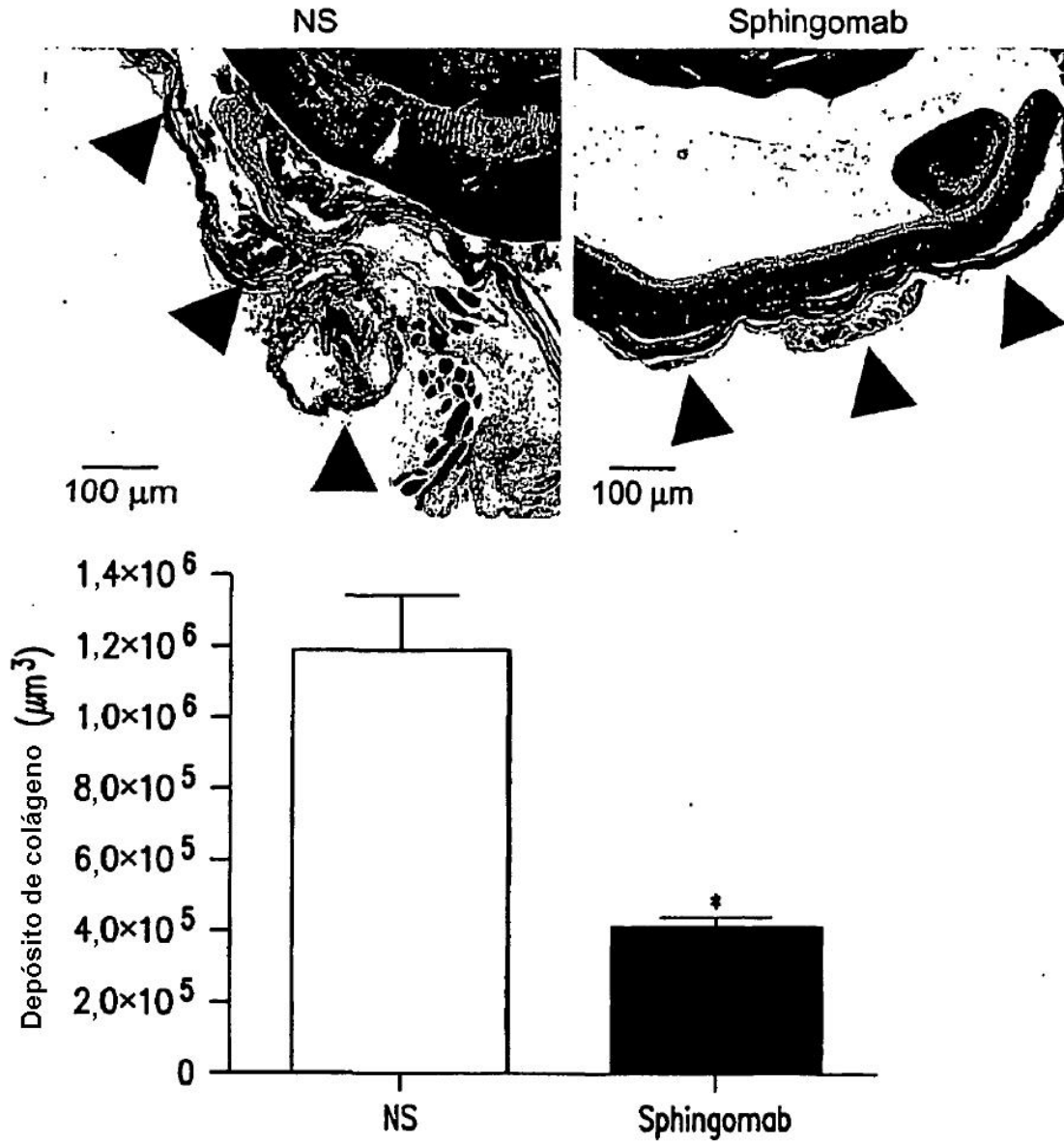
**Spingomab inhibe la formación de lesión de NVC en un modelo murino de rotura de la membrana de Bruch inducida por láser**



**FIG. 1A**



**SPHINGOMAB inhibe el depósito de colágeno en un modelo murino de rotura de la membrana de Bruch inducida por láser**



**FIG.1B**

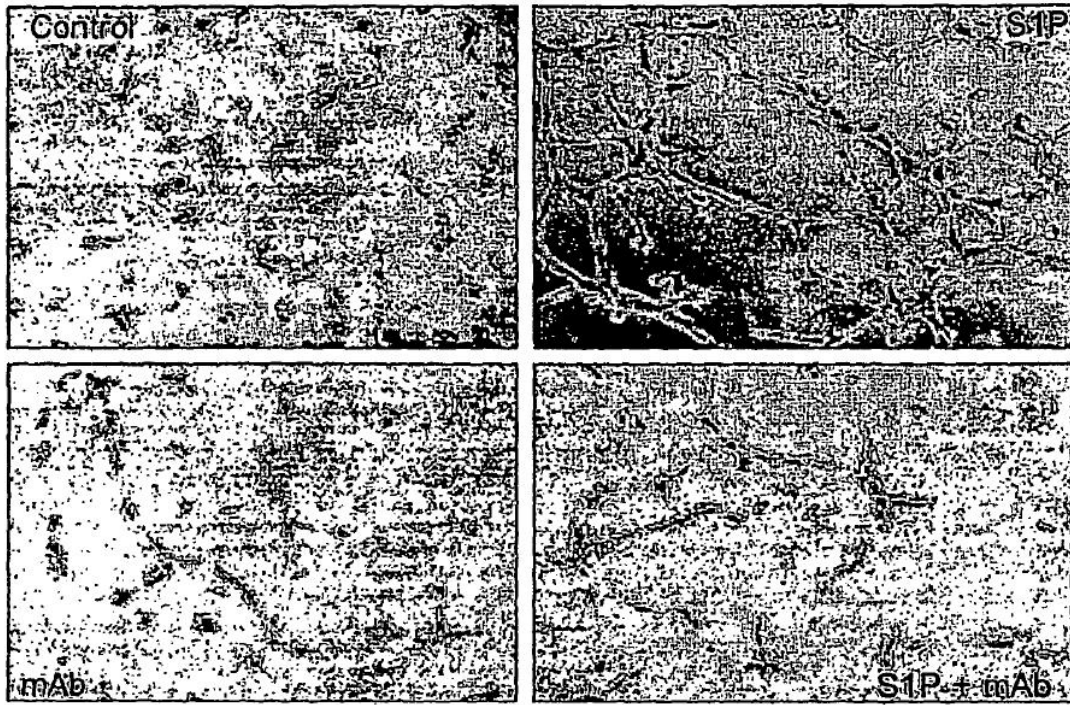


FIG.2A

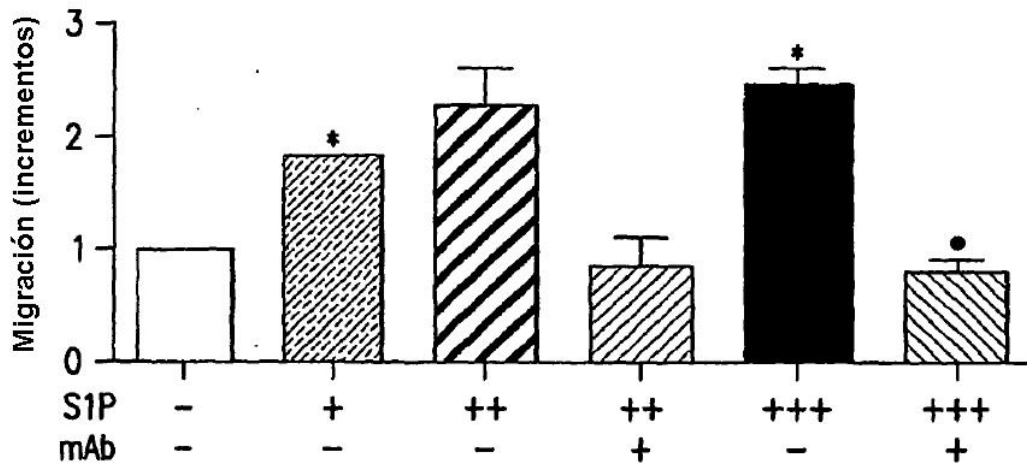


FIG.2B

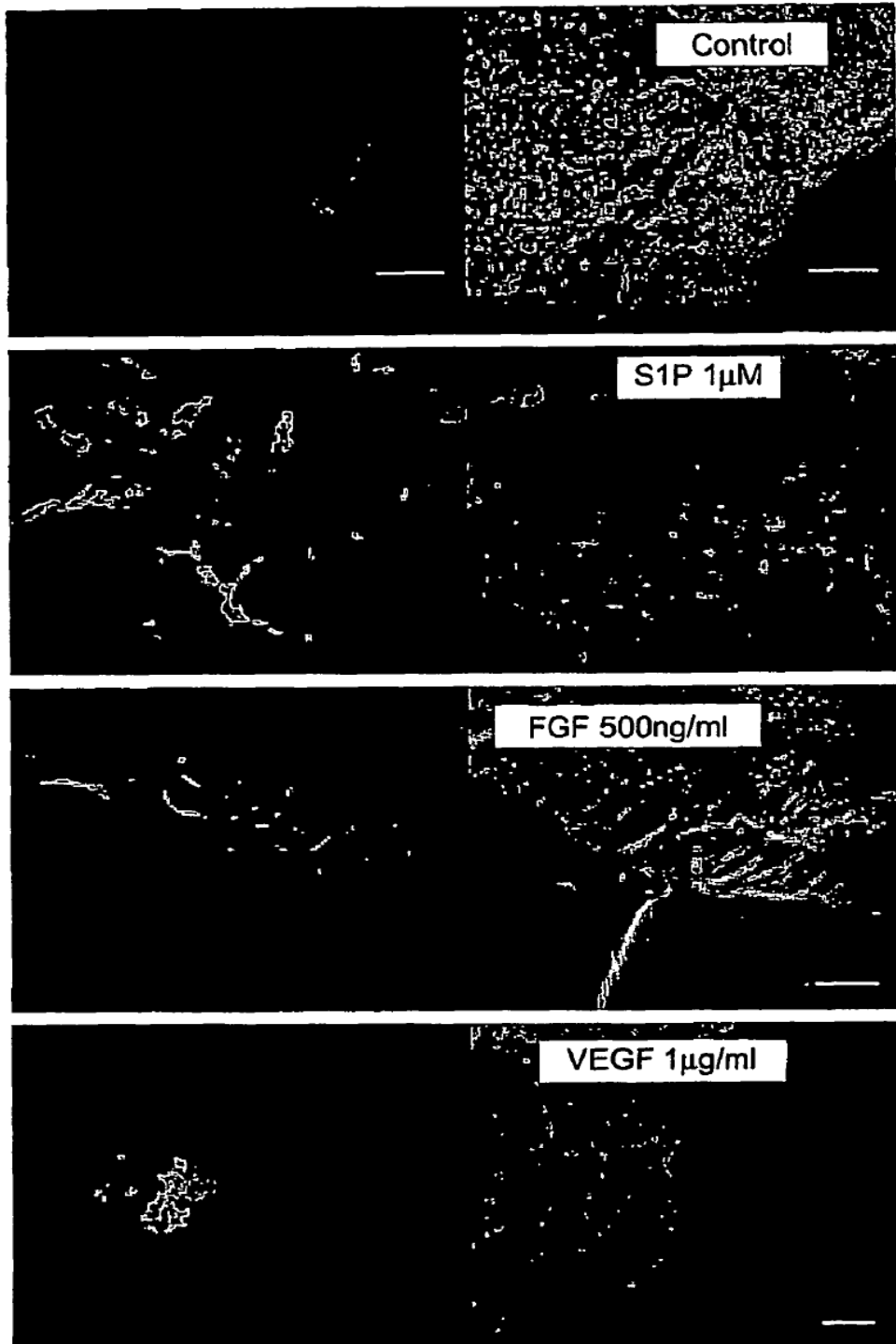


FIG.3A

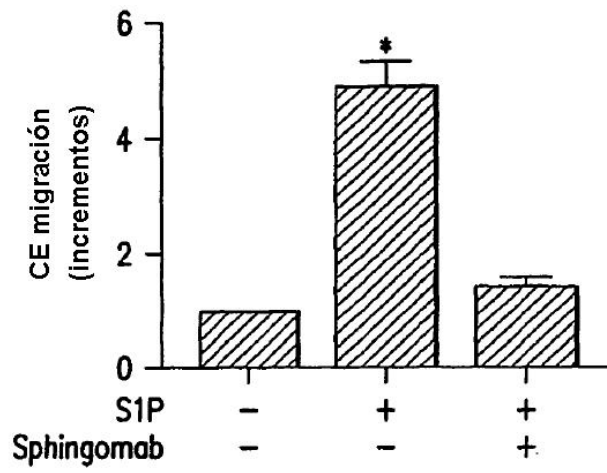


FIG.3B

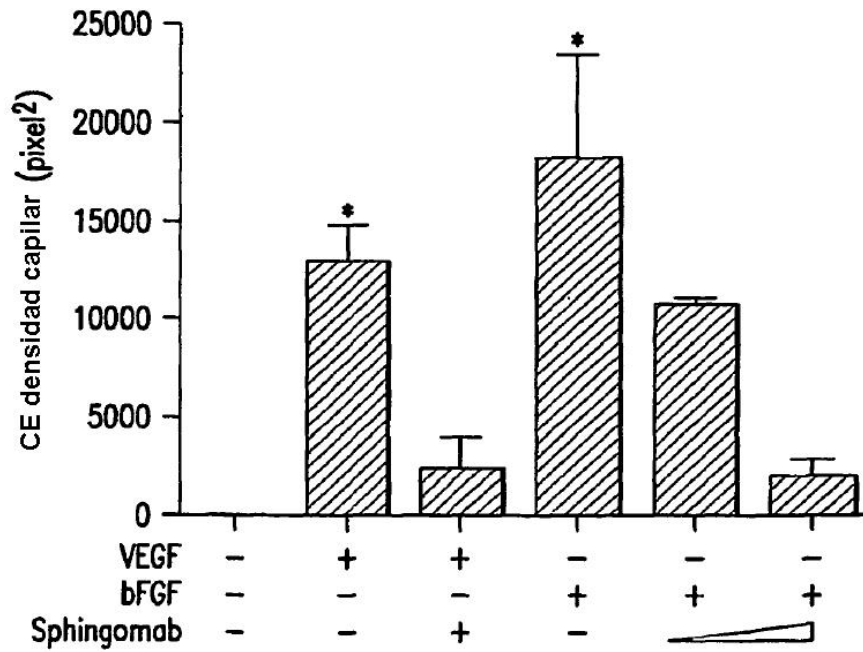


FIG.3C

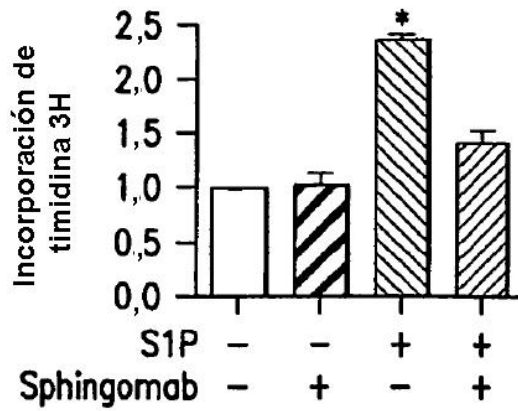


FIG.4A

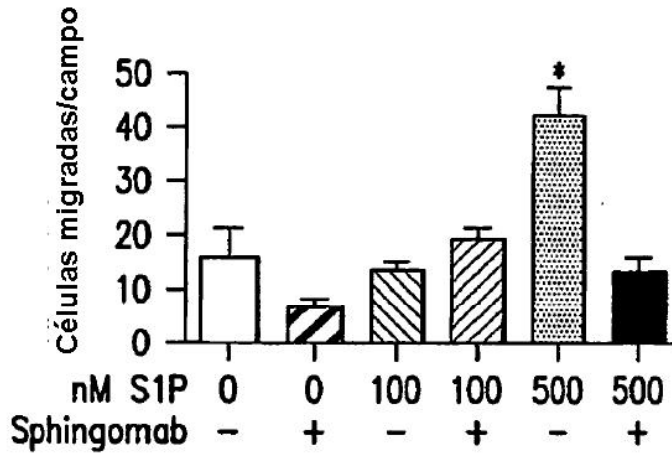


FIG.4B

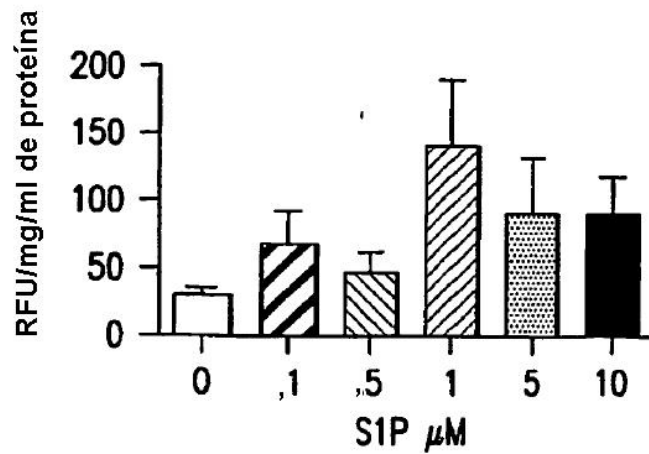


FIG.4C

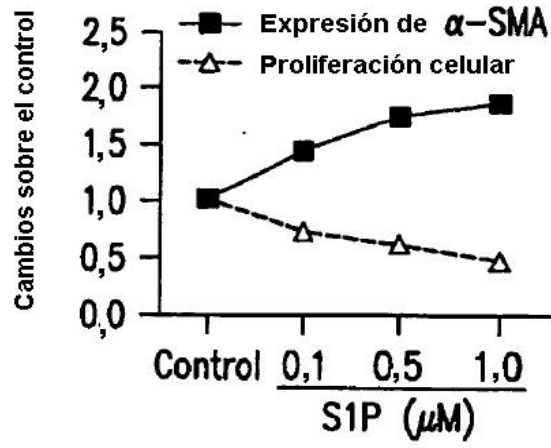


FIG.4D

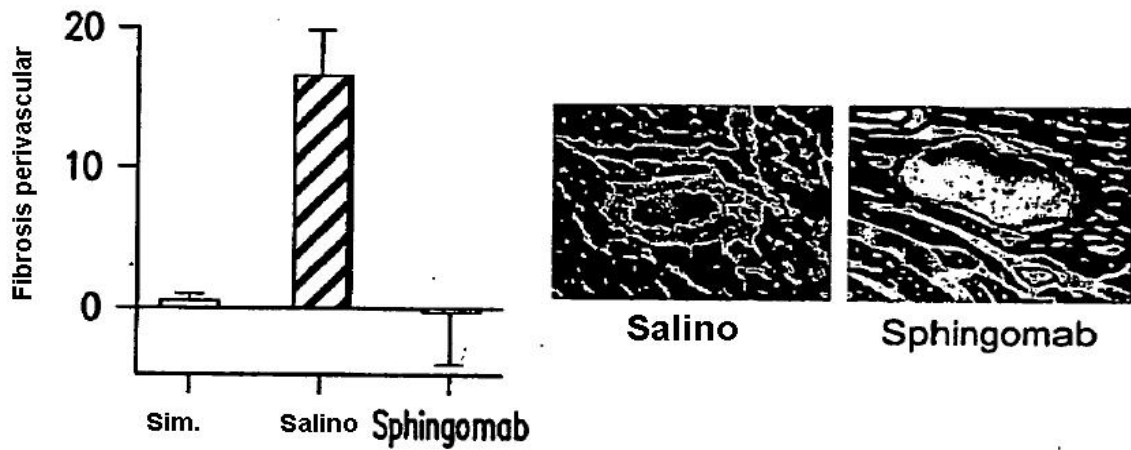


FIG.4E

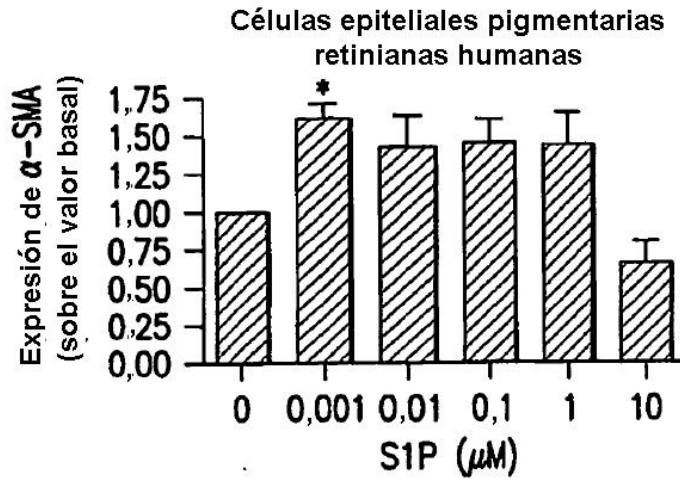


FIG.5A

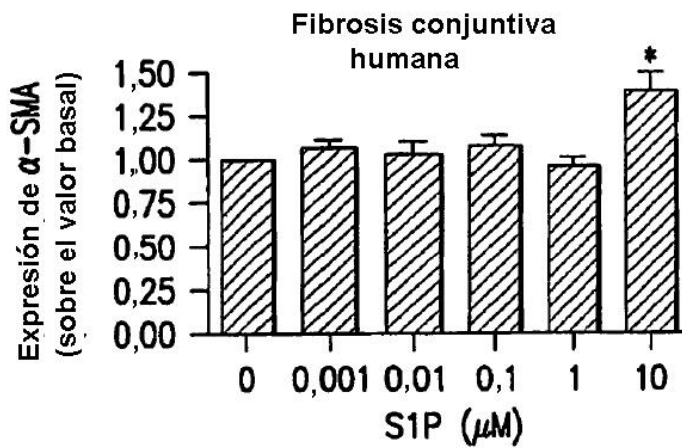


FIG.5B

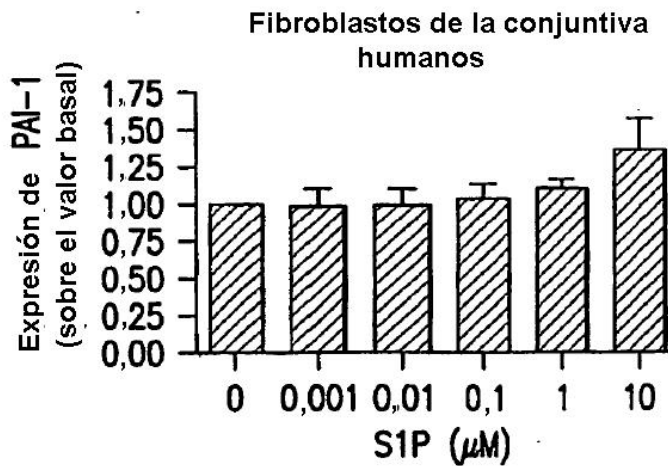
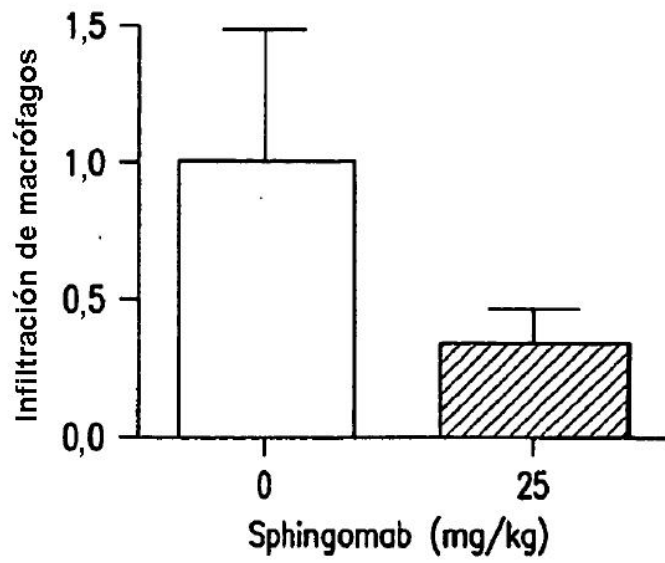
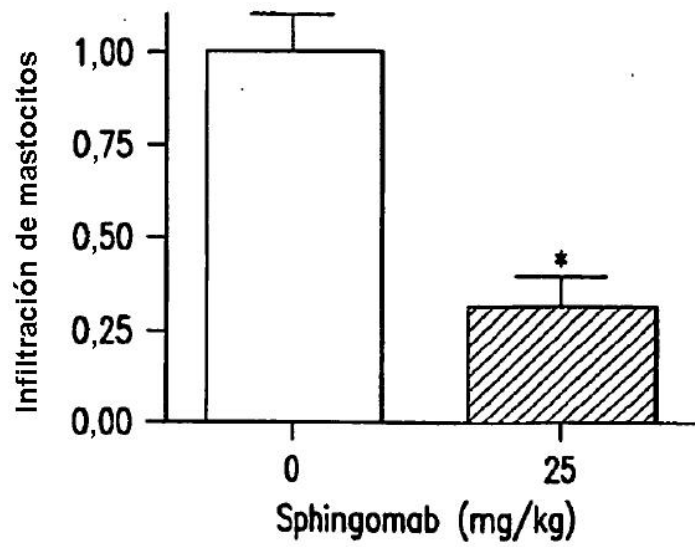


FIG.5C



**FIG.6A**



**FIG.6B**



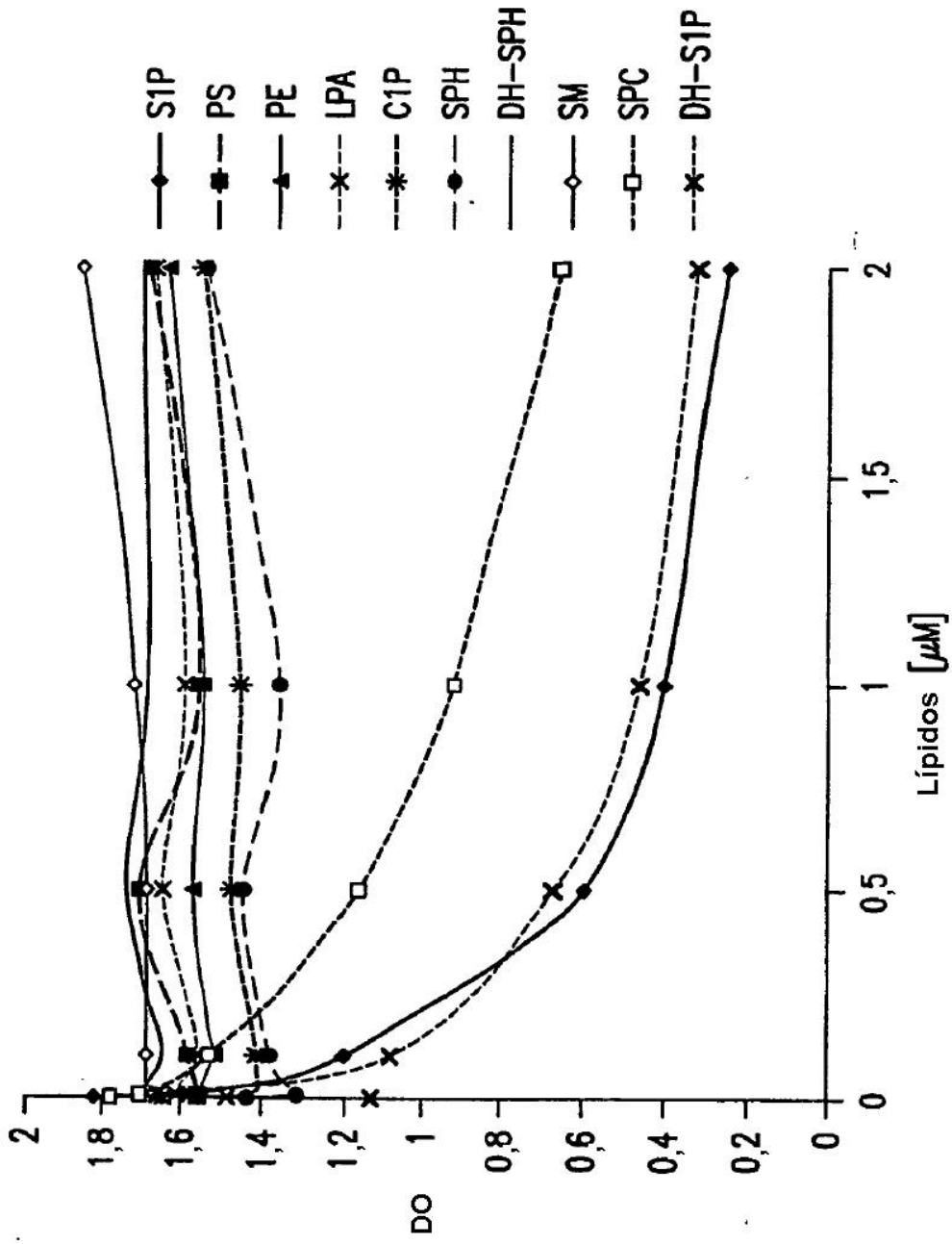


FIG.7