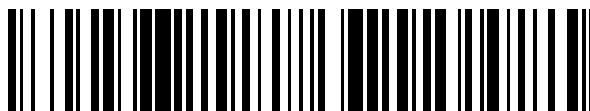


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 656**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2004 E 04735259 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 1638591**

54 Título: **Agonistas de SLRP de clase III para la reducción de la formación de vasos sanguíneos**

30 Prioridad:

**29.05.2003 GB 0312292**

**12.01.2004 GB 0400547**

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

**21.06.2013**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF MANCHESTER (100.0%)  
OXFORD ROAD  
MANCHESTER M13 9PL, GB**

72 Inventor/es:

**BISHOP, PAUL, N.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 408 656 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

Agonistas de SLRP de clase III para la reducción de la formación de vasos sanguíneos

- 5 La presente invención se refiere a medicamentos para la inhibición de la formación de vasos sanguíneos, y para el tratamiento y/o la prevención de una afección caracterizada por la formación excesiva de vasos sanguíneos. Además proporciona medicamentos para la prevención y/o el tratamiento de afecciones caracterizadas por la actividad y/o migración excesivas de monocitos y/o macrófagos.
- 10 La formación de nuevos vasos sanguíneos aparece en principio como resultado de la angiogénesis (un crecimiento a partir de vasos sanguíneos existentes) y vasculogénesis *in situ* (la diferenciación de células precursoras en redes de vasos sanguíneos). En muchos contextos, la formación de nuevos vasos sanguíneos tiene un papel importante en el aporte de oxígeno y nutrientes a los tejidos dañados o en desarrollo, sin embargo también hay muchas afecciones patológicas asociadas con la formación de nuevos vasos sanguíneos.
- 15 Los ejemplos de enfermedades asociadas con la formación de nuevos vasos sanguíneos incluyen el cáncer, donde el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos está asociado con el crecimiento tumoral y la propagación, las retinopatías vasoproliferativas que incluyen la retinopatía diabética proliferativa, la retinopatía del prematuro y la retinopatía de células falciformes, la degeneración macular húmeda y otras formas de neovascularización coroidea, psoriasis, y muchas afecciones inflamatorias tales como la artritis.
- 20 Las retinopatías vasoproliferativas, en las que el ojo es objeto del incremento patológico de la vascularización, constituyen una de las causas que conducen al déficit visual y ceguera en el mundo occidental. La retinopatía diabética proliferativa se caracteriza por hemorragia vítrea, desprendimiento de retina, glaucoma neovascular y la consiguiente pérdida de visión.
- 25 La actividad y/o la migración excesivas de monocitos y/o macrófagos forman parte del proceso de angiogénesis patológica y, además, está asociada con muchas afecciones inflamatorias. Los ejemplos de tales afecciones incluyen choque séptico, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria del intestino y artritis reumatoide. La actividad y/o la migración excesivas de células del linaje de los monocitos/macrófagos son responsables de muchos de los efectos perjudiciales asociados con tales afecciones. Por ejemplo, en la artritis reumatoide la actividad de los macrófagos contribuye de forma importante a la destrucción de los tejidos articulares y huesos asociada con esta enfermedad.
- 30 Debido a la cantidad de contextos en los que la formación de nuevos vasos sanguíneos se puede considerar no deseable, existe la necesidad de nuevos agentes capaces de inhibir la formación de vasos sanguíneos.
- 35 También existe la necesidad de agentes capaces de prevenir y/o tratar afecciones asociadas con el exceso de actividad y/o la migración de monocitos y/o macrófagos.
- 40 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un agente que promueve la actividad de pequeños proteoglicanos/proteínas repetidos ricos en leucina de clase III (SLRP de clase III) en la fabricación de un medicamento para la inhibición de la formación de vasos sanguíneos.
- 45 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona el uso de un agente que promueve la actividad de pequeños proteoglicanos/proteínas repetidos ricos en leucina de clase III (SLRP de clase III) en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de afecciones caracterizadas por la actividad y/o la migración excesivas de monocitos y/o macrófagos.
- 50 La expresión "agente que promueve la actividad de los SLRP de clase III", como se usa en la presente solicitud, engloba los SLRP de clase III *per se*; fragmentos biológicamente activos de SLRP de clase III; derivados de SLRP de clase III; y también agentes que imitan la actividad de los SLRP de clase III, como se define en las reivindicaciones.
- 55 Las referencias a "monocitos y/o macrófagos" se tienen que tomar, excepto cuando el contexto dicte otra cosa, para englobar todos los tipos celulares derivados del linaje celular de monocitos/macrófagos. En particular, se considera que este término engloba los hialocitos.
- 60 El inventor ha descubierto que los miembros de la familia de los pequeños proteoglicanos/proteínas repetidos ricos en leucina (SRLP) de clase III, tales como la opticina (un SLRP de clase III que se identificó en primer lugar asociado con las fibrillas de colágeno en el humor vítreo, y que también tiene muchos de los efectos perjudiciales asociados con tales afecciones. Por ejemplo, en la artritis reumatoide, la actividad de los macrófagos es de los contribuyentes más importantes a la destrucción del tejido articular y óseo asociada con esta enfermedad.
- 65 Debido a la cantidad de contextos en los que la formación de nuevos vasos sanguíneos puede considerarse no deseable, sigue existiendo la necesidad de nuevos agentes capaces de inhibir la formación de vasos sanguíneos.

También existe la necesidad de agentes capaces de prevenir y/o tratar afecciones asociadas con el exceso de actividad y/o migración de monocitos y/o macrófagos.

5 Los documentos WO 98/24466 y US 2002/115589 se refieren a la prevención de trastornos proliferativos asociados con un exceso de proliferación de fibroblastos y el depósito excesivo de matriz extracelular. Estas solicitudes de patente sugieren que tales afecciones se pueden prevenir con el uso de agentes capaces de secuestrar (o modular de otra manera) el TGF- $\beta$ , e identifican el epificano como ejemplo de tales agentes.

10 Pellegrini et al. ("Cloning and characterization of opticin cDNA: evaluation as a candidate for oculo-skeletal dysplasia" Gene, vol. 282, n°. 1-2, páginas 121-131) tratan la patología de la displasia oculoesquelética (OSD) en perros, y relaciona la expresión genética de la opticina con la enfermedad. La opticina se excluye como gen candidato causante de OSD, pero se sugiere como candidato para el diagnóstico de otros trastornos que dan como resultado displasia vítrea.

15 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de un SLRP de clase III, o un agente que promueve la actividad de SLRP de clase III, seleccionado del grupo que comprende:

- a) opticina; o
- 20 b) epificano; o
- c) mimecano (también conocido como osteoglicina); o
- d) una molécula quimérica que comprende elementos de cualquiera de a) a c); o
- e) un fragmento biológicamente activo de cualquiera de a) a d); o
- f) un derivado peptoide biológicamente activo, derivado D-aminoacídico, o derivado de híbrido péptido-peptoide de cualquiera de a) a e) que tenga una mayor semivida *in vivo*; o
- 25 g) un sistema de liberación que comprende una molécula de ADN que codifica cualquiera de a) a e)

en la fabricación de un medicamento para la inhibición de la formación de vasos sanguíneos.

30 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona el uso de un SLRP de clase III, o un agente que promueve la actividad de SLRP de clase III, seleccionado del grupo que comprende:

- a) opticina; o
- b) epificano; o
- 35 c) mimecano (también conocido como osteoglicina); o
- d) una molécula quimérica que comprende elementos de cualquiera de a) a c); o
- e) un fragmento biológicamente activo de cualquiera de a) a d); o
- f) un derivado peptoide biológicamente activo, derivado D-aminoacídico, o derivado de híbrido péptido-peptoide de cualquiera de a) a e) que tenga una mayor vida media *in vivo*; o
- 40 g) un sistema de liberación que comprende una molécula de ADN que codifica cualquiera de a) a e)

en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de afecciones caracterizadas por una actividad y/o la migración excesivas de monocitos y/o macrófagos.

45 La expresión "agente que promueve la actividad de SLRP de clase III", como se usa en la presente solicitud, engloba los SLRP de clase III *per se*; fragmentos biológicamente activos de SLRP de clase III; y también agentes que imitan la actividad de los SLRP de clase III.

50 Las referencias a "monocitos y macrófagos" se deben tomar, excepto donde el contexto dicte otra cosa, para englobar todos los tipos celulares derivados del linaje celular de monocitos/macrófagos. En particular, debe considerarse que esta expresión engloba los hialocitos.

55 El inventor ha descubierto que los miembros de la familia de los pequeños proteoglicanos/proteínas repetidos ricos en leucina (SRLP) de clase III, tales como la opticina (un SLRP de clase III que se identificó al principio asociado con las fibrillas de colágeno del humor vítreo, y que se conoce también como oculoglicano), el epificano y el mimecano (que se conoce también como osteoglicina) son capaces de inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos.

60 Las secuencias de aminoácidos de la opticina (tanto la forma bovina como la humana), del epificano y del mimecano se muestran en la Figura 1. Esta figura también muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos, que ilustra el alto grado de similitud entre los diferentes miembros de la familia de SLRP de clase III.

65 La Figura 2 ilustra (en el panel 2a) un fragmento biológicamente activo liberado tras la escisión del SLRP de clase III opticina por metaloproteasas de la matriz 2 o 9 (MMP-2 o MMP-9). El panel 2b muestra sus secuencias peptídicas dentro de la región NH terminal de la opticina humana y bovina que se prefieren por su actividad anti-angiogénica y la capacidad para afectar a los monocitos/macrófagos. Estas secuencias están muy conservadas entre especies, siendo indicativo este alto grado de conservación de su función biológica. El panel 2c de la Figura 2 ilustra el alineamiento de restos de aminoácidos en la región NH terminal de la opticina derivada de especies diferentes

(vaca, perro, humano y ratón).

Además de sus efectos en la formación de nuevos vasos sanguíneos, los inventores han encontrado también que los SLRP de clase III inhibirán la actividad y la migración de los monocitos y macrófagos. El trabajo llevado a cabo para establecer estos dos hallazgos se describe con más detalle en los Ejemplos y las Figuras que se adjuntan.

Las moléculas quiméricas de SLRP de clase III que comprenden elementos de SLRP de clase III y fragmentos biológicamente activos de los mismos son capaces de inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos *in vitro* e *in vivo*. Aunque sin el deseo de quedar ligado por hipótesis alguna, los inventores creen que los SLRP de clase III inhiben la proliferación y reordenamiento de las células endoteliales vasculares cultivadas en respuesta a factores de crecimiento angiogénicos tales como el factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF o FGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF-2) y el factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF). Estos factores están entre los factores de crecimiento mejor conocidos y más potentes capaces de estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Los inventores han demostrado que los SLRP de clase III de acuerdo con la invención son capaces de unirse a factores de crecimiento tales como VEGF<sub>165</sub> y FGF-2, y creen que esta unión puede secuestrar el factor de crecimiento ligado, previniendo de esta manera la interacción entre el factor de crecimiento ligado con sus correspondientes receptores (tales como VEGF-R2 y FGF-R1). Además, los inventores han mostrado que los SLRP de clase III, tales como la opticina, son capaces de ligarse a los receptores de factores de crecimiento por sí mismos, y se cree que esta unión y la consiguiente reducción de la señalización intracelular de los receptores, puede contribuir adicionalmente a los efectos anti-angiogénicos de las moléculas.

VEGF-R1 y FGF-R2 son receptores importantes en la angiogénesis y, además, median otras importantes actividades biológicas. En particular, se sabe que VEGF-R1 regula la migración celular de monocitos y macrófagos. Los inventores creen que esta unión de los SLRP de clase III al VEGF-R1 puede ser responsable de la capacidad de estos agentes para inhibir la actividad de monocitos/macrófagos y/o la migración y por tanto representan agentes adecuados para el uso de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

A la luz de los resultados tratados en los párrafos anteriores, el experto apreciará que los agentes a usar de acuerdo con la presente invención se pueden seleccionar por su capacidad para unirse a factores de crecimiento angiogénicos o sus receptores, y la capacidad para inhibir la señalización intracelular por receptores de factores de crecimiento angiogénicos.

Los inventores además creen que los SLRP de clase III de acuerdo con la invención también son capaces de inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos por su interacción con integrinas tales como  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha 5\beta 1$ . Esta interacción inhibe la adhesión endotelial, y por tanto previene la diseminación celular y migración necesaria para la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por ejemplo, los inventores han descubierto que el SLRP de clase III opticina contiene un motivo LDV (leucina-ácido aspártico-valina), que representa un posible sitio de reconocimiento para la integrina  $\alpha 1\beta 1$ .

Los inventores han descubierto que los SLRP de clase III son capaces de inhibir la angiogénesis en células endoteliales vasculares cultivadas derivadas de diversos tejidos. Los SLRP de clase III reducen la proliferación celular, la migración y la formación de brotes, y reducen la formación de nuevos vasos sanguíneos como se indica en un ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM). Tomando en su conjunto estos resultados, que representan una prueba clara de las propiedades de anti-neovascularización *in vitro* de los SLRP de clase III, se proporciona una clara indicación de que los agentes de acuerdo con la invención son capaces de inhibir la formación de vasos sanguíneos en una variedad de tejidos *in vivo*.

Además de prevenir la formación de nuevos vasos sanguíneos asociada con enfermedades y otras afecciones perjudiciales, hay ciertos contextos en los que puede ser ventajoso inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos asociada con funciones biológicas normales. Dicha reducción en la formación de nuevos vasos sanguíneos puede servir, por ejemplo, para reducir la disponibilidad de oxígeno, nutrientes y factores de crecimiento aportados por la sangre a células asociadas con un proceso biológico normal en particular, ralentizando de esta manera la velocidad del proceso en cuestión.

Se apreciará que los agentes se pueden usar en la fabricación de medicamentos para la prevención y/o el tratamiento de afecciones caracterizadas por la formación excesiva de vasos sanguíneos, así como en la fabricación de medicamentos para la prevención y/o el tratamiento de afecciones caracterizadas por una actividad y/o migración excesiva de monocitos y/o macrófagos.

Los ejemplos de afecciones caracterizadas por la formación excesiva de vasos sanguíneos incluyen el cáncer (donde la formación de nuevos vasos sanguíneos está asociada con el crecimiento tumoral), retinopatías vasoproliferativas incluyendo retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular húmeda y otras formas de neovascularización coroidea, vítreo primario hiperplásico persistente (VPHP), psoriasis y curación de heridas. Otras afecciones que implican el desarrollo patológico de nuevos vasos sanguíneos en el ojo incluyen neovascularización

subretiniana, neovascularización del iris (que puede conducir a glaucoma), rubeosis, neovascularización corneal y neovascularización retiniana.

5 Las retinopatías vasoproliferativas (RVP) se desarrollan debido al cierre microvascular de la retina y la ausencia de perfusión que da como resultado hipoxia retiniana e isquemia. Se cree que esta hipoxia e isquemia inducen la producción de factores de crecimiento angiogénicos que producen neovascularización prerretiniana y fibrosis, y por consiguiente conducen al desarrollo de las características patológicas de las RVP (que incluyen hemorragia vítrea, desprendimiento de retina, glaucoma neovascular y pérdida de visión resultante).

10 Las afecciones caracterizadas por la actividad y/o la migración excesivas de monocitos y/o macrófagos incluyen una amplia variedad de afecciones inflamatorias (por ejemplo, uveítis y artritis). Muchas de estas afecciones inflamatorias, tales como la artritis, también se caracterizan por formación excesiva de vasos sanguíneos, lo que hace que sean particularmente adecuadas para el tratamiento con medicamentos fabricados de acuerdo con el primer o segundo aspecto de la invención. Se sabe también que la angiogénesis patológica está asociada con la  
15 actividad de los monocitos/macrófagos, ya que ambas células estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos y actúan como marcadores para los sitios de neovascularización futura.

Los agentes utilizados de acuerdo con el primer o segundo aspectos de la invención incluyen

- 20 a) opticina (también conocida como oculoglicano); o  
b) epifcano; o  
c) mimecano (también conocido como osteoglicina); o  
d) una molécula quimérica que comprende elementos de cualquiera de a) a c); o  
e) un fragmento biológicamente activo o derivado de cualquiera de a) a d).

25 Se apreciará que los agentes adecuados para su uso de acuerdo con la invención engloban moléculas capaces de imitar la actividad de SLRP de clase III. Tales moléculas pueden ser capaces de replicar la actividad de unión de los SLRP de clase III (por ejemplo, capaces de replicar la unión a factores de crecimiento y/o sus receptores). Las moléculas preferidas pueden, por ejemplo, replicar la conformación de partes de SLRP de clase III que son importantes para conseguir sus funciones biológicas. Los agentes adecuados capaces de imitar la actividad de  
30 SLRP de clase III pueden incluir pequeñas moléculas solubles.

Además, se apreciará que las propiedades de unión de los agentes sintéticos o naturales adecuados para su uso de acuerdo con la invención se pueden modificar, según el uso que se vaya a dar al agente, para producir agentes mejorados. Por ejemplo, los agentes a usar de acuerdo con el primer aspecto de la invención se pueden modificar con el fin de incrementar su capacidad de unirse con factores de crecimiento angiogénicos tales como VEGF y FGF-2. De igual manera, los agentes para su uso de acuerdo con el segundo aspecto de la invención se pueden  
35 modificar para aumentar su capacidad para unirse con receptores tales como VEGF-R1.

40 El agente es preferentemente un SLRP de clase III humano, o un fragmento o derivado del mismo. Más preferentemente, el agente es opticina humana o un fragmento o derivado de la misma.

En caso de que el agente sea un SLRP de clase III no humano, o un fragmento del mismo, se prefiere que el agente se tolere bien por un paciente humano al que se le administra el agente. Un agente derivado no humano adecuado  
45 se puede seleccionar de tal manera que contenga pocos epitopos que probablemente contribuyan al rechazo del agente por un paciente humano, o puede "humanizarse", por ejemplo, por modificación para incluir partes de la secuencia del SLRP de clase III humano correspondiente. Un ejemplo preferido de tal agente derivado de un SLRP de clase III no humano es uno derivado de un SLRP de clase III bovino, tal como la opticina bovina.

50 El SLRP de clase III se puede aislar de fuentes que se producen naturalmente. Como ejemplo, el SLRP de clase III opticina es abundante en el humor vítreo del ojo, y por consiguiente se puede enriquecer y aislar a partir de este tejido. De manera alternativa, pueden producirse agentes que incluyen SLRP de clase III utilizando tecnologías de ADN recombinante. Preferentemente, el agente puede ser un SLRP de clase III recombinante o un fragmento o derivado del mismo. El SLRP de clase III recombinante se puede producir a partir de muchas fuentes alternativas,  
55 por ejemplo SLRP de clase III recombinante bovino, tal como opticina. Más preferentemente, tales agentes comprenden un SLRP de clase III humano recombinante o un fragmento del mismo. Aún más preferentemente, el agente es opticina humana recombinante, o un fragmento de la misma.

60 La expresión "fragmento biológicamente activo de un SLRP de clase III", como se utiliza de acuerdo con la invención, engloba fragmentos que son capaces de replicar las actividades de SLRP (tanto en términos de su capacidad para inhibir la formación de vasos sanguíneos como de su capacidad para prevenir y/o reducir la migración y/o actividad de monocitos o macrófagos) como se evaluó mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*.

65 Se sabe que el SLRP de clase III opticina comprende un homodímero formado por repeticiones ricas en leucina (LRR) enlazadas de forma no covalente unidas a un dominio amino terminal (NH). El dominio LRR y el dominio NH pueden escindirse enzimáticamente entre sí, y tales fragmentos de SLRP de clase III escindidos enzimáticamente

representan un agente preferido para su uso de acuerdo con el primer y segundo aspectos de la invención. Preferentemente, la escisión enzimática de SLRP de clase III tales como la opticina se puede llevar a cabo utilizando metaloproteasas de la matriz MMP-2 o MMP-9. A modo de ejemplo, la secuencia de aminoácidos del fragmento NH terminal obtenido por escisión por MMP-2 o MMP-9 de la opticina bovina se ilustra en la Figura 2. Un experto apreciará que se pueden producir productos de escisión similares por tratamiento enzimático de SLRP de clase III humanos.

El fragmento del dominio NH de los SLRP de clase III escindidos enzimáticamente es soluble y representa agentes preferidos adecuados para su uso de acuerdo con la invención. El dominio NH puede ser preferentemente el dominio NH de la opticina.

De manera alternativa, se pueden usar también como agentes de acuerdo con la invención fragmentos N-terminales de SLRP de clase III que se han obtenido por medios distintos de la digestión enzimática. Por fragmento N-terminal se entiende cualquier fragmento que comprenda al menos siete aminoácidos contiguos, preferentemente al menos doce restos de aminoácidos contiguos, y más preferentemente al menos veinticuatro restos de aminoácidos contiguos, de los sesenta y cinco aminoácidos localizados en el extremo N terminal de un SLRP de clase III.

Un fragmento N-terminal preferido adecuado para su uso de acuerdo con la invención puede comprender una de las siguientes secuencias de aminoácidos tomadas de las formas bovina y humana de opticina:

De la opticina humana: DNYGEVIDLSNYEELTDYGDQLPE

De la opticina bovina: DNYDEVIDPSNYDELIDYGDQLPQ

Las secuencias anteriores están muy conservadas entre especies, lo que indica la importancia de esos restos de aminoácidos en la mediación de las actividades biológicas de los SLRP de clase III.

Los fragmentos de SLRP de clase III que no se han obtenido por escisión enzimática pueden producirse, por ejemplo, por cualquier metodología de síntesis de péptidos adecuada conocida en la técnica. Los aminoácidos que constituyen tales fragmentos sintetizados se pueden seleccionar para incluir partes preferidas de la secuencia de SLRP de clase III. El experto apreciará que la variedad de posibles fragmentos obtenidos de manera no enzimática de SLRP de clase III es mayor que la que podría obtenerse por digestión enzimática, debido a que las secuencias potenciales de tales fragmentos sintetizados no están limitadas por la localización de los sitios de escisión enzimática en los SLRP de clase III.

Se apreciará que las regiones LRR de SLRP de clase III también pueden representar agentes adecuados para su uso de acuerdo con la invención. La región LRR se puede utilizar adecuadamente en forma de fragmentos que incluyen la región LRR de SLRP de clase III. Tales fragmentos pueden comprender adicionalmente más restos de aminoácidos de la porción C terminal de un SLRP de clase III adecuado. Los fragmentos se pueden obtener enzimáticamente o por otros medios, de la misma manera que se consideró anteriormente.

Preferentemente, el dominio LRR es el LRR de la opticina, sin embargo los dominios LRR del epifcano y mimecano también representan agentes adecuados para su uso de acuerdo con el primer y segundo aspectos de la invención, ya que se sabe que estos dominios LRR también están glicosilados y tienen una solubilidad relativamente alta. Las regiones LRR de los diferentes SLRP de clase III comparten un alto grado de similitud entre sí, como se ilustra por los datos de alineamiento de secuencias mostrados en la Figura 1, y por tanto un experto reconocerá que es previsible que las actividades biológicas asociadas con la región LRR de un SLRP de clase III en particular sean comunes a otros miembros de la familia.

La capacidad de los agentes de acuerdo con la invención para inhibir la formación de vasos sanguíneos puede comprobarse fácilmente en modelos bien conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos de tales ensayos incluyen el modelo de membrana corialantoidea de pollo y modelos de cultivos celulares endoteliales (en los que la angiogénesis y/o la vasculogénesis pueden indicarse por la proliferación de células endoteliales, la migración y/o la formación de "túbulos" celulares endoteliales vasculares que se parecen a vasos sanguíneos).

La capacidad de los agentes de acuerdo con la invención para inhibir la actividad de monocitos y/o macrófagos y/o la migración se puede también evaluar utilizando ensayos bien conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos de ensayos adecuados para investigar esta actividad incluyen ensayos en cámara de Boyden y similares.

Los agentes para su uso de acuerdo con el primer o segundo aspectos de la invención incluyen derivados específicos de SLRP de clase III que aumentan las semividas *in vivo* de los SLRP de clase III. Los ejemplos de derivados que aumentan la semivida de SLRP de clase III, o fragmentos de SLRP de clase III, incluyen los derivados peptoides de SLRP de clase III, derivados de D-aminoácidos de SLRP de clase III e híbridos péptido-peptide.

Los agentes tales como los SLRP de clase III nativos, o los fragmentos de SLRP de clase III, pueden estar sometidos a la degradación por varios medios (tales como la actividad de proteasas en sistemas biológicos). Tal degradación puede limitar la biodisponibilidad de los SLRP de clase III (o sus fragmentos), y por tanto la capacidad

de los SLRP de clase III para inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos o para prevenir la actividad de monocitos/macrófagos y/o su migración. Hay muchos ejemplos de técnicas bien establecidas por las que se pueden diseñar y producir derivados que tengan mayor estabilidad en contextos biológicos. Tales derivados peptídicos pueden tener una mayor biodisponibilidad como resultado del incremento de resistencia a la degradación mediada por las proteasas.

Preferentemente, un derivado adecuado para su uso de acuerdo con la invención es más resistente a proteasas que el péptido (o glicoproteína) del que procede. La resistencia a proteasas de un derivado y el péptido (o glicoproteína) del que procede se puede evaluar por medio de ensayos bien conocidos de degradación de proteínas. Se pueden entonces comparar los valores relativos de resistencia a proteasas del derivado y el péptido (o glicoproteína o proteoglicano).

Los derivados peptoides de los agentes de la invención se pueden diseñar fácilmente conociendo la estructura de los SLRP de clase III. Se puede utilizar el software disponible comercialmente para desarrollar derivados peptoides de acuerdo con protocolos bien establecidos.

Una realización más de una forma modificada de SLRP de clase III adecuados para su uso de acuerdo con la invención comprende D-aminoácidos. En este caso, el orden de los restos de aminoácidos está invertido en comparación con el que se encuentra en el SLRP de clase III nativo.

Se apreciará que los agentes de acuerdo con la presente invención se puedan utilizar en monoterapia (es decir, el uso de agentes de acuerdo con la invención solos para reducir la formación de nuevos vasos sanguíneos o condiciones caracterizadas por una actividad y/o migración excesiva de monocitos y/o macrófagos).

De manera alternativa, los agentes de acuerdo con la invención se pueden usar como un adyuvante, o en combinación con terapias conocidas capaces de inhibir la formación de vasos sanguíneos o la actividad y/o la migración excesivas de monocitos y/o macrófagos. El uso de los agentes de acuerdo con la invención en combinación con otras terapias se puede preferir ya que se cree generalmente que la redundancia en las rutas proangiogénicas (particularmente las asociadas con la propagación tumoral) puede requerir el bloqueo de varias rutas con el fin de proporcionar un efecto terapéutico óptimo.

Los agentes de acuerdo con la invención se pueden utilizar en combinación con sustancias capaces de inhibir la función de la integrina. Tales sustancias pueden incluir anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a las integrinas. Preferentemente, las integrinas cuya función se inhibe se pueden seleccionar del grupo que comprende  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 3$ .

La investigación realizada por el inventor representa el primer uso médico de SLRP de clase III y sus derivados. Por tanto, de acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención se proporciona la opticina, o un fragmento biológicamente activo de la misma, para su uso como un medicamento.

Los agentes de acuerdo con la invención se pueden combinar en composiciones que tienen varias formas diferentes dependiendo, en particular, de la manera en que la composición se vaya a usar. Así, por ejemplo, la composición puede estar en forma de polvo, comprimido, cápsula, líquido, ungüento, crema, gel, hidrogel, aerosol, pulverización, micela, parche transdérmico, liposoma o cualquier otra forma adecuada que pueda administrarse a una persona o un animal. Se apreciará que el vehículo de la composición de la invención debería ser uno que se tolere bien por el sujeto al que se le administra.

Las composiciones que comprenden agentes de acuerdo con la invención se pueden usar de varias maneras. Por ejemplo, puede requerirse la administración sistémica, en cuyo caso el compuesto puede estar contenido en una composición que pueda, por ejemplo, ingerirse por vía oral en forma de un comprimido, cápsula o líquido. De manera alternativa, la composición se puede administrar por inyección en la corriente sanguínea. Las inyecciones pueden ser intravenosas (en embolada o infusión) o subcutáneas (en embolada o infusión). Los compuestos pueden administrarse por inhalación (por ejemplo, por vía intranasal).

Las composiciones que comprenden agentes de acuerdo con la invención se pueden utilizar para regular la formación de vasos sanguíneos en el ojo. Tales composiciones pueden formularse para inyección dentro del propio ojo (por ejemplo inyección intravítrea) o alrededor del ojo (por ejemplo inyección periorbital). De manera alternativa, los compuestos se pueden formular para aplicación tópica o para irrigación del ojo, por ejemplo en forma de gotas oftálmicas. Las composiciones adecuadas de las formulaciones para inyección o uso tópico serán bien conocidas por los expertos en la materia.

La iontoforesis representa otra ruta por la que se pueden suministrar los agentes de acuerdo con la invención en el tejido que se desee. Se reconoce que la iontoforesis ocular (por ejemplo utilizando el sistema OcuPhor producido por lomed, Inc.) puede proporcionar un método por el que los agentes se pueden introducir de manera no invasiva en el interior del ojo.

Los agentes pueden también incorporarse en un dispositivo de liberación lenta o retardada. Tales dispositivos pueden, por ejemplo, insertarse sobre o bajo la piel, u otros tejidos (por ejemplo dentro de ojo - y particularmente en su humor vítreo; o en las proximidades del ojo) y el compuesto se puede liberar durante semanas o incluso durante meses. Tales dispositivos pueden ser particularmente ventajosos cuando se requiere un tratamiento prolongado con un agente y que normalmente requeriría una administración frecuente (por ejemplo, al menos una inyección diaria).

Se apreciará que la cantidad que se requiera de un agente se determina por la actividad biológica y la biodisponibilidad, lo cual a su vez depende del modo de administración, de las propiedades fisicoquímicas del agente empleado y de si el agente se usa como monoterapia o en una terapia combinada. La frecuencia de administración también estará influenciada por los factores mencionados anteriormente y particularmente por la semivida del agente dentro del sujeto que se está tratando.

Las dosificaciones óptimas que se administren se determinarán por los expertos en la materia, y variarán con el agente particular que se use, la concentración de la preparación, el modo de administración, y lo avanzada que esté la enfermedad. Los factores adicionales que dependen del sujeto en particular a tratar darán como resultado la necesidad de ajustar las dosificaciones, incluyendo la edad del sujeto, el peso, el género, la dieta y el momento de administración.

Pueden usarse procedimientos conocidos, tales como los que se emplean convencionalmente por la industria farmacéutica (por ejemplo, experimentación *in vivo*, ensayos clínicos, etc.) para establecer formulaciones específicas de los agentes de acuerdo con la invención y regímenes terapéuticos precisos (tales como dosis diarias de los compuestos y la frecuencia de administración).

Generalmente, se puede usar una dosis diaria entre 0,01 µg/kg de peso corporal y 1,0 g/kg de peso corporal de los agentes de acuerdo con la invención, para inhibir la angiogénesis, dependiendo del agente específico que se utilice. Más preferentemente, la dosis diaria será entre 0,01 mg/kg de peso corporal y 100 mg/kg de peso corporal.

Las dosis diarias se pueden administrar como una administración única (por ejemplo, una única inyección diaria o aplicación de gotas oftálmicas). De manera alternativa, el agente utilizado puede requerir la administración en dos o más veces durante el día. Como ejemplo, los agentes de acuerdo con la invención se puede administrar como dos (o más dependiendo de la severidad de la afección) dosis diarias de entre 10 µg y 5000 mg en forma de gotas oftálmicas. Un paciente que reciba tratamiento puede tomar una primera dosis al despertarse y luego una segunda dosis por la tarde (si está en un régimen de dos dosis) o a intervalos de 3 o 4 horas posteriormente. De manera alternativa, se puede usar un dispositivo de liberación lenta para proporcionar dosis óptimas a un paciente sin necesidad de administrar dosis repetidas.

La presente invención de acuerdo con el tercer aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la opticina o un fragmento biológicamente activo de la misma y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la cantidad del agente es una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 800 mg. En otra realización, la cantidad del agente es una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg. En otra realización, la cantidad del agente es una cantidad es aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 250 mg. En otra realización, la cantidad del agente es una cantidad de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg. En otra realización, la cantidad del agente es una cantidad de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg.

Se ha encontrado que la administración de 1-25 µg/ml de opticina es particularmente eficaz para inhibir la formación de vasos sanguíneos (véanse los ejemplos). La opticina se puede administrar a una concentración de 1-10 µg/ml, y preferentemente la opticina se puede administrar a una concentración de 1-25 µg/ml.

Se apreciará que las dosis preferidas de SLRP de clase III distintos de opticina se pueden determinar utilizando métodos similares a los empleados en los Ejemplos, pero se prevé que la administración de estos compuestos a una concentración de 1-25 µg/ml puede conseguir un efecto terapéutico.

También se describe un proceso para fabricar una composición farmacéutica que comprende combinar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es cualquier cantidad de un agente de acuerdo con el primer aspecto de la invención que, cuando se administra a un sujeto, inhibe la angiogénesis. Un "sujeto" es un vertebrado, mamífero, animal doméstico o ser humano.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere en el presente documento a cualquier vehículo fisiológico conocido por los expertos habituales en la materia, útil para formular composiciones farmacéuticas.

En una realización preferida, el vehículo farmacéutico es un líquido y la composición farmacéutica está en forma de una solución. En otra realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un sólido y la composición está en forma de polvo o comprimido. En una realización más, el vehículo farmacéutico es un gel y la composición está en



forma de crema o similar.

Un vehículo sólido puede incluir una o más sustancias que también pueden actuar como agentes saporíferos, lubricantes, solubilizantes, agentes de suspensión, cargas, sustancias de deslizamiento, adyuvantes de compresión, aglutinantes o agentes disgregantes de comprimidos; también puede ser un material de encapsulación. En los polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido que está mezclado con el principio activo finamente dividido. En los comprimidos, el principio activo está mezclado con un vehículo que tiene las propiedades de compresión necesarias en proporciones adecuadas y compactado en la forma y tamaño deseados. Los polvos y comprimidos preferentemente contienen hasta un 99% del principio activo. Los vehículos sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato cálcico, estearato magnésico, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, polivinilpirrolidona, ceras de bajo punto de fusión y resinas de intercambio iónico.

Los vehículos líquidos se usan en la preparación de soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, elixires y composiciones presurizadas. El principio activo puede disolverse o suspenderse en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable tal como agua, un disolvente orgánico, una mezcla de ambos o aceites o grasas farmacéuticamente aceptables. El vehículo líquido puede contener otros aditivos farmacéuticamente adecuados tales como solubilizantes, emulsionantes, tampones, conservantes, edulcorantes, agentes saporíferos, agentes de suspensión, agentes espesantes, colorantes, reguladores de la viscosidad, estabilizantes u osmorreguladores. Los ejemplos adecuados de vehículos líquidos para la administración oral y parenteral incluyen agua (que contiene parcialmente aditivos como se describe anteriormente, por ejemplo, derivados de celulosa, preferentemente solución de carboximetilcelulosa sódica), alcoholes (incluyendo alcoholes monohidroxílicos y alcoholes polihidroxílicos, por ejemplo glicoles) y sus derivados, y aceites (por ejemplo, aceite de coco fraccionado y aceite de cacahuete). Para la administración parenteral, el vehículo puede ser también un éster oleoso tal como el oleato de etilo y el miristato de isopropilo. Los vehículos líquidos estériles son útiles en las composiciones en forma de líquido estéril para administración parenteral. El vehículo líquido para las composiciones presurizadas puede ser un hidrocarburo halogenado u otro propulsor farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas líquidas que son soluciones o suspensiones estériles se pueden utilizar, por ejemplo, por inyección intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal, subcutánea y particularmente intraocular. Las soluciones estériles también se pueden administrar por vía intravenosa o usarse para irrigar el ojo. Los compuestos pueden prepararse como una composición sólida estéril que se puede disolver o suspender en el momento de la administración utilizando agua estéril, solución salina, u otro medio estéril inyectable apropiado. Se entiende que los vehículos incluyen necesariamente aglutinantes inertes, agentes de suspensión, lubricantes, saporíferos, edulcorantes, conservantes, colorantes, y recubrimientos.

Los agentes de acuerdo con la invención se pueden administrar por vía oral en forma de una solución o suspensión estériles que contienen otros solutos o agentes de suspensión (por ejemplo, suficiente solución salina o glucosa para hacer una solución isotónica), sales biliares, goma arábiga, gelatina, monooleato de sorbitán, polisorbato 80 (ésteres oleato de sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con óxido de etileno) y similares.

Los agentes de acuerdo con la invención pueden también administrarse por vía oral en forma de composición líquida o sólida. Las composiciones adecuadas para la administración oral incluyen formas sólidas tales como píldoras, cápsulas, gránulos, comprimidos, y polvos, y formas líquidas tales como soluciones, jarabes, elixires y suspensiones. Las formas útiles para su administración parenteral incluyen las soluciones estériles, emulsiones y suspensiones.

Se apreciará por un experto en la materia que los agentes adecuados para su uso de acuerdo con la invención también incluyen agentes que codifican SLRP de clase III. Por ejemplo, los agentes posibles incluyen moléculas de ácidos nucleicos que codifican SLRP de clase III. Tales ácidos nucleicos pueden administrarse preferentemente en vectores adecuados, por ejemplo el ADNc de la opticina insertado en un plásmido que contiene el genoma de Ad5 delecionado con E1/E3, es decir un adenovirus de vector adenoviral). Tales vectores pueden proporcionar agentes adecuados para su uso en terapia génica.

Una forma conveniente para poder inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos y/o prevenir la activación y/o migración de monocitos/macrófagos es proporcionando una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho agente de acuerdo con la invención en el sitio donde se requiere tal actividad por medio de terapia génica.

También se desvela un sistema de liberación para su uso en una técnica de terapia génica, comprendiendo dicho sistema de liberación una molécula de ADN que codifica un agente de acuerdo con la invención, siendo capaz dicha molécula de ADN de transcribirse para dar lugar a la expresión del agente elegido.

También se desvela el uso de un sistema de liberación como se define en el párrafo anterior para utilizarse en la fabricación de un medicamento para su uso en la inhibición de la formación de vasos sanguíneos.

También se desvela un método para inhibir la formación de vasos sanguíneos, comprendiendo el método la administración a un paciente que necesita tratamiento, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un sistema de

liberación como se define anteriormente.

Debido a la degeneración del código genético, está claro que las secuencias de ácido nucleico que codifican agentes adecuados para su uso de acuerdo con la invención pueden variar o cambiar sin afectar sustancialmente a la secuencia del producto codificado, proporcionando de esta manera una variante funcional del mismo. Un agente adecuado para su uso de acuerdo con la invención debe conservar la capacidad de inhibir la formación de vasos sanguíneos y de prevenir la actividad y/o la migración de monocitos y/o macrófagos.

Los nucleótidos adecuados que codifican los agentes de acuerdo con la invención (incluyendo los SLRP de clase III y fragmentos de los mismos) incluyen aquellos que tienen una secuencia alterada por la sustitución de diferentes codones que codifican el mismo aminoácido dentro de la secuencia, produciendo por lo tanto un cambio silencioso. Otras variantes adecuadas son las que tienen secuencias de nucleótidos homólogas pero que comprenden la totalidad o partes de secuencias que están alteradas por la sustitución de diferentes codones que codifican un aminoácido con una cadena lateral con propiedades biofísicas similares a las del aminoácido que sustituye, produciéndose un cambio conservativo. Por ejemplo, los aminoácidos pequeños no polares hidrófobos incluyen la glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina y metionina. Los aminoácidos grandes no polares hidrófobos incluyen la fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos polares neutros incluyen la serina, treonina, cisteína, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen la lisina, arginina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico.

Los sistemas de liberación de acuerdo con la invención son muy adecuados para conseguir niveles sostenidos de un agente de acuerdo con la invención en el sitio donde se desea inhibir la formación de vasos sanguíneos o la migración y/o actividad de los monocitos y/o macrófagos durante un periodo de tiempo mayor que el que puede conseguirse con la mayoría de los sistemas de suministro convencionales. Por ejemplo, los agentes de acuerdo con la invención adecuados para la inhibición de la formación de vasos sanguíneos pueden expresarse continuamente en el sitio donde se va a inhibir la neovascularización por células que se han transformado con la molécula de ADN. Por tanto, aunque el agente de acuerdo con la invención tenga una semivida muy corta *in vivo*, pueden expresarse de forma continua cantidades terapéuticamente eficaces del agente en el tejido tratado.

Además, el sistema de liberación de la invención puede usarse para proporcionar la molécula de ADN (y por tanto el agente de acuerdo con la invención) sin la necesidad de usar vehículos farmacéuticos convencionales tales como los que se requieren en ungüentos o cremas que pueden, por otro lado, usarse con la invención.

El sistema de liberación de la presente invención es tal que la molécula de ADN es capaz de expresarse (cuando el sistema de liberación se administra a un paciente) para producir un agente de acuerdo con la invención.

La molécula de ADN puede estar contenida en un vector adecuado para formar un vector recombinante. El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido, un cósmido o un fago. Tales vectores recombinantes son muy útiles en los sistemas de liberación de la invención para transformar células con la molécula de ADN.

Los vectores recombinantes pueden incluir también otros elementos funcionales. Por ejemplo, se pueden diseñar vectores recombinantes de tal manera que el vector se replique de forma autónoma en el núcleo de la célula. En este caso, pueden ser necesarios elementos que induzcan la replicación de ADN en el vector recombinante. De manera alternativa, el vector recombinante se puede diseñar de forma tal que el vector y la molécula de ADN recombinante se integren en el genoma de una célula. En este caso son deseables secuencias de ADN que favorezcan la integración dirigida (por ejemplo, por recombinación homóloga). Los vectores recombinantes pueden tener también ADN que codifique genes que puedan usarse como marcadores detectables en el proceso de clonación.

El vector recombinante también puede además comprender un promotor o regulador para controlar la expresión de gen según se necesite.

La molécula de ADN puede (aunque no necesariamente) llegar a incorporarse en el ADN de las células del sujeto a tratar. Las células indiferenciadas pueden transformarse establemente conduciendo a la producción de células hijas modificadas genéticamente. En este caso, puede necesitarse la regulación de la expresión en el sujeto, por ejemplo con factores de transcripción específicos, activadores genéticos o más preferentemente con promotores inducibles que transcriban los genes en respuesta a una señal encontrada específicamente en el sitio de formación de nuevos vasos sanguíneos. De manera alternativa, el sistema de liberación se puede diseñar para favorecer una transformación inestable o transitoria de células diferenciadas en el sujeto a tratar. En este caso, la regulación de la expresión puede ser menos importante porque la expresión de la molécula de ADN parará cuando las células transformadas mueran o dejen de expresar la proteína (idealmente cuando se haya efectuado la inhibición de la formación de vasos sanguíneos requerida).

El sistema de liberación puede proporcionar la molécula de ADN a un sujeto sin incorporarla en un vector. Por ejemplo, la molécula de ADN se puede incorporar en un liposoma o en una partícula vírica. De manera alternativa, la molécula de ADN "desnuda" se puede insertar en las células del sujeto por medios adecuados, por ejemplo, por

incorporación endocitótica directa.

La molécula de ADN se puede transferir a las células de un sujeto a tratar por transfección, infección, microinyección, fusión celular, fusión protoplásmica o bombardeo balístico. Por ejemplo, la transferencia puede ser por transfección balística con partículas de oro recubiertas, liposomas que contienen la molécula de ADN, vectores virales (por ejemplo adenovirus) y medios para la proporcionar la incorporación directa de ADN (por ejemplo endocitosis) por aplicación del ADN plasmídico directamente (por ejemplo, tópicamente o por inyección) en el sitio donde se vaya a inhibir la formación de vasos sanguíneos.

10 El agente de acuerdo con la invención que se expresa a partir de la molécula de ADN puede ser un SLRP de clase III o un fragmento biológicamente activo del mismo.

15 La invención se puede poner en práctica induciendo el aumento de expresión celular de un agente de acuerdo con la invención, con lo que entonces se puede inhibir la formación de vasos sanguíneos o la actividad y/o migración de macrófagos y/o monocitos. Tal expresión terapéutica de un agente de acuerdo con la invención se puede conseguir incrementando la expresión que se produce de manera natural del agente (por ejemplo, la expresión natural de un SLRP de clase III que se produce naturalmente), o por inducción de la expresión no natural del agente (por ejemplo por la inducción de la expresión de SLRP de clase III en células que no expresan naturalmente SLRP de clase III) o por la inducción de la sobre-expresión del agente. Se apreciará que un incremento en la expresión endógena de SLRP de clase III tales como la opticina se puede conseguir fácilmente por la administración de un agente capaz de incrementar la transcripción del gen que codifica la opticina.

También se desvela un método de selección de un compuesto de ensayo por su capacidad para inhibir la formación de vasos sanguíneos, comprendiendo el método:

25 i) evaluar el grado de unión entre el SLRP de clase III y un sustrato del SLRP de clase III en ausencia del compuesto de ensayo,  
 ii) evaluar el grado de unión entre el SLRP de clase III y el sustrato en presencia del compuesto de ensayo,  
 30 iii) comparar el grado de unión que se produce en la etapa i) con el grado de unión que se produce en la etapa ii);

donde el compuesto de ensayo es capaz de inhibir la formación de vasos sanguíneos si el grado de unión que se produce en la etapa ii) es menor que el grado de unión que se produce en la etapa i).

35 También se desvela un método de selección de un compuesto de ensayo por su capacidad para inhibir la actividad y/o la migración de monocitos y/o macrófagos, comprendiendo el método:

i) evaluar el grado de unión entre un SLRP de clase III y un sustrato de SLRP de clase III en ausencia del compuesto de ensayo,  
 40 ii) evaluar el grado de unión entre el SLRP de clase III y el sustrato en presencia del compuesto de ensayo,  
 iii) comparar el grado de unión que se produce en la etapa i) con el grado de unión que se produce en la etapa ii);

45 donde el compuesto de ensayo es capaz de inhibir la actividad y/o la migración de monocitos y/o macrófagos si el grado de unión que se produce en la etapa ii) es menor que el grado de unión que se produce en la etapa i).

50 El sustrato puede ser heparina o sulfato de heparano, o un factor de crecimiento, particularmente un factor de crecimiento angiogénico tal como VEGF, FGF. De manera alternativa, el sustrato puede ser un receptor celular ligado por el SLRP de clase III. Los ejemplos de tales receptores incluyen los receptores celulares para VEGF y FGF.

55 Se apreciará que se puede esperar que otros agentes que tengan el mismo perfil de unión a receptores celulares que los SLRP de clase III, tales como la opticina, tengan efectos biológicos similares a los que muestran los SLRP de clase III. También se desvela el uso de un agente que tiene sustancialmente el mismo perfil de unión al receptor que el SLRP de clase III en la fabricación de un medicamento para la inhibición de la formación de vasos sanguíneos. Los agentes que tienen sustancialmente el mismo perfil de unión al receptor que el SLRP de clase III también se pueden usar en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de afecciones caracterizadas por una actividad y/o migración excesiva de monocitos y/o macrófagos.

60 También se apreciará que el reconocimiento de la importancia del perfil de unión al receptor de SLRP de clase III en la mediación del comportamiento biológico de estas moléculas proporciona un medio por el que se pueden identificar agentes capaces de imitar la actividad de SLRP de clase III (es decir, por inhibición de la formación de vasos sanguíneos o la migración y/o la activación de monocitos y/o macrófagos).

65 En consecuencia, también se desvela un método de selección de un compuesto de ensayo por su capacidad para imitar la actividad de SLRP de clase III, comprendiendo el método comparar el perfil de unión al receptor del

compuesto de ensayo con el perfil de unión al receptor del SLRP de clase III, donde tener sustancialmente el mismo perfil de unión al receptor que el SLRP de clase III indica que el compuesto de ensayo es capaz de imitar la actividad del SLRP de clase III.

- 5 Las características de los perfiles de unión al receptor de los SLRP de clase III se pueden determinar fácilmente utilizando métodos y protocolos experimentales bien conocidos por los expertos en la materia.

La invención se describirá en los siguientes Ejemplos, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- 10 La Figura 1 representa las secuencias de aminoácidos de longitud total de la opticina bovina y humana madura, el epifcano humano y el mimecano humano, además de ilustrar el alineamiento de aminoácidos entre las regiones repetidas ricas en leucina de los SLRP de clase III humanos;
- 15 La Figura 2 ilustra en el Panel 2a la secuencia de aminoácidos de un fragmento NH-terminal de opticina bovina que se libera tras la digestión con las metaloproteinasas MMP2 o MMP9, en el Panel 2b la secuencia de aminoácidos de los fragmentos preferidos de la opticina humana y bovina, y en el Panel 2c el alineamiento de aminoácidos entre las secuencias NH terminales de la opticina de diferentes especies.
- 20 La Figura 3 es un gráfico que ilustra que el que el SLRP de clase III opticina inhibe la proliferación celular endotelial vascular inducida por el factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2) en el Ejemplo 1;
- La Figura 4 ilustra gráficamente el efecto de la opticina en la proliferación celular endotelial inducida por FGF básico o ácido.
- La Figura 5 es un gráfico que ilustra que el SLRP de clase III opticina inhibe la proliferación celular endotelial vascular inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en el Ejemplo 1;
- La Figura 6 ilustra gráficamente el efecto de la opticina sobre la proliferación celular endotelial inducida por VEGF<sub>164</sub> o VEGF<sub>120</sub>;
- 25 La Figura 7 muestra fotografías representativas que ilustran que el SLRP de clase III opticina inhibe el crecimiento/formación de tubos BAEC inducidos por FGF-2 en el Ejemplo 2;
- La Figura 8 muestra los resultados de los experimentos que investigan la capacidad del SLRP de clase III opticina para inhibir el crecimiento/formación de tubos celulares endoteliales vasculares en el Ejemplo 2;
- La Figura 9 muestra los resultados de experimentos que investigan la capacidad del SLRP de clase III opticina para inhibir la migración celular endotelial en el Ejemplo 3;
- 30 La Figura 10 ilustra que la presencia de SLRP de clase III opticina reduce la fosforilación de ERK-1/2 en células estimuladas por VEGF<sub>164</sub> o FGF-2 en el Ejemplo 4;
- La Figura 11 ilustra que el SLRP de clase III opticina es capaz de inhibir la formación de vasos sanguíneos inducida por FGF-2 en un ensayo en membrana corialantoidea de pollo (CAM) en el Ejemplo 5;
- 35 La Figura 12 muestra los efectos del SLRP de clase III opticina sobre la diseminación celular en el Ejemplo 6;
- La Figura 13 muestra los efectos del SLRP de clase III opticina y de anticuerpos de integrina bloqueantes de la función sobre la diseminación celular en el Ejemplo 6;
- La Figura 14 ilustra la unión del SLRP de clase III opticina a receptores de factores de crecimiento angiogénicos:
- 40 La Figura 15 ilustra la unión del SLRP de clase III opticina a factores de crecimiento angiogénicos; y
- La Figura 16 ilustra que el SLRP de clase III opticina es capaz de prevenir la unión de factores de crecimiento angiogénicos a sus receptores en el Ejemplo 7.

### Ejemplo 1

45

#### **Efectos de la opticina sobre la proliferación celular endotelial vascular**

- Se llevaron a cabo ensayos de proliferación con células endoteliales aórticas bovinas (BAEC) (método descrito en Slevin M, Kumar S, Gaffney J. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. J. Biol. Chem. 2002. 277: 41046-59) en presencia de factores de crecimiento y opticina recombinante. La opticina recombinante de longitud total se generó utilizando el vector pCEP-Pu en células embrionarias renales humanas (Le Goff et al. Characterization of opticin and evidence of stable dimerisation in solution. J. Biol. Chem. 2003. 278: 45280-7). La opticina se purificó a partir de un medio acondicionado utilizando una combinación de cromatografía de intercambio iónico y de afinidad de lectina.
- 50 Para los ensayos de proliferación las BAEC se sembraron por triplicado en placas de 6 pocillos a una concentración de  $2 \times 10^4$ /ml. Después de fijarse, se cultivaron en medio pobre en suero que contenía un 2,5% de suero fetal bovino. En algunos pocillos las células se preincubaron con opticina a 0, 1-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante una hora antes de la adición de los factores de crecimiento, que incluían FGF-2, FGF-1 (ambos a 25 ng/ml) o isoformas de VEGF (a 10 ng/ml). Las células entonces se incubaron durante 72 horas más. A las 72 horas, las células se lavaron, se despegaron con tripsina y se contaron en un contador Coulter.
- 60

- Los experimentos de control mostraron que la opticina no es tóxica para las células a las concentraciones que se utilizaron en estos experimentos (no se muestran los datos). Los valores medios se muestran en las Figuras 3 a 6, que ilustran el efecto de la opticina en la proliferación de las células endoteliales inducidas por varios factores de crecimiento pro-angiogénicos.
- 65

**En la Figura 3:** 1 = Control (es decir las células sin factor de crecimiento ni opticina añadidos), 2 = Control + 10  $\mu\text{g/ml}$  de opticina, 3 = FGF-2 solo, 4 = FGF-2 + 0,1  $\mu\text{g/ml}$  de opticina, 5 = FGF-2 + 1  $\mu\text{g/ml}$  de opticina, 6 = FGF-2 + 10  $\mu\text{g/ml}$  de opticina, 7 = FGF-2 + 25  $\mu\text{g/ml}$  de opticina. Con el incremento de las concentraciones de opticina, la proliferación celular inducida por FGF-2 disminuye hacia los niveles de la línea base (control). Las concentraciones entre 1 y 25  $\mu\text{g/ml}$  produjeron una reducción significativa en la proliferación de las BAEC cuando se compara con el FGF-2 solo. La opticina a 25  $\mu\text{g/ml}$  produjo una inhibición >95% de la proliferación de BAEC inducida por FGF-2.

**En la Figura 4:** Se comparan los efectos de la opticina a 10  $\mu\text{g/ml}$  sobre la proliferación de BAEC inducida por FGF-2 y FGF-1. La presencia de opticina reduce el nivel de proliferación inducida por ambos factores de crecimiento hasta aproximadamente los niveles de control; por tanto se ilustra que la opticina es igualmente eficaz para inhibir la proliferación inducida por FGF-1 y FGF-2.

**En la Figura 5:** 1 = Control, 2 = VEGF, 3 = VEGF + 1  $\mu\text{g/ml}$  de opticina, 4 = VEGF + 10  $\mu\text{g/ml}$  de opticina. Con el incremento de las concentraciones de opticina la proliferación celular inducida por VEGF desciende hacia los niveles de la línea base (control). Tanto 1  $\mu\text{g/ml}$  como 10  $\mu\text{g/ml}$  de opticina produjeron una reducción significativa de la proliferación de BAEC cuando se comparó con VEGF solo, y 10  $\mu\text{g/ml}$  de opticina produjeron una inhibición de la proliferación >90%.

**En la Figura 6:** Se comparan los efectos de la opticina a 10  $\mu\text{g/ml}$  sobre la proliferación de BAEC inducida por VEGF<sub>164</sub> y VEGF<sub>120</sub>. La presencia de opticina reduce el nivel de proliferación inducida por ambos factores de crecimiento hasta aproximadamente los niveles de control; por tanto se ilustra que la opticina es igualmente eficaz en la inhibición de la proliferación inducida por VEGF<sub>120</sub> y VEGF<sub>164</sub>.

Se apreciará que la inhibición de la proliferación de las células endoteliales indica que los agentes de acuerdo con la presente invención tendrán eficacia en la inhibición de la formación de vasos sanguíneos.

### Ejemplo 2:

#### **Efectos de la opticina sobre la formación de brotes en células endoteliales aórticas bovinas (BAEC) inducida por FGF-2 y VEGF**

Se investigó la capacidad de BAEC confluentes para formar "brotes" de capilares "en forma de tubos" en placas recubiertas con 0,1% de gelatina/PBS en presencia de opticina (basándose en el método descrito en Canfield AE y Schor AM. Evidence that tenascin and thrombospondin-1 modulate sprouting of endothelial cells. J Cell Sci. 1995. 108: 797-809). Tal actividad de crecimiento de brotes proporciona un modelo *in vitro* de formación de nuevos vasos sanguíneos.

En resumen, se colocaron placas de 6 pocillos recubiertos por triplicado que contenían BAEC justo en la confluencia en 2,5% de FCS-DMEM y se trataron con opticina durante 1 hora (0,1-10  $\mu\text{g/ml}$ ) antes de añadir FGF-2 (25  $\mu\text{g/ml}$ ) o VEGF (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y después se dejaron incubar durante 12 días. Los pocillos de control se trataron con vehículo únicamente (PBS). Al final del experimento, se fotografiaron 5 campos aleatorios de cada pocillo por microscopía de contraste de fase (**Figura 7**) y el área cubierta por brotes se determinó por análisis de las imágenes.

**En la Figura 8:** Se muestra una representación gráfica de las áreas medias cubiertas por los brotes. Los valores de "control" representan el % de cobertura por brotes celulares tras 12 días sin añadir mitógeno ni opticina. Las barras marcadas con "Opticina" muestran los efectos de la adición de opticina sola sobre la formación de brotes, e ilustran que no hay diferencias significativas cuando se comparan con los controles. Al lado se muestran los efectos de la adición de factor de crecimiento solo. Las últimas tres barras muestran el efecto de la adición del factor de crecimiento y concentraciones crecientes de opticina. Las barras están marcadas con un asterisco cuando hubo un descenso significativo en la formación de brotes comparado con el factor de crecimiento solo. A 10  $\mu\text{g/ml}$ , la opticina redujo el crecimiento celular inducido por FGF-2 un 73% y el crecimiento inducido por VEGF un 70%, ilustrando la efectividad del SLRP de clase III opticina en la reducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos.

### Ejemplo 3:

#### **Efectos de la opticina en la migración de células endoteliales aórticas bovinas (BAEC) inducida por FGF-2 y VEGF**

Se utilizó el ensayo de herida en capa de células descrito en: Slevin M, Kumar S, Gaffney J. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. J. Biol. Chem. 2002. 277: 41046-59. Las BAEC se cultivaron en cubreobjetos de plástico hasta la confluencia y después se colocaron en un medio que contenía un 5% de FCS. Después de 24 horas más, los cubreobjetos se lavaron en PBS y se hizo una herida en la capa celular con una cuchilla de afeitar. Se añadió opticina (0,1-10  $\mu\text{g/ml}$ ) a algunos pocillos y se dejó incubar durante una hora más. Entonces se añadió FGF-2 (25  $\mu\text{g/ml}$ ) o VEGF (10  $\mu\text{g/ml}$ ) a los pocillos de ensayo y la placa se incubó a 37 °C durante 24 h. Tras la incubación, los

cubreobjetos se aclararon con PBS y se fijaron con etanol al 100%. Se cuantificó el movimiento de las células en el área desnuda utilizando un sistema informatizado de análisis de imágenes. Después, el área se convirtió para dar el % medio de cobertura a partir de 3 cubreobjetos tratados idénticamente.

5 **En la Figura 9:** Análisis gráfico de las áreas desnudas recubiertas por BAEC. El valor de “control” representa el área media cubierta por las células tras 24 horas de incubación sin añadir mitógeno ni opticina. La barra marcada con “Opticina” ilustra que la adición de opticina sola no tiene un efecto significativo sobre la migración celular cuando se compara con las células de control sin tratar.

10 Las barras marcadas con “VEGF” y “FGF-2” muestran el efecto en la migración celular de estos factores (añadidos a concentraciones de 10 ng/ml y 25 ng/ml respectivamente).

15 Las barras marcadas con “VEGF + Opticina” y “FGF-2 + Opticina” ilustran el efecto de la adición de 10 µg/ml de opticina en la migración celular inducida por factores de crecimiento. El SLRP de clase III opticina redujo el movimiento celular inducido por VEGF en un 53% y la migración celular inducida por FGF-2 en un 86%. Esta reducción en la migración celular endotelial ilustra la capacidad de los SLRP de clase III para inhibir la formación de vasos sanguíneos.

20 Se apreciará a la luz de los resultados descritos anteriormente que los SLRP de clase III tales como la opticina se pueden utilizar para prevenir la migración de las células endoteliales en una variedad de contextos.

#### Ejemplo 4:

##### Efectos de la opticina sobre la fosforilación de ERK inducida por VEGF<sub>164</sub> y FGF-2

25 En este caso, se investigaron los efectos de la opticina en la señalización a través de la ruta MAPK ya que esta ruta tiene un papel clave en la proliferación celular endotelial vascular y la migración. BAEC cultivadas hasta la semiconfluencia en placas de 6 pocillos en SPM durante 48 h se preincubaron durante una hora con opticina a 10 µg/ml antes de la adición de FGF-2 (35 ng/ml) o VEGF<sub>164</sub> (10 ng/ml). Tras una incubación de entre cinco y veinte minutos se recogieron los lisados celulares totales en un tampón de radioinmunoprecipitación (RIPA), que contenía 30 Tris HCl 10 mM, (pH 7,5), NaCl 50 mM, desoxicolato sódico al 0,5% p/v, Nonidet P40 al 0,5% v/v, SDS al 0,1% p/v, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM y 5 µg/ml de aprotinina (Vainnik y col, 1994). Las muestras después se centrifugaron (10.000 g durante 15 min a 4 °C) para retirar los restos insolubles, y se almacenaron a -70 °C hasta su uso. La concentración de proteínas de los lisados celulares se determinó utilizando una modificación del ensayo de Bradford (Bio-Rad California, USA) y se mezclaron cantidades iguales de proteína (15 µg) con el doble de tampón de muestras de 35 Laemmli, se agitaron con vórtice y se hirvieron en un baño de agua durante 15 min. La SDS-PAGE se realizó utilizando geles de gradiente de Bis-Tris al 4-12% (Invitrogen) con el sistema MES de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras después se sometieron a transferencia de Western con anticuerpos que reconocían ERK-1 y 2 fosforilados, ERK-2 total y actina α.

40 **En la Figura 10:** Las transferencias de Western demuestran que la preincubación de BAEC con opticina reducía la capacidad de VEGF<sub>164</sub> y FGF-2 para inducir la fosforilación de ERK 1/2 en las células tratadas con VEGF<sub>164</sub> y FGF-2. Se confirmó que las calles de gel se habían cargado igualmente mediante pruebas con anticuerpos que reconocían el ERK-2 total y la actina α.

#### Ejemplo 5:

##### Ensayo en membrana corioalantoidea de pollo (CAM)

50 Los ensayos en CAM se llevaron a cabo de acuerdo con protocolos aceptados. En resumen, los microgránulos que contenían el factor de crecimiento angiogénico FGF-2, en presencia o ausencia de 1 µg de opticina, se pusieron en contacto con las membranas corioalantoideas de huevos de 8 días. Tras 2 días, el número de vasos sanguíneos que crecieron hacia el microgránulo se contaron y se analizó el número de vasos sanguíneos presentes.

55 **En la Figura 11:** Las imágenes ejemplares ilustran claramente que habían crecido menos vasos sanguíneos nuevos hacia el gránulo que contenía FGF-2 y opticina comparado con los microgránulos que contenían FGF-2 solo. Esto estableció claramente que el SLRP de clase III opticina es capaz de reducir espectacularmente la formación de nuevos vasos sanguíneos, lo que por otra parte ocurre *in vivo* en respuesta a la actividad de los factores de crecimiento angiogénicos.

#### Ejemplo 6:

##### La opticina interactúa con integrinas implicadas en la angiogénesis

65 Los ensayos de dispersión celular se llevaron a cabo utilizando células de melanoma humano A375-SM, que

expresan una amplia variedad de integrinas. Las células se pusieron en placas con opticina recombinante bovina o sustratos de control incluyendo BSA (control negativo), VCAM y 50K, un fragmento de fibronectina de 50-kDa (controles positivos). Las células se dejaron diseminarse durante 1 h y durante ese tiempo la diseminación fue menos del 5% en BSA; ilustrando que no había una diseminación detectable en el ligando producido endógenamente en este periodo de tiempo.

**En la Figura 12:** La diseminación celular con opticina a diferentes concentraciones mostró un efecto de respuesta dependiente de la dosis y alcanzó una diseminación máxima de ~30% cuando se recubrió con opticina a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ . Las curvas de dosis-respuesta (mostradas a continuación) se usaron para determinar las concentraciones de recubrimiento óptimas de los ligandos para los ensayos de inhibición, es decir 35  $\mu\text{g/ml}$  para la opticina, 10  $\mu\text{g/ml}$  para VCAM y 10  $\mu\text{g/ml}$  para 50K.

**En la Figura 13:** Los ensayos de diseminación celular se llevaron a cabo junto con anticuerpos de integrina bloqueantes de la función. El gráfico muestra el porcentaje de diseminación celular representado contra diferentes combinaciones de anticuerpos. El H120 es un anticuerpo irrelevante utilizado como control negativo. Las combinaciones de anticuerpos incluyendo anticuerpos  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha V$  o  $\beta 1$  y  $\beta 3$  inhibieron casi completamente la diseminación y tomando juntos estos resultados se puede sugerir que la opticina interactúa con  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ . Las integrinas  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha V\beta 3$  se expresan por el endotelio vascular durante la angiogénesis y tienen papeles claves en el proceso. Aunque los inventores no desean limitarse a hipótesis alguna, se cree que la interacción de SLRP de clase III tales como la opticina con estas integrinas angiogénicas puede ayudar a prevenir la adhesión celular, la diseminación y la migración necesarias para el crecimiento de brotes angiogénicos, y por tanto previene la formación de nuevos vasos sanguíneos. Además, se cree que las interacciones de la opticina con estas integrinas causan una señalización de fuera a dentro a través de las integrinas que conduce a la regulación por descenso de la señalización a través de factores de crecimiento, incluyendo los receptores VEGF y FGF.

#### Ejemplo 7:

#### Ensayos de unión en fase sólida que analizan la unión de la opticina a FGF-1, FGF-2, VEGF<sub>164</sub>, VEGF<sub>121</sub> y sus receptores

Los dominios solubles extracelulares de los receptores se obtuvieron de R&D Systems Europe Ltd.

#### i) Ensayos de unión de la opticina

En resumen, se aplicaron receptores de factor de crecimiento (FGF-R1, FGF-R2, VEGF-R1 y VEGF-R2 - Véase la Figura 14), y factores de crecimiento (FGF-2, FGF-1, VEGF<sub>164</sub>, VEGF<sub>120</sub>, - véase la Figura 15) como un recubrimiento a 2  $\mu\text{g/ml}$  sobre placas de 96 pocillos. Los pocillos después se bloquearon con BSA al 1%. Se añadió a los pocillos opticina en concentraciones variables en PBS y se incubaron durante 2 h. La unión de la opticina se detectó con un anticuerpo específico para la opticina.

**En la Figura 14:** La opticina se unió al VEGF-R1 y FGF-R2 de manera dependiente de la respuesta a la dosis, pero no se unió a VEGF-R2 ni a FGF-R1. Se obtuvo una Kd aparente de 21 nM para la unión con VEGF-R1, pero no se alcanzó la saturación para la unión con FGF-R2, no fue posible obtener una Kd.

La capacidad de la opticina para unirse a VEGF-R1 y a FGF-R2 sugiere que es esta unión la que es importante para mediar la actividad de la opticina en lo que se refiere a la angiogénesis patológica y a la actividad y/o migración de monocitos y/o macrófagos. La unión de la opticina a estos receptores puede prevenir la unión de sus ligandos biológicamente activos, reduciendo de esta manera el nivel de actividad y/o migración que pueden inducir tales ligandos.

**En la Figura 15:** La opticina se unió a FGF-2 y VEGF<sub>164</sub> de manera dependiente de la respuesta a la dosis, pero no se unió a FGF-1 ni a VEGF<sub>120</sub>. Se obtuvieron valores de la constante de disociación aparente (Kd) de 34 nM para FGF-2 y de 42 nM para VEGF<sub>164</sub>.

#### ii) Ensayos de competición

Como la opticina no se unía a VEGF-R2 y FGF-R1 en los experimentos en fase sólida, los inventores investigaron si la opticina inhibía las interacciones de estos receptores con VEGF<sub>164</sub> y FGF-2 respectivamente. Los ensayos de competición se llevaron a cabo cubriendo los pocillos con (A) FGF-R1 o (B) VEGF-R2 a 2  $\mu\text{g/ml}$ , posteriormente, tras bloquearse con BSA al 1%, los pocillos se incubaron con 0,2  $\mu\text{g/ml}$  de (A) FGF-2 o (B) VEGF<sub>164</sub> mezclados con concentraciones variables de opticina. La unión de los factores de crecimiento a sus receptores se detectó con anticuerpos específicos.

**En la Figura 16:** La opticina inhibe la interacción entre FGF-2 y FGF-R1 (A) y VEGF<sub>134</sub> a VEGF-R2 (B) de manera dependiente a la dosis. Por tanto, en ambos casos la unión de la opticina al factor de crecimiento inhibe la

interacción del factor de crecimiento con su receptor.

**iii) Conclusiones**

- 5 Los resultados muestran que los SLRP de clase III son capaces de inhibir la proliferación celular endotelial, la migración y la formación de brotes. Todos estos son elementos esenciales del proceso de angiogénesis con lo que un experto apreciará que los SLRP de clase III inhiben la angiogénesis. Además, la opticina inhibe la angiogénesis en el ensayo CAM, proporcionando así la prueba *in vivo* de los efectos antiangiogénicos de la opticina.
- 10 El SLRP de clase III opticina inhibe procesos implicados en la angiogénesis a través de varios mecanismos. Inhibe las acciones proangiogénicas de los factores de crecimiento FGF-1, FGF-2, VEGF<sub>165</sub> y VEGF<sub>121</sub>. En los casos del VEGF<sub>165</sub> y FGF-2, la opticina tiene una acción directa por unión a los factores de crecimiento e inhibición de sus interacciones con sus receptores. Sin embargo, la opticina también inhibe la angiogénesis a través de otros mecanismos, como son la eficacia en la inhibición de las acciones estimulantes de factores de crecimiento a los que no se une, incluyendo FGF-1 y VEGF<sub>121</sub>. Otros mecanismos a través de los cuales la opticina inhibe la angiogénesis son a través de interacciones directas de receptores de factores de crecimiento con VEGF-R1 y FGF-R2, reduciendo de esta manera la actividad biológica mediada por estos receptores, y por interacción con integrinas implicadas en la angiogénesis incluyendo  $\alpha V\beta 3$  y  $\alpha 5\beta 1$ , afectando por lo tanto a la unión integrina-ligando y/o a la señalización de fuera a dentro y suprimiendo indirectamente la señalización a través de los receptores de factores de crecimiento.
- 20



REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un SLRP de clase III, o un agente que promueve la actividad de SLRP de clase III seleccionado del grupo que comprende:
- 10 a) opticina; o  
 b) epificano; o  
 c) mimecano (también conocido como osteoglicina); o  
 d) una molécula quimérica que comprende elementos de cualquiera de a) a c); o  
 e) un fragmento biológicamente activo de cualquiera de a) a d); o  
 f) un derivado peptoide biológicamente activo, un derivado D-aminoacídico, o derivado híbrido péptido-peptoide de cualquiera de a) a e) que tiene una semivida *in vivo* aumentada; o  
 g) un sistema de liberación que comprende una molécula de ADN que codifica cualquiera de a) a e)
- 15 en la fabricación de un medicamento para la inhibición de la formación de vasos sanguíneos.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el agente es un SLRP de clase III.
- 20 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el fragmento biológicamente activo es un fragmento N-terminal.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el fragmento biológicamente activo es un fragmento repetido rico en leucina.
- 25 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el sistema de liberación comprende una molécula de ADN que codifica opticina.
6. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, para el tratamiento y/o la prevención de una afección **caracterizada por** la excesiva formación de vasos sanguíneos.
- 30 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde la afección se selecciona del grupo que comprende el cáncer, la psoriasis y la curación de heridas.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, donde la afección es una retinopatía vasoproliferativa del ojo.
- 35 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde la retinopatía vasoproliferativa es retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular “húmeda” o cualquier otra forma de neovascularización coroidea o vítreo primario hiperplásico persistente.
- 40 10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la afección es una afección inflamatoria.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde la afección inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en: uveítis y artritis.
- 45 12. El uso de un SLRP de clase III, o un agente que promueve la actividad de SLRP de clase III seleccionado del grupo que comprende:
- 50 a) opticina; o  
 b) epificano; o  
 c) mimecano (también conocido como osteoglicina); o  
 d) una molécula quimérica que comprende elementos de cualquiera de a) a c); o  
 e) un fragmento biológicamente activo de cualquiera de a) a d); o  
 f) un derivado peptoide biológicamente activo, un derivado D-aminoacídico, o derivado híbrido péptido-peptoide de cualquiera de a) a e) que tiene una semivida *in vivo* aumentada; o  
 g) un sistema de liberación que comprende una molécula de ADN que codifica cualquiera de a) a e)
- 55 en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de afecciones **caracterizadas por** la actividad y/o migración excesivas de monocitos y/o macrófagos.
- 60 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde el agente es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.
14. La opticina, o un fragmento biológicamente activo de la misma, para su uso como un medicamento.

**Figura 1. Secuencias de proteína madura**

**Opticina humana:**

ASLPRKERKRREEQMPREGDSFEVLPLRNDVLPDNYGEVIDLSNYEELTDYGDQLPEVKVTSI  
 PATSISPAKSTTAPGTPSSNPTMTRPTTAGLLSSQPNHGLPTCLVCVCLGSSVYCDIDLEDI  
 PLPRRTAYLYARFNRI SRIRAEDFKGLTKLKRIDL SNLISSIDNDAFRLLHALQDLILPENQI  
 ALPVLPSGIEFLDVRLNRLQSSGIQPAAFRAMEKQLQFLYLSDNLLDSIPGPLPLSLRSVHLQNI  
 IETMQRDVFCDPPEEHKHTRRQLEDIRLDGNPINLSLFP SAYFCLPRLPIGRFT

**Opticina bovina:**

ASLSEEREGDPYAILHLGDYVLSLDNYDEVIDPSNYDELIDYGDQLPQVKGTSLASLTRTRFTQ  
 TEARTLPSNPTTARPTLGLLAAPANHGLPTCLICVCLGSSVYCDADLENIPPLPQTAYLYA  
 RFNRISHIRAGDFKGLTKLKRIDL SGNLISSIDDKALRLLPALRDILPENKLVALPTLPTSI  
 LDVRMNRLQSSGIQPEAFRALEKQLQFLYLADNLLDAIPPSLPLSLRSLHLQNNMIETMQDAP  
 AEEHRHTRRPLEDIRLDGNPINLSLFP SAYFCLPRLPTGRFV

**Epificano humano:**

APTLESINYDSETYDATLEDLDNLYNYENIPVGKVEIEIATVMPSGNRELLTPPPQPEKAQEEI  
 EEESTPRLIDGSSPQEPFTGVLGPHNTNEFTPCLLCTCISTTVYCDDELAI PPLPKNTAYFY  
 RFNRICKINKNDFASLSDLKRIDLTSNLI SEIDEDAFRKLQQLRELVL RDNKIRQELPTTLTF  
 ISNNRLGRKGIKQEA FKDMYDLHHL YLTDNNLDHI PLPLPENLRALHLQNNNILEMHEDTFCM  
 NLTYIRKALEDIRLDGNPINLSKTPQAYMCLPRLPVGSLV

**Osteoglicina/mimecano humano:**

KPAPPTQODSRIIYDYGTDNFEEISFSQDYEDKYLDGKNIKEKETV IIPNEKSLQLOKDEAITI  
 PPKKENDEMPCLLCVCLSGSVYCEEVDIDAVPPLPKESAYLYARFNKI KKLTAKDFADI PNLH  
 LDFTGNLIEDIEDGTFSKLSLLEELSLAENQLLKL PVLPPKLT LFNAYNKIKSRGIKANAFKI  
 NNLTFLYLDHNALESVPLNLPESLRVIHLQFNNIASITDDTFCKANDTSYIRDRIEEIRLEGNI  
 VLGKHPNSFICLKRLPIGSYF

**Alineamiento de las regiones repetidas ricas en leucina de opticina, osteoglicina/mimecano y epificano:**

Opticina	GLPTCLVCVCLGSSVYCDIDLEDI PPLPRRTAYLYARFNRI SRIRAEDFKGLTKLKRID
Epificano	DFPTCLWCTCISTTVYCDDELAI PPLPKNTAYFYSRFNRI KINKNDFASLSDLKRID
Osteoglicina	EMPTCLLCVCLSGSVYCEEVDIDAVPPLPKESAYLYARFNKI KKLTAKDFADI PNLRRLO :*** *.*. :***: : : :***: :***:***:*. : : ** . . . :*.*
Opticina	LSNNLISSIDNDAFRLLHALQDLILPENQLEALPVLPSGIEFLDVRLNRLQSSGIQPAAF
Epificano	LTSNLI SEIDEDAFRKLQQLRELVL RDNKIRQELPELPTTSTFIDISNNRLGRKGIKQEA
Osteoglicina	FTGNLIEDIEDGTFSKLSLLEELSLAENQLLKL PVLPPKLT LFNAYNKIKSRGIKANAF :.***. *.:.* * .*. * :*: ** ** . : : * : : ** : *
Opticina	RAMEKQLQFLYLSDNLLDSIPGPLPLSLRSVHLQNNLIETMQRDVFCDPPEEHKHTRRQLED
Epificano	KDMYDLHHL YLTDNNLDHI PLPLPENLRALHLQNNNILEMHEDTFCNGKNLTYIRKALED
Osteoglicina	KKLNNLTFLYLDHNALESVPLNLPESLRVIHLQFNNIASITDDTFCKANDTSYIRDRIEE : : . * .*** . * * : * ** . * * :*** * * : * .***. : : : * : *
Opticina	IRLDGNPINLSLFP SAYFCLPRLPIGRFT
Epificano	IRLDGNPINLSKTPQAYMCLPRLPVGSLV
Osteoglicina	IRLEGNPVLGKHPNSFICLKRLPIGSYF ***:*** * . * . : : * ***:*

\* = Aminoácidos idénticos en las tres proteínas  
 : = Aminoácidos conservados  
 . = Aminoácidos semi-conservados

**Figura 2.**

**Fig 2a**

ASLSEEREGDPYAILHLGDYVLSLDNYDEVIDPSNYDELIDYGDQLPQVKGTSLASLTRT  
RFTQSTEAARTLPSNPTTARPPTLGLL

**Fig 2b**

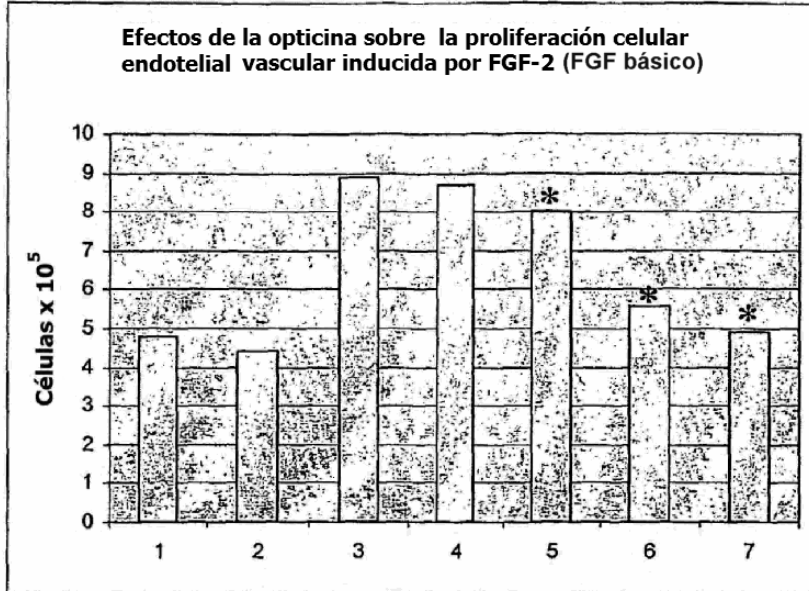
Humana: DNYGEVIDLSNYEELTDYGDQLPE  
Bovina: DNYDEVIDPSNYDELIDYGDQLPQ

**Fig 2c**

Alineamiento del NH terminal de las secuencias de opticina de diferentes especies:

Bovino	ASLS--EERE-----GDPYAILHLGDYVLSLDNYDEVIDPSNYDELIDYGDQLPQVKG	
Perro	ASLP--KERKRRDEM---GEGDSYVVLGNYVLGPDNYDEVIDLSDYEGLMDYGDQLPEAKV	
Humano	ASLPR-KERKRREQMPREGDSFEVLPLRNDVLPDNYGEVIDLSNYEELTDYGDQLPEVKV	
Ratón	ASLLGEREREBQSPEE---GDTYASLYVGNHTLSIEDYNEVIDLSNYEELADYGDQIPEAKI	
	*** .**:	*: : : .*. :*.***** **: * *****:*.*
Bovino	TSLASLTRTRFTQSTEAARTLPSNPTTARPPTLGLLAAP	109
Perro	TNLAPPTGISSAQSTMTPTLSLKPTMIRPTLGVLGSP	115
Humano	TSLAPATSISPAKSTTAPGTTSSNPTMTRPTTAGLLSS	119
Ratón	SNLTLPTRTSPT-STVAQKTLSPNLTMVPTTTGLLNSQ	116
	:.*: * : ** : * . : * *. **: :	

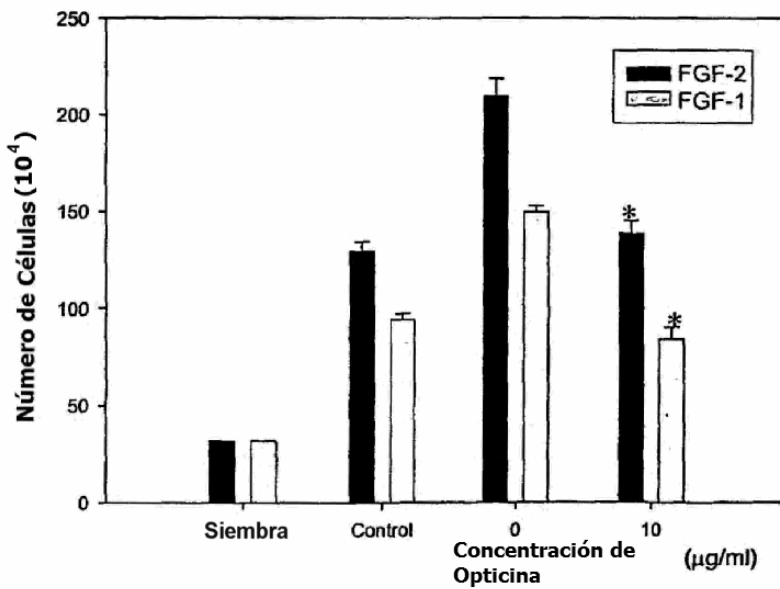
**Figura 3. Ensayos de proliferación con FGF-2**



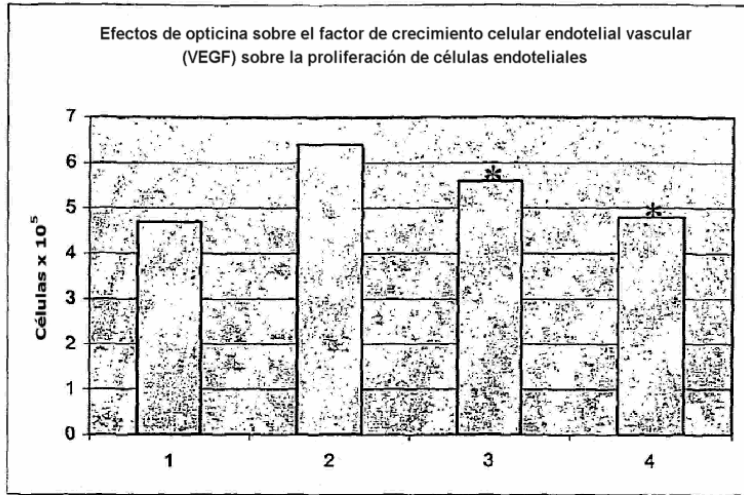
- 1 = Control
- 2 = Control con opticina añadida ( 10 µg/ml )
- 3 = FGF-2 solo
- 4 = FGF-2 y 0.1 µg/ml de opticina
- 5 = FGF-2 y 1 µg/ml de opticina
- 6 = FGF-2 y 10 µg/ml de opticina
- 7 = FGF-2 y 25 µg/ml de opticina

\* Denota un descenso significativo en la proliferación

**Figura 4 Ensayos de proliferación que comparan FGF-2 y FGF-1**

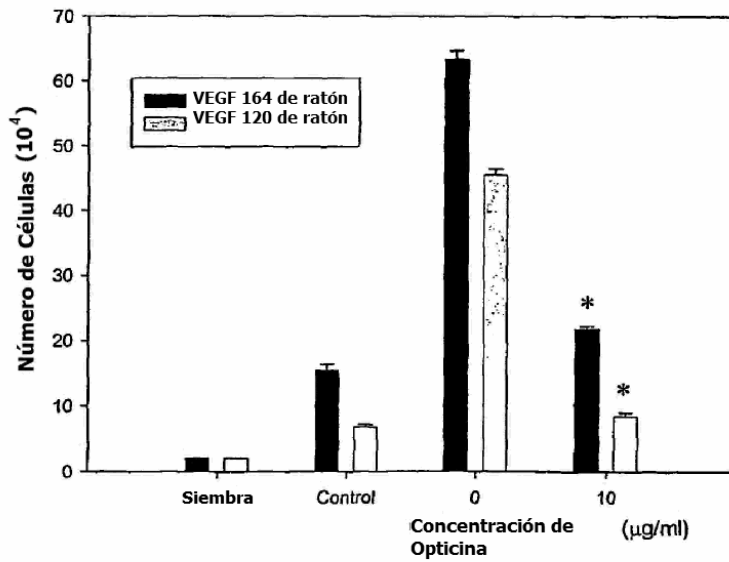


**Figura 5 Ensayos de proliferación con VEGF<sub>164</sub>**



- 1 = Control
- 2 = VEGF<sub>164</sub> solo
- 3 = VEGF<sub>164</sub> + 1 µg/ml de opticina
- 4 = VEGF<sub>164</sub> + 10 µg/ml de opticina
- \* Denota un descenso significativo en la proliferación

**Figura 6. Ensayos de proliferación que comparan VEGF<sub>164</sub> con VEGF<sub>120</sub>**

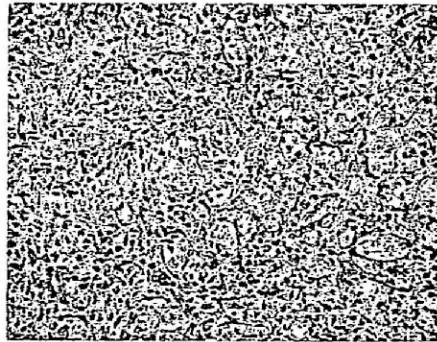


**Figura 7. Imagen ejemplares del ensayo de formación de brotes/tubos con FGF-2**

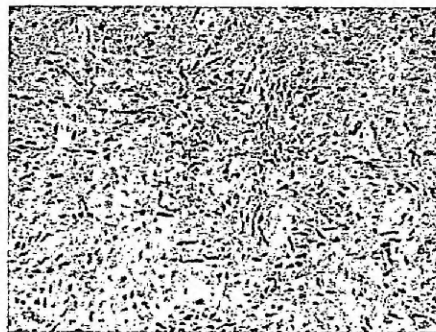
Control



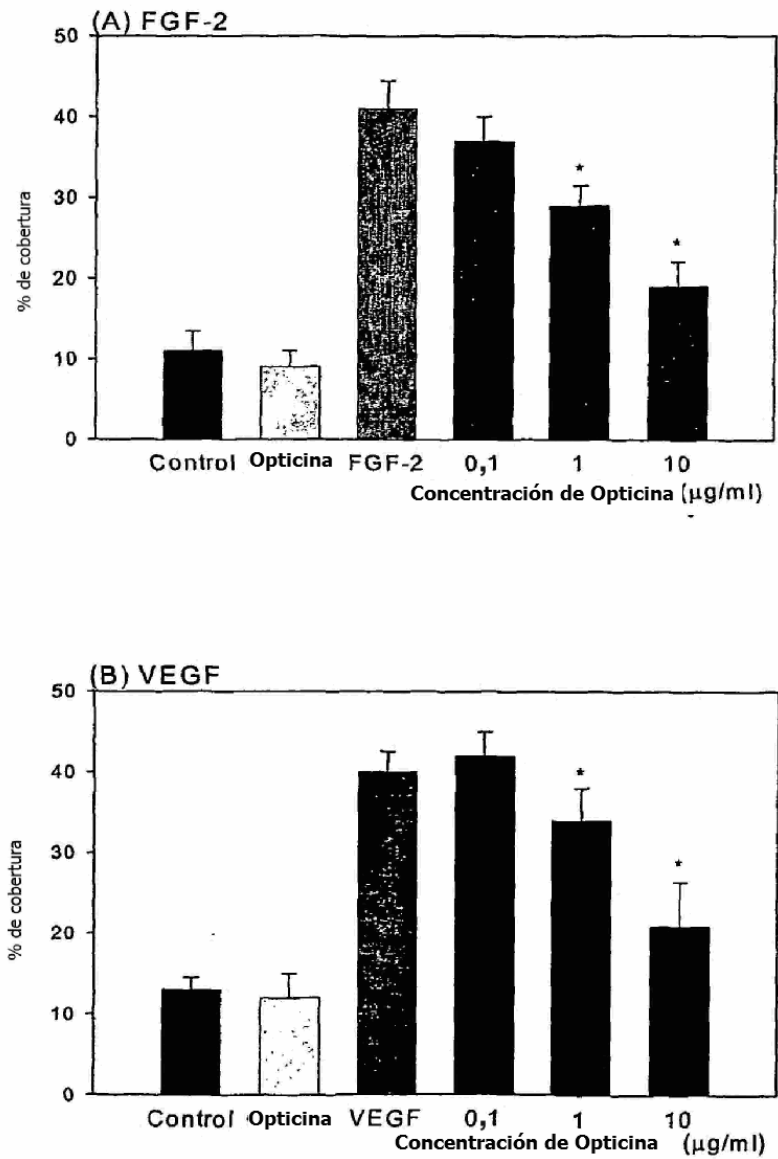
Con FGF-2



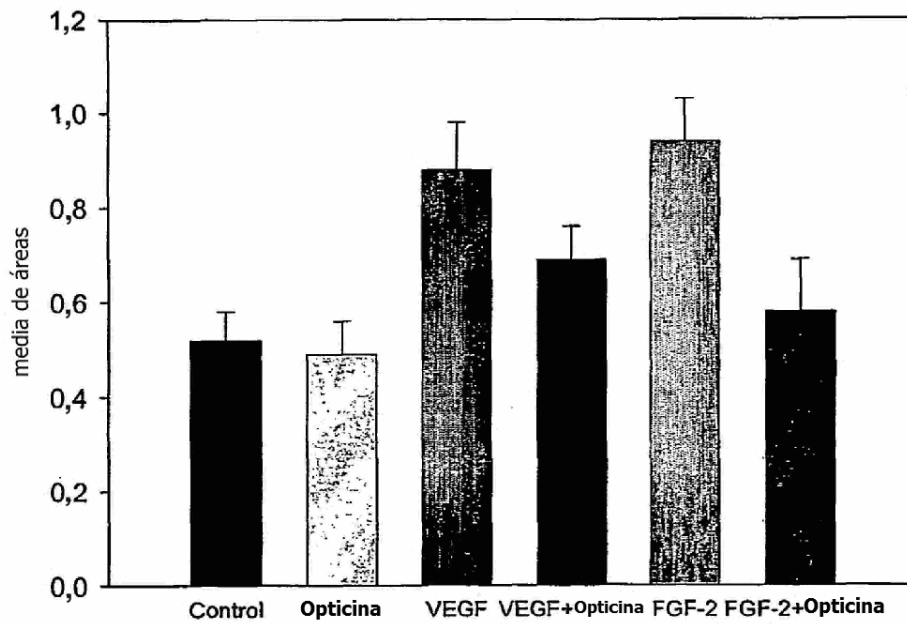
Con FGF-2 y  
opticina a 10  $\mu\text{g/ml}$



**Figura 8. Representación gráfica de los datos de los ensayos de formación de brotes/tubos con FGF-2 y VEGF<sub>164</sub>**

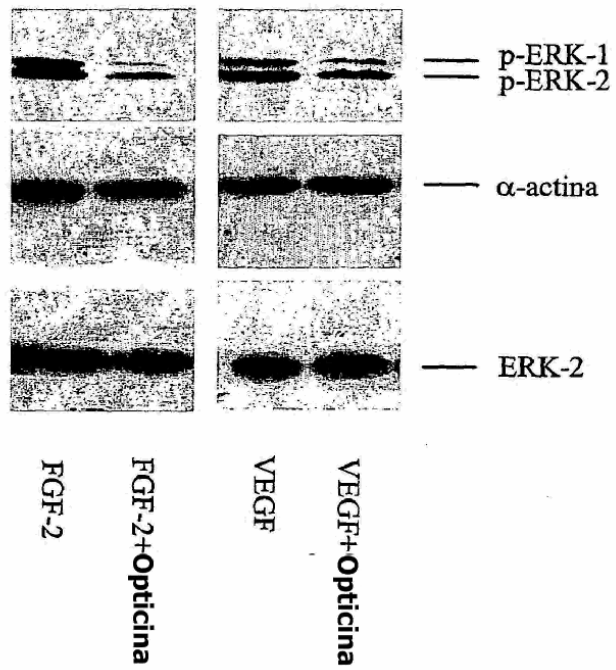


**Figura 9. Ensayo de migración celular endotelial vascular con VEGF<sub>164</sub> y FGF-2**

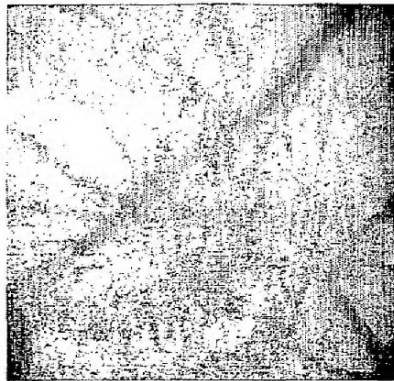




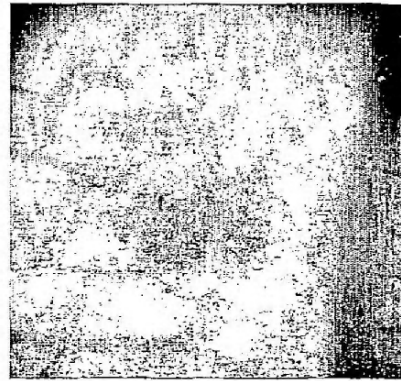
**Figura 10.**  
**Descenso de la fosforilación de ERK-1/2 cuando las células se estimulan por VEGF<sub>164</sub> y FGF-2 en presencia de opticina**



**Figura 11. Ensayo de membrana corialantoidea de pollo (CAM)**

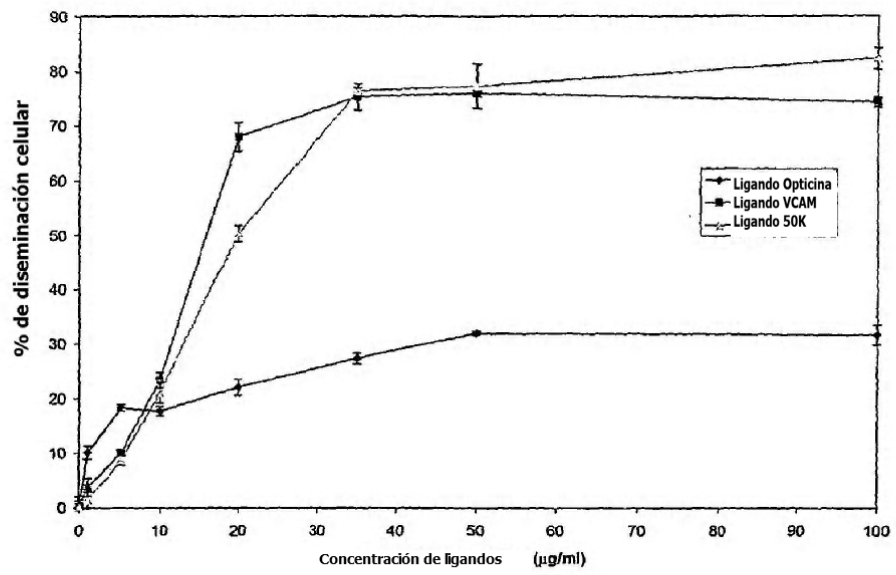


FGF-2

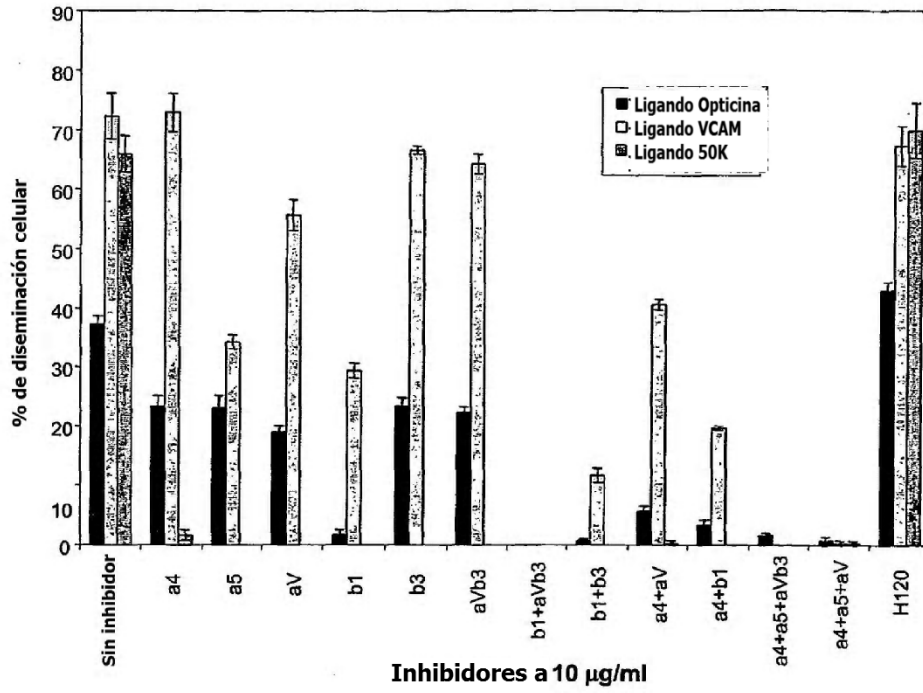


FGF-2 + Opticina

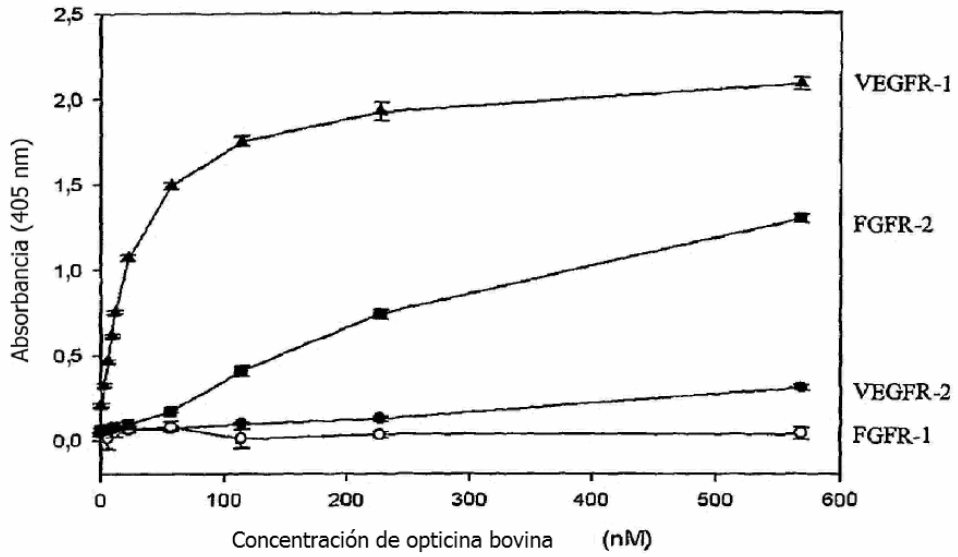
**Figura 12. Ensayos de diseminación celular**



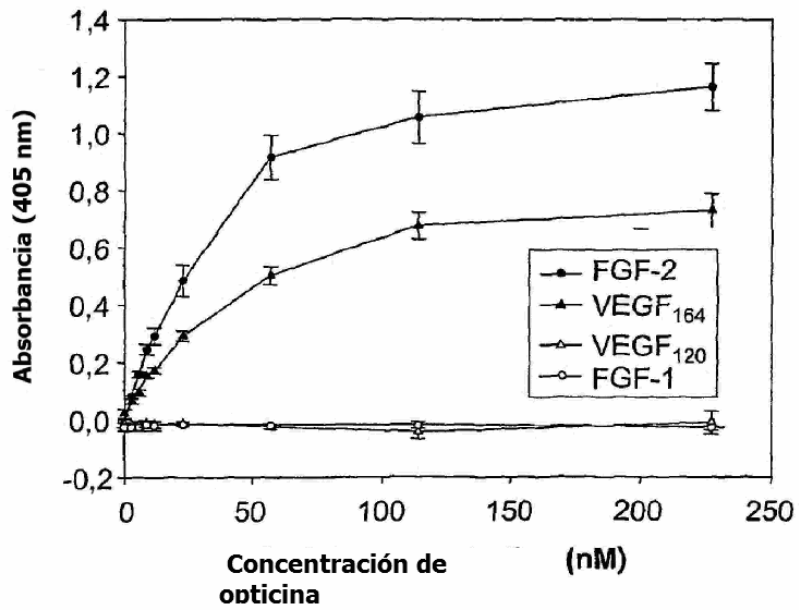
**Figura 13. Ensayos de diseminación celular con función de bloqueo de integrinas**



**Figura 14. Ensayos de unión en fase sólida**

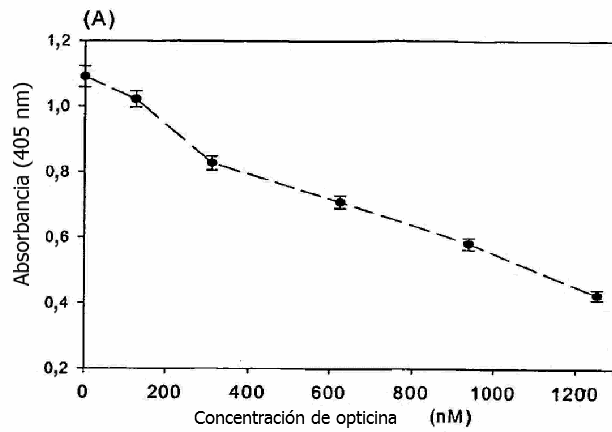


**Figura 15. Gráfico que muestra la unión en fase sólida con unión de optina a VEGF<sub>164</sub> y FGF-2 pero no a VEGF<sub>120</sub> y FGF-1.**



**Figura 16. Ensayos de competición en fase sólida**

(A) La opticina, por unión a FGF-2 inhibe su interacción con el receptor de factor de crecimiento FGFR-1



(B) La opticina, por unión a VEGF<sub>164</sub> inhibe su interacción con el receptor del factor de crecimiento VEGFR-2

