

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 772**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10	(2006.01)	C07K 19/00	(2006.01)
A61K 38/45	(2006.01)		
A61K 47/42	(2006.01)		
A61K 47/48	(2006.01)		
A61K 9/19	(2006.01)		
A61P 25/00	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 35/04	(2006.01)		
A61P 9/00	(2006.01)		
C07K 14/435	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2007** **E 10195185 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013** **EP 2407536**

54 Título: **Variantes de proteínas de fusión de ADP-ribosil transferasa**

30 Prioridad:

22.12.2006 US 643940
12.06.2007 US 808773

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.01.2014

73 Titular/es:

BIOAXONE BIOSCIENCES INC. (100.0%)
1313 s. Andrew Avenue
Fort Lauderdale, FL 33316, US

72 Inventor/es:

MCKERRACHER, LISA y
MUNZER, JON SCOTT

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 439 772 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

Variantes de proteínas de fusión de ADP-ribosil transferasa

Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas

Esta solicitud es una continuación en parte de la solicitud estadounidense n.º 11/643.940 presentada el 22 de diciembre de 2006, que es una continuación en parte de la solicitud estadounidense n.º 10/902.878 presentada el 2 de agosto de 2004 y de la solicitud n.º 10/902.959 presentada el 2 de agosto de 2004, reivindicando ambas solicitudes prioridad de las solicitudes canadienses n.º 2.342.970, 2.362.004 y 2.367.636 presentadas el 12 de abril de 2001, el 13 de noviembre de 2001 y el 15 de enero de 2002 respectivamente, y reivindicando además prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 60/506.162 presentada el 29 de septiembre de 2003. El contenido total de estas solicitudes, por la presente, se incorpora como referencia.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos antagonistas de la Rho análogos a la C3 quimérica y a su uso para promover la reparación y la supervivencia neuronales en lesiones del sistema nervioso central de mamíferos, incluida la retina, y para la inhibición de la proliferación de células neoplásicas.

Antecedentes

La lesión traumática de la médula espinal da como resultado un deterioro funcional permanente. La mayoría de los déficits asociados a la lesión medular resultan de la pérdida de los axones dañados en el sistema nervioso central (SNC). Análogamente, otras enfermedades del SNC se asocian a pérdida y retracción axonales, como accidentes vasculares cerebrales, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), demencia, enfermedades priónicas, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, lesiones cerebrales traumáticas, degeneración macular y glaucoma. Estas enfermedades del SNC, incluyendo muchas enfermedades oftalmológicas, comparten la pérdida de las conexiones axonales con sus dianas y la muerte celular. La capacidad de estimular el crecimiento de los axones de la población neuronal afectada o dañada mejoraría la recuperación de las funciones neurológicas perdidas y la protección frente a la muerte celular limitaría la extensión del daño. Por ejemplo, después de un accidente vascular en la sustancia blanca, los axones se dañan y se pierden, aun cuando los cuerpos neuronales sigan vivos; el accidente vascular en la sustancia gris destruye muchas neuronas y células no neuronales (gliales). Los tratamientos eficaces para generar brotes de axones dañados son igualmente efectivos para tratar algunos tipos de accidente vascular cerebral (Chen *et al.*, 2002, PNAS 99:9031-9036). Con frecuencia se estudian agentes neuroprotectores como posibles compuestos para limitar el daño después del accidente vascular cerebral. Los compuestos con propiedades promotoras del crecimiento y neuroprotectoras son candidatos especialmente buenos para el tratamiento del accidente vascular cerebral y las enfermedades neurodegenerativas.

Se ha propuesto el uso de varios antagonistas de Rho como agentes para estimular la regeneración de axones (seccionados), es decir, de lesiones nerviosas; véase, por ejemplo, la solicitud de patente canadiense n.º 2.304.981 (McKerracher *et al.*) y 2.300.878 (Strittmatter). Estos documentos de solicitud de patente proponen el uso de antagonistas de Rho conocidos, como, por ejemplo, las proteínas C3 quiméricas, así como sustancias seleccionadas entre compuestos trans-4-amino (alquil)-1-piridilcarbamoilciclohexano o inhibidores de la Rho cinasa conocidos para uso en la regeneración de axones. La C3 inactiva la Rho mediante ADP-ribosilación y es poco tóxica para las células (Dillon y Feig, 1995, *Methods in Enzymology: Small GTPases and their regulators* Part. B, 256: 174-184).

El tratamiento con antagonistas de la Rho también se usaría para potenciar la velocidad de crecimiento axonal de los nervios periféricos y, por tanto, sería eficaz para la reparación de los nervios periféricos tras la cirugía, por ejemplo, al reimplantar miembros amputados. Además, la Rho es una diana importante para el tratamiento del cáncer y las metástasis (Clark *et al.*, 2000, *Nature*, 406: 532-535) y la hipertensión arterial (Uehata *et al.*, 1997, *Nature*, 389: 990); se ha descrito que RhoA tiene un efecto cardioprotector (Lee *et al.*, *FASEB J.*, 15: 1886-1884).

Se ha propuesto la dianización de los mecanismos de señalización intracelular en los que participan Rho y Rho cinasa para promover la regeneración axonal (solicitud de patente canadiense n.º 2.304.981). La C3 exotransferasa del *Clostridium botulinum* (a partir de ahora, denominada simplemente C3) puede estimular la regeneración y la gemación de los axones dañados; la C3 es una toxina purificada del *Clostridium botulinum* (Wilde *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem.*, 275: 16478). Los compuestos de la familia de la C3 del *Clostridium botulinum* inactivan la Rho por ADP-ribosilación y, por tanto, actúan como antagonistas del efecto o la función de Rho (antagonistas de Rho).

Mientras la proteína C3 puede promover eficazmente la regeneración, se ha observado que no penetra fácilmente en las células, por lo que deben administrarse dosis altas para que sea eficaz. La alta dosis de C3 recombinante necesaria para promover la recuperación funcional representa una limitación práctica al uso de C3 *in vivo* para favorecer la regeneración. En estudios en cultivos tisulares, se ha observado que la cantidad mínima de C3 que puede emplearse para inducir el crecimiento en sustratos inhibidores es de 25 µg/ml (Lehmann *et al.*, 1999, *J. Neurosci.* 19: 7537-7547). Si las células no están trituradas, incluso esta dosis es ineficaz. Se ha estimado que se requiere aplicar un mínimo de 40 µg de C3 por 20 g de ratón a la médula espinal o nervio óptico de rata (solicitud de patente canadiense n.º 2.325.842). Calculando las dosis que serían necesarias para tratar un ser humano adulto con

una dosis equivalente por peso (según la proporción de la dosis empleada en experimentos en ratas y ratones), se requeriría aplicar 120 mg/kg de C3 a la médula espinal humana dañada. La gran cantidad de proteína C3 recombinante necesaria entraña problemas considerables de fabricación, por la purificación proteica a gran escala y el coste. También limita los intervalos posológicos que pueden analizarse por la gran cantidad de proteína necesaria para las dosis mínimas efectivas.

Otra limitación relacionada respecto al uso de C3 para promover la reparación del SNC dañado es la dificultad de penetración de la membrana plasmática de la célula viva. En estudios en cultivos tisulares en los que se han analizado los efectos biológicos de la C3, esta se ha microinyectado directamente a las células (Ridley y Hall, 1992, *Cell*, 70: 389-399) o se ha aplicado por trituración de las células para romper la membrana celular (Lehmann *et al.*, 1999, *J. Neurosci.*, 19: 7537-7547). En la lesión axonal *in vivo*, la proteína C3 probablemente pueda entrar en las células porque los axones dañados captan ávidamente las sustancias del entorno. Tras la lesión medular (LM) incompleta se observa una plasticidad de los sistemas motores atribuida a niveles cortical y subcortical, incluidos los circuitos medulares. Esta plasticidad puede atribuirse a la gemación axonal o dendrítica de colaterales y al reforzamiento o debilitamiento sinápticos. Además, se ha demostrado que la conservación de algunas fibras ventrolaterales puede traducirse en diferencias significativas de la función motora, dado que estas fibras son importantes para el inicio y el control del patrón locomotor a través de generadores de patrones medulares centrales. Está bien documentado que se produce una reorganización de las fibras medulares corticales colaterales preservadas después de la lesión medular, lo que contribuye a la recuperación funcional. El proceso de reorganización y gemación de las fibras preservadas podría potenciarse con el tratamiento con proteínas similares a la C3 capaces de penetrar en las neuronas no dañadas, lo que fomentaría la plasticidad espontánea de los axones y el remodelado dendrítico que, como es sabido, contribuyen a la recuperación funcional.

Otros métodos de administración de C3 *in vitro* incluyen la creación de una proteína recombinante que pueda ser captada por un mecanismo mediado por un receptor (Boquet *et al.*, 1995, *Meth. Enzymol.*, 256: 297-306). El inconveniente de este método estriba en que las células que requieren el tratamiento deben expresar el receptor relevante. Por último, la adición de una proteína de unión C2II al medio de cultivo tisular, junto con una toxina de fusión C21N-C3 permite la captación de C3 por endocitosis mediada por receptor (Barthe *et al.*, 1998, *Infection and Immunity*, 66: 1364). El inconveniente de este sistema radica en que gran parte de la C3 en la célula quedará confinada en el interior de un compartimento membranoso. Y aún más importante, deben añadirse dos proteínas por separado para que se produzca el transporte, lo que dificulta la aplicación de este sistema en la enfermedad *in vivo*.

Actualmente, se requiere una terapia que pueda detener la progresión de la degeneración de las enfermedades oftalmológicas. Las neuronas de la retina se derivan del SNC y cabe esperar que respondan a los tratamientos efectivos en otras regiones del SNC, por ejemplo, la degeneración macular asociada con la edad (DMAE). La mayoría de tratamientos experimentales conocidos hasta la fecha abordan la forma húmeda de la DMAE y se dirigen específicamente contra la neovascularización. La fotocoagulación con láser de las membranas neovasculares subretinianas que se producen en el 10-15% de los pacientes afectados puede ser beneficioso en pacientes con degeneración macular que desarrollan neovascularización coroidea extrafoveal aguda. En la DMAE seca, altas dosis diarias de antioxidantes como vitamina C (500 mg), vitamina E (400 IU) y betacaroteno (15 mg), así como de óxido de zinc (80 mg; en los tejidos oculares se ha observado una alta concentración de zinc, especialmente, en la retina, el epitelio pigmentario y la coroides) pueden reducir moderadamente el riesgo de progresión de pacientes con drusas de tamaño intermedio y grande, atrofia geográfica no central o degeneración macular avanzada en un ojo. Existe una necesidad actual de tratamiento de estas enfermedades oftalmológicas con sustancias que protejan las neuronas retinianas. Asimismo existe una necesidad actual de tratamiento para personas con retinopatía isquémica aguda. La retinopatía isquémica o la neuropatía óptica isquémica provocan la muerte irreversible de las neuronas retinianas, lo que provoca un deterioro visual permanente. No cabe esperar que esta afección responda a los tratamientos actuales de la DMAE. Las proteínas análogas a C3 pueden reducir la muerte celular y la progresión de la enfermedad.

Por tanto, cabe esperar que las nuevas proteínas análogas a C3 sean útiles en diversas enfermedades en las que se requiera la inhibición de la actividad de la Rho. Así, existe una necesidad de sustancias, métodos terapéuticos y formulaciones para el tratamiento o la prevención de las enfermedades en las que se requiere la inhibición de la actividad de la Rho. Asimismo sería deseable disponer de compuestos proteicos análogos a la C3 con la capacidad de penetrar en el interior de las células tumorales y de inactivar rápidamente la Rho en dosis inferiores.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a los nuevos antagonistas de la Rho análogos a la C3 quimérica y su uso para promover la reparación y la supervivencia neuronales en lesiones del sistema nervioso central de mamíferos, incluida la retina, y para la inhibición de la proliferación de células neoplásicas. En un aspecto, se facilitan los polipéptidos correspondientes a los nuevos antagonistas de la Rho análogos a la C3 quimérica, así como las composiciones que comprenden los polipéptidos. En otros aspectos, se facilitan métodos terapéuticos con los polipéptidos y las composiciones de la invención, así como el uso de los polipéptidos y las composiciones de la invención.

En un aspecto, los polipéptidos de la invención incluyen proteínas conjugadas o de fusión (polipéptidos) que comprenden, por ejemplo, proteínas de fusión análogas a C3 y proteínas de fusión quiméricas de C3. Los polipéptidos ejemplares de la invención incluyen SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 10, así como análogos o variantes de estos. En otro aspecto, los polipéptidos de la invención incluyen SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 10; los polipéptidos están truncados por 20 aminoácidos en el N-terminal o los polipéptidos están truncados por 10 aminoácidos en el C-terminal o los polipéptidos están truncados tanto por 20 aminoácidos en el N-terminal y 10 aminoácidos en el C-terminal. En otro aspecto, los polipéptidos de la invención incluyen cualquiera de los polipéptidos presentados aquí. En otro aspecto, los polipéptidos de la invención están PEGilados.

En otro aspecto, los polipéptidos de la invención incluyen los de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79.

En otro aspecto, un polipéptido de la invención está unido covalentemente a una secuencia de aminoácidos de un agente de transporte, lo que facilita la captación del polipéptido por un mecanismo independiente o dependiente de receptor. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del agente de transporte es el polipéptido de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76 y/o SEQ ID NO: 77. En otro aspecto, el polipéptido de la invención es un conjugado de proteínas de fusión, con permeabilidad celular, que comprende una parte polipeptídica de transporte de membrana celular y las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir un conjugado de proteínas de fusión, con permeabilidad celular, que comprende una parte polipeptídica de transporte de membrana celular y un polipéptido de la invención sustancialmente purificado. En otro aspecto, se facilita una parte polipeptídica de transporte de membrana celular que comprende un péptido que contiene entre aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos.

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos de la invención. En un aspecto, las composiciones farmacéuticas incluyen un portador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición farmacéutica es estéril, esterilizable o está esterilizada. En otro aspecto, la composición farmacéutica está en un vial en cantidad de dosis unitaria o en un múltiplo integral de una cantidad de dosis unitaria. En otro aspecto, la composición farmacéutica está seca o liofilizada o comprende una matriz deshidratada o comprende una proteína de fusión en una matriz liofilizada. Además, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir un adhesivo tisular y/o fibrina, que puede ser un sellador de fibrina, por ejemplo, Tisseel®.

Los ejemplos no limitantes de portadores farmacéuticamente aceptables para emplear en las composiciones de la invención incluyen poli(etileno-co-vinil acetato), PVA, poli(etileno-co-vinil acetato) parcialmente hidrolizado, poli(etileno-co-vinil acetato-co-vinil alcohol), un poli(etileno-co-vinil acetato) reticulado, un poli(etileno-co-vinil acetato) parcialmente hidrolizado reticulado, poli(etileno-co-vinil acetato-co-vinil alcohol) reticulado, poli-D,L-ácido láctico, poli-L-ácido láctico, ácido poliglicólico, PGA, copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico (PLGA), policaprolactona, polivalerolactona, poli (anhídridos), copolímeros de policaprolactona con polietilenglicol, copolímeros de ácido poliláctico con polietilenglicol, polietilenglicol y combinaciones y mezclas de los mismos.

En otro aspecto, el portador farmacéuticamente aceptable es una gelatina acuosa, una proteína acuosa, un portador polimérico, un agente reticulante o una combinación de los mismos. En otro aspecto, el portador farmacéuticamente aceptable es una matriz. En otro aspecto, el portador farmacéuticamente aceptable incluye agua, una sal tamponada farmacéuticamente aceptable, una solución tamponada farmacéuticamente aceptable, un antioxidante farmacéuticamente aceptable, ácido ascórbico, uno o más polipéptidos de bajo peso molecular farmacéuticamente aceptables, un péptido con aproximadamente 2 a aproximadamente 10 aminoácidos, una o más proteínas farmacéuticamente aceptables, uno o más aminoácidos farmacéuticamente aceptables, un aminoácido esencial para el ser humano, uno o más carbohidratos farmacéuticamente aceptables, uno o más materiales derivados de los carbohidratos farmacéuticamente aceptables, un azúcar no reductor, glucosa, sacarosa, sorbitol, trehalosa, manitol, maltodextrina, dextrinas, ciclodextrina, un agente quelante farmacéuticamente aceptable, EDTA, DTPA, un agente quelante para un ion metálico divalente, un agente quelante para un ion metálico trivalente, glutatión, albúmina sérica inespecífica farmacéuticamente aceptable y/o combinaciones de los mismos.

La invención también se refiere a métodos terapéuticos que comprenden la administración a un sujeto de los polipéptidos o composiciones de la invención. En un aspecto, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de polipéptido o composición. En otro aspecto, el sujeto necesita dicho tratamiento. El sujeto puede ser un mamífero, concretamente, un ser humano, en ciertos aspectos de la invención. En un aspecto, los polipéptidos y las composiciones de la invención pueden administrarse por vía tópica. En otro aspecto, los polipéptidos y las composiciones de la invención pueden administrarse por inyección.

En un aspecto, la invención pertenece al campo de la reparación del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos (p. ej., la reparación de un daño en el sistema nervioso central (SNC), reparación de la retina dañada o de un daño en el sistema nervioso periférico (SNP)), la regeneración axonal y la gemación axonal, el crecimiento de neuritas, la actividad neuroprotectora, la protección frente a la neurodegeneración y el daño isquémico y/o el tratamiento de las lesiones traumáticas del sistema nervioso. Un aspecto de la presente invención es promover la regeneración de los axones nerviosos en la región dañada en las lesiones medulares y estimular el crecimiento nervioso en otras enfermedades del sistema nervioso central y periférico. Otro aspecto de la presente invención es promover la regeneración neuronal del sistema nervioso periférico.

Se facilitan los siguientes métodos terapéuticos: un método para tratar la degeneración macular en un sujeto; un método para inhibir o reducir la tasa de neovascularización subretiniana y/o la proliferación de tejido neovascular intraocular asociadas a la degeneración macular en un sujeto; un método para proteger los fotorreceptores retinianos de la muerte celular asociada a la degeneración macular en un sujeto y/o un método para prevenir y/o inhibir la proliferación incontrolada o la diseminación o la migración de una célula neoplásica metastásica de un cáncer en un sujeto. En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la prevención o la inhibición de la proliferación incontrolada o la diseminación o la migración, con un margen de resección de un tejido del huésped proximal al sitio de extirpación de un tumor de un cáncer en un sujeto o una célula neoplásica metastásica residente en el margen de resección. La administración puede ser directamente en la superficie del margen de resección o por debajo de la superficie del margen de resección o en el tejido proximal al margen de resección que queda en el sujeto y la administración puede ser en un intervalo de tiempo anterior o posterior o anterior y posterior a la extirpación o eliminación del tumor.

En otro aspecto, se facilita un método de prevención del crecimiento de un tumor a partir de una célula maligna en un tejido del huésped en un sujeto. El polipéptido, proteína de fusión o composición de la invención puede prevenir o inhibir simultáneamente como mínimo dos características: migración de células malignas, proliferación de células malignas, angiogénesis o formación de estructuras tubulares o crecimiento de una red capilar proximal a la célula maligna y la secreción de una metaloproteinasa activa por parte de la célula maligna. También se presenta un método de prevención del crecimiento dentro de un margen de resección de tejido de un huésped proximal al sitio de extirpación o eliminación de un primer tumor de un cáncer en un sujeto o un segundo tumor que comprende una célula tumoral residual del cáncer. La administración puede ser directamente en la superficie del margen de resección o por debajo de la superficie del margen de resección o en el tejido proximal al margen de resección que queda en el sujeto y puede ser en un intervalo de tiempo anterior o posterior o anterior y posterior a la extirpación o eliminación del primer tumor; la proteína de fusión simultáneamente previene o inhibe como mínimo dos características: migración de células tumorales residuales, proliferación de células tumorales residuales, angiogénesis o formación de estructuras tubulares o crecimiento de una red capilar proximal a la célula tumoral residual y secreción de una metaloproteinasa activa por parte de la célula tumoral residual. En un aspecto, el cáncer es mamario, cerebral, colónico, cutáneo, renal o hepático. En otro aspecto, el cáncer es un tumor cerebral como, por ejemplo, un tumor glial, un tumor neuronal, un tumor de la glándula pineal, un tumor meníngeo, un tumor de una vaina nerviosa, un linfoma, un tumor malformativo y un tumor metastásico derivado de tumores de pulmón, mama, melanoma, riñón o tubo digestivo. En otro aspecto, el cáncer es un tumor cerebral seleccionado del grupo que comprende: astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, astrocitoma pilocítico, oligodendroglioma, ependimoma, ependimoma mixopapilar, subependimoma, papiloma del plexo coroideo, neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, ganglioneuroma y meduloblastoma, pineoblastoma y pineocitoma, meningioma, hemangiopericitoma meníngeo, sarcoma meníngeo, schwannoma (neurolemmoma) y neurofibroma, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, subtipos primario y secundario del linfoma de Hodgkin, subtipos primario y secundario del linfoma no hodgkiniano, craneofaringioma, quistes epidermoides, quistes dermoides y quistes coloides.

En un aspecto, una cantidad terapéuticamente eficaz es aproximadamente de 0,001 microgramos por cc a aproximadamente 50 microgramos por cc de tejido, o aproximadamente 0,0001 microgramos de proteína de fusión por centímetro cúbico (cc) de tejido a aproximadamente 100 microgramos por centímetro cúbico de tejido, o aproximadamente 1 microgramo por mililitro a aproximadamente 10 microgramos por mililitro a aproximadamente 50 microgramos por mililitro. La administración puede ser por inyección, por aplicación tópica o por implantación. En un aspecto, la administración es intraarticular, intraocular, intranasal, intraneural, intradérmica, intraósea, sublingual, oral, tópica, intravesical, intratecal, intravenosa, intraperitoneal, intracraneal, intramuscular, subcutánea, inhalación, por atomización e inhalación, por aplicación directamente en un tumor, por aplicación directamente en un punto patológico, por aplicación directamente en los márgenes remanentes tras la resección de un tumor, enteral, enteral junto con un procedimiento gastroscópico y/o CPRE.

En otro aspecto, se facilita un método para el tratamiento de las lesiones de la médula espinal, así como un método para prevenir o tratar la degeneración macular y/o un método para prevenir o tratar el cáncer.

La invención también se refiere a el uso de polipéptidos y composiciones de la invención, por ejemplo, para el tratamiento de lesiones medulares, degeneración macular y/o cáncer (p. ej., cáncer mamario, cerebral, colónico, cutáneo, renal o hepático). En un aspecto, se promueve la regeneración o crecimiento de axones o neuritas en un sujeto. En otro aspecto, la invención se refiere a el uso de polipéptidos y composiciones de la invención en la

fabricación de un medicamento, p. ej., para el tratamiento de las lesiones de la médula espinal, degeneración macular y/o cáncer (p. ej., cáncer mamario, cerebral, colónico, cutáneo, renal o hepático).

En un aspecto, un sujeto puede tener una enfermedad neurológica o neurodegenerativa. Los ejemplos no limitantes de dichas enfermedades son: enfermedad de Stargardt, amaurosis congénita de Lebers, enfermedad de Best, coroideremia, retinosquiasis, síndrome de Bardet-Biedl, neuropatía óptica anterior isquémica, retinopatía de Purtscher, neuritis óptica, papiledema, enfermedad de Coats y/o aneurisma miliar de Leber, neuropatía inmunitaria y periférica, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, neuropatía de axones gigantes, neuralgia del trigémino, neuralgia del glosofaríngeo, parálisis de Bell, miastenia grave, distrofia muscular, atrofia muscular progresiva, atrofia muscular hereditaria progresiva bulbar, síndromes por herniación, ruptura o prolapso de discos vertebrales, espondilosis cervical, trastornos del plexo, síndromes de destrucción de la salida torácica, acrilamidas, gamma-dicetonas (neuropatía del inhalador de cola), disulfuro de carbono, dapsona, garrapatas, porfiria, síndrome de Guillain-Barré, corea de Huntington, demencia por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), enfermedades priónicas y glaucoma. En otro aspecto, un sujeto tiene una lesión del sistema nervioso resultante de un accidente vascular cerebral, cirugía, infarto, infección, exposición a agentes tóxicos, síndromes de neoplasia maligna o paraneoplásicos.

Estos y otros aspectos de la presente invención serán evidentes con la referencia a la descripción detallada asociada y las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

Ahora se hará referencia a los dibujos acompañantes que muestran, mediante la ilustración, una realización de estos, y en los que:

- La Figura 1 ilustra la actividad de una proteína de fusión de la invención, la SEQ ID NO: 43, y ausencia de actividad de una mutante inactiva de la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 6, según el análisis por bioensayo con células NG-108; las células NG-108 cultivadas con SEQ ID NO: 43 presentan una gemación acelerada de neuritas (barra 42, que muestra aproximadamente un 40% de gemación de neuritas); y la gemación de neuritas de células NG-108 tratadas con SEQ ID NO: 6 (barra 41, que muestra aproximadamente un 12% de gemación de neuritas) es similar a la del control (barra 40, que muestra aproximadamente un 14% de gemación de neuritas) de las células no tratadas lo que demuestra que la proteína de la SEQ ID NO: 6 no es activa como proteína de fusión para inducir una gemación acelerada de neuritas;

- La Figura 2 ilustra en (A) una alineación de los extremos N-terminales de la exoenzima WT C3, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 43; los aminoácidos indicados en cursiva representan el péptido de señal escindido endógenamente de la exoenzima WT C3, mientras que los que están en negrita se han obtenido por ingeniería genética; en (B) una representación esquemática de las variantes; en (C) un gel de gradiente que muestra dimerización de la SEQ ID NO: 44; en (D) un gel de gradiente que muestra una estabilidad potenciada de la SEQ ID NO: 10; y en (E) un gel de gradiente que muestra la purificación representativa de la variante (SEQ ID NO: 44);

- La Figura 3 ilustra las secuencias eliminadas de las variantes truncadas de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO: 13-22); las partes resaltadas de las secuencias peptídicas ilustran los estiramientos de aminoácidos suprimidos para generar las nuevas variantes truncadas de SEQ ID NO: 10; los aminoácidos resaltados en gris representan las secuencias suprimidas del extremo N- o C-terminal de SEQ ID NO: 10; los aminoácidos subrayados indican la secuencia del transporte de membrana;

- La Figura 4A ilustra geles NuPAGE que muestran una variante de peso molecular estándar (banda 1), una variante purificada PEG-BA-220 (banda 3), una variante PEG-BA-225 (banda 4), una variante PEG-BA-230 (banda 5), una variante PEG-BA-231 (bandas 6 y 7); y la Figura 4B ilustra geles NuPAGE que muestran una variante de peso molecular estándar (banda 1), una variante purificada PEG-BA-230 (banda 3), una variante PEG-BA-231 (banda 4), una variante PEG-BA-235 (banda 5), una variante PEG-BA-236 (banda 6) y una variante PEG-BA-240 (banda 8);

- La Figura 5 ilustra el efecto neuroprotector de SEQ ID NO: 10 en retinas glaucomatosas. *: $p < 0,0001$ (ANOVA)

- La Figura 6 ilustra la supervivencia de los fotorreceptores visualizada mediante tinción H&E en ratas adultas expuestas a la luz durante 3 días y la supervivencia determinada 5 días después de la exposición en presencia de 1 μ g de SEQ ID NO: 10;

- La Figura 7 ilustra que SEQ ID NO: 10 aumenta la supervivencia de los fotorreceptores después de 2 inyecciones de 0,01 μ g;

- La Figura 8 ilustra que la inyección intravítrea de SEQ ID NO: 10 protege la capa nuclear exterior en ratones *Rd1*;

- La Figura 9A ilustra un histograma que representa el número total de fotorreceptores analizados con TUNEL en una longitud de 100 micras, mientras en la Figura 9B se ilustra que SEQ ID NO: 10 reduce la muerte celular por apoptosis de los fotorreceptores en retinas de ratones *Rd1*;

- La Figura 10 ilustra que la inyección intravítrea de SEQ ID NO: 10 inhibe la angiogénesis fisiológica en la retina de rata;
- La Figura 11 ilustra que la aplicación tópica de SEQ ID NO: 10 redujo la angiogénesis patológica en la córnea de ratón;
- 5 - La Figura 12 ilustra que la inyección intravítrea de SEQ ID NO: 10 redujo la neovascularización subretiniana inducida por láser en ratones;
- La Figura 13 ilustra en (A–C) fotografías de secciones de nervio óptico tratadas mediante inmunotinción con un anticuerpo CTβ para demostrar la regeneración de axones distalmente al sitio de la lesión (puntas de flecha) 2 semanas después de la microlesión en animales no tratados (A) y tratados con SEQ ID NO: 44 (B) o tratados con SEQ ID NO: 43 (C) y en (D–E) cuantificación de la regeneración 2 semanas después de la microlesión en animales tratados con SEQ ID NO: 44 (D) y SEQ ID NO: 43 (E), en comparación con controles; barra de escalas: en A–C = 100 μm, *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, prueba de la t de Student;
- 10 - La Figura 14 ilustra en (A) fotografías de secciones de nervio óptico tratadas mediante inmunotinción con un anticuerpo CTβ para demostrar la regeneración de axones distalmente al sitio de la lesión (puntas de flecha) 2 semanas después de la microlesión en animales tratados con la SEQ ID NO: 43 y en controles tratados con PBS. Se inyectó SEQ ID NO: 43 o PBS en el vítreo 4 días después de la lesión del nervio óptico. Barra de escala = 100 μm; en (B) una cuantificación de la regeneración en animales tratados con la SEQ ID NO: 43 en comparación con controles; y en (C) una comparación de la mayor longitud axonal media en cada grupo de tratamiento después del tratamiento inmediato o diferido; en que ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ y prueba de la t de Student;
- 15 - La Figura 15 ilustra CGR marcadas retrospectivamente 1 semana antes de la lesión del nervio óptico. Se inyectó SEQ ID NO: 43 o vehículo en el vítreo tras la sección del nervio óptico y se contaron las CGR marcadas retrospectivamente en preparaciones de retina total realizadas 7 o 14 días después de la axotomía;
- 20 - La Figura 16 ilustra los niveles de variantes PEG-BA de bajo peso molecular descritas en la Figura 5 en las retinas de ratas adultas (ELISA) a las 24 horas de la inyección intravítrea;
- 25 - La Figura 17 ilustra la ADP-ribosilación de RhoA 24 horas después de la inyección intraocular de la variante PEG-BA en ratas;
- La Figura 18 ilustra la evolución cronológica de la permanencia retiniana de la SEQ ID NO: 10 frente a BA-231 (variante PEGilada de SEQ ID NO: 10) después de la inyección intravítrea;
- La Figura 19 ilustra los niveles de la variante PEG-BA de alto peso molecular en la retina de ratas adultas a las 24 h y 48 h tras la inyección intraocular;
- 30 - La Figura. 20 presenta geles SDS que demuestran un desplazamiento del peso molecular indicativo de la ADP-ribosilación de RhoA a las 24 y 48 horas de la inyección intraocular de variantes de BA en ratas;
- La Figura 21 ilustra el efecto de una composición de esta invención que comprende una proteína de fusión, la SEQ ID NO: 43, sobre la proliferación de células HEC1B de adenocarcinoma endometrial humano determinada mediante incorporación de timidina tritiada; el vehículo (10) es solución salina tamponada con fosfato y la SEQ ID NO: 43 se emplea en concentraciones de 1 μg/ml (11), 10 μg/ml (12) y 50 μg/ml (13) y se reduce la proliferación de células cancerosas de forma dependiente de la dosis;
- 35 - La Figura 22 ilustra el efecto de una composición de esta invención que comprende una proteína de fusión, SEQ ID NO: 43, sobre la proliferación de células SK-MEL-1 de melanoma humano determinada mediante incorporación de timidina tritiada; el vehículo es solución salina tamponada con fosfato y la SEQ ID NO: 43 se emplea en concentraciones de 1 μg/ml, 10 μg/ml y 50 μg/ml; se reduce la proliferación de células cancerosas de forma dependiente de la dosis;
- 40 - La Figura 23A ilustra la formación de tubos por células endoteliales HUVEC cultivadas en una matriz MATRIGEL®; es un ensayo en cultivo celular para la angiogénesis y puede observarse la formación de tubos en el control que no contiene una proteína de fusión de esta invención (casilla 30);
- 45 - La Figura 23B ilustra la reducción de la formación de tubos por células endoteliales HUVEC cultivadas en una matriz MATRIGEL®; los cultivos tratados con una composición de esta invención que contiene una proteína de fusión, la SEQ ID NO: 43, presentaron menos tubos, lo que demuestra una inhibición de la angiogénesis, como se muestra en la casilla 31;
- 50 - La Figura 24 muestra la inhibición del crecimiento de células TK-10 de carcinoma renal humano por una composición de esta invención que contiene una proteína de fusión, SEQ ID NO: 43, determinada por un ensayo de inhibición del crecimiento de sulforrodamina B (SRB); el SEQ ID NO: 43, se emplea en concentraciones de 0,1 μg/ml, 1 μg/ml, 10 μg/ml y 100 μg/ml; en todas las concentraciones usadas redujeron la proliferación de células cancerosas; la reducción de la proliferación de células cancerosas es dependiente de la dosis y en una

concentración de proteína de fusión de 100 µg/ml, la composición de la invención indujo la muerte celular de las células cancerosas;

- La Figura 25 muestra la inhibición del crecimiento de células HOP-62 de cáncer pulmonar no microcítico por una composición de esta invención que contiene la SEQ ID NO: 43, determinada por un ensayo de inhibición del crecimiento de sulforrodamina B (SRB); el SEQ ID NO: 43 se emplea en concentraciones de 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml y 100 µg/ml y en todas las concentraciones empleadas, se reduce la proliferación de las células cancerosas y esta reducción es dependiente de la dosis;

- La Figura 26 muestra la inhibición del crecimiento de células SF-286 de cáncer del SNC por una composición de esta invención que contiene una proteína de fusión, la SEQ ID NO: 43, determinada por un ensayo de inhibición del crecimiento de sulforrodamina B (SRB); la SEQ ID NO: 43 se emplea en concentraciones de 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml y 100 µg/ml y en todas las concentraciones empleadas, se reduce la proliferación de las células cancerosas y esta reducción es dependiente de la dosis;

- La Figura 27 muestra la reducción de los niveles de RhoA activada después de la incubación con 10 microgramos por mililitro de SEQ ID NO: 10, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas y 24 horas después de la administración de una composición farmacéutica con una proteína de fusión de esta invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- La Figura 28 muestra la inhibición del crecimiento (en crecimiento porcentual frente a un control de vehículo como referencia) de células Caki-1 de carcinoma renal por una composición que contiene la SEQ ID NO: 43, el porcentaje de crecimiento determinado con un ensayo de SRB en concentraciones relativas de proteína de fusión de 0,1, 1, 10 y 100;

- La Figura. 29 ilustra que la SEQ ID NO: 10 reduce la angiogénesis en anillos aórticos de rata; se cortó la aorta de una rata en anillos de 1 mm, los anillos aórticos se recubrieron con ECMatrix® solidificada (matrigel) y se incubaron sin (control) o con 10 µg/ml de la SEQ ID NO: 10 del día 0 al día 7-8, se rellenaron los medios que contenían (paneles 2 y 4) o no (paneles 1 y 3) SEQ ID NO: 10 el día 4; en (A) se observó angiogénesis en los anillos bajo microscopía de contraste invertida de fases a un aumento de 25 X (panel superior) o 100 X (panel inferior) y en (B) se determinó la longitud de los vasos y se presentó como media ± EEM (los resultados son representativos de 3 experimentos independientes analizados como mínimo por triplicado y el símbolo * representa una diferencia significativa ($p < 0,05$) frente a los anillos de control);

- La Figura 30 ilustra que la SEQ ID NO: 10 ADPRibosila la RhoA; HUVEC subconfluentes se trataron durante 24 horas con diferentes concentraciones de SEQ ID NO: 10 (0-25 µg/ml, panel superior) o con 10 µg/ml de SEQ ID NO: 10 durante un tiempo variable (0,5-8 h, panel inferior) y se analizó la ADP-ribosilación de la RhoA mediante inmunoelectrotransferencia (western blot) usando el ensayo de inmunoprecipitación de RhoA

- La Figura 31 ilustra que SEQ ID NO: 10 reduce la formación de tubos en HUVEC, cuando se sembraron HUVEC en ECMatrix® solidificada sin (Control) o con 10 µg/ml o 50 µg/ml de SEQ ID NO: 10 o el inhibidor de la angiogénesis Tranilast, las células también se incubaron con 10 µM o 50 µM del inhibidor de la ROCK Fasudil, se visualizaron estructuras semejantes a capilares entre las 6 h a las 20 h de incubación, y en (A) se obtuvieron fotografías bajo microscopía de contraste invertido de fases a un aumento de 40 X y (B) se describió la cuantificación de la longitud de los tubos como porcentaje ± EEM de la longitud de las células no tratadas (fotografías y cuantificación representativas como mínimo de 2 experimentos independientes analizados por triplicado; los símbolos * y ** representan respectivamente diferencias significativas ($p < 0,05$) y altamente significativas ($p < 0,01$) respecto a las células no tratadas);

- La Figura 32 ilustra que SEQ ID NO: 10 afecta la proliferación de HUVEC en alta concentración; las HUVEC se colocaron en placas de 96 pocillos (recubiertos de colágeno I) y se incubaron durante 24 h o 72 h con 0 a 100 µg/ml (o µM) de SEQ ID NO: 10, Fasudil o Tranilast, las células de 4 h y 24 h se lavaron y se añadió medio fresco que no contenía compuestos de estudio y se dejaron hasta 72 horas y al final del tratamiento (72 horas), se añadió Alamar Blue (R), se incubaron durante 4 horas y se determinó la fluorescencia. La proliferación se representa en una gráfica como porcentaje de la proliferación de las células no tratadas (0 µg/ml) ± DE y representa 2 estudios independientes analizados por triplicado;

- La Figura 33 ilustra que SEQ ID NO: 10 puede modificar la migración de HUVEC dependiente de VEGF; en (A) se sembraron HUVEC en cámaras Transwell® de 24 pocillos recubiertos con fibronectina que contenían SEQ ID NO: 10, Fasudil o Tranilast, se estimuló la migración durante 20 horas con 10 ng/ml de VEGF con o sin compuesto de estudio; las células migradas se determinaron por fluorescencia usando calceína-AM como sonda y en (B) HUVEC fueron pretratadas durante 24 horas con 50 µg/ml de SEQ ID NO: 10 antes del inicio de la migración (los resultados se expresan como porcentaje respecto a las células no tratadas estimuladas con VEGF ± EEM y representan 4 experimentos independientes analizados por duplicado; los símbolos * y *** representan, respectivamente, diferencias significativas ($p < 0,05$) y altamente significativas ($p < 0,001$) respecto a las células no tratadas + VEGF (Control + VEGF); el símbolo # # # representa una diferencia significativa ($p < 0,001$) respecto a las células no tratadas - VEGF (control - VEGF));

- La Figura 34 ilustra el perfil de penetración y distribución de una C3 permeable para las células en la médula espinal de la rata; en (A) se muestra la comparación de la penetración de la SEQ ID NO: 10 con C3 natural (SEQ ID NO: 1) en la médula espinal de la rata; SEQ ID NO: 10 se detectó por inmunoelectrotransferencia (western blot) tras contusión con dura intacta y dura abierta, mediante cirugía (B) se muestra el patrón de distribución de SEQ ID NO: 10 a lo largo de la médula espinal y (C) también se presenta (detección inmunohistoquímica) la penetración de SEQ ID NO: 10 (50 µg) 24 h después de la aplicación en la médula espinal contusionada;

- La Figura 35 muestra la inactivación de Rho dependiente del tiempo y la dosis por el tratamiento con SEQ ID NO: 10 tras la contusión en ratas; en (A) se aplicaron extraduralmente diferentes dosis de SEQ ID NO: 10 en Tisseel® inmediatamente después de una contusión moderada de la médula espinal en ratas hembra adultas (10 g x 25 mm) y se determinaron los niveles de Rho activa 24 h después de la lesión medular; en (B) se lesionaron médulas espinales en diferentes momentos tras la aplicación de 50 µg de SEQ ID NO: 10 en Tisseel® (2 h a 7 días) y se recogieron tejidos 3 h después de la lesión para medir los niveles de Rho activa;

- La Figura 36 muestra el tratamiento diferido con la SEQ ID NO: 10 que promueve la recuperación funcional en ratones; en (A) se muestra que después de laminectomía y hemisección de la ME en ratones BALB/c hembra adultos, se aplicó inmediatamente 1 µg de la SEQ ID NO: 10 en Tisseel® en la médula espinal, (B) el tratamiento se difirió 24 h tras la LM y (C) el tratamiento se difirió 72 h tras la LM; cada grupo de tratamiento tenía su propio control (solo Tisseel®) para representar la variabilidad en la segunda cirugía diferida necesaria para administrar el tratamiento a las 24 o 72 h (las flechas representan la aplicación del tratamiento); la lesión medular inicial se consideró el día 0 y la recuperación locomotora se determinó durante 16 días con la escala "Beattie-Bresnahan-Basso" modificada de 17 puntos para ratones (escala BBB);

- La Figura 37 ilustra que la SEQ ID NO: 10 es bien tolerada cuando se aplica localmente en la médula espinal de la rata; (A) muestra el peso corporal de cada rata (SEQ ID NO: 10 o vehículo) que se determinó inmediatamente antes de la cirugía y cada semana durante 8 semanas; (B) y (C) muestran la morfología de la médula espinal de la rata 3 meses después de la laminectomía y tratamiento; en (B) se muestra la sección longitudinal de la médula espinal de una rata tratada con vehículo (Tisseel®); en (C) la médula espinal es una sección longitudinal de una rata tratada con 50 µg de SEQ ID NO: 10; se realizó la laminectomía pero se mantuvo la dura intacta; el rostral se dejó en el lado izquierdo y la barra indica 400 µm;

- La Figura 38 ilustra que la SEQ ID NO: 10 mejora la función locomotora tras la contusión de la médula espinal en ratas; en (A) se determinó el peso corporal de cada rata (SEQ ID NO: 10, n = 11 o vehículo, n = 12) antes de la cirugía y cada semana durante 8 semanas; (B), se sometió a ratas macho adultas a laminectomía y una contusión moderada de la médula espinal (impactador NYU, un peso de 10 g soltado desde una altura de 50 mm), se aplicó la SEQ ID NO: 10 (15 µg) o vehículo en Tisseel® en la dura de la médula espinal inmediatamente después de la LM. Se midió la puntuación BBB de vehículo y SEQ ID NO: 10 en las ratas tratadas cada semana durante 8 semanas por parte de dos observadores independientes que desconocían la asignación terapéutica; en (C) se presenta el porcentaje de ratas que alcanzaron la colocación en soporte plantar con carga o que caminaron (puntuación BBB de 9 a 11) en el grupo tratado con vehículo frente al grupo tratado con la SEQ ID NO: 10 en función del tiempo;

- La Figura 39 muestra que la SEQ ID NO: 10 confiere neuroprotección a la médula espinal contusionada en la rata; en (A) se determinó la sustancia gris y blanca preservadas en la lesión de 1 cm en secciones transversales de la médula espinal, teñidas con azul de Luxol rápido mediante un sistema informatizado; el análisis se realizó 8 semanas después de la lesión y el tratamiento; en (B) se calcularon las áreas totales de lesión para cada rata mediante el área bajo la curva generada por el porcentaje de tejido preservado en 2 cm de médula espinal; y

- La Figura 40 ilustra que la SEQ ID NO: 10 no influyó sobre la aparición de alodinia tras la contusión en ratas; se realizó la prueba de Von Frey de retirada de la pata 6 semanas tras el tratamiento con la SEQ ID NO: 10 o vehículo en ratas hembra con contusión grave.

- La Figura 41 ilustra que la SEQ ID NO: 10 modificó la localización y expresión de cadherina; se sembraron HUVEC en portas de cámara de 8 pocillos recubiertos de colágeno I en A) 2×10^3 células o 2×10^4 células por pocillo y se incubaron durante 24 h sin (Control) o con 25 µg/ml de SEQ ID NO: 10. Después de la fijación y permeabilización de las células, se visualizó la localización de la cadherina bajo microscopia de fluorescencia empleando anticuerpos monoclonales murinos contra la Pan-cadherina y anticuerpos secundarios conjugados con FITC. Se obtuvieron imágenes a un aumento de 400 X y son representativas de 2 experimentos independientes analizados como mínimo por triplicado. Las flechas finas indican la cadherina en los contactos intercelulares, mientras las flechas gruesas indican los contactos celulares sin cadherina; en B) se incubaron HUVEC subconfluentes durante 24 h con 0, 10 o 25 µg/ml de SEQ ID NO: 10, las proteínas se extrajeron y se sometieron a SDS-PAGE al 7,5% y a inmunodetección mediante anticuerpos monoclonales murinos contra la Pan-cadherina; se realizó un sondaje de Erk en la misma membrana como control de carga de gel con anticuerpos específicos Erk1/2. Los números bajo las inmunoelectrotransferencias representan la expresión relativa de las células no tratadas y son representativos como mínimo de dos experimentos independientes analizados por duplicado.

- La Figura 42 ilustra que la SEQ ID NO: 10 modificó la localización y la expresión de ocludina, se sembraron HUVEC en portas de cámara de 8 pocillos recubiertos de colágeno I en A) 2×10^4 células por pocillo y se incubaron

durante 24 h sin (Control) o con 25 µg/ml de SEQ ID NO: 10; después de la fijación celular, se visualizó la localización de ocludina bajo microscopia de fluorescencia empleando anticuerpos policlonales de conejo antioccludina y anticuerpos secundarios conjugados con FITC. Se obtuvieron imágenes a un aumento de 400 X y son representativas de 3 experimentos independientes analizados como mínimo por duplicado. Las flechas finas indican la ocludina en los contactos intercelulares; en B) se incubaron HUVEC subconfluentes durante 24 h o 48 h con 25 µg/ml de SEQ ID NO: 10, las proteínas se extrajeron y se sometieron a SDS-PAGE al 7,5% y a inmunodetección mediante los mismos anticuerpos antioccludina; se realizó un sondaje de Erk en la misma membrana como control de carga de gel con anticuerpos específicos de Erk1/2. Los números bajo las inmunoelectrotransferencias representan la expresión relativa de las células no tratadas y son representativos como mínimo de dos experimentos independientes analizados por duplicado.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a proteínas conjugadas o de fusión (polipéptidos) que comprenden, por ejemplo, proteínas de fusión análogas a C3 y proteínas de fusión quiméricas de C3. Las proteínas de fusión de la presente invención se comentarán especialmente en cuanto a su uso para facilitar la regeneración de axones y la neuroprotección, así como compuestos antitumorales. Cabe entender que las proteínas de fusión pueden ser aprovechadas también en otros contextos.

La presente invención pertenece especialmente al campo de la reparación del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos (p. ej., la reparación de un daño en el sistema nervioso central (SNC), reparación de la retina dañada o de un daño en el sistema nervioso periférico (SNP)), la regeneración axonal y la gemación axonal, el crecimiento de neuritas, la actividad neuroprotectora y la protección frente a la neurodegeneración y el daño isquémico.

La presente invención es útil para el tratamiento de las lesiones traumáticas del sistema nervioso. En particular, los métodos y composiciones de la presente invención pueden ser útiles para el tratamiento del daño asociado a la oclusión de la arteria/vena central o colateral, traumatismo, edema macular, glaucoma de ángulo cerrado, glaucoma de ángulo abierto, degeneración macular asociada a la edad, retinitis pigmentosa, desprendimientos retinianos, daño asociado al tratamiento con láser (incluida la terapia fotodinámica), retinopatía diabética y retinopatía yatrogénica fotoinducida. En otra realización, los métodos y composiciones de la invención se emplean para el tratamiento del daño asociado a la enfermedad de Stargardt, amaurosis congénita de Lebers, enfermedad de Best, coroideremia, retinosquiasis, síndrome de Bardet-Biedl, neuropatía óptica isquémica anterior, retinopatía de Purtscher, neuritis óptica, papiledema, enfermedad de Coats y/o aneurisma miliar de Leber. La presente invención es útil para tratar enfermedades o trastornos como lesiones de la médula espinal, neuropatía inmunitaria y periférica, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, lesión cerebral traumática, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, neuropatía de axones gigantes, neuralgia del trigémino, neuralgia del glosofaríngeo, parálisis de Bell, miastenia grave, distrofia muscular, atrofia muscular progresiva, atrofia muscular hereditaria progresiva bulbar, síndromes por herniación, ruptura o prolapso de discos vertebrales, espondilosis cervical, trastornos del plexo, síndromes de destrucción de la salida torácica, acrilamidas, gamma-dicetonas (neuropatía del inhalador de cola), disulfuro de carbono, dapsona, garrapatas, porfiria, síndrome de Guillain-Barré, corea de Huntington y otras enfermedades asociadas a la pérdida y retracción axonales, demencia por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), enfermedades priónicas y glaucoma.

El glaucoma es la segunda causa más frecuente de ceguera en todo el mundo, después de las cataratas. Se ha estimado que más de 50 millones de personas sufren glaucoma; más de 7 millones de personas presentan ceguera bilateral (de ambos ojos) causada por esta enfermedad (Quigley HA. Glaucoma: Macrocosm to Microcosm The Friedenwald Lecture. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2005; 46: 2663-2670). El glaucoma es un grupo de enfermedades caracterizadas por la degeneración progresiva del nervio óptico que provoca pérdida de campo visual y ceguera irreversible. Hay varios tipos de glaucoma, como el glaucoma primario de ángulo abierto, de ángulo cerrado y congénito. Una característica común de todos los tipos de glaucoma es la muerte de las células ganglionares de la retina (CGR). Cuando se produce una pérdida sustancial de CGR, el paciente experimenta un deterioro gradual y progresivo de la visión, habitualmente más acusado en un ojo que en el otro. La pérdida visual habitualmente empieza en la periferia y avanza hasta afectar a la visión central. En estadios avanzados de la enfermedad, el paciente puede notar también pérdida de visión nocturna.

La elevación de la presión intraocular es otro factor clave de riesgo para la aparición de glaucoma. El glaucoma de ángulo abierto y de ángulo cerrado, las formas más frecuentes de la enfermedad, se asocian con frecuencia a la elevación de la presión intraocular. El tratamiento convencional actual del glaucoma estriba en reducir la presión intraocular con medicación (p. ej., tratamiento con prostaglandinas) y/o cirugía. Sin embargo, estos tratamientos tienen riesgos y efectos adversos (Lee DA, Higginbotham EJ. Glaucoma and its treatment: a review. Am. J. Health-Syst. Pharm. 2005; 62: 691-600). Una proporción significativa de pacientes sigue experimentando pérdida de visión a pesar de responder bien a las medicaciones hipotensoras. Además, aproximadamente del 25% al 30% de pacientes en EE. UU. presentan "glaucoma normotensional" en el que se produce degeneración del nervio óptico en ausencia de elevación de la presión intraocular (Anderson DR. Collaborative Normal Tension Glaucoma Study. Curr. Opin. Ophthalmol. 2003; 14: 86-90). Por tanto, las actuales estrategias terapéuticas contra el glaucoma son insuficientes y se necesitan con urgencia nuevas soluciones para retrasar la progresión de la enfermedad.

En otra realización, las composiciones y métodos de la invención se emplean para tratar el glaucoma, incluido, sin limitación, el glaucoma de ángulo abierto, el glaucoma de ángulo cerrado y el glaucoma congénito.

La presente invención es útil para el tratamiento de lesiones de la médula espinal. La médula espinal y el cerebro forman el sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados. La médula espinal se extiende a lo largo del eje longitudinal del cuerpo y está rodeada por el canal medular. En el ser humano, la médula espinal está dividida en ocho segmentos cervicales, doce segmentos torácicos, cinco segmentos lumbares, cinco segmentos sacros y uno o dos segmentos coccígeos. La sustancia gris central, con sus proyecciones laterales (el asta anterior y el asta posterior), está formada por los citosomas de las neuronas, mientras que la sustancia blanca periférica está formada por los haces de las fibras nerviosas medulares. Las vías nerviosas aferentes (ascendentes o sensitivas) y las eferentes (descendentes o efectoras) discurren en la sustancia blanca. Las vías eferentes de la médula espinal son piramidales (para los movimientos voluntarios) o extrapiramidales (para los movimientos involuntarios y para la distribución del tono muscular). La mayoría de las fibras piramidales discurren con una decusación en el tracto piramidal lateral del lado opuesto y en menor número sin la decusación en el tracto piramidal anterior a las neuronas del asta anterior y del asta posterior en los diversos segmentos de la médula espinal.

La médula espinal y el cerebro están formados por células de dos tipos: las células nerviosas o neuronas y las células gliales. Las células gliales pueden ser oligodendrocitos o astrocitos. Los oligodendrocitos forman la vaina de mielina de los axones, en tanto que los astrocitos aportan nutrientes a las neuronas, absorben los neurotransmisores secretados y forman la barrera hematoencefálica. La mielina compone la vaina aislante lipídica que envuelve los nervios, de manera helicoidal. Este recubrimiento asegura la conducción fluida de los impulsos eléctricos a lo largo del nervio.

En numerosas enfermedades, la vaina miélica es atacada y destruida: esclerosis múltiple, encefalitis periaxial, esclerosis difusa, encefalomiелitis diseminada aguda, neuromielitis óptica, SMON (neuropatía mieloóptica subaguda), trastornos congénitos desmielinizantes (como la leucodistrofia) y las enfermedades inflamatorias generalmente inmunomediadas del sistema nervioso, como el síndrome de Behcet neurológico y el síndrome de Kawasaki. Esta lesión bloquea la conducción eléctrica y provoca síntomas neurológicos, con la pérdida de numerosas funciones importantes. La lesión de la médula espinal, p. ej., como resultado de un accidente, produce la anulación persistente de la función conductiva de las fibras nerviosas afectadas. La parálisis causada por la anulación completa como mínimo de un segmento se denomina lesión transversa de la médula espinal con paraplejía, lo que significa la pérdida de funciones sensitivas (p. ej., sensibilidad térmica, dolorosa y a la presión), funciones motoras (movimientos voluntarios e involuntarios) y funciones vegetativas (p. ej., función vesical e intestinal) para todas las áreas que se encuentran por debajo del segmento afectado. Debido a la poca capacidad regenerativa de las fibras nerviosas, la parálisis de los movimientos voluntarios y la pérdida total de sensibilidad son permanentes.

En una realización, la presente invención puede emplearse cuando se desea un aumento de la extensión, crecimiento o regeneración de las neuritas, p. ej., en pacientes con lesión del sistema nervioso. En otra realización, se incluye el tratamiento de pacientes con lesiones traumáticas (entre otras, traumatismos de la médula espinal, lesiones de la médula espinal u otras lesiones de las vías del SNC), lesiones nerviosas quirúrgicas, daño secundario a infarto, infección, exposición a agentes tóxicos, neoplasias malignas, síndromes paraneoplásicos o pacientes con diversos tipos de enfermedades degenerativas del sistema nervioso central. Como ejemplos de dichos trastornos figuran, entre otros, la esclerosis lateral amiotrófica, la parálisis supranuclear progresiva y otras demencias.

Una realización de la presente invención es promover la regeneración de los axones nerviosos en la región dañada en las lesiones medulares y estimular el crecimiento nervioso en otras enfermedades del sistema nervioso central y periférico.

Otra realización de la presente invención es promover la regeneración neuronal del sistema nervioso periférico. El sistema nervioso periférico comprende los nervios y las neuronas que se encuentran en el sistema nervioso central o se proyectan fuera de este (el cerebro y la médula espinal) para inervar las extremidades y los órganos. A diferencia del sistema nervioso central, el SNP no está protegido por hueso ni por una barrera hematoencefálica, lo que le expone a toxinas y lesiones mecánicas. El sistema nervioso periférico se divide en el sistema nervioso somático y el sistema nervioso autónomo.

La presente invención también es útil para el tratamiento de enfermedades oftalmológicas como la retinitis pigmentosa, la degeneración macular y la neuropatía óptica isquémica. La degeneración de componentes de la retina puede inducir ceguera parcial o total. La degeneración macular consiste en un deterioro de la región macular de la retina que reduce la agudeza visual y puede desembocar en una pérdida de la agudeza visual. La forma húmeda de la degeneración macular se relaciona con un crecimiento patológico de vasos sanguíneos en la retina que pueden sangrar y dañar las células fotorreceptoras.

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) consiste en un conjunto de síntomas oculares clínicamente identificables y puede provocar ceguera.

La degeneración macular abarca un grupo de enfermedades que afectan a la región central de la retina o mácula. Hay dos tipos básicos de degeneración macular: “húmeda” y “seca”. En la degeneración macular húmeda, hay un

crecimiento patológico de nuevos vasos sanguíneos. Estos nuevos vasos sanguíneos se rompen y sangran, lo que daña la región central de la retina. Esta forma de degeneración macular se asocia frecuentemente al envejecimiento. Aproximadamente el 90% de casos de degeneración macular son de tipo seco. En la degeneración macular seca, la pérdida visual puede ser el resultado de la acumulación de depósitos en la retina, denominados drusas, y de la muerte de las células fotorreceptoras. Este proceso puede provocar adelgazamiento y atrofia de la retina.

Los síntomas de la DMAE consisten en la presencia de drusas, trastornos del epitelio pigmentario retiniano, como acumulaciones y/o dispersiones de pigmento, desprendimiento del epitelio pigmentario retiniano, atrofia geográfica, neovascularización retiniana y aparición de cicatrices disciformes. La degeneración macular asociada a la edad es una de las principales causas de ceguera, actualmente incurable, particularmente en personas mayores de 55 años. Aproximadamente una de cada cuatro personas de edad igual o superior a 65 años presenta signos de maculopatía asociada a la edad y aproximadamente el 7% de personas de edad igual o superior a 75 años presenta degeneración macular avanzada con pérdida de visión. Un paciente con drusas y complicaciones en un ojo puede no presentar complicaciones en el otro ojo. Las complicaciones pueden consistir en una o más de las siguientes: atrofia del epitelio pigmentario retiniano, neovascularización coroidea, desprendimiento retiniano seroso y desprendimiento retiniano hemorrágico. Las drusas pueden afectar a la sensibilidad del contraste y reducir la capacidad del ojo para leer con poca luz o ver con el suficiente detalle como para conducir con seguridad por la noche. No se requiere que todas estas manifestaciones estén presentes para diagnosticar una DMAE y la presencia únicamente de drusas no se relaciona directamente con la pérdida de visión. Aunque se desconocen las causas exactas de la degeneración macular, se han identificado factores contribuyentes. El resultado conjunto de los factores contribuyentes es la alteración de las células fotorreceptoras y los tejidos subyacentes a la retina y que nutren las células fotorreceptoras, incluido el epitelio pigmentario retiniano, que directamente sustenta las células fotorreceptoras, y la coroides, que sustenta y nutre el epitelio pigmentario retiniano.

La retina y la mácula pueden sufrir daño oxidativo por oxidantes como los radicales libres y el oxígeno singlete. La mácula contiene ácidos grasos poliinsaturados y se expone a la luz, incluido el espectro visible, el espectro de la luz ultravioleta y la luz azul de alta energía, que pueden fotosensibilizar la conversión del oxígeno triplete a oxígeno singlete, un agente oxidante capaz de dañar los ácidos grasos poliinsaturados, el ADN, las proteínas, los lípidos y los carbohidratos de la mácula. Los productos reactivos resultantes de las interacciones oxidativas entre los componentes de la retina y los agentes oxidantes pueden acumularse en el epitelio pigmentario retiniano y contribuir a la degeneración macular. Algunos nutrientes antioxidantes pueden reducir el riesgo de degeneración macular al reducir la formación de radicales y oxígeno reactivo, lo que previene la muerte celular. Otro factor que puede estar implicado en la patología de la degeneración macular es la elevación de la concentración sérica del colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (LDL). El colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad puede ser oxidado por un agente oxidante para formar LDL oxidadas, que se encuentran en las placas ateroscleróticas. Estos productos oxidados pueden acumularse como depósitos en el epitelio pigmentario retiniano sano y provocar necrosis o muerte del tejido funcionante. El colesterol LDL también puede formar placas ateroscleróticas en los vasos sanguíneos de la retina y el tejido subretiniano, lo que provoca hipoxia en el tejido e induce la neovascularización. Las mujeres posmenopáusicas en tratamiento sustitutivo únicamente con estrógenos pueden tener una reducción del riesgo de degeneración macular asociada a la edad con neovascularización. Los estrógenos pueden aumentar la cantidad de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (HDL) en la sangre, lo que puede modificar el transporte y el metabolismo de los antioxidantes liposolubles y limitar la acumulación de colesterol LDL oxidado en los tejidos y vasos sanguíneos retinianos y subretinianos.

Un factor contribuyente e indicativo de degeneración macular avanzada es la neovascularización del tejido corioideo subyacente a las células fotorreceptoras en la mácula. La vasculatura ocular madura sana normalmente está quiescente y existe en un estado de homeostasis en que se mantiene el equilibrio entre mediadores positivos y negativos de la angiogénesis en el desarrollo de nueva vasculatura. La degeneración macular, particularmente en estadios avanzados, se caracteriza por el crecimiento patológico de nuevos vasos sanguíneos en la coroides subyacente a la mácula. Los vasos sanguíneos angiogénicos en la coroides subretiniana pueden rezumar líquidos que obstaculizan la visión, lo que provoca ceguera.

En un aspecto, las enfermedades oftalmológicas que cursan con neovascularización proximal a la retina, como la degeneración macular húmeda, pueden ser tratadas para reducir la tasa de neovascularización mediante la administración de una composición de esta invención que comprende una proteína de fusión de esta invención con actividad inhibidora de la angiogénesis.

En otro aspecto, las enfermedades oftalmológicas que cursan con neovascularización proximal a la retina, como la degeneración macular húmeda, pueden ser tratadas para prevenir o reducir la tasa de muerte de células fotorreceptoras mediante la administración de una composición de esta invención que comprende una proteína de fusión de esta invención.

La neovascularización proximal a la retina como resultado de una enfermedad, especialmente, la neovascularización proximal a la mácula, pueden provocar la muerte de las células fotorreceptoras en la retina de un paciente. La muerte de las células fotorreceptoras en la retina puede deberse a una enfermedad de la retina, como resultado de la neovascularización, así como de otros mecanismos de muerte celular.

La degeneración macular seca avanzada implica el depósito de drusas y la muerte de las células fotorreceptoras. Se desconoce el mecanismo del depósito de drusas, aunque la exocitosis es uno de los posibles mecanismos de liberación al espacio extracelular. Otra realización de la presente invención consiste en la inhibición del depósito de drusas y la prevención de la muerte de las células fotorreceptoras por un conjugado de proteína de fusión con permeabilidad celular que contiene un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos de un agente de transporte unido covalentemente a una secuencia de aminoácidos de un agente activo; dicha secuencia de aminoácidos de dicho agente activo consiste en una C3 ADP-ribosil transferasa o un fragmento que conserva una actividad ADP-ribosil transferasa, dicha secuencia de aminoácidos de dicho agente de transporte facilita la captación celular del agente activo, por ejemplo, una proteína de fusión como la C3APLT. En un aspecto, el análogo funcional de una unidad de exotransferasa C3 del *Clostridium botulinum* comprende una proteína que presenta una actividad ADP-ribosil transferasa en el rango del 50% al 500% de la actividad ADP-ribosil transferasa de la exotransferasa C3 del *Clostridium botulinum*. La inactivación de Rho en una célula por una proteína de fusión de esta invención después de la penetración de la membrana celular puede bloquear o inhibir la exocitosis y bloquear o inhibir la liberación por parte de la célula de material de desecho celular o material de origen celular que puede formar drusas. Una proteína de fusión de esta invención también puede prevenir la muerte celular inducida por daño de una célula del SNC.

La angiogénesis es el complejo proceso de formación de vasos a partir de vasos sanguíneos preexistentes. El proceso implica acontecimientos bioquímicos y celulares, como (1) activación de las células endoteliales (CE) por un estímulo angiogénico; (2) degradación de la matriz extracelular, invasión de las células endoteliales activadas de los tejidos circundantes y migración hacia la fuente del estímulo angiogénico y (3) proliferación y diferenciación de las células endoteliales para formar nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis en la coroides puede ser inducida por la presencia de factores de crecimiento citocínicos, como el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, basic fibroblast growth factor). La hipoxia de las células retinianas puede inducir la expresión de dichos factores de crecimiento; la hipoxia puede ser inducida por acumulaciones de desechos celulares o drusas en el epitelio pigmentario retiniano, por daño oxidativo del tejido retiniano y subretiniano o por depósitos de colesterol LDL oxidado.

El control de la angiogénesis es un proceso altamente regulado que implica estimulantes e inhibidores angiogénicos. En seres humanos y animales sanos, la angiogénesis se produce en situaciones específicas y restringidas. Por ejemplo, la angiogénesis habitualmente se observa durante la cicatrización de las heridas y la formación del cuerpo lúteo, el endometrio y la placenta. Otra realización de la presente invención consiste en la inhibición de la angiogénesis por un conjugado de proteína de fusión con permeabilidad celular que comprende un polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos de un agente de transporte unido covalentemente a una secuencia de aminoácidos de un agente activo; dicha secuencia de aminoácidos de dicho agente activo consiste en una C3 ADP-ribosil transferasa o un fragmento que conserva una actividad ADP-ribosil transferasa, dicha secuencia de aminoácidos de dicho agente de transporte facilita la captación celular del agente activo, por ejemplo, una proteína de fusión como la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 10. En un aspecto, el análogo funcional de una unidad de exotransferasa C3 del *Clostridium botulinum* comprende una proteína que presenta una actividad ADP-ribosil transferasa en el rango del 50% al 500% o más de la actividad ADP-ribosil transferasa de la exotransferasa C3 del *Clostridium botulinum*.

Se han investigado las proteínas de la familia Rho en relación con el cáncer. Ras (y RhoB como diana secundaria) son dianas para la metástasis por moléculas que inhiben la modificación postraduccional. Sin embargo, estas investigaciones terapéuticas se centran en Ras y se limitan a RhoB entre los miembros de la familia de Rho.

Se observa elevación de los niveles proteicos de RhoA y RhoB en tumores de colon, mama y pulmón. Se han observado niveles de RhoA y RhoB en secciones de 5 µm de carcinomas epidermoides de cabeza y cuello mediante anticuerpos policlonales dirigidos contra dichas proteínas, con la posterior visualización gracias al uso del kit VectaStain (Vector Labs) y análisis de imágenes. Las áreas “no neoplásicas” circundantes actuaron como controles. Aunque los niveles de la proteína RhoA aumentan con la progresión tumoral, los niveles de RhoB se redujeron en los tumores invasivos en comparación con los carcinomas *in situ* y los tumores bien diferenciados.

La sobreexpresión de RhoA y RhoB puede producirse en adenocarcinomas mamarios y pulmonares en comparación con el tejido normal, mientras que la expresión de proteínas de Rho se reduce en los tumores astrocíticos y presenta una relación inversa con las neoplasias malignas de grado II a IV.

Rho está implicada en la regulación de la migración y motilidad celulares. Las células MM1 de hepatoma de rata transfectadas con constructos mutantes de Rho A (Val¹⁴ o Val¹⁴Ile⁴¹) dieron como resultado Rho activada constitutivamente. En un ensayo *in vitro*, el porcentaje de células sembradas capaces de infiltrarse en una capa de células mesoteliales se correlacionó con el nivel de expresión de transfección con RhoA Val¹⁴. Cuando estas células transfectadas con RhoA activada se emplearon en un ensayo *in vivo* en la cavidad peritoneal, 6 de 10 implantes dieron como resultado nódulos tumorales en comparación con 2 de 8 para transfectantes simulados. Estos resultados indican que Rho activa se correlaciona con la oncogénesis.

Un extenso estudio sobre la expresión genética comparó dos sistemas de modelos de melanoma metastásico, uno humano y otro murino, y la comparación de las similitudes compartidas de la expresión genética por micromatriz

concluyó que la expresión de RhoC estaba alterada en niveles crecientes de metástasis (Clark *et al.*, 2000, Nature, 406: 532-535). Además, al manipular experimentalmente la expresión genética, la sobreexpresión de RhoC indujo el cambio de una línea celular de melanoma humano de un bajo potencial metastásico a un alto potencial metastásico.

Aunque no se observó sobreexpresión de RhoA, una mutación negativa dominante (N19RhoA) redujo el potencial metastásico.

Se identificó un conjunto de 70 genes cuya expresión se correlacionaba con la propensión a la metástasis en el cáncer mamario humano (van't Veer *et al.*, 2002, Nature, 415:530-536). Aunque no se encontraron genes Rho, el valor de un marcador de enfermedad como indicador pronóstico no se relaciona necesariamente con su valor como diana terapéutica. En el caso de la señalización de la familia Rho, se ha observado una compleja regulación de la actividad enzimática y las interacciones entre las proteínas que no es evidente únicamente a partir de las determinaciones de los niveles de transcripción.

En el cáncer, la regulación de los mecanismos de control de la proliferación celular está alterada. Se produce un aumento de la apoptosis en células EL4 de linfoma de linfocitos T murino tras la inactivación de Rho por la exoenzima C3 recombinante. En células NIH3t3, el tratamiento con el inhibidor de la Rho cinasa, Y-27632, inhibió significativamente el crecimiento independiente del anclaje. En una realización, la inactivación de Rho puede evitar la proliferación de las células tumorales y la presente invención comprende la reducción o la detención de la proliferación celular o la inducción de apoptosis por un conjugado de proteína de fusión con permeabilidad celular que contiene una parte polipeptídica de transporte membranoso y una unidad de C3 exotransferasa de *Clostridium botulinum* o un análogo funcional de estos. En otra realización, la presente invención comprende la reducción o la detención de la proliferación celular o la inducción de apoptosis por una cantidad eficaz de una composición farmacológica que comprende un conjugado de proteína de fusión con permeabilidad celular que contiene una parte polipeptídica de transporte membranoso y una unidad de C3 exotransferasa de *Clostridium botulinum* o un análogo funcional de estos.

Las células metastásicas tienen una gran capacidad migratoria. La inactivación de Rho puede evitar la migración celular en ciertos tipos de células. La C3 transferasa y el inhibidor de la Rho cinasa Y-27632 bloquean la invasión celular por células HT29 de cáncer de colon humano. En una línea celular de fibroblastos 3Y1 de rata inducibles por v-Crk, la C3 y el Y-27632 inhibieron la v-Crk, lo que dió como resultado una reducción de la motilidad celular. La reducción de la apoptosis en células RhoB^{-/-}, Rho B^{+/-} o RhoB^{-/-} MEF tratadas con doxorubicina, radiación o Taxol es el resultado de la ausencia de proteína RhoB. En otra realización, el antagonismo de Rho puede reducir la migración celular y la metástasis. En una realización, la presente invención comprende la inhibición de la migración celular por un conjugado de proteína de fusión con permeabilidad celular que contiene una parte polipeptídica de transporte membranoso y una unidad de C3 exotransferasa de *Clostridium botulinum* o un análogo funcional de estos.

Las células tumorales invasivas tienen la propiedad de degradar la matriz extracelular que las circunda mediante la secreción de proteasas que degradan la matriz extracelular. Una importante clase de proteasas secretadas por las células tumorales está integrada por las metaloproteinasas de la matriz (MMP). Estas enzimas abren vías en la matriz, a través de las cuales las células tumorales pueden propagarse e invadir. Las células tumorales producen diferentes tipos de MMP, y las MMP con frecuencia se sintetizan como proenzimas que son escindidas y liberadas tras la activación. La MMP 1 escinde la matriz de colágeno. La MMP 2 puede desempeñar una importante función en la invasión de las células del cáncer de pulmón. La MMP 9 también ha sido implicada en la invasión de las células tumorales. En otra realización, la presente invención comprende la inhibición de la expresión de MMP, procesamiento de MMP o secreción de MMP por una célula tumoral, la inhibición por un conjugado de proteína de fusión con permeabilidad celular que contiene una parte polipeptídica de transporte membranoso y una unidad de C3 exotransferasa de *Clostridium botulinum* o un análogo funcional de estos.

El cerebro está altamente especializado funcionalmente por localización: es decir, cada región anatómica específica está especializada para desempeñar una función específica. La localización de un cáncer en el cerebro de un paciente (y las enfermedades cerebrales) puede ser más importante que el tipo de tejido o el tipo de tumor. Un tumor o lesión relativamente pequeños en un área clave del cerebro puede ser mucho más devastador que una lesión mucho mayor en un área relativamente menos importante del cerebro. Una lesión de la superficie del cerebro puede ser relativamente fácil de extirpar quirúrgicamente, en tanto que un tumor de tamaño comparable, pero localizado a mayor profundidad posiblemente no sea fácil de extirpar quirúrgicamente porque el acceso al tumor profundo puede requerir la destrucción del tejido interpuesto, como la sección de estructuras vitales para alcanzar o acceder y extirpar el tumor profundo. Además, los tumores cerebrales benignos pueden ser peligrosos para el paciente. Un tumor benigno puede crecer en un área clave y causar una destrucción significativa del tejido cerebral circundante y su función. Aunque un tumor benigno puede curarse mediante resección quirúrgica, la extirpación del tumor de tejidos profundos quizá sea imposible. Si se abandona a su propia evolución, un tumor benigno puede crecer, aumentar de volumen e incrementar la presión intracraneal. Si se deja sin tratamiento, pueden comprimirse estructuras vitales del cerebro y puede sobrevenir la muerte del paciente. La incidencia de neoplasias malignas del sistema nervioso central (SNC) es aproximadamente de 8 a 16 casos por 100.000 individuos. El pronóstico de una neoplasia maligna cerebral es infausto; la supervivencia media es inferior a 1 año, aún después de la extirpación

quirúrgica. Los tumores cerebrales, especialmente, los gliomas, son predominantemente una enfermedad local que puede recidivar a una distancia aproximada de 2 centímetros del foco original de la extirpación quirúrgica.

Los ejemplos representativos de tumores cerebrales que pueden tratarse con las composiciones y métodos descritos aquí son los tumores gliales como el astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, astrocitoma poliquístico, oligodendroglioma, ependimoma, ependimoma mixopapilar, subependimoma, papiloma del plexo coroideo; tumores neuronales como el neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, ganglioneuroma y meduloblastoma; tumores de la glándula pineal como pineoblastoma y pineocitoma; tumores meníngeos como meningioma, hemangiopericitoma meníngeo, sarcoma meníngeo; tumores de las células de la vaina nerviosa como el schwannoma (neurolemmoma) y el neurofibroma; linfomas como el linfoma de Hodgkin y el linfoma no hodgkiniano, subtipos primarios y secundarios del linfoma de Hodgkin, subtipos primarios y secundarios del linfoma no hodgkiniano (incluidos numerosos subtipos de estos, tanto primarios como secundarios); tumores malformativos como craneofaringioma, quistes epidermoides, quistes dermoides y quistes coloides y tumores metastásicos localizados en el cerebro y que pueden proceder prácticamente de cualquier tipo de tumor, los más frecuentes, de tumores del pulmón, mama, melanoma, riñón y tubo digestivo.

Se han indicado ejemplos de técnicas de administración de la composición farmacéutica de la presente invención para la administración de fármacos en el ojo, incluida la región posterior del ojo. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.707.643 hace referencia a un tapón escleral biodegradable que se inserta, a través de una incisión en la esclerótica, en el cuerpo vítreo. Para la administración de un fármaco en el ojo, el tapón libera un fármaco en el cuerpo vítreo para el tratamiento de la retina por difusión a través del cuerpo vítreo.

Otra técnica para la administración de un fármaco en el ojo se indica en la patente estadounidense n.º 5.443.505 que muestra implantes que pueden colocarse en el espacio supracoroideo sobre una región avascular del ojo, como la pars plana o una región avascular creada quirúrgicamente. Otra realización implica la formación de un colgajo escleral de grosor parcial sobre una región avascular, insertar un implante en el lecho escleral remanente, opcionalmente con perforaciones, y cerrar el colgajo mediante sutura. El fármaco se puede difundir en el vítreo y las estructuras intraoculares.

Otra solución para la administración de un fármaco en el ojo es la transfección de las neuronas retinianas con ADNc que codifique la secuencia proteica del fármaco. Dicha forma de administración está descrita por Fischer *et al.* (J. Neuroscience, 2004, 24:8726-2740) que transfectaron C3 en las neuronas ganglionares retinianas y observaron un aumento de la supervivencia y de la regeneración de los axones de las neuronas ganglionares retinianas. Otra realización será la transfección de células con los fragmentos truncados o variantes descritas en la Figura 4 de esta solicitud.

Otra solución de liberación para la administración de un fármaco en el ojo es la inyección directa. Para el segmento posterior del ojo, se ha empleado la inyección intravítrea para administrar fármacos en el cuerpo vítreo. A este respecto, la patente estadounidense n.º 5.632.984 hace referencia a un tratamiento de la degeneración macular con varios fármacos por inyección intraocular. Para la administración de un fármaco en el ojo, es preferible la inyección del fármaco como microcápsulas. La inyección intraocular en el segmento posterior del ojo puede permitir la difusión del fármaco a través del vítreo, la totalidad de la retina, la coroides y la esclerótica opuesta. Además, la patente estadounidense n.º 5.770.589 hace referencia al tratamiento de la degeneración macular mediante la inyección intravítrea de un antiinflamatorio en el humor vítreo para la administración de un fármaco en el ojo. Las inyecciones pueden administrarse a través de la pars plana para minimizar el daño ocular cuando el fármaco se administra en el segmento posterior.

Otra solución para la liberación es el procedimiento quirúrgico. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.767.079 hace referencia a enfermedades oftalmológicas como los orificios maculares y la degeneración macular, mediante la administración de TGF- β , por ejemplo, aplicando una cantidad eficaz del factor de crecimiento en la alteración oftálmica. En el tratamiento de la mácula y la retina, para la administración de un fármaco en el ojo, se realiza un procedimiento quirúrgico que implica una vitrectomía central o una vitrectomía completa de la pars plana antes de que pueda aplicarse directamente el factor de crecimiento, presumiblemente por administración a la esclerótica del segmento anterior del ojo en una región avascular o mediante la administración en la esclerótica por detrás de la retina mediante un procedimiento quirúrgico a través del cuerpo vítreo, la retina y la coroides, una técnica espectacular y altamente invasiva, adecuada por lo general solo cuando ya se ha producido una pérdida visual parcial o la visión está amenazada de forma inminente.

Otra solución de liberación para la administración de un fármaco en el ojo comprende el uso de un dispositivo y una cánula. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.273.530 hace referencia a la administración intrarretiniana y a la retirada de muestras y un dispositivo. A diferencia de las técnicas de inyección intraocular directa, el método presentado en esta patente evita la práctica de una incisión en la pars plana y, en su lugar, emplea una vía de inserción alrededor del exterior de la órbita. El dispositivo, que tiene un mango curvo y una punta con un collar, permite la inserción de una cánula a través de la esclerótica posterior y hacia abajo en el espacio subretiniano sin atravesar el cuerpo vítreo. El collar se ajusta para reglar la penetración a la profundidad deseada. El dispositivo es ajustable a cualquier parte del ojo, incluida el área escleral, el área coroidea, el área subretiniana, el área retiniana y el área vítrea.

Otra solución de liberación para la administración de un fármaco en el ojo es la inyección intraescleral. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.397.849 presenta un método de inyección intraescleral que comprende la inyección en la capa escleral del ojo a través de una localización en la superficie exterior de la esclerótica suprayacente al tejido retiniano de una cantidad eficaz de un material terapéutico o diagnóstico. Según las condiciones de la inyección, el material puede formar un depósito en el interior de la capa escleral y difundirse en las capas de tejidos adyacentes como la coroides y/o la retina; asimismo, el material puede ser impulsado a través de la capa escleral hacia las capas subyacentes. Puesto que la esclerótica se mueve con la totalidad del ojo, incluida la retina, el punto de depósito en la esclerótica se mantiene constante, aunque el ojo se mueva en el interior de la órbita para permitir la administración específica en un sitio al depositar el material en la esclerótica en un punto suprayacente a la mácula, lo que permite que el material se libere en la mácula y los tejidos circundantes. El procedimiento de inyección emplea una cánula o aguja, así como técnicas de partícula o solución sin aguja. En una realización preferible, se inserta una cánula en la esclerótica en dirección rotatoria respecto al ojo y no perpendicular a la superficie de la esclerótica.

Otra solución de liberación para la administración de un fármaco en el ojo se presenta en la patente estadounidense n.º 6.299.895, un método para liberar una molécula biológicamente activa en el ojo que comprende la implantación de una cápsula periorcularmente bajo el espacio de Tenon; la cápsula tiene un núcleo que contiene una fuente celular de moléculas biológicamente activas y una cubierta biocompatible; esta cubierta permite la difusión de la molécula biológicamente activa en el ojo; la dosis de la molécula biológicamente activa liberada oscila entre 50 pg y 1000 ng por ojo, por paciente y por día. La molécula biológicamente activa puede ser un factor antiangiogénico y una segunda molécula biológicamente activa o péptido puede coadministrarse de la cápsula al ojo. Se ha demostrado que el método es útil para el tratamiento de enfermedades oftalmológicas, como la degeneración macular.

Otras estrategias de administración de un fármaco en el ojo y que puede ser útil con composiciones de la invención actual son bien conocidas en la práctica. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.399.163 presenta un método para administrar una inyección en chorro presurizando un inyector de líquidos; la patente estadounidense n.º 5.383.851 presenta un dispositivo de inyección sin aguja; la patente estadounidense n.º 5.312.335 presenta un sistema de inyección sin aguja; la patente estadounidense n.º 5.064.413 presenta un dispositivo de inyección; la patente estadounidense n.º 4.941.880 presenta una ampolla para la inyección no invasiva de medicación; la patente estadounidense n.º 4.790.824 presenta un dispositivo de inyección hipodérmica no invasiva; la patente estadounidense n.º 4.596.556 presenta un aparato de inyección hipodérmica que funciona a presión; la patente estadounidense n.º 4.487.603 presenta una bomba implantable de microinfusión para la dispensación de medicación a una velocidad controlada; la patente estadounidense n.º 4.486.194 presenta un dispositivo terapéutico para la administración transcutánea de medicamentos; la patente estadounidense n.º 4.447.233 presenta una bomba de infusión de medicación para la administración de medicación a una velocidad exacta de infusión; la patente estadounidense n.º 4.447.224 presenta un aparato implantable de infusión de flujo variable para la administración continua de fármacos; la patente estadounidense n.º 4.439.196 presenta un sistema de administración de fármacos por ósmosis con cámaras multicompartimentadas y la patente estadounidense n.º 4.475.196 presenta un sistema de administración de fármacos por ósmosis.

Otra solución para la administración de un fármaco en regiones de resección tumoral incluye la inyección del fármaco en el sitio quirúrgico o la administración en una matriz de fibrina en la cavidad de la lesión, después de la extirpación quirúrgica del tumor.

El término “antagonistas de Rho” empleado aquí incluye, entre otros, a las proteínas C3, incluidas las proteínas análogas a C3.

El término “proteína C3” alude a la C3 ADP-ribosil transferasa aislada de *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* o *Staphylococcus aureus* o como ADP-ribosil transferasa recombinante.

Los términos “proteína análoga a C3”, “proteína análoga a C3 ADP-ribosil transferasa”, “análogo de C3 ADP-ribosil transferasa” o “proteínas C3 quiméricas” empleados aquí se refieren a cualquier proteína o polipéptido con una actividad biológica similar (p. ej., la misma, sustancialmente similar) a la C3 ADP-ribosil transferasa C3. Ejemplos de proteínas análogas a C3 incluyen, entre otros, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79.

El término “sitio de lesión nerviosa” se refiere al lugar de la lesión nerviosa traumática o del daño nervioso causado por una enfermedad. El sitio de lesión nerviosa puede ser un nervio único (p. ej., el nervio ciático o el nervio óptico) o un tracto nervioso compuesto por varios nervios (p. ej., una región dañada de la médula espinal). El sitio de lesión nerviosa puede estar en el sistema nervioso central o en el sistema nervioso periférico o en cualquier región que requiera reparación. El sitio de lesión nerviosa puede ser el resultado de un daño causado por un accidente vascular cerebral en el SNC, incluido el cerebro y el nervio óptico. El sitio de lesión nerviosa puede estar en el cerebro como resultado de una cirugía, extirpación de un tumor cerebral o tratamiento después de una lesión cancerosa. El sitio de lesión nerviosa puede ser el resultado de un accidente vascular cerebral, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), diabetes mellitus o cualquier otro tipo de enfermedad neurodegenerativa.

Como se emplea aquí, el término “sustancialmente purificado” significa una preparación con una pureza superior al 80%, preferiblemente superior al 90% y más preferiblemente superior al 95%. Más específicamente, el término “sustancialmente purificado” significa sustancialmente libre de contaminantes asociados a la proteína en su entorno natural.

5 Como se emplea aquí, el término “pegilación o variante PEG” se refiere a una variante en que el PEG está unido covalentemente a la proteína de fusión C3 para aumentar la retención del fármaco en el tejido. La proteína de fusión C3 que está pegilada puede incluir la SEQ ID NO: 10 o variantes truncadas descritas en esta solicitud. Los ejemplos incluyen variantes PEG con diferentes pesos moleculares por la variación de la longitud del constructo de fusión de C3 y las diferencias del peso molecular del PEG utilizado.

10 Como se emplea aquí, el término “agente de liberación” se refiere a un agente que comprende una parte de carga y una parte de transporte. Los ejemplos de la parte de carga incluyen la C3 ADP-ribosil transferasa y los análogos de la C3 ADP-ribosil transferasa. Los ejemplos de la parte de transporte comprenden, por ejemplo, la SEQ ID NO: 2 y análogos de la misma.

15 El término “polinucleótido” generalmente hace referencia a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Los “polinucleótidos” incluyen, sin limitación, ADN monocatenario y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, ARN monocatenario y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más típicamente, bicatenarios o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, “polinucleótido” alude a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. El término polinucleótido también incluye ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas y ADN o ARN con estructuras básicas modificadas por la estabilidad o por otros motivos. Las bases “modificadas” incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases poco comunes, como la inosina. Se han realizado diversas modificaciones al ADN y al ARN, por tanto, “polinucleótido” abarca formas química, enzimática o metabólicamente modificadas de polinucleótidos como se encuentran típicamente en la naturaleza, así como las formas químicas de ADN y ARN características de los virus y las células. “Polinucleótido” incluye, entre otros, moléculas lineales y cerradas terminalmente. “Polinucleótido” también abarca los oligonucleótidos.

25 “Polipéptidos” hace referencia a cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados (es decir, isómeros peptídicos). “Polipéptido” hace referencia tanto a cadenas cortas, generalmente denominadas péptidos, oligopéptidos u oligómeros, y a cadenas más largas, generalmente conocidas como proteínas. Como se describe más arriba, los polipéptidos pueden contener aminoácidos diferentes a los 20 aminoácidos genéticamente codificados.

30 Un péptido potenciador del transporte membranoso (también denominado “parte de transporte” o “agente de transporte”) de una composición de esta invención puede comprender una o más regiones ricas en prolina, cada una de las cuales puede ser una secuencia de aminoácidos igual o diferente y cada una de las cuales está unida covalentemente por un enlace peptídico o por los enlaces peptídicos que comprenden una o más secuencias de aminoácidos no ricas en prolina que pueden ser iguales o diferentes cuando la secuencia de aminoácidos no rica en prolina comprende más de 10 aminoácidos.

35 Como se emplea aquí, la expresión “contribuir a que la(s) neurona(s) establezca(n) nuevas conexiones con otras células” o “contribuir a que las neuronas establezcan nueva(s) conexión(ones) celular(es)” significa que, con el tratamiento de las células (p. ej., neurona(s)) o el tejido con un constructo para la liberación de fármaco, un conjugado, una proteína de fusión, un polipéptido o una composición farmacéutica de la presente invención, las neuronas pueden desarrollar, por ejemplo, nueva(s) dendrita(s), nuevo(s) axón(ones) o nueva(s) neurita(s) (es decir, gema(s) celular(es) o que se induce el crecimiento en mayor grado de dendrita(s), axón (ones) o neurita(s) (es decir, gema(s) celular(es)) ya existentes.

40 Como se emplea aquí, el término “vector” hace referencia a una molécula de ADN o ARN que se replica autónomamente en la que se insertan fragmentos no propios de ADN o ARN y que, posteriormente, son propagados a una célula huésped para la expresión o amplificación de la molécula de ADN o ARN no propia. El término “vector” comprende, entre otros, un plásmido (p. ej., linealizado o no) que puede usarse para transferir secuencias de ADN de un organismo a otro.

45 Los términos “portador farmacéuticamente aceptable” y “adyuvante” y “vehículo fisiológicamente aceptable” y similares deben comprenderse como alusivos a un portador o adyuvante aceptables que pueden administrarse a un paciente, junto con un compuesto de esta invención, y que no destruye la actividad farmacológica de este. Además, como se emplean aquí, “portador farmacéuticamente aceptable” o “portador farmacéutico” son conocidos en la práctica e incluyen, entre otros, al tampón fosfato 0,01-0,1 M y preferiblemente 0,05 M o salino al 0,8%. Además, dichos portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son: propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, como el oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen: agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluido el suero salino y los medios tamponados. Los vehículos

parenterales incluyen: solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, lactato de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen: reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, como los basados en la dextrosa de Ringer y similares. Pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, como por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes aglutinantes, gases inertes y similares.

- 5 Como se emplea aquí, “composición farmacéutica” significa cantidades eficaces (dosis) del agente junto con los diluyentes, conservantes, disolventes, emulsificantes, adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” como la empleada aquí se refiere a la cantidad que confiere un efecto terapéutico para un trastorno y un régimen posológico dados. Dichas composiciones son formulaciones líquidas, liofilizadas o secadas de otro modo e incluyen diluyentes con un contenido tamponado variable (p. ej., Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y potencia iónica, aditivos como la albúmina o la gelatina para evitar la absorción a las superficies y detergentes (p. ej., Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de los ácidos biliares). La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender agentes disolventes farmacéuticamente aceptables (p. ej., glicerol, polietilenglicerol), antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico, metabisulfito sódico), conservantes (p. ej., timerosal, benzil alcohol, parabenos), sustancias formadoras de masa o modificadores de la tonicidad (p. ej., lactosa, manitol), unión covalente de polímeros como polietilenglicol a la proteína, formación de complejos con iones metálicos o incorporación del material en o sobre preparaciones particuladas de compuestos poliméricos como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilaminares o multilaminares, eritrocitos fantasma o esferoplastos. Dichas composiciones influirán sobre el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de aclaramiento *in vivo*. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen la formulación en depósitos lipofílicos (p. ej., ácidos grasos, ceras, aceites). También comprendidas en la invención están las composiciones particuladas recubiertas de polímeros (p. ej., poloxámeros o poloxaminas). Otra realización de las composiciones de la invención incorpora formas particuladas, recubrimientos protectores, inhibidores de la proteasa o potenciadores de la permeación para varias vías de administración, como la vía parenteral, pulmonar, nasal y oral. En una realización la composición farmacéutica se administra por vía parenteral, paratumoral, transmucosa, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal, intratumoral o más preferiblemente, directamente en el sitio de la lesión del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP).

- Además, la expresión “cantidad farmacéuticamente eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” hace referencia a la cantidad (dosis) eficaz para tratar a un paciente que presenta, por ejemplo, una lesión nerviosa. Debe asimismo comprenderse aquí que una “cantidad farmacéuticamente eficaz” puede interpretarse como una cantidad que confiere un efecto terapéutico deseado, sea tomada en una dosis o en cualquier posología o por cualquier vía, tomada sola o combinada con otros agentes terapéuticos. En la presente invención, una “cantidad farmacéuticamente eficaz” puede entenderse como una cantidad de C3 ADP-ribosil transferasa o análogos de la C3 ADP-ribosil transferasa (p. ej., proteínas de fusión) de la presente invención que, por ejemplo, pueden suprimir (p. ej., total o parcialmente) la inhibición del crecimiento axonal neuronal, facilitar el crecimiento axonal, evitar la apoptosis celular, suprimir la actividad de Rho, contribuir a la regeneración de axones o que puede ayudar a las neuronas a establecer nuevas conexiones con otras células.

- Una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis de un agente activo, p. ej., proteína C3 o análogo de la proteína C3, puede oscilar entre aproximadamente 0,001 a 30 mg/kg de peso corporal; otros rangos de la invención incluyen aproximadamente 0,01 a 25 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 0,025 a 10 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 0,3 a 20 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 1 a 10 mg/kg de peso corporal, de 2 a 9 mg/kg de peso corporal, de 3 a 8 mg/kg de peso corporal, de 4 a 7 mg/kg de peso corporal, de 5 a 6 mg/kg de peso corporal y de 20 a 50 mg/kg de peso corporal. En otras implementaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis de un agente activo puede oscilar entre aproximadamente 0,001 a 50 mg totales; otros rangos de la invención incluyen aproximadamente 0,01 a 10 mg, aproximadamente 0,3 a 3 mg, aproximadamente 3 a 10 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 a 20 mg, aproximadamente 20-30 mg, aproximadamente 30 a 40 mg y aproximadamente 40 a 50 mg.

- Además, un técnico experto apreciará que las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden formularse para administración intravenosa o subcutánea. Por ejemplo, pueden producirse viales de dosis única que contengan aproximadamente 25, aproximadamente 40, aproximadamente 60, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 300 o aproximadamente 500 microgramos del agente activo.

- El técnico experto apreciará que ciertos factores pueden influir sobre la dosis necesaria para el tratamiento eficaz de un sujeto, como, entre otras, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos previos, el estado general de salud y/o la edad del sujeto y la presencia de otras enfermedades. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto activo puede consistir en un único tratamiento o una serie de tratamientos. En un ejemplo, un sujeto es tratado con un compuesto activo en el rango de aproximadamente 0,3 a 10 mg, una vez a la semana durante aproximadamente 1 a 10 semanas, alternativamente entre 2 a 8 semanas, entre aproximadamente 3 a 7 semanas o aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. Un sujeto también puede ser tratado con un compuesto activo más de una vez a la semana, por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco veces por semana. En otro ejemplo, un sujeto es tratado con un compuesto activo en el rango de aproximadamente 0,3 a 10 mg, dos veces

por semana, p. ej., mediante inyecciones intravítreas, durante aproximadamente 1 a 10 semanas, alternativamente entre 2 a 8 semanas, entre aproximadamente 3 a 7 semanas o aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. También se apreciará que la dosis eficaz de un compuesto activo usado para el tratamiento puede aumentar o disminuir durante el curso de un tratamiento en concreto.

- 5 Como se usa aquí, el término “sujeto” significa un paciente que requiere tratamiento. En una realización, un sujeto es un mamífero. En otra realización, un sujeto es un ser humano.

Además, un agente de transporte como, por ejemplo, un subdominio de la proteína Tat del VIH y un homeodominio de Antennapedia pueden repetirse más de una vez en un polipéptido que comprende la C3 ADP-ribosil transferasa o análogos de la C3 ADP-ribosil transferasa. La región del agente de transporte puede estar en la región aminoterminal, en la región carboxiterminal o en ambas regiones de la C3 ADP-ribosil transferasa o análogos de la C3 ADP-ribosil transferasa. La repetición de la región de un agente de transporte puede afectar (p. ej., aumentar) la captación de la C3 ADP-ribosil transferasa o análogos de la C3 ADP-ribosil transferasa por la célula deseada.

La fusión heteróloga incluye nuevos polipéptidos creados por la fusión de polipéptidos de la presente invención con polipéptidos heterólogos. Dichos polipéptidos pueden incluir, entre otros, polipéptidos bacterianos (p. ej., betalactamasa, glutatión-S-transferasa o una enzima codificada por el locus *trp* de *E. coli*), proteínas de levaduras, proteínas víricas, proteínas de fagos, albúmina sérica bovina, polipéptidos quimiotácticos, regiones constantes de inmunoglobulinas (u otras regiones de inmunoglobulinas), albúmina o ferritina.

Se incluyen en la invención las proteínas y los polipéptidos con una identidad del 50% como mínimo, determinada por métodos conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, los métodos descritos por Smith y Waterman, 1981, *Ad. Appl. Math.*, 2:482-489; o Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.*, 48: 443-453), con los polipéptidos de la invención descrita aquí. En una realización, un polipéptido de la invención tiene una identidad como mínimo aproximadamente de un 50%, como mínimo aproximadamente de un 55%, preferiblemente como mínimo aproximadamente de un 60%, como mínimo aproximadamente de un 65%, como mínimo aproximadamente de un 70%, como mínimo aproximadamente de un 75%, más preferiblemente como mínimo aproximadamente de un 80%, como mínimo aproximadamente de un 85%, como mínimo aproximadamente de un 90% o como mínimo aproximadamente de un 95% con los polipéptidos descritos aquí. En una realización, la identidad se extiende a una región como mínimo de 5 o como mínimo de 20 aminoácidos contiguos.

A menos que se indique lo contrario, las técnicas de ADN recombinante empleadas en la presente invención son procedimientos convencionales, conocidos por los expertos en la materia. Ejemplos de estas técnicas se explican en la bibliografía, en fuentes como Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); y Ausubel *et al.* (editores), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, incluidas todas las actualizaciones hasta el momento actual) y se incorporan aquí como referencias.

Las Rho GTPasas incluyen miembros de la familia de proteínas Rho, Rac y Cdc42. La presente invención atañe a miembros de la familia Rho de la clase Rho. Las proteínas Rho comprenden diferentes variantes codificadas por diferentes genes. Por ejemplo, las células PC-12 (línea celular de feocromocitoma) expresan RhoA, RhoB y RhoC. Para inactivar las proteínas Rho en el interior de las células, los antagonistas de la Rho de la familia C3 son eficaces porque inactivan todas las formas de Rho (p. ej., RhoA, Rho B, etc.). En cambio, las técnicas de terapia genética, como la introducción de un miembro dominante negativo de la familia RhoA en una célula enferma, solo inactivarán dicho miembro específico de la familia RhoA.

Las proteínas C3 recombinantes o las proteínas C3 que conservan la actividad de ribosilación también son eficaces en el sistema de liberación presentado y están cubiertas por esta invención. Además, las Rho cinasas son una diana bien conocida para la Rho activa y la inactivación de la Rho cinasa tiene el mismo efecto que la inactivación de Rho, como mínimo, en cuanto al crecimiento de neuritas o axones.

Las proteínas de la presente invención pueden prepararse a partir de extractos celulares bacterianos o mediante técnicas recombinantes. En general, las proteínas C3 de acuerdo con la invención pueden producirse por transformación (transfección, transducción o infección) de una célula huésped con la totalidad o una parte de un fragmento de ADN que codifica la C3 en un vehículo de expresión adecuado. Los vehículos de expresión adecuados son conocidos en la práctica y como ejemplos, entre otros, figuran, por ejemplo: plásmidos, partículas víricas y fagos. Para las células de insectos los vectores de expresión de baculovirus son adecuados. La totalidad o parte del vehículo de expresión pueden integrarse en el genoma de la célula huésped. En algunas circunstancias, es deseable emplear un vector de expresión inducible.

Las células hospedadoras que albergan el vehículo de expresión pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales adaptados a las necesidades para la activación de un gen seleccionado, la represión de un gen seleccionado, la selección de transformantes o la amplificación de un gen dado. Un sistema de expresión es el fibroblasto hospedador murino 3T3 transfectado con un vector de expresión pMAMneo (Clontech, Palo Alto, Calif.).

Los expertos en el campo de la biología molecular comprenderán que puede emplearse una diversidad de sistemas de expresión para la proteína recombinante. La célula hospedadora exacta no es crítica para la invención. Las

proteínas C3 y análogas de C3 pueden producirse en un hospedador procariótico (p. ej., *E. coli* o *B. subtilis*) o en un hospedador eucariótico (p. ej., *Saccharomyces* o *Pichia*; células de mamífero, p. ej., células COS, NIH 3T3, CHO, BHK, 293 o HeLa o células de insectos).

Las células vegetales también pueden producir proteínas y polipéptidos. Para las células vegetales, son adecuados los vectores de expresión víricos (p. ej., el virus del mosaico de la coliflor o el virus del mosaico del tabaco) y los vectores de expresión plasmídicos (p. ej., plásmido Ti). Dichas células pueden obtenerse de una diversidad de procedencias (p. ej., la American Type Culture Collection, Rockland, Md.). Los métodos de transformación o transfección y la elección del vehículo de expresión dependerán del sistema hospedador seleccionado.

Los polipéptidos C3 pueden producirse como proteínas de fusión. Por ejemplo, los vectores de expresión pueden emplearse para crear proteínas de fusión lacZ. Los vectores pGEX pueden usarse para expresar polipéptidos no propios como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente por adsorción en gránulos de glutatión-agarosa, seguida de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión de trombina o factor Xa proteasa para que el producto genético diana clonado pueda ser liberado de la parte GST. Otra estrategia para fabricar proteínas de fusión consiste en emplear el sistema de etiquetas de His.

En un sistema de expresión de células de insecto, se emplea el virus de la polihedrosis nuclear de la *Autographa californica* (AcNPV), que crece en células de *Spodoptera frugiperda*, como vector para expresar genes no propios. Puede clonarse individualmente una secuencia codificante de C3 en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y colocar bajo control de un promotor del AcNPV, por ejemplo, el promotor de la polihedrina. La inserción con éxito de un gen que codifica la C3 o una proteína análoga de C3 (polipéptido) dará como resultado la inactivación del gen de la polihedrina y la producción de virus recombinantes no ocluidos (es decir, virus que carecen de la cubierta proteica codificada por el gen de la polihedrina). Estos virus recombinantes se emplean seguidamente para infectar células de *Spodoptera frugiperda*, en las que se expresa el gen insertado.

En células hospedadoras de mamífero pueden utilizarse diversos sistemas de expresión basados en virus. Si se emplea un adenovirus como vector de expresión, la secuencia de ácidos nucleicos de C3 puede ligarse a un complejo de control de transcripción/traducción de un adenovirus, p. ej., la secuencia promotora tardía y tripartita inicial. El gen quimérico puede ser insertado en ese momento en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma vírico (p. ej., región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante viable y capaz de expresar un producto del gen C3 en los hospedadores infectados.

Pueden necesitarse también señales específicas de inicio para una traducción eficaz de las secuencias insertadas de ácidos nucleicos. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. Estas señales de control de la traducción y los codones de iniciación externos pueden tener varios orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse por la inclusión, p. ej., de elementos adecuados de potenciación de la transcripción o terminadores de la transcripción, etc.

Además, puede seleccionarse una célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas o modifique y procese el producto genético de una manera deseada específica. Dichas modificaciones (p. ej., glicosilación) y procesamiento (p. ej., escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraducciona y modificación de las proteínas y productos genéticos. Pueden seleccionarse líneas celulares o sistemas hospedadores adecuados para garantizar la modificación y procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Para este objetivo, pueden emplearse células hospedadoras eucarióticas que posean la maquinaria celular para el adecuado procesamiento del transcrito primario, glicosilación y fosforilación del producto genético.

Alternativamente, puede producirse una proteína C3 por una línea de células de mamífero transfectadas de manera estable. Se dispone públicamente de diversos vectores adecuados para la transfección estable de células de mamíferos; también están al alcance del público los métodos para la construcción de dichas líneas celulares. En un ejemplo, puede clonarse el ADNc que codifica la proteína C3 en un vector de expresión que incluya el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR). Se selecciona la integración del plásmido y, por tanto, el gen que codifica la C3 o la proteína análoga C3 en el cromosoma de la célula hospedadora incluyendo metotrexato 0,01-300 µM (micromoles) al medio de cultivo celular (como describieron Ausubel *et al.*, ver más arriba). Esta selección dominante se puede realizar en la mayoría de tipos celulares. La expresión de proteínas recombinantes puede aumentarse mediante la amplificación mediada por DHFR del gen transfectado. Los métodos para seleccionar líneas celulares portadoras de amplificaciones genéticas son conocidos en la práctica; dichos métodos generalmente implican cultivo ampliado en medios que contienen concentraciones gradualmente crecientes de metotrexato. Los vectores de expresión que contienen DHFR frecuentemente utilizados para este propósito son pCVSEII-DHFR y pAdD26SV(A). Entre las células hospedadoras preferidas para la selección de DHFR de una línea celular transfectada establemente o la amplificación genética mediada por DHFR están cualquiera de las células hospedadoras descritas más arriba o, preferiblemente, una línea celular CHO con deficiencia de DHFR (p. ej., células CHO DHFR, n° de acceso de la ATCC n.º CRL 9096).

Pueden emplearse diversos sistemas de selección, entre otros, los genes de la timidina cinasa, la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa y la adenina fosforribosiltransferasa del virus del herpes simple en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, pueden emplearse gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico, neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 e hgro, que confiere resistencia a la higromicina.

- 5 Alternativamente, puede purificarse fácilmente cualquier proteína de fusión con un anticuerpo específico para la proteína de fusión expresada. Por ejemplo, un sistema descrito en Janknecht *et al.* (1981) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88, 8972, permite la fácil purificación de proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas celulares humanas. En este sistema, se subclona el gen de interés en un plásmido de recombinación de vaccinia de modo que la estructura abierta de lectura del gen se fusiona traducionalmente a una etiqueta aminoterminal que
10 consiste en seis residuos de histidina. Los extractos de células infectadas con el virus vaccinia recombinante se cargan en columnas de ácido Ni²⁺ nitriloacético-agarosa y las proteínas con las etiquetas de histidina se eluyen selectivamente con tampones que contienen imidazol.

Alternativamente, la proteína C3 o análogos de la proteína C3 o una parte (fragmento) de estas puede fusionarse a un dominio Fc de inmunoglobulina. Esta proteína de fusión puede purificarse fácilmente con una columna de
15 proteína A.

Para determinar la actividad relativa y eficaz del antagonista de Rho de las composiciones de esta invención, puede utilizarse un sistema de bioensayos de cultivos de tejidos. Por ejemplo, una proteína de fusión como la SEQ ID No: 8 en un intervalo de concentraciones de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 µg/ml (microgramos por mililitro) es útil y no es tóxico para las células.

20 Un compuesto puede confirmarse como un antagonista de Rho en una de las siguientes maneras, por ejemplo:

- a. Se cultivan las células en un sustrato de inhibición del crecimiento, como arriba, y se exponen al candidato a antagonista de Rho;
 - b. Las células del paso a) son homogeneizadas y se realiza un ensayo de extracción. Este ensayo se basa en la capacidad de la GST-Rhotecina para unirse a la Rho unida a la GTP. Se añade GST-Rhotecina recombinante o
25 dominio de unión a GST rhotecina (GST-RBD) al homogeneizado celular hecho a partir de las células cultivadas como se describe en a). Se ha observado que los sustratos inhibidores activan Rho y que esta Rho activada es extraída por el GST-RBD. Los antagonistas de Rho bloquearán la activación de Rho y, por tanto, un antagonista efectivo de Rho bloqueará la detección de Rho cuando las células se cultivan como se describe en a) arriba; o
 - c. Un método alternativo para este ensayo de extracción sería el uso de la proteína activadora de la GTPasa, Rho-GAP, como cebo para la extracción de Rho activada.
- 30

Otro método para confirmar que un compuesto es un antagonista de Rho es el siguiente: cuando se añaden a células vivas, los antagonistas que inactivan Rho por ADP-ribosilación del dominio efector pueden identificarse por la detección de un desplazamiento del peso molecular en Rho. El desplazamiento del peso molecular puede detectarse
35 después del tratamiento de las células con antagonista de Rho mediante homogeneización de las células, separación de las proteínas en el homogeneizado celular por electroforesis en gel de SDS poliacrilamida. Se transfieren las proteínas a papel de nitrocelulosa y se detecta Rho seguidamente con anticuerpos anti-Rho específicos mediante una técnica de inmunoelectrotransferencia.

Otros agentes de transporte que pueden emplearse en conjugados de la presente invención son conocidos en la práctica. Por ejemplo, los polipéptidos de la presente invención pueden incluir un agente de transporte como el subdominio de la proteína Tat del VIH o un homeodominio de Antennapedia. La secuencia de transporte puede incluir una región consistente en aminoácidos básicos, como la secuencia de poliarginina. El agente de transporte puede repetirse más de una vez en un polipéptido. El agente de transporte puede localizarse en la región aminoterminal o en la región carboxiterminal o en ambas regiones del conjugado. La duplicación de un agente de
45 transporte puede afectar (p. ej., aumentar) la captación del conjugado por una célula.

En una realización, un agente de transporte facilita la captación de un agente activo por un mecanismo independiente de receptor. En otra realización, los ejemplos de secuencias de transporte incluyen, entre otros, SEQ ID NO: 45-51. Otros agentes de transporte comprendidos en la presente invención incluyen, entre otros, la tercer hélice del homeodominio de la proteína de Antennapedia (Penetratin[®]; SEQ ID NO: 52); TAT (SEQ ID NO: 53); conjugados de silaprolina; oligómeros de gamma-amino-L-prolina; poliarginina (SEQ ID NO: 54); Transportan (SEQ ID NO: 55-56); Pep-1 (SEQ ID NO: 57); S4₁₃-PV (SEQ ID NO: 58); proteína VP22; MAO (Model sunthic peptide; SEQ ID NO: 59); Syn B1 (SEQ ID NO: 60); Syn B3 (SEQ ID NO: 61); Syn B5 (SEQ ID NO: 62); b-FGF; señal de secuencia FGF-4 (SEQ ID NO: 63); pVEC (SEQ ID NO: 64); SAP (sweet arrow peptide); hCT(9-32)-br péptido derivado de la calcitonina humana; bPrPp (proteína priónica N-terminal; SEQ ID NO: 65); péptido BagP; proteína de
55 entrada celular de Mycobacterium (Mce1A); péptidos sintéticos YTA2 e YTA4; SEQ ID NO: 66; C105Y (correspondiente a los aminoácidos 359-374 de la alfa1-antitripsina; SEQ ID NO: 67), TP10; dinorfinas A y B y vectores peptídicos de Diatos (Vectocell[®]; SEQ ID NO: 68-77).

Se conocen otras secuencias de transporte que se han analizado en otros contextos (es decir, para demostrar que actúan mediante el uso de secuencias indicadoras). Un péptido de transporte, un dodecámero, AAVLLPVLLAAP (SEQ ID NO: 3), es rico en prolina. Se construyó como una proteína de fusión GST-MTS y deriva de la región h de la secuencia señal FGF de Kaposi. Otro ejemplo es el péptido alfa de la fertilina espermica, HPIQIAAFLARIPPISSIGTCILK (SEQ ID NO: 4). Sin embargo, cabe destacar que la propensión a la rotura de la hélice alfa de los residuos de prolina (Pro) no es una regla general, dado que el presunto péptido de fusión de la alfa fertilina espermica muestra un alto contenido de hélices alfa en presencia de liposomas. Sin embargo, se requiere la secuencia Pro-Pro para la eficacia de las propiedades de fusión de la fertilina. La proteína de fusión de SEQ ID No: 8 analizada cumple los requisitos de tener dos prolinas para el transporte efectivo de péptidos. Por tanto, las secuencias ricas en prolina y las secuencias aleatorias con propensión a la rotura helicoidal que actúan como transportadores eficaces también serían eficaces si se fusionan a C3.

Con referencia a la Figura 1, se ilustra la inactividad intencional de una mutante de la proteína de fusión SEQ ID No: 43, es decir, la SEQ ID NO: 6 inactiva (la secuencia de nucleótidos se corresponde con la de SEQ ID NO: 5), analizada mediante un bioensayo con células NG-108. Las células NG-108 cultivadas con una proteína de fusión activa de esta invención, SEQ ID NO: 43, presentan una aceleración de la gemación de neuritas; la gemación de neuritas es el resultado de la presencia de la SEQ ID NO: 43. Sin embargo, la gemación de neuritas de las células tratadas con la SEQ ID NO: 6 mutante intencionalmente inactiva se asemeja a la de las células de control no tratadas con la proteína adicional. La similitud con el grupo control demuestra que la proteína mutante intencionalmente inactiva de SEQ ID NO: 6 es inactiva respecto a la estimulación de la gemación neurítica.

La inyección de una proteína de fusión de esta invención, la SEQ ID NO: 43, puede evitar (reducir sustancialmente la tasa observada de) muerte de las células ganglionares retinianas (CGR) inducidas por el aplastamiento del nervio óptico después de una inyección única. Después de la axotomía o la axotomía del nervio óptico con una inyección de vehículo (salino tamponado con fosfato), las células mueren. Cuando se inyecta la SEQ ID NO: 6, una mutante intencionalmente inactiva de la SEQ ID NO: 43, en el ojo, no es capaz de evitar la muerte de las CGR. Una única inyección de la SEQ ID NO: 43 evita la muerte celular y el número de células supervivientes es similar a la de las retinas de control no axotomizadas. Los resultados demuestran que SEQ ID NO: 43 como proteína de fusión de esta invención puede evitar la muerte de las neuronas retinianas; la actividad neuroprotectora de SEQ ID NO: 43 requiere que se conserve la actividad enzimática de la proteína de fusión C3.

La administración de una composición farmacéutica que comprenda una proteína de fusión de la invención a un paciente que requiere tratamiento por degeneración macular puede reducir o evitar sustancialmente la angiogénesis asociada a la neovascularización subretiniana, la neovascularización coroidea subyacente a la mácula y la proliferación de tejido neovascular en la coroides subretiniana proximal a la mácula en el ojo del mamífero hospedador. En un aspecto, la invención se refiere a un método de tratamiento de la degeneración macular. En otro aspecto, las composiciones de la invención son útiles para inhibir o reducir sustancialmente la tasa de neovascularización subretiniana y proliferación de tejido neovascular relacionados con la degeneración macular. El método puede ser útil como tratamiento profiláctico para prevenir el inicio o la progresión de la degeneración macular en un ojo. En otro aspecto, el método puede ser útil como tratamiento profiláctico para prevenir el depósito de drusas y la muerte de las células en la mácula. En otro aspecto, el método puede prevenir la muerte de las células fotorreceptoras (las células fotorreceptoras se denominan aquí también fotorreceptores) en el ojo de un paciente al actuar sobre mecanismos intracelulares de la regulación de la muerte celular. El método también puede ser útil para prevenir el inicio o la progresión de la degeneración macular en un ojo que no presenta síntomas de degeneración macular como deterioro visual, especialmente si el otro ojo del paciente presenta síntomas de deterioro visual por degeneración macular.

En otro aspecto de la invención, un método de tratamiento de la degeneración macular comprende la administración por inyección o implantación en el tejido proximal al ojo de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de la invención. Además, la invención comprende la administración de una composición farmacéutica estéril de la invención adecuada para la administración inyectable y que comprende un polipéptido de la invención y un portador adecuado para uso inyectable (p. ej., estéril, esterilizable e isotónico con la sangre); el polipéptido o la composición farmacéutica puede prevenir o retrasar el inicio de la angiogénesis asociada al grupo consistente en neovascularización subretiniana, neovascularización coroidea subyacente a la mácula y proliferación de tejido neovascular en la coroides subretiniana proximal a la mácula en el ojo del paciente promedio en una población estadísticamente relevante de pacientes para producir un retraso medio del inicio de la pérdida visual. El retraso del inicio de la pérdida de visión puede resultar del retraso de dicha angiogénesis y el retraso medio del inicio determinado en relación con el tiempo medio del inicio de la pérdida de visión que se produce en un paciente promedio en la población estadísticamente relevante de pacientes en ausencia de dicha cantidad de polipéptido, el retraso medio del inicio de la pérdida de visión comprende un período como mínimo de 1 mes y más preferiblemente un período como mínimo de 6 meses y más preferiblemente un período superior a 6 meses.

La inhibición de la angiogénesis por una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de esta invención como la SEQ ID NO: 8 (correspondiente secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 7) o SEQ ID NO: 10 puede evaluarse en un sistema *in vitro* que también puede ser útil para el estudio de la angiogénesis en el crecimiento de un tumor, es decir, un sistema que comprende el cultivo de células endoteliales en presencia de un extracto de membrana basal (MATRIGEL®) como modelo para la angiogénesis y para la neovascularización y

proliferación de tejido neovascular en el ojo de un mamífero. En condiciones experimentales, pueden verse al microscopio las estructuras similares a capilares o túbulos asociadas a la angiogénesis o formación de vasos sanguíneos capilares. El efecto inhibitorio de una proteína de fusión de esta invención como SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10 sobre la progresión de la angiogénesis o sobre la formación de una red de capilares o sobre la interrupción del proceso o progresión de la angiogénesis asociada a los tumores puede observarse al seguir la desaparición de las estructuras tubulares en un ensayo de MATRIGEL®.

La matriz MATRIGEL® (BD Biosciences) es una preparación de membrana basal solubilizada extraída del sarcoma murino Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), un tumor rico en proteínas de la matriz extracelular (MEC). Sus componentes principales son laminina, colágeno IV, proteoglicanos de heparán sulfato y entactina. A temperatura ambiente, la matriz BD MATRIGEL® se polimeriza para producir material de matriz biológicamente activa que puede imitar la membrana basal celular de los mamíferos, donde las células pueden comportarse *in vitro* de forma similar a como lo harían *in vivo*. La matriz MATRIGEL® puede proporcionar un entorno fisiológicamente relevante para estudios de morfología, migración, invasión o función bioquímica celulares y expresión génica.

En un ensayo de MATRIGEL®, se descongela MATRIGEL® (aproximadamente 12,5 mg/ml) aproximadamente a 4 °C. Se añade matriz (aproximadamente 50 microlitros (μL)) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se permite que se solidifique durante 10 minutos aproximadamente a 37 °C. Los pocillos que contienen MATRIGEL® sólido se incuban durante 30 minutos con célula endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) en una concentración aproximadamente de 15.000 células por pocillo. Cuando las células se adhieren, se retira el medio y se sustituye por medio fresco complementado con una proteína de fusión de esta invención como SEQ ID NO: 8 se incuban a 37 °C durante aproximadamente 6 a aproximadamente 8 horas. Los pocillos de control se incuban solo con medio. Para analizar el crecimiento, puede visualizarse la formación de tubos por microscopía, por ejemplo a un aumento de 50X. La longitud relativa media, Y_x, de una red capilar derivada por angiogénesis observada en una evaluación de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión, x, de esta invención puede cuantificarse con el programa informático Northern Eclipse de acuerdo con las instrucciones.

Construcción de SEQ ID NO: 10, una variante truncada de SEQ ID NO: 43

La SEQ ID NO: 10, con la correspondiente secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 9, es un derivado de la SEQ ID NO: 43 (Figura 2). La SEQ ID NO: 43 es un derivado de SEQ ID NO: 8, sin la secuencia GST.

La exoenzima C3 no posee los dominios específicos de unión de receptores y de translocación típicos de otras toxinas bacterianas. Por tanto, la captación celular es lenta e inespecífica y está dirigida principalmente por pinocitosis. La SEQ ID NO: 44 es una proteína de fusión obtenida por la unión de la exoenzima C3 a una secuencia de transporte rica en prolina que facilita el paso a través de la membrana plasmática de manera independiente de receptor. Se ha demostrado que esta proteína de fusión manipulada es > 100 veces más eficaz que la C3 al analizarse *in vitro* mediante el ensayo de crecimiento de las neuritas.

Para mejorar la pureza y el rendimiento de las preparaciones de C3, la SEQ ID NO: 44 se elimina de la proteína de fusión GST el vector pGEX-4T y se transfiere a un vector pET. La proteína de fusión resultante, la SEQ ID NO: 43, está purificada por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) mediante los pasos cromatográficos convencionales. La proteína purificada es pura en > 95%, pobre en endotoxinas (< 2 unidades/mg), estable a -70 °C durante > 2 años y equivalente a altas actividades de glucohidrolasa y de crecimiento de neuritas en comparación con SEQ ID NO: 44.

Para estabilizar el producto final de acuerdo con las BPF, se constituye una variante adicional, la SEQ ID NO: 10. Se elimina una secuencia de 15 aminoácidos, compuesta por 8 residuos de la secuencia de señal natural de C3 y 7 aminoácidos derivados de un sitio de clonación múltiple vestigial, del N-terminal de SEQ ID NO: 44. El N-terminal de la resultante SEQ ID NO: 10 es prácticamente idéntica a la de la enzima de tipo natural (WT) después de la escisión endógena de la secuencia de señal natural por *C. botulinum*. Una alineación de los extremos N-terminales de la exoenzima WT C3, (entrada Swiss-Prot P15879), SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 43; los aminoácidos indicados en cursiva representan el péptido señal escindido endógenamente de la exoenzima WT C3, mientras que los que están en negrita se han obtenido por ingeniería genética, presentado en la Figura 2A. Además, se presenta una representación esquemática de las variantes en la Figura 2B.

La SEQ ID NO: 10 es más estable que su predecesora la SEQ ID NO: 44. Aunque la SEQ ID NO: 44 producida a escala de laboratorio no ha demostrado signos de degradación, incluso después de varias semanas de almacenamiento a 4 °C, esto no es así para la SEQ ID NO: 44 producida a gran escala. La HPLC con exclusión de tamaño o la SDS-PAGE no reductora demostraron que la SEQ ID NO: 44 formaba espontáneamente dímeros sensibles al agente reductor ditiotreitól (Figura 2C). Más específicamente, se presenta en la Figura 2C un gel de gradiente al 12% preparado (no reductor) que demostró la dimerización de la SEQ ID NO: 44 en que la banda 1 = Bio-Rad® proteínas convencionales de peso molecular de bajo rango, banda 2 = SEQ ID NO: 44 a escala de laboratorio tomada de la conservada a -80 °C, banda 3 = SEQ ID NO: 44 a escala de laboratorio conservada durante 5 días a 4 °C, banda 4 = SEQ ID NO: 44 a escala de laboratorio conservada durante 5 días a 4 °C en presencia de 0,5 mM DTT. Estos datos indican que la unión disulfuro intermolecular se produce por el único residuo de cisteína en el extremo N-terminal. Mientras que nunca se ha observado que la dimerización influya sobre la actividad funcional

de la SEQ ID NO: 44, su eliminación facilitaría significativamente el proceso de la purificación a gran escala, al eliminar la necesidad de agentes reductores. Además, después de la purificación de la SEQ ID NO: 44 de las fermentaciones biorreactivas de alta densidad, se observa una segunda banda principal en la SDS-PAGE que, por análisis de espectroscopia de masas se confirma que se debe a una escisión del extremo N-terminal en lisados bacterianos (Figura 2D). Más específicamente, en el gel de gradiente al 12% preparado (reductor) se demuestra la estabilidad potenciada de la SEQ ID NO: 10 en que la banda 1 = Bio-Rad® proteínas convencionales de peso molecular de bajo rango, banda 2 = SEQ ID NO: 44 a escala de laboratorio tomada de la conservada a -80 °C, banda 3 = SEQ ID NO: 44 generada por biorreactor conservada durante 8 semanas a 4 °C, banda 4 = SEQ ID NO: 44 generada por biorreactor conservada durante 10 semanas a 4 °C, banda 5 = SEQ ID NO: 10 generada por biorreactor tomada de la conservada a -80 °C y banda 6 = SEQ ID NO: 10 generada por biorreactor conservada durante 2 semanas a 4 °C (Figura 2D). Por tanto, se creó una variante truncada en el extremo N-terminal, SEQ ID NO: 10, que no demostró degradación ni dimerización (Figura 2D) después de la conservación a 2 - 8 °C. El análisis a largo plazo confirmó que esta variante conserva actividad y estabilidad plenas incluso después de más de 18 meses de conservación a -70 °C y 2-8 °C (datos no presentados). La proteína purificada es pura en > 95% y pobre en endotoxinas (<2 unidades/mg) (Figura 2E). Se muestra un gel de gradiente al 12% preparado (reductor) que muestra la purificación representativa de la variante (SEQ ID NO: 44) en la Figura 2E, en la que banda 1 = Bio-Rad® proteínas convencionales de peso molecular de bajo rango, banda 2 = lisado de células brutas, banda 3 = sobrenadante después del tratamiento con polimina p, banda 4 = gránulos resuspendidos después del tratamiento con sulfato de amonio, banda 5 = carga de columna desaladora PD-10, banda 6 = carga SP-XL, banda 7 = pico de eluato SP-XL, banda 8 = pico de eluato Superdex-75, banda 9 = eluato desalador HiPrep, banda 10 = eluato Q-sefamosa y banda 11 = conjunto final concentrado.

La SEQ ID NO: 10 fabricada a gran escala es funcionalmente intercambiable con sus predecesoras, las SEQ ID NO: 43 y 44, con las mismas actividades enzimáticas y biológicas o superiores, pero menos impurezas, como endotoxina.

Construcción de variantes truncadas de la SEQ ID NO: 10

Las variantes de la SEQ ID NO: 10 se derivaron suprimiendo grupos sucesivos de residuos de aminoácidos tanto del extremo N-terminal como del extremo C-terminal, sin incluir la secuencia del péptido de transporte. Estas variantes se ilustran en la Figura 3. Las variantes se crearon por mutagénesis dirigida al emplazamiento, con métodos convencionales de biología molecular, para truncar el ADNc codificador de la SEQ ID NO: 10, tanto en el extremo N-terminal como en el extremo C-terminal, dejando intacta la secuencia de transporte. La actividad de las variantes truncadas mostradas aquí puede verificarse con cualquiera de los métodos descritos aquí, p. ej., en los ejemplos 9-13 y 18. Sin desear estar sujetos a la teoría, se cree que las variantes truncadas pueden penetrar más fácilmente en las células y, por tanto, se requiere una dosis inferior. En una realización de la invención, por tanto, un fragmento más corto o truncado de la SEQ ID NO: 10 biológicamente activa se administra a un sujeto que lo requiere.

Además, las características físicas de las variantes de la SEQ ID NO: 10 se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1

Características físicas de las variantes truncadas de la SEQ ID NO: 10.

Variantes de la SEQ ID NO	Número de aminoácidos	% de identidad de la secuencia con la SEQ ID NO: 43	Peso molecular teórico (kDa) ¹	Coefficiente de extinción teórico (Abs 0,1% a 280 nm) ²	PI teórico ¹
10	232	94	25,9	0,72	9,7
13	222	90	24,6	0,65	9,8
14	212	86	23,6	0,44	9,8
15	202	82	22,4	0,34	9,7
16	192	78	21,2	0,3	9,8
17	182	74	20,2	0,32	9,7
18	154	62	17	0,38	9,5
19	121	49	13,3	0,38	9,9
20	203	82	22,7	0,76	9,8
21	214	87	24	0,77	9,7

Variantes de la SEQ ID NO	Número de aminoácidos	% de identidad de la secuencia con la SEQ ID NO: 43	Peso molecular teórico (kDa) ¹	Coefficiente de extinción teórico (Abs 0,1% a 280 nm) ²	PI teórico ¹
22	224	91	25	0,74	9,7

¹ De la página web Expasy ProtParam (<http://ca.expasy.org/cgi-bin/protparam>);

² Nuevo algoritmo en la página web ProtParam cambia los valores obtenidos previamente.

5 Los mutantes de delección o variantes se preparan mediante una reacción en cadena de la polimerasa y se subclonan al vector pET9a. Se diseñan dos oligonucleótidos por variante para eliminar los aminoácidos deseados mediante mutagénesis dirigida al emplazamiento usando el kit QuikChange (Stratagene). La reacción en cadena de la polimerasa se realiza con el conjunto adecuado de cebadores de mutantes (ver Tabla 2). El programa de ciclo es el siguiente: 95 °C durante 30 s, 18 ciclos de 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 1 minuto y 68 °C durante 10 minutos y mantener a 4 °C.

Tabla 2

10 Cebador y secuencia de información para las variantes truncadas de la SEQ ID NO: 10.

Variantes de la SEQ ID NO	Conjunto de cebadores	Número de secuencia de ADN	Cebadores de SEQ ID NO
10	-	AJ5858-2	
13	MD3-13F/ MD3-13R	MD13-2	23-24
14	MD3-23F/ MD3-23R	MD23-1	25-26
15	MD3-33F/MD3-33R	MD33-1	27-28
16	MD3-43F/ MD3-43R	MD43-3	29-30
17	MD3-53F/ MD3-53R	MD53-2	31-32
18	MD3-81F/ MD3-81R	MD81-1	33-34
19	MD3-114F/ MD3-114R	MD114-1	35-36
20	MD183-211F/ MD183-211R	MD183-1	37-38
21	MD194-211F/ MD194-211R	MD194-1	39-40
22	MD204-211F/ MD204-211R	MD204-1	41-42

15 Los cebadores para los mutantes de truncado se sintetizaron en Bio S&T y se suministraron como polvo liofilizado. Después de la resuspensión, las concentraciones de los cebadores se verificaron por espectrofotometría. Se realizó una reacción de mutagénesis con los citados cebadores de acuerdo con las instrucciones del kit QuikChange. Los análisis de las reacciones en un gel de agarosa al 0,8% verificaron que las reacciones eran correctas.

20 La digestión DpnI y la transformación de XL1-Blue Supercompetent Cells con 1 µL de este producto se realiza conforme a las instrucciones del fabricante. Se permite el crecimiento de tres clones de cada transformación durante una noche para una miniprep de plásmido. Se envía una muestra de ADN de cada mutante truncado de SEQ ID NO: 10 para la secuenciación de ADN. Los datos de secuenciación se analizan con el programa informático de análisis de secuencias del NCBI, Blast2, y se observa una alineación del 100% con las secuencias teóricas de codificación de la variante C3, excepto para MD43-1.

25 Cada una de las muestras verificadas de ADN se emplea para transformar las células competentes BL21(DE3) (One-Shot BL21(DE3), Invitrogen) con ADN plasmídico conforme a las instrucciones del fabricante. Se transfieren tres colonias de cada clon en medios LB separados con kanamicina 30 µg/ml para los análisis de inducción a miniescala. Se realizan los geles de proteína y se cuantifican las bandas teñidas con Coomassie mediante densitometría.

Se inocula el clon con mejor expresión de cada mutante truncado para la expresión a gran escala y la purificación. Primero, se inocula un frasco de 0,5 l de caldo de Luria con glucosa con 2 viales de células del banco de investigación (RCB) y se dejan crecer durante una noche. El cultivo de partida se diluye 10 veces en 8 frascos, cada uno de los cuales contiene 500 ml del medio de cultivo. Los frascos se incuban a 37 °C y después de 1 hora 20 minutos, se añade isopropilto-B-D-galactósido (IPTG) para aumentar la expresión de la variante. Tras otras 4 horas, las células se recogen por centrifugación y se almacenan a -80 °C hasta su uso. Se analiza una muestra del cultivo recogido para determinar el contenido de variantes truncadas de SEQ ID NO: 10. Seguidamente, los agregados de células se descongelan y sonicán en tampón de extracción. Estos extractos brutos se purifican hasta una pureza aproximadamente del 90% mediante columnas SP-Sepharose Fast-Flow de 1 ml (HiTrap SP FF, Pharmacia). Las soluciones proteicas resultantes se concentran por ultrafiltración y seguidamente se pasan a través de una membrana de filtración de 0,2 micrómetros antes de la congelación. Se analizan alícuotas por A₂₈₀ para determinar la concentración de proteínas y se someten a densitometría de muestras en geles de SDS-poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie para determinar la pureza. La actividad biológica se analiza mediante un ensayo enzimático basado en fluorescencia (glicohidrolasa) y un ensayo de crecimiento de neuritas basado en células.

La bioactividad de las variantes de C3 puede determinarse mediante un ensayo de glicohidrolasa que mide la formación de ϵ -ADP-ribosa producida como resultado de la hidrólisis de ϵ -NAD por variantes de la C3. La actividad glicohidrolasa de las variantes de C3 convierte ϵ -NAD⁺ en ϵ -ADP-ribosa, una molécula con una fluorescencia 10 veces más intensa en las longitudes de onda seleccionadas. La intensidad de la fluorescencia de ϵ -ADP-ribosa se emplea para medir la cantidad de ϵ -ADP ribosa formada usando una curva estándar de fluorescencia de concentraciones conocidas de ϵ -AMP. Las intensidades de fluorescencia de ϵ -AMP y ϵ -ADP-ribosa se miden excitando la reacción a 305 nm y registrando la emisión a 410 nm. Una unidad de actividad se define como nmoles de ADP-ribosa formados en 30 minutos a 37 °C. El ensayo es lineal con un mínimo de 12 μ g de la proteína variante C3 y un mínimo de 180 minutos de tiempo de incubación. Se ha observado que este ensayo es preciso, exacto y reproducible. Asimismo, se ha observado que este ensayo es útil para medir las reducciones de la actividad enzimática tras la incubación a 70 °C y puede considerarse indicador de la estabilidad si se emplea en un estudio de estabilidad bien diseñado. Otros métodos que pueden emplearse para medir la bioactividad de las variantes de C3 se describen en la práctica (por ejemplo, ver Winton *et al.*, 2002, J Biol Chem, 277: 32820-32829).

La bioactividad de las variantes de C3 también puede determinarse con un bioensayo de crecimiento de neuritas NG108. El procedimiento del bioensayo comprende la incubación de células de NG-108 durante 4 horas con una alícuota de una solución tamponadora que contiene la variante C3. Se realiza simultáneamente un ensayo idéntico como control positivo, en el que se usa la SEQ ID NO: 10 en vez de la variante C3. A continuación, las células se fijan con paraformaldehído, se tiñen con violeta de cresilo y se determina el porcentaje de células en cada pocillo que presentan neuritas de longitud superior a la de un soma mediante recuento con microscopio. Los resultados presentados (Tabla 3) se basan en determinaciones por triplicado como mínimo de dos experimentos separados.

Tabla 3

Actividades ϵ NAD glicohidrolasa y crecimiento de neuritas de mutantes con truncado en N-terminal y C-terminal de SEQ ID NO: 10.

Muestra	GH (Act. media muestra)	Crecimiento de neuritas (Media control en múltiplos)
SEQ ID NO: 10	29	70
SEQ ID NO: 13	26	73
SEQ ID NO: 14	2	35
SEQ ID NO: 15	0	0
SEQ ID NO: 16	0	-
SEQ ID NO: 17	25	22

Estos datos indican que el tamaño funcional mínimo demostrado de SEQ ID NO: 10 truncada en el extremo N-terminal es de 212 aminoácidos y que la de SEQ ID NO: 10 truncada en el extremo C-terminal es de 224 aminoácidos. La doble delección esperada de aminoácidos de ambos términos produciría una variante funcional de poco más de 204 aminoácidos. Los ejemplos de variantes de doble delección comprendidas en la presente invención incluyen, entre otras, las SEQ ID NO: 78 y 79.

Variantes PEGiladas de la SEQ ID NO: 10

La SEQ ID NO: 10 está modificada por el acoplamiento químico a partes de polietilenglicol para potenciar las propiedades de permanencia biológica (Tabla 4). La PEGilación es la acción de unir covalentemente una estructura de PEG a otra molécula mayor, por ejemplo, una proteína o polipéptido terapéuticos (que entonces se denomina “PEGilado”). Como se conoce en la práctica, cuando el polietilenglicol se une a diversas proteínas o polipéptidos puede retrasar el aclaramiento de la proteína transportada de la sangre, lo que puede prolongar el efecto medicinal y/o reducir la toxicidad y, por tanto, permitir la prolongación de los intervalos posológicos. La actividad de las variantes PEGiladas mostradas aquí puede verificarse con cualquiera de los métodos descritos aquí, p. ej., en los ejemplos 9-13 y 18.

Tabla 4

10 Variantes PEGiladas de SEQ ID NO: 10

Variante	Aducto de PEG	PM observado (kDa)
SEQ ID NO: 10	-	27
BA-220	Mono-2,4 kDa	33
BA-225	Mono-6,3 kDa	39
BA-230	Mono-21 kDa	61
BA-231	Di-21 kDa	83
BA-235	Mono-30 kDa	64
BA-236	Di-30 kDa	112
BA-240	Mono-40 kDa	86

PEGilación y purificación de SEQ ID NO: 10 con mPEG-ButyrALD

La PEGilación del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 10 puede realizarse mediante reactivos de mPEG-butiraldehído comercializados (Nectar Therapeutics) suministrados en alícuotas prepesadas y precintadas. Una reacción típica comienza con la dilución de la SEQ ID NO: 10 (en tampón de citrato sódico, pH 6,5) hasta una concentración final de 3,3 mg/ml en citrato sódico-NaOH 0,1 M desgasificado, 0,5 M EDTA a pH 5,0. Inmediatamente antes de empezar la reacción de PEGilación, se disuelven los reactivos mPEG-ButyrALD en agua MilliQ fresca hasta alcanzar la concentración deseada. El grado de PEGilación se controla con una combinación de tiempo de reacción, pH y proporción de reactivo mPEG-ButyrALD/SEQ ID NO: 10. Por ejemplo, se favorece la mono-PEGilación en el extremo N-terminal si la proporción es de 1:1 a un pH 5,5. Alternativamente, se generan formas di- o multi-PEGiladas si se aumentan las proporciones de reactivo mPEG-ButyrALD/SEQ ID NO: 10 (130:1 para mPEG-ButyrALD de 2,4 kDa; 20:1 para mPEG-ButyrALD de 6,3 kDa y 2:1 para mPEG-ButyrALD de 21 kDa).

Se añade una alícuota de la solución de mPEG-ButyrALD a la solución de SEQ ID NO: 10, se mezcla suavemente y se incuba 1 hora a 37 °C con inversión a intervalos de 30 minutos. Después de 1 hora, y nuevamente después de 2 horas, las reacciones se complementan con alícuotas frescas del reactivo de PEGilación. Se permite la incubación de las reacciones durante una tercera hora, después de la cual, se neutralizan con la adición de 85 µL de cianoborohidruro sódico [Na(CN)BH₃] 1 M y se deja en incubación durante una noche a TA para reducir la base de Schiff intermedia a una unión estable de amina secundaria. Bajo condiciones óptimas, puede obtenerse una conversión ~ 25% de SEQ ID NO: 10 a SEQ ID NO: 10 PEGilada (ver Tabla 5).

Tabla 5

Rendimiento de diversas variantes de BA-210 PEGilada.

Muestra	Volumen (ml)	Concentración (mg/ml)	Rendimiento (mg)	% de SEQ ID NO: 10 inicial
BA-230	0,82	5,80	4,76	24
BA-231	0,08	4,54	0,36	2

Muestra	Volumen (ml)	Concentración (mg/ml)	Rendimiento (mg)	% de SEQ ID NO: 10 inicial
BA-235	0,51	8,22	4,19	21
BA-236	0,16	3,55	0,57	3
BA-240	0,72	5,46	3,89	19

Se emplean columnas de intercambio catiónico SP-Sepharose Fast-Flow 1 ml (HiTrap SP FF, Pharmacia) para purificar la SEQ ID NO: 10. Antes de la reacción, la SEQ ID NO: 10 no PEGilada se une fuertemente a la resina; las formas PEGiladas de la SEQ ID NO: 10 (en función del número de partes PEG unidas) se unen con menos fuerza a la resina. El tampón de unión consistió en HEPES 0,05 M, NaCl 0,075 M y EDTA 0,5 mM, pH 7,5. Se eluye por adición gradual de NaCl empleando un gradiente lineal de NaCl 0-0,16 M. Se agrupan las fracciones FPLC que contienen las diversas formas PEGiladas, se concentran con Amicon YM-10 s y seguidamente se dializan frente a citrato sódico 5 mM, pH 6,5, usando un cartucho de diálisis Slide-A-Lyzer con un valor discriminativo de 10 kDa. El análisis de geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie demostró que algunas de las muestras concentradas purificadas todavía contenían una pequeña cantidad de SEQ ID NO: 10 sin reaccionar en las tres purificaciones. Por tanto, las muestras concentradas se vuelven a purificar por FPLC empleando columnas HiTrap SP FF 1 ml. El perfil de elución de la repurificación de una muestra PEGilada de 2 kDa demostró picos semirresueltos, mientras que en una muestra de 6 kDa se observaron dos picos bien separados (Figuras 5A y B). Las fracciones de tres purificaciones se analizan en geles NuPAGE y se agrupan las fracciones puras.

Propiedades antimetastásicas de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de esta invención

En otro aspecto de la presente invención, una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de esta invención puede administrarse, por ejemplo, por inyección o mediante aplicación tópica como método de recubrimiento u otro método como se describe aquí, a un tejido proximal a un primer tumor o que contiene un primer tumor en un mamífero que requiere tratamiento y puede inhibir la migración de una célula de un tumor metastásico en un mamífero, la célula tumoral que se origina en un sitio del primer tumor en un mamífero, a un sitio en el tejido sano o normal del mamífero relacionado funcionalmente y proximal al tejido en el que se asienta el primer tumor. Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de esta invención puede administrarse a un tejido renal proximal a un tumor renal o que contiene un tumor renal en un mamífero y puede inhibir la migración de una célula tumoral renal metastásica del tumor en el riñón al tejido sano en el mismo riñón en el que se asienta el primer tumor.

En otro aspecto, una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de esta invención puede administrarse, por ejemplo, por inyección o por recubrimiento u otro método como se describe aquí, a un tejido proximal a un primer tumor o que contiene un primer tumor en un mamífero que requiere tratamiento y puede inhibir la migración de una célula de un tumor metastásico en un mamífero, la célula tumoral que se origina en un sitio del primer tumor en un mamífero, a un sitio en el tejido u órgano sanos o normales del mamífero funcionalmente separados o distantes del tejido en el que se asienta el primer tumor. Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de esta invención puede administrarse a un tejido en el cerebro que contiene un tumor cerebral y puede inhibir la migración de una célula de un tumor cerebral metastásico a tejidos sanos en otra localización del organismo, como el tejido hepático, esplénico o pulmonar.

En otro aspecto, tras la administración de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de esta invención a un paciente que necesita tratamiento, se previene o inhibe la migración metastásica de una célula tumoral maligna, y puede reducir sustancialmente o prevenir completamente la formación de un tumor secundario, así como prevenir la diseminación de un cáncer maligno en un paciente.

Demostración de que una proteína de fusión de esta invención, por ejemplo, SEQ ID NO: 43 puede reducir la motilidad celular

La eficacia terapéutica de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de esta invención (como la SEQ ID NO: 44) como agente antimetastásico se puede demostrar, por ejemplo de forma cuantitativa, mediante un ensayo de invasión celular bidimensional *in vitro*. En un ensayo de este tipo, la inhibición de la capacidad de migración metastásica de una célula maligna puede medirse mediante el uso de cámaras de Boyden adquiridas. Las cámaras de Boyden tienen 2 compartimentos, donde los compartimentos superior e inferior están separados por una membrana. La extensión de la migración celular se mide preparando en placas un número total de células en el compartimento superior, y contando la fracción del número total de células que migran al compartimento inferior. Se pueden añadir factores de crecimiento al compartimento inferior para potenciar la migración celular. Este modelo es útil como modelo de migración de células cancerosas *in vivo* en un mamífero. Para probar la capacidad de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de esta invención (como la SEQ ID NO: 43 en una solución salina estéril amortiguada con fosfatos que es isotónica con la sangre de

un mamífero) para bloquear la migración de células tumorales, la composición que comprende la SEQ ID NO: 43 se añade a diferentes concentraciones de SEQ ID NO: 43 a las células cancerosas en el compartimento superior. Se cuenta la fracción del número total de células que migran al compartimento inferior en presencia de la composición de la proteína de fusión y se comparan con los controles en los que la proteína de fusión tiene una concentración de cero. El número de células cancerosas que migran en un experimento de control modela dicha migración en un paciente con cáncer que no recibe tratamiento con una composición de esta invención. El número de células cancerosas que migran en presencia de una alícuota de una composición de esta invención modela dicha migración en un paciente con cáncer que recibe tratamiento con una alícuota de una composición de esta invención. La diferencia entre el último y los números de migración celular experimental de control se puede expresar en porcentaje y pueden oscilar entre el 100% (es decir, inhibición completa de la migración de una célula metastásica) y alrededor del 5%, preferentemente entre el 100% y alrededor del 50%, más preferentemente entre alrededor del 100% y alrededor del 75%, y más preferentemente entre alrededor del 100% y alrededor del 90%. Se puede observar una cantidad del 0% al comparar un primer vehículo de control con un segundo vehículo de control, que puede ser el mismo que el primer vehículo de control. Una manera de calcular este porcentaje consiste en resolver la expresión = {(número de células que migran en el control menos número de células que migran en presencia de una proteína de fusión) dividido por (número de células que migran en el control)} multiplicado por 100%.

La eficacia terapéutica de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de esta invención (como la SEQ ID NO: 44) como un agente antimetastático se puede demostrar al menos cualitativamente y en un aspecto mediante un ensayo de invasión celular tridimensional *in vitro*. En un ensayo de este tipo, la inhibición de la capacidad de migración metastásica de una célula maligna se puede medir mediante el cambio en la capacidad relativa de una célula maligna para migrar a través de una matriz MATRIGEL® tras el tratamiento de la célula con una formulación farmacéuticamente aceptable de esta invención que comprende una proteína de fusión de esta invención en un vehículo portador en relación con la capacidad de la célula maligna de migrar a través de la matriz MATRIGEL® tras el tratamiento con el vehículo portador como un control de referencia, donde el vehículo portador no contiene ninguna proteína de fusión. En un aspecto, una proteína de fusión de esta invención puede inhibir la migración de una célula tumoral metastásica en un modelo de matriz tisular para producir un cambio inhibitorio como una reducción en la velocidad de migración de la célula o como una reducción en la distancia de la migración de la célula en un período.

El cambio relativo en la distancia de la migración de una célula maligna a través de una matriz modelo es igual a la diferencia en la distancia de la migración de una célula en presencia de la proteína de fusión más el vehículo y la distancia de migración de la célula en presencia de un vehículo de control en ausencia de la proteína de fusión, dividiendo la diferencia por la distancia de migración del vehículo de control. Los cambios relativos se pueden expresar en porcentaje y pueden oscilar entre el 100% (inhibición completa de la migración de una célula metastásica) y alrededor del 5%, preferentemente entre el 100% y alrededor del 50%, más preferentemente entre alrededor del 100% y alrededor del 75%, y más preferentemente entre alrededor del 100% y alrededor del 90%. Se puede observar una cantidad del 0% al comparar un primer vehículo de control con un segundo vehículo de control, que puede ser el mismo que el primer vehículo de control.

En una realización, la comparación de eficacias de dos proteínas de fusión A y B de esta invención, donde las proteínas de fusión difieren una de la otra en su secuencia de aminoácidos, como por ejemplo en su respectiva secuencia de potenciación de la penetración en la membrana, puede proporcionar distintos porcentajes observados de inhibición de la migración de un tipo de célula tumoral dado causada por A y por B. Las diferencias relativas (o bien un porcentaje absoluto como el 100% por A frente al 80% por B, o bien diferencias cualitativas como A es mejor que B) en la inhibición puede ser la misma de tipo tumoral a tipo tumoral o puede cambiar de tipo tumoral a tipo tumoral.

En un aspecto, una proteína de fusión de esta invención puede inhibir sustancialmente (100%) la migración metastásica de al menos un tipo de célula tumoral.

En otro aspecto, una proteína de fusión de esta invención puede inhibir sustancialmente (100%) la migración metastásica de al menos dos tipos de células tumorales.

Un ensayo útil se basa en la capacidad observada de una célula tumoral invasiva de migrar a través de una membrana basal artificial (MATRIGEL®). En este ensayo, el cambio en la capacidad de distintos tipos de células cancerosas, cada uno con una capacidad diferente de migrar a través de la MATRIGEL® en ausencia de tratamiento con una composición de esta invención, y por tanto una capacidad de invasión metastásica diferente se evalúan mediante exposición de una concentración o intervalo posológico de una proteína de fusión de esta invención de 0,1 µg/ml a 100 µg/ml. Un intervalo de concentración preferida es alrededor de 0,0001 microgramos de proteína de fusión por centímetro cúbico (cm³) de tejido hasta alrededor de 100 microgramos por centímetro cúbico de tejido.

La matriz MATRIGEL® (BD Biosciences) es una preparación de membrana basal solubilizada extraída del sarcoma murino EHS, un tumor con gran cantidad de proteínas ECM. Sus componentes principales son laminina, colágeno IV, proteoglicanos de heparán sulfato y entactina. A temperatura ambiente, la matriz BD MATRIGEL® se polimeriza para producir material de matriz biológicamente activa que puede imitar la membrana basal celular de los mamíferos, donde las células pueden comportarse *in vitro* de forma similar a como lo harían *in vivo*. La matriz MATRIGEL®

puede proporcionar un entorno fisiológicamente relevante para estudios de morfología celular, migración, invasión o función bioquímica, y expresión génica.

La demostración de que una proteína de fusión de esta invención, como la SEQ ID NO: 43, puede influir en múltiples aspectos de los fenotipos de células malignas se puede observar monitorizando la incorporación de timidina tritiada a células que están creciendo y proliferando, donde la timidina tritiada añadida al medio de cultivo celular se transporta al interior de las células y se convierte en parte de la reserva de trifosfato de timidina que se encuentra allí y que cada célula usa para sintetizar ADN. La timidina tritiada queda incorporada de forma covalente en las macromoléculas de ADN de cada una de las células. En células que no están creciendo o en células que están muriendo por apoptosis o necrosis, o bien la timidina tritiada no se transporta al interior de la célula, o bien se libera al medio celular tras la lisis de la célula. La incorporación de timidina tritiada puede usarse como medición global del efecto de una proteína de fusión de esta invención, como SEQ ID NO: 43, en el crecimiento celular, división celular, estasis celular y muerte celular. Las líneas celulares en que SEQ ID NO: 43 induce un descenso en la composición de 3H-timidina: línea celular HEC 1B de cáncer endometrial humano, línea celular CaCo2 de cáncer colorrectal humano, línea celular Sk-MEL-2 de cáncer de melanoma humano y línea celular A-172 de cáncer del SNC humano.

Los datos de la Tabla 6 ilustran los efectos de los cambios en las cantidades posológicas de una composición que comprende una proteína de fusión de esta invención, la SEQ ID NO: 43, administrada a cada una de las tres líneas celulares de cáncer humano representativas, sobre la incorporación de timidina tritiada a las ocho líneas celulares de cáncer humano: HEC 1B, Caco-2, SK-MEL-1, HT1080, MCF7, SW480, 293S y A172. La dosis de SEQ ID NO: 43 administrada osciló en 50 veces entre alrededor de 1 microgramo por mililitro a alrededor de 10 microgramos por mililitro a alrededor de 50 microgramos por mililitro (µg/ml).

Tabla 6

Datos de respuesta de líneas celulares de tumores humanos respecto a la administración de una proteína de fusión, BA-07, medida según la incorporación de timidina tritiada.

	Dosis de SEQ ID NO: 43 en microgramos por mililitro		
Línea celular de cáncer humano	50	10	1
	% de crecimiento en presencia de una proteína de fusión en relación con el porcentaje en la presencia de un único vehículo como control		
HEC 1B	10	13	30
Caco-2	21	17	30
SK-MEL-1	34	30	33

Se ha observado de forma inesperada que estas líneas de células tumorales humanas muestran una proliferación celular reducida en presencia de la proteína de fusión. En la Tabla 6 se muestra el porcentaje de crecimiento comparado con un valor de control del 100%.

Las líneas de células tumorales se pueden dividir en tres grupos separados en lo que respecta a la incorporación de timidina tritiada. Una composición de la invención que comprende la SEQ ID NO: 43 muestra un efecto pronunciado sobre la proliferación celular en la línea celular HEC 1B, que es una línea celular de carcinoma endometrial, con una inhibición de la proliferación relacionada con una concentración inhibidora del 50% (IC₅₀) de menos de 1 µg/ml. Además de la inhibición, existe un efecto de respuesta a la dosis consistente en una mayor inhibición con la concentración mayor de SEQ ID NO: 43.

En las líneas celulares Caco 2 y SK-MEL-1, que aparecen en la Tabla 6, una proteína de fusión muestra un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular evidenciado por un nivel menor de incorporación de timidina tritiada al interior de las células de cada línea celular.

Composición farmacéutica

A modo de ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar mezclando la SEQ ID NO: 10 (30 mg/ml de disolución madre o disolución diluida) con un componente portador fluido capaz de formar in vivo una matriz terapéuticamente aceptable, como por ejemplo adhesivos tisulares, como por ejemplo un adhesivo de fibrina o un gel de colágeno.

En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar mezclando la SEQ ID NO: 10 (30 mg/ml de disolución madre o disolución diluida) con los cuatro componentes del kit Tisseel® (sellador de fibrina):

- Trombina liofilizada;
- 5 • 1 ml de CaCl_2 /solución de reconstitución amortiguadora para reconstituir la trombina;
- Fibrinógeno liofilizado; y
- 1 ml de solución amortiguadora para reconstituir el fibrinógeno.

El sellador de fibrina tiene tres componentes básicos: concentrado de fibrinógeno, cloruro de calcio y trombina. Se pueden añadir otros componentes para influir en las propiedades de la formación de gel. Los componentes añadidos se pueden usar para modular el tiempo que tarda el gel de fibrina en formar, a partir de los componentes solubles, el tamaño de la red de proteínas que se forma y la resistencia del gel, y los inhibidores de proteasas ralentizan la eliminación del gel después de haber sido colocado en el cuerpo. Existen varias preparaciones comerciales diferentes en forma de kits. Los ejemplos no limitantes de estas incluyen Tissucol/Tisseel (Immuno AG, Viena, en la actualidad comercializado por Baxter), Beriplast P (Hoechst, Alemania Occidental) y Hemaseel (Haemacure Inc., Kirkland, Quebec).

Para hacer un gel de fibrina, la trombina soluble y el fibrinógeno se mezclan en presencia de cloruro de calcio. Cuando los componentes se mezclan, se forma un gel adhesivo de fibrina debido a que la trombina degrada la molécula de fibrinógeno para formar monómeros de fibrina. Los monómeros de fibrina polimerizan de forma espontánea para formar una red tridimensional de fibrina, una reacción que imita la vía común final de la cascada de coagulación, es decir, la conversión de fibrinógeno en sellador de fibrina. La clave para preparar las preparaciones comerciales consiste en mantener separados los componentes de fibrinógeno y trombina hasta su uso, de manera que se pueda controlar la polimerización con el ritmo adecuado antes o después de colocarlo en el cuerpo.

Hoy en día, este uso de la fibrina como adhesivo biológico ha sido aceptado ampliamente y aplicado en muchos campos de la cirugía. El Hemaseel o Tisseel VH se usa como ayuda para la hemostasia en cirugías que requieren un baipás cardiopulmonar y tratamiento de lesiones esplénicas debido a traumatismo cerrado o penetrante en el abdomen cuando el control de la hemorragia mediante técnicas quirúrgicas convencionales, incluido sutura, ligadura y cauterización, no resulta eficaz ni práctico. La acción de estos geles de fibrina también se utiliza para detener la hemorragia en procedimientos quirúrgicos que requieren un baipás cardiopulmonar o una reparación esplénica. Se ha demostrado que Tisseel VH también es un sellador eficaz como ayuda en el cierre de las colostomías.

Tal como se ha mencionado anteriormente y en la patente estadounidense n.º 7.141.428, cuyo contenido total, por la presente, se incorpora como referencia, el sellador de fibrina tiene tres componentes básicos: concentrado de fibrinógeno, cloruro de calcio y trombina. Se pueden añadir otros componentes para influir en el tiempo de formación de coágulos y en el tamaño de la red de proteínas que se forma. Por lo general, al mezclar los componentes, se forma un coágulo de fibrina en el que la molécula de fibrinógeno es degradada por la acción de la trombina para formar monómeros de fibrina, que polimerizan de forma espontánea para formar una red tridimensional de fibrina, que principalmente se mantiene unida mediante enlaces de hidrógeno. Esto corresponde a la última fase de la cascada de coagulación sanguínea natural, siendo la velocidad de coagulación dependiente de la concentración de trombina usada. A fin de mejorar la resistencia a la fractura, se ha proporcionado una reticulación covalente entre las cadenas de fibrina mediante la introducción del factor XIII en la composición selladora. En presencia de iones de calcio, la trombina activa el factor XIII a factor XIIIa. El factor XIIIa activado, junto con la trombina, cataliza el enlace cruzado de la fibrina y aumenta la resistencia del coágulo. La resistencia del coágulo de fibrina se mejora aun más mediante la adición de fibronectina a la composición, donde la fibronectina mantiene una reticulación y está unida a la red de fibrina formada. Durante la cicatrización, el material del coágulo sufre una lisis gradual y se absorbe por completo. Para prevenir una degradación demasiado temprana del coágulo de fibrina mediante fibrinólisis, la composición selladora de fibrina puede comprender un inhibidor activador del plasminógeno o un inhibidor plasmático, como la aprotinina. Un inhibidor de este tipo también reducirá la actividad fibrinolítica derivada de cualquier plasminógeno residual en la composición de fibrinógeno. De forma similar, las composiciones pueden incluir ácido hialurónico (u otros polisacáridos), y estas también pueden comprender un inhibidor de hialuronidasa, como uno o más flavonoides (o los inhibidores correspondientes para otros polisacáridos), a fin de prevenir la degradación (es decir, prolongar la duración) del componente de ácido hialurónico mediante la hialuronidasa que siempre está presente en los tejidos contiguos. El ácido hialurónico puede, tal como se ha mencionado anteriormente, tener un enlace cruzado, siendo el Hylan® (disponible en Biomatrix, Ritschfield, N.Y., EE. UU.) un ejemplo disponible comercialmente. Las composiciones de ácido hialurónico pueden, por ejemplo, tener la forma de geles, soluciones, etc.

Los coágulos de fibrina se pueden usar para aplicar una sustancia farmacéuticamente activa. Al añadir un fármaco, como un antibiótico, un factor de crecimiento, etc., al adhesivo tisular quedará contenido en la red de fibrina formada al aplicar el adhesivo tisular. Por tanto, se garantizará que el fármaco se encuentre en el lugar de aplicación mientras se libera de forma controlada desde la composición.

Los productos selladores de fibrina preparados a partir del factor XIII/fibrinógeno plasmático humano están disponibles comercialmente. Un producto es un adhesivo tisular denominado Tisseel Fibrin Sealant (Baxter Hyland Immuno Corporation; Tissucol/Tisseel, Immuno AG, Viena). Otro producto es el Beriplast P (Hoechst, Alemania Occidental). Un ejemplo de una formulación congelada de un adhesivo de fibrina acompañado de un sistema de 2 jeringas es Evicel[®]; fabricado por Omrix (Nueva York, EE. UU.).

En una realización, el sellador de fibrina que se usa para formular/administrar la composición farmacéutica de la presente invención es TISSEEL VH, sellador de fibrina de dos componentes, calentado a vapor, kit (TISSEEL VH Fibrin Sealant), fabricado por Baxter Healthcare Corporation. El kit TISSEEL VH Fibrin Sealant contiene fibrinógeno (concentrado de proteína selladora) y trombina como ingredientes activos principales. También contiene solución de cloruro de calcio y solución inhibidora de la fibrinólisis (aprotinina, bovina). Los dos componentes de dilución, la solución de proteína selladora y la solución de trombina, se mezclan y aplican por vía tópica. Mezclar la solución de proteína selladora y la solución de trombina produce una solución viscosa que forma rápidamente un coágulo elástico. La trombina es una proteasa muy específica que transforma en fibrina el fibrinógeno contenido en el concentrado de proteína selladora. La mayor parte de la trombina es absorbida por la fibrina así formada. El exceso de trombina, si lo hubiera, queda inactivado por los inhibidores de la proteasa presentes en la sangre. La solución inhibidora de la fibrinólisis (aprotinina) es un inhibidor de proteasas polivalente que previene la degradación prematura de la fibrina.

Otros selladores de fibrina que pueden usarse para formular/administrar la composición farmacéutica de la presente invención son Cebus[®], Ateles[®] y Proleus[®] (PlasmaSeal); Vivostat[®] (Vivolution); CryosSeal FS[®] (Thermogenesis); CoSeal[®] (Angiotech); Duraseal[®] (Confluent Surgical); Poliphase[®] (Avalon Medical); Bioglue[®] (Cryolife Inc.); Avitene Flour[®] (Davol); Dermabond[®] (Johnson & Johnson); Hemaseel, Hemaseel-HMN y Hemaseel-Thrombin (Haemacure); Beriplast-P[®] (Aventis); Fibrocaps[®] (Profibrix), y Crosseal[®], Evicel[®] y Thrombin (Omrix Pharmaceuticals).

De forma alternativa, otros selladores de fibrina que también se pueden usar en los métodos y composiciones de la invención han quedado descritos en las patentes estadounidenses n.º RE39.298; RE39.321; 4.427.650; 4.427.651; 4.414.976; 4.640.834; 5.290.552; 5.607.694; 5.714.370; 5.750.657; 5.773.418; 5.962.405; 5.962.420; 6.117.425; 6.162.241; 6.262.236; 6.780.411; en la publicación de la solicitud de patente estadounidense n.º 2005/0271646, y en la patente europea n.º 0 804 257, todas las cuales, por la presente, se incorporan por referencia en su totalidad. Las formulaciones de adhesivos tisulares también están descritas en la patente estadounidense n.º 7.141.428, que, por la presente, se incorpora como referencia en su totalidad.

Se debe entender que estos adhesivos tisulares se mencionan a modo de ejemplo y no son limitantes. Se debe entender que cualquier adhesivo tisular farmacéuticamente aceptable, como una fibrina o gel de colágeno, puede usarse en los métodos y composiciones de la invención.

Componentes de Tisseel VH

Tisseel VH contiene las siguientes sustancias en cuatro viales separados:

1. Concentrado de proteína selladora (humana), calentado a vapor, liofilizado;
2. Solución inhibidora de fibrinólisis (bovina);
3. Trombina (humana), calentada a vapor, liofilizada, y
4. Solución de cloruro de calcio.

El concentrado de proteína selladora (humana), calentado a vapor, está formulado como una preparación en polvo, calentada a vapor, liofilizada, no pirogénica y estéril, hecha de mezcla de plasma humano. La solución inhibidora de fibrinólisis (bovina) está formulada como una solución no pirogénica y estéril, que contiene 3.000 unidades de inhibidor de calicreína (KIU)/ml de aprotinina, un inhibidor de proteasas que incluye plasmina. Tras preparar el concentrado de proteína selladora liofilizado en la solución inhibidora de fibrinólisis, la solución resultante de proteínas selladoras contiene:

Proteínas totales: 100 – 0130 mg/ml;

Fibrinógeno: 75 – 0115 mg/ml;

Inhibidor de fibrinólisis: 2250 – 3750 KIU/ml, y

Excipientes.

La trombina (humana), calentada a vapor, está formulada como una preparación en polvo, calentada a vapor, liofilizada, no pirogénica y estéril, hecha de mezcla de plasma humano. La solución de cloruro de calcio está formulada como una solución no pirogénica y estéril que contiene 40 µmol/ml de CaCl₂. Tras preparar la trombina liofilizada en la solución de cloruro de calcio, la solución de trombina resultante contiene:

Trombina (humana): 400 – 600 UI/ml;

Cloruro de calcio: 36 – 044 μ mol/ml, y

Excipientes: véase la Tabla 4.

5 La solución de proteína selladora y la solución de trombina se combinan entonces usando el sistema de preparación y aplicación DUPLOJECT o un dispositivo de administración equivalente autorizado por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) para su uso con TISSEEL VH Fibrin Sealant, para formar el sellador de fibrina. TISSEEL VH Fibrin Sealant se suministra en cuatro tamaños diferentes de kit de 0,5 ml; 1,0 ml; 2,0 ml y 5,0 ml, que contienen los siguientes componentes que se presentan a continuación.

10 El plasma original obtenido en centros estadounidenses de recolección de plasma autorizados se usa para producir el concentrado de proteína selladora y el polvo FEIBA[®], el material inicial de la trombina. Para obtener el concentrado de proteína selladora, se lava el crioprecipitado derivado del plasma humano, se disuelve en solución amortiguadora, se filtra y se liofiliza. La solución inhibidora de la fibrinólisis se produce a partir de una solución de aprotinina, no pirogénica y estéril, obtenida en Bayer. La trombina se prepara disolviendo el polvo FEIBA[®] e incubando la solución con cloruro de calcio a fin de activar la protrombina a trombina, seguido por ultra/diafiltración, 15 filtración estéril y liofilización. La solución de cloruro de calcio se prepara a partir de cloruro de calcio de conformidad con las especificaciones que figuran en la farmacopea estadounidense (USP).

20 El concentrado de proteína selladora y la trombina están hechos a partir de mezcla de plasma humano. Se ha observado que el tratamiento de calentamiento a vapor en dos pasos que se usa para su fabricación permite lograr una reducción vírica significativa. En la técnica se conocen otros selladores de fibrina que pueden usarse en la presente invención. Por ejemplo, los selladores de fibrina que se describen en la solicitud estadounidense n.º RE 39.299 y en las patentes estadounidenses n.º 6.162.241; 6.780.411; 5.773.418; 5.290.552; 5.607.694; 4.414.976; 4.427.650 y 4.427.651, documentos que, por la presente, se incorporan por referencia.

La invención se ilustra aun más en varias realizaciones y aspectos mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

25 Experimento analítico con Matrigel

Los datos de un experimento analítico típico con Matrigel, por ejemplo, relacionado con el efecto de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión designada SEQ ID NO: 8 sobre la longitud de los túbulos capilares derivados de la angiogénesis se resumen en la Tabla 7. En estos datos se observa que la formación de la red fue inhibida en aproximadamente del 13% a alrededor del 20% en las condiciones de formulación y dosis usadas 30 frente a la inhibición producida por un vehículo de control en que la inhibición cero proporciona un crecimiento del 100%. Este efecto sobre la angiogénesis puede potenciarse usando dosis mayores de proteína de fusión y por incubación previa de las células HUVEC con SEQ ID NO: 8 antes de añadir las células a Matrigel. El efecto de antiangiogénesis de una composición que comprende un polipéptido de esta invención que comprende una secuencia de aminoácidos de un agente transportador enlazado de forma covalente a una secuencia de 35 aminoácidos de un agente activo, donde la secuencia de aminoácidos del agente activo retiene una actividad de ADP-ribosilo transferasa, puede ser útil para inhibir o reducir sustancialmente la velocidad de neovascularización subretiniana y la proliferación de tejido neovascular en los ojos de un receptor mamífero cuando la composición se administra al mamífero conforme a los métodos de esta invención.

Tabla 7

40 Efecto de antiangiogénesis de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión, la SEQ ID NO: 8, sobre la longitud media de una red capilar en un ensayo de matriz Matrigel.

Longitud media de una red capilar asociada a angiogénesis	Longitud media relativa de una red capilar producida en presencia de un vehículo control	Longitud media relativa de una red capilar producida en presencia de una composición farmacéutica que comprende SEQ ID NO: 8, con una concentración de 10 microgramos por mililitro
Y1	100	86,4
Y2	100	78,2
Y3	100	86,7

Ejemplo 2Preparación de SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 10

La SEQ ID NO: 43 se prepara mediante una reacción en cadena de la polimerasa y se subclona al vector pET9a para crear la SEQ ID NO: 10. Los dos oligonucleótidos están diseñados para eliminar los aminoácidos 3-17 mediante mutagénesis dirigida al emplazamiento usando el kit QuikChange (Stratagene). La reacción en cadena de la polimerasa se lleva a cabo en un reciclador térmico con 50 ng de la variante pET9a-C3, usando cebadores mutantes de 42 meros: cebador 2029F 5'-GGA GAT ATA CAT ATG TC*G GCT TAT TCA AAT ACT TAC CAG GAG-3' (SEQ ID NO: 11); y cebador 2029R 5'-CTC CTG GTA AGT ATT TGA ATA AGC C*GA CAT ATG TAT ATC TCC-3' (SEQ ID NO: 12). El símbolo (*) indica la intersección en que se produce la delección del nucleótido 45.

La digestión de DpnI se lleva a cabo conforme a las instrucciones del fabricante; se usó 1 µL de este producto para transformar XL1-Blue Supercompetent Cells (Invitrogen). A continuación, estas placas se incuban durante la noche a 37 °C. Se seleccionan los clones de la supuesta SEQ ID NO: 10 y se amplifica y purifica su ADN plasmídico usando el kit Qiagen Midi-Prep. Los plásmidos purificados se someten a análisis de digestión con restricción. El ADN de los tres clones candidatos se secuencian en BioS&T (Lachine, Quebec) usando los cebadores T7 y T7T. Se confirma el mutante AJC311-2 para contener la mutación y el ADN se usa para transformar las células BL21 (DE3) (Invitrogen) y preparar un banco de células de investigación (RCB, *research cell bank*).

La SEQ ID NO: 10 purificada se prepara a partir de *E. coli*. En primer lugar, un matraz de 0,5 l de caldo Luria con glucosa se cuba con 2 viales del banco de células de investigación (RCB) y se cultiva durante la noche. El cultivo de partida se diluye 10 veces en 8 matraces, cada uno de los cuales contiene 500 ml del medio de cultivo. Los matraces se incuban a 37 °C y, después de 1 hora y 20 minutos, se añade isopropiltio-B-D-galactósido (IPTG) para aumentar la expresión de la SEQ ID NO: 10. Tras otras 4 horas, las células se recolectan por centrifugación y se almacenan a -80 °C hasta su uso. Se analiza una muestra del cultivo recolectado para determinar el contenido de SEQ ID NO: 10. A continuación, las células se descongelan y se someten a una recuperación primaria, que en el proceso a escala de investigación para la producción de SEQ ID NO: 10 consiste en la homogeneización con ultrasonidos en el tampón de extracción. El extracto sin elaborar se trata con polímeros cargados positivamente para eliminar los ácidos nucleicos y con sulfato de amonio para eliminar algunas proteínas y reducir el volumen. Se elimina el exceso de sal; y la proteína se sigue purificando haciéndola atravesar cuatro columnas de cromatografía. La purificación final y los pasos de aislamiento consisten en la concentración de la solución de proteínas purificada resultante (se puede usar ultrafiltración), la filtración de la solución de proteínas (por ejemplo, a través de una membrana de filtración de 0,2 micrómetros que puede ser útil para esterilizar la solución de proteínas), la dispensación de la solución en tubos estériles, la congelación de la solución de proteínas y la liofilización de la solución congelada para dejar la proteína formulada en forma de polvo. Cuando la SEQ ID NO: 10 ya está purificada, se analiza la proteína de fusión para determinar la cantidad de proteína que se ha producido, su pureza, su potencia y su actividad biológica (por ejemplo, la actividad relacionada con la ADP-ribosil transferasa para detectar excrecencias de neuritas). La pureza se mide mediante densitometría de los geles de poliácridamida con SDS, teñidos con azul de Coomassie. La actividad de la SEQ ID NO: 10 se determina mediante un ensayo de excrecencia de neuritas a las 4 horas con la célula NG108. El procedimiento del bioensayo comprende la incubación de células NG-108 durante 4 horas con una alícuota de una solución amortiguadora que contiene SEQ ID NO: 10. Se realiza simultáneamente un ensayo idéntico como control positivo, en el que se usa SEQ ID NO: 8 en vez de SEQ ID NO: 10. A continuación, las células se fijan con paraformaldehído, se tiñen con violeta de cresilo y se determina el porcentaje de células en cada pocillo que presentan neuritas de longitud superior a la de un soma mediante recuento con microscopio. Cada uno de los datos puntuales se determina por triplicado.

Ejemplo 3Preparación de la proteína de fusión SEQ ID NO: 10

La SEQ ID NO: 10 deriva de la variante exoenzimática C3 que penetra en las células, la SEQ ID NO: 44. La SEQ ID NO: 44 se transfiere del vector pGEX-4T al vector pET9a para mejorar la expresión y eliminar el marcador de fusión GST. La variante resultante, la SEQ ID NO: 43, se purifica mediante FPLC con un Akta Explorer® (Amersham Biosciences, Montreal, QC). Para lograr un proceso fiable de fabricación de cGMP, se utiliza mutagénesis dirigida al emplazamiento para retirar los residuos en el extremo N y eliminar los residuos sensibles a las proteasas a fin de obtener la SEQ ID NO: 10.

Las SEQ ID NO: 44 o 10 se purifican mediante técnicas estándar conocidas en la técnica. Por ejemplo, las SEQ ID NO: 44 o 10 se expresan en células BL21 (DE3) de *E. coli* cultivadas en 4 matraces. Tras la inducción con IPTG, las células se extraen mediante homogeneización con ultrasonidos y se precipitan con polietilenglicol y sulfato de amonio o se filtran para eliminar los ácidos nucleicos. Los lisados atraviesan una columna SPXL a un pH neutro. Tras este paso, la variante eluida tiene una pureza >85%. Se siguen eliminando contaminantes mediante filtración de gel (Superdex® 75, Amersham Biosciences, Montreal, QC) y un paso de intercambio de aniones (Q Sepharose®, Amersham Biosciences, Montreal, QC). El paso de purificación final consiste en una ultrafiltración por membrana seguida de una filtración estéril. Las alícuotas purificadas se almacenan a -70 °C. La endotoxina residual, evaluada

con la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus*; kit BioWhittaker QCL-1000, es inferior a 2 UE/mg. La concentración de proteína se evalúa o bien mediante espectroscopia ultravioleta (A280), o bien mediante la reacción de Bradford (reactivo Coomassie® Plus, Pierce), mientras que la identidad e integridad de la proteína se establecen mediante una tinción con Coomassie de los geles en gradiente de acrilamida al 4-12% (NuPAGE Bis-Tris; Invitrogen, Burlington, ON) con o sin la adición del agente reductor. La actividad de glucosidolasa de las variantes se determina mediante un ensayo de fluorescencia que cuantifica la descomposición de NAD a ADP-ribosa y nicotinamida (Lasko y McKerracher, 2006, *Methods Enzymol.*, 406: 512-520). La actividad neuritogénica se evalúa mediante un ensayo de excrecencias de neuritas con células NG-108.

Ejemplo 4

Método general para determinar la inhibición de la angiogénesis

Con referencia a la Figura 33, la formación de nuevos vasos sanguíneos se puede estudiar en un modelo de cultivo celular cultivando células endoteliales en presencia de una matriz de membrana basal (Matigel). Las células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVEC) se recogen de los cultivos madre por tripinización, y se vuelven a suspender en un medio de cultivo compuesto por EBM-2 (Clonetics), FBS, hidrocortisona, hFGF, VEGF, R3-IGF-1, ácido ascórbico, hEGF, GA-1000 y heparina. MATRIGEL® (12,5 mg/ml) se descongela a 4 °C, y 50 ml de MATRIGEL® se añaden a cada pocillo de una placa de 96 pocillos; se dejan solidificar durante 10 minutos a 37 °C. Se añaden a cada pocillo las células del medio de cultivo a una concentración de 15.000 células por pocillo, y se deja que se adhieran durante 6 horas. Una proteína de fusión de esta invención, por ejemplo, la SEQ ID NO: 8, en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) se añade al pocillo a unos 10 mg/ml; en otros pocillos, la PBS se añade como control. Los cultivos se dejan reposar durante otras 6 a 8 horas. El crecimiento de los tubos se puede observar mediante microscopia con un aumento de 50X, y la longitud media de la red capilar se cuantifica con el software Northern Eclipse. El tratamiento de las células en el ensayo de Matrigel con una proteína de fusión de esta invención (por ejemplo, la SEQ ID NO: 8) reduce la formación de tubos (véase la Figura 33).

Ejemplo 5

Una formulación liofilizada

Una solución que comprende una cantidad de dosificación unitaria de una composición de esta invención que comprende una proteína de fusión como la SEQ ID NO: 8 disuelta en un medio acuoso isotónico farmacéuticamente aceptable que comprende una sal amortiguadora farmacéuticamente aceptable y/o un carbohidrato farmacéuticamente aceptable fácilmente hidrosoluble (preferentemente un azúcar no reductor farmacéuticamente aceptable o una ciclodextrina) se filtra de forma estéril (por ejemplo, con un filtro de 0,2 micras) en condiciones asépticas; el filtrado se coloca en un vial esterilizado; el filtrado se congela; la solución acuosa congelada se liofiliza de forma aséptica a presión reducida en una liofilizador farmacéuticamente aceptable para dejar una matriz seca que comprende la proteína de fusión en el vial; el vial se devuelve a la presión atmosférica en una atmósfera inerte y estéril, y el vial se sella con un tapón estéril (por ejemplo, junto con una tapa de rosca). El vial sellado se etiqueta con el contenido y la cantidad de dosificación, y se coloca en un kit junto con un segundo vial, estéril y sellado, que contiene agua esterilizada para inyectar en una cantidad que permita transferirla al primer vial, que contiene la proteína de fusión liofilizada, para reconstituir la matriz de la proteína de fusión hasta obtener una solución en forma de dosificación unitaria. En otra realización, la proteína de fusión se puede disolver en un volumen inicial de un medio acuoso que comprende un medio acuoso hipertónico, la solución estéril filtrada, y el filtrado traspasado a un vial y liofilizado para formar una matriz seca. La matriz seca se puede disolver o reconstituir en un volumen de agua estéril mayor que el original, siendo el volumen mayor suficiente para formar una solución isotónica para inyección, como una inyección y/o infusión intravenosa. De forma alternativa, se puede usar una solución hipertónica para administrar mediante infusión a una bolsa de goteo que contiene un volumen mayor de medio acuoso isotónico de forma que la solución hipertónica se diluya sustancialmente. De forma opcional, un vial que contiene un volumen de agua estéril en una cantidad adecuada para reconstituir la matriz hasta una forma de dosificación unitaria se distribuye como kit con la proteína liofilizada. Preferentemente, la composición reconstituida comprende una solución isotónica. La proteína de fusión se puede usar para la administración y/o la infusión intravenosa y/o la inyección directa en el tejido del ojo o del tejido proximal al ojo con esta formulación.

Ejemplo 6

Procedimiento general para determinar la capacidad de neuroprotección relativa en la retina de una proteína de fusión de esta invención

En el aparato visual, las células ganglionares retinianas mueren tras una lesión del nervio óptico. La gravedad (es decir, el número de células que mueren) y la velocidad de muerte celular dependen de la proximidad de la lesión axonal al ojo. Para estudiar los efectos de la inactivación de Rho sobre la supervivencia de las células ganglionares retinianas, se usan dos derivados que penetran la membrana celular (es decir, son permeables a las membranas celulares) de la transferasa C3 (SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 43). De forma similar, se pueden usar las versiones truncadas de la SEQ ID NO: 10 (Figura 3) o las variantes BA pegiladas (Figuras 4A y 4B).

Se anestesia a las ratas con isoflurano al 2-3%. Las células ganglionares retinianas se marcan de forma retrógrada desde el tubérculo cuadrigémino superior con Fluorogold (Fluorochrome Inc, Denver, CO). Se expone el mesencéfalo derecho de una rata haciendo una pequeña abertura circular en el hueso, seguido de aspiración del córtex y eliminación de la piamadre superpuesta a los tubérculos superiores. Un trozo pequeño de Gelfoam empapado en un medio acuoso que comprende fluorgold al 2% y DMSO al 10% se coloca en la superficie del tubérculo cuadrigémino superior derecho. Siete días después de aplicar el Fluorogold, el nervio óptico izquierdo se corta transversalmente a una distancia de 1 mm a partir del ojo. Se accede al nervio óptico dentro de la órbita haciendo una incisión parasagital en la piel que cubre el borde superior del hueso de la órbita, teniendo cuidado de dejar la vena supraorbitaria intacta. Después de la resección parcial o reflexión de la glándula lagrimal, los músculos extraoculares superiores se extienden con un pequeño separador o una sutura de seda 6-0. El nervio óptico queda expuesto y la vaina circundante se corta longitudinalmente para evitar cortar vasos sanguíneos al exponer el nervio óptico. Se corta la piamadre del nervio óptico, se mueve el nervio óptico con suavidad para desplazarlo y, después, se deslizan las tijeras de forma tangencial bajo el nervio óptico para hacer un corte limpio a una distancia de 1 mm desde el ojo. En los animales utilizados para estudios sobre niveles de citocinas, se efectúa una lesión por microplastamiento. En estos estudios la pia se deja intacta; el nervio óptico se levanta de la vaina y se aplasta a 1 mm de distancia del globo por constricción con una sutura 10,0 mantenida durante 60 segundos.

Los animales anestesiados reciben inyecciones únicas de SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 43 en un tampón acuoso después de cortar el nervio óptico, o 4 días después. Las inyecciones intraoculares se realizan con una jeringa de 10 µl unida a una micropipeta de vidrio. Se hace un agujero en la retina nasal superior aproximadamente a una distancia de 4 mm del disco óptico con una aguja de 30 g antes de introducir la pipeta de vidrio para inyectar 5 µl de proteína de fusión (por ejemplo, SEQ ID NO: 43) o un tampón de control. La aguja se retira lentamente para permitir que la solución se difunda en los espacios vítreos. A continuación, la esclerótica se sella con adhesivo tisular (Indermil, Tyco Healthcare, Mansfield, EE. UU.). Se tiene cuidado para no dañar el cristalino durante la inyección a fin de evitar la formación de cataratas y el consiguiente aumento de la supervivencia de las células ganglionares retinianas. Se cierra la piel y se evalúa la integridad de la vasculatura retiniana mediante un examen oftalmoscópico postoperatorio. Las ratas con vasculatura afectada o las ratas que desarrollen cataratas no se incluyen en los resultados experimentales.

Las retinas marcadas con Fluorogold se preparan para el recuento 7 o 14 días después de la axotomía. Se perfunde a los animales con paraformaldehído (PFA) al 4%, y los ojos se extraen y se fijan posteriormente en PFA al 4% tras puncionar la córnea. A continuación, los ojos se aclaran con solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 1 hora. Se realizan incisiones en cada ojo, en los cuatro cuadrantes retinianos, y las retinas se extraen y se montan planas en portas de vidrio. El exceso de vítreo se elimina con bastoncillos de papel. Se colocan cubres en los portas, sobre las retinas preparadas, y las células ganglionares retinianas se examinan con un filtro ultravioleta (365/420). Las células ganglionares retinianas marcadas se cuentan en el microscopio con un aumento de 20X y la ayuda de una inserción rectangular en un campo ocular de visión del microscopio para ofrecer una superficie de campo rectangular de 0,375 mm x 0,1125 mm. Cuatro áreas rectangulares estándar de retina se cuentan a una distancia de 1 mm y 2 mm del disco. El número de células marcadas en cada área se divide por 0,04125 (área rectangular contada en mm²), y la densidad promedio de cada retina se calcula como células ganglionares retinianas por mm². Los recuentos de células los efectúa el mismo investigador, que no debe conocer el tratamiento. Tras la axotomía, Fluorogold también está presente en las células endoteliales y en los microglíocitos. Estas células, que se identifican por la morfología, quedan excluidas de los recuentos de células ganglionares retinianas. Se efectúan estadísticas con Excel y los resultados de los animales tratados se comparan con los resultados de los controles mediante la prueba de la t.

Una única inyección de SEQ ID NO: 8 purificada mediante FPLC tiene un efecto neuroprotector y salva todas las células ganglionares retinianas a los 7 días de la axotomía; una única inyección de SEQ ID NO: 43 purificada mediante FPLC tiene un efecto neuroprotector y salva todas las células ganglionares retinianas a los 7 días de la axotomía. Para determinar si la supervivencia de las células ganglionares retinianas tras la inyección de SEQ ID NO: 43 aumenta debido a otras propiedades de SEQ ID NO: 43 distintas de su actividad de ribosilación de Rho, se analiza el efecto de la SEQ ID NO: 6 sobre la supervivencia de las células ganglionares retinianas. La proteína mutante, SEQ ID NO: 6, se purifica mediante FPLC, y se inyecta 1 µg inmediatamente después de la axotomía de la forma utilizada para la SEQ ID NO: 43. La supervivencia celular tras administrar SEQ ID NO: 6 no es significativamente diferente de la supervivencia celular tras la axotomía solamente, y sí es significativamente diferente del efecto de SEQ ID NO: 43. Por lo tanto, la actividad neuroprotectora de SEQ ID NO: 43 se debe a la presencia de ADP-ribosil transferasa en la proteína de fusión y, en consecuencia, a la inactivación de Rho, y no por otros efectos (no se muestran los datos).

Se puede producir isquemia en la retina de la rata Lewis albina aumentando la presión intraocular mediante inyección intraocular de solución salina (Unoki y LaVail, Invest Ophthalmol Vis. Sci. 35:907, 1994). La supervivencia de las células ganglionares retinianas se puede evaluar contando las células ganglionares retinianas marcadas de forma retrógrada con Fluorogold en piezas retinianas completas, tal como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 7

Neuroprotección de células ganglionares retinianas en un modelo de glaucoma

La eficacia de la inactivación de Rho como tratamiento neuroprotector se puede probar en un modelo preclínico de glaucoma. Por ejemplo, se puede usar un modelo animal de hipertensión ocular, que comparte muchas similitudes con el glaucoma humano, como el modelo de hipertensión ocular en ratas Norway Brown desarrolladas por el Dr. J. Morrison y colaboradores en el Casey Eye Institute (Portland, Oregón) (Morrison *et al.*, 1997, Exp. Eye Res., 64: 85-96). La presión intraocular es una medida de la presión del líquido que se encuentra dentro del ojo. Este líquido, denominado humor acuoso, circula y se drena por vías de drenaje especializadas. Si el sistema de drenaje no funciona adecuadamente, como en las formas prevalentes de glaucoma, aumenta la presión dentro del ojo. El modelo de Morrison requiere la inyección de solución salina hipertónica en una vena episcleral, lo que provoca el bloqueo de las vías de drenaje del humor acuoso. Este procedimiento da lugar a un aumento gradual de la presión en el ojo y la muerte progresiva de las células ganglionares retinianas. Es de importancia que la atrofia retiniana interior, la degeneración del nervio óptico y la remodelación de la cabeza del nervio óptico que se observan en este modelo sean similares a las observadas en el glaucoma humano. Por este motivo, el modelo de Morrison se considera el mejor modelo preclínico de glaucoma con roedores (Morrison *et al.*, 2005, Progress in Retinal and Eye Research, 217-240).

El modelo de Morrison se puede usar para determinar si las variantes C3 de la invención ofrecen protección a las células ganglionares retinianas en el glaucoma. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención o la solución salina (control) se pueden inyectar en la cámara vítrea del ojo sometido a cirugía de hipertensión ocular. Se puede contar el número de células ganglionares retinianas que han sobrevivido tras la inyección a fin de determinar si el polipéptido ofrece una neuroprotección significativa a las células ganglionares retinianas en el modelo de glaucoma en ratas con hipertensión ocular.

Ejemplo 8

Procedimiento para medir la eficacia a la hora de prevenir la muerte de células fotorreceptoras en los modelos de ratas de degeneración fotorreceptora

Los animales se manipularon de conformidad con las directrices del Consejo Canadiense de Protección de los Animales. Los animales fueron alojados con un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad y acceso libre a agua y comida. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho y hembra exentas de patógenos (8 semanas). El día de la cirugía, los animales fueron asignados al azar a sus grupos respectivos mientras se enmascaraban los grupos de tratamiento para el equipo quirúrgico. Los tratamientos postoperatorios incluyeron solución salina al 0,9% por vía subcutánea para rehidratación, Buprenex para aliviar el dolor y Baytril para prevenir las infecciones. Las inspecciones diarias consistieron en evaluar el funcionamiento de la vejiga y la micción, el examen del lugar en que se realizó la laminectomía para detectar signos de infección y la presencia de autofagia. Ninguno de los animales asignados inicialmente a los estudios quedó excluido de los análisis.

Se inyectó a las ratas (Sprague-Dawley) en la cámara posterior del ojo derecho 5 µl de solución salina o el ojo izquierdo con 5 µl (1 µg) de SEQ ID NO: 10 utilizando una jeringa Hamilton/capilar. Tras las inyecciones, se colocó a las ratas en jaulas y fueron expuestas a luz constante (~ 2000 lux) durante 1 o 2 días. Se aplicó atropina una vez al día o según fuera necesario durante la exposición a la luz. A continuación, las ratas fueron devueltas a las instalaciones habituales y mantenidas durante otros 5 o 7 días. Se extrajeron los ojos y se diseccionaron del tejido conjuntivo, se fijaron en Bouin durante 24 horas y se incluyeron en parafina para seccionar. Los fotorreceptores se visualizaron mediante tinción H&E (Figura 6). El efector destructor de los fotorreceptores de los tratamientos lumínicos es evidente en el panel medio como un adelgazamiento sustancial de la capa receptora(*). El correspondiente efecto de rescate de la SEQ ID NO: 10 es evidente debido al mayor número de células fotorreceptoras, con la consiguiente capa más gruesa, en animales tratados con 1 µg de SEQ ID NO: 10 (panel derecho).

El rescate de las células fotorreceptoras se puede demostrar en ratas del Real Colegio de Cirujanos (RCS, por sus siglas en inglés), que han heredado degeneración retiniana (Faktorovich *et al.*, Nature 347:83, 1990). Las inyecciones intraoculares de SEQ ID NO: 8 en tampón acuoso se realizan con una jeringa de 10 µl unida a una micropipeta de vidrio. Se hace un agujero en la retina nasal superior aproximadamente a una distancia de 4 mm del disco óptico con una aguja de 30 g antes de introducir la pipeta de vidrio para inyectar 5 µl de 1 µg de SEQ ID NO: 8 o un amortiguador de control. La aguja se retira lentamente para permitir que la solución se difunda en los espacios vítreos, y la esclerótica se sella con adhesivo tisular. Se tiene cuidado para no dañar el cristalino durante la inyección, ya que esto puede dar lugar a la formación de cataratas y al consiguiente aumento de la supervivencia de las células ganglionares retinianas. Se cierra la piel y se evalúa la integridad de la vasculatura retiniana mediante un examen oftalmoscópico postoperatorio. Las ratas con vasculatura afectada o las ratas que desarrollen cataratas no se incluyen en los resultados experimentales.

Un análisis histológico útil para evaluar la supervivencia de los fotorreceptores en ratas RCS que han recibido o no han recibido tratamiento terapéutico comprende las etapas de perfusión vascular de un animal anestesiado, incluir el ojo del animal en parafina y teñir secciones con un grosor de 6 micras con hemotoxilina y eosina o azul de toluidina. En los ojos de ratas RCS que no han recibido tratamiento, a los 53 días tras el nacimiento (P53), la capa nuclear externa, que contiene las células fotorreceptoras, disminuye de grosor hasta solo unas pocas filas de células (aproximadamente el 20% del grosor que se encuentra en ratas normales de la misma edad). Una dosis

terapéuticamente eficaz de SQ ID NO: 8, administrada mediante administración intravítrea (por ejemplo, una única inyección que comprende un microgramo de proteína) puede recuperar el grosor de la capa nuclear externa y, por tanto, rescatar las células fotorreceptoras.

De forma alternativa, el rescate de las células fotorreceptoras se puede demostrar con ratas Sprague-Dawley de 2 a 3 meses de edad en un modelo de exposición a luz constante (115-200 lúmenes por pie cuadrado) durante 1 semana tras realizar los procedimientos de LaVail *et al.* (1992, PNAS USA 89: 11249). Se puede inyectar una solución amortiguadora acuosa de SEQ ID NO: 8 (1 µg de proteína) en el espacio subretiniano o en el humor vítreo 48 horas antes de comenzar con la iluminación continua. El examen histológico y el análisis de las retinas tras un período fijo de recuperación (generalmente, 10 días) permite evaluar la muerte o el daño, así como el rescate o la supervivencia de las células fotorreceptoras.

El desprendimiento de retina también conlleva la muerte de las células fotorreceptoras. El modelo animal que describe Erickson *et al.* (1992, J Struct. Biol., 108: 148) puede demostrar el efecto de la administración de SEQ ID NO: 8 para potenciar la supervivencia de las células retinianas *in vitro* en relación con la administración del amortiguador de control, una proteína mutada para eliminar la actividad de ADP-ribosilación, y de controles sin tratamiento.

Ejemplo 9

Procedimiento para medir la eficacia de una proteína de fusión de la invención con el objetivo de prevenir la muerte de células fotorreceptoras en modelos de ratones transgénicos de degeneración fotorreceptora

Puesto que se ha demostrado que la SEQ ID NO: 10 tiene un efecto neuroprotector respecto a las células ganglionares retinianas, sus propiedades neuroprotectoras fueron estudiadas con poblaciones de neuronas retinianas usando un modelo de degeneración retiniana genética en ratón (*rd*). Estos modelos, que albergan mutaciones genéticas similares a las que se pueden encontrar en pacientes con retinitis pigmentaria, muestran una pérdida progresiva de células fotorreceptoras. Aunque estos modelos *rd* no representan de forma adecuada la naturaleza multifactorial de los cambios que se observan en la degeneración macular humana (por ejemplo, la acumulación de drusas), estos modelos animales permiten conocer la supervivencia fotorreceptora tras el tratamiento. Los ratones homocigóticos para la mutación *Rd1* presentan una degeneración retiniana de inicio temprano debida a una mutación del gen *Pde6b* que codifica la subunidad beta de la fosfodiesterasa-cGMP expresada en fotorreceptores retinianos. Esta mutación produce la acumulación del segundo mensajero cGMP en el cuerpo celular, que desencadena la muerte celular por apoptosis. En ratones *Rd1*, la degeneración comienza los días (P) 7-9 siguientes al nacimiento, con la desaparición completa de la capa nuclear externa en menos de 4 semanas (Chang *et al.*, 2002).

A cuatro ratones por grupo se les inyectó dos veces en el ojo derecho dosis diferentes de SEQ ID NO: 10 (de 0,001 a 0,1 µg) (el día 7 tras el nacimiento y el día 14 tras el nacimiento), y el día 21 se extrajeron los tejidos. En todos los ojos izquierdos se inyectó solución salina o BA-304 (la secuencia nucleotídica se corresponde con la de SEQ ID NO: 80; la secuencia de aminoácidos se corresponde con la de SEQ ID NO: 81) (mutante enzimáticamente inactivo) y se utilizaron como controles quirúrgicos.

Los resultados de la Figura 7 representan la densidad celular (recuentos medios superiores a una longitud de 100 micras) de tres regiones de las retinas murinas (retinas central, media y periférica) en el grupo que recibió 0,01 µg 21 días después de nacer. Tal como se esperaba, en los ratones *Rd1* sacrificados 3 semanas después del nacimiento quedaban muy pocos fotorreceptores. La capa nuclear externa (CNE) se redujo a 1 capa, y en la mayoría de los animales habían desaparecido casi por completo los segmentos exteriores. La degeneración era muy uniforme en toda la retina con alrededor de 17 núcleos fotorreceptores por longitud de 100 micras en la CNE en comparación con alrededor de 200 en un ratón normal. El tratamiento con 0,01 µg de SEQ ID NO: 10 antes de que comenzara la apoptosis en ratones *Rd1* permitió salvar los fotorreceptores de todas las regiones de la retina. El efecto neuroprotector fue más drástico en la retina periférica, con un aumento de alrededor del 50% en la supervivencia de los fotorreceptores. No se observó ningún efecto protector para la dosis menor de 0,001 µg y para el mutante enzimáticamente inactivo BA-304 (SEQ ID NO: 81). No se obtuvo ningún beneficio adicional con las dosis de 0,1 µg (no se muestran los resultados).

También se estudió el efecto protector a corto plazo de la SEQ ID NO: 10 en el período de degeneración activa (P13-16). La Figura 8 muestra imágenes representativas de retinas del mismo animal con un grosor mayor de la capa nuclear externa (CNE) en el ojo que recibió una inyección de 0,05 µg de SEQ ID NO: 10.

A fin de correlacionar la supervivencia de los fotorreceptores con el alcance de la apoptosis, también se tiñeron preparaciones de los mismos animales usadas en los recuentos de fotorreceptores (Figura 8) para evaluar el alcance de la apoptosis en la CNE. Se contó el número total de fotorreceptores marcados con TUNEL en longitudes de 100 micras y se mostró en la Figura 9A.

Se observó una reducción significativa del número de células apoptóticas en todas las regiones de las retinas murinas en las que se inyectó SEQ ID NO: 10 (Figura 9B).

Los resultados de los ratones Rd1 son prometedores y muestran neuroprotección de los fotorreceptores asociada a los efectos antiapoptóticos en un modelo animal de degeneración retiniana rápida y grave. El tiempo de evolución de degeneración de la enfermedad es bien conocido, con un máximo de apoptosis en torno a P14. Cuando la SEQ ID NO: 10 se inyectó en este período de apoptosis máxima, el número de fotorreceptores apoptóticos se redujo en

alrededor del 40% en toda la retina. En todos los ratones examinados 3 días después de la inyección, los ojos tratados con SEQ ID NO: 10 siempre presentaron CNE más gruesas, compuestas por más filas de fotorreceptores, en comparación con el ojo de control en el que se inyectó un vehículo (solución salina). La inactivación de Rho en la fase activa de la degeneración ralentizó la muerte celular por apoptosis de los fotorreceptores en este modelo de degeneración retiniana grave.

Los resultados indicados aquí demuestran que SEQ ID NO: 10 presenta una serie de actividades biológicas interesantes. Sus potentes efectos antiangiogénicos, combinados con la inhibición de la apoptosis de fotorreceptores, podría conllevar una prolongación de la visión en pacientes humanos con degeneración macular.

Se pueden usar varios modelos genéticos de ratones con degeneración fotorreceptora (por ejemplo, el mutante rd de la subunidad β de fosfodiesterasa cGMP y el mutante rds de la periferina) con los modos de administración descritos anteriormente, a fin de demostrar los efectos *in vivo* de la supervivencia potenciada de las células fotorreceptoras relacionada con proteínas de fusión (por ejemplo, la SEQ ID NO: 8).

Los ratones con mutación rd y los ratones con mutación rds presentan degeneración retiniana en un plazo de pocas semanas después de nacer. Tras administrar una inyección intravítrea de una proteína de fusión (por ejemplo, la SEQ ID NO: 8) como se ha descrito anteriormente, los tejidos se analizan con los métodos histológicos descritos más arriba.

En los explantes retinianos procedentes de ratones con mutación rd, cultivados en un medio que contiene SEQ ID NO: 8, se puede analizar el grosor de la capa nuclear externa con los métodos que se describen en Caffé *et al.* (1993, Curr. Eye Res., 12: 719). Así pues, se somete a las crías de ratón a enucleación 48 horas después de nacer, y se tratan con proteinasa K. Después del tratamiento enzimático, la retina neural, con el epitelio pigmentario retiniano (EPR) unido, se aísla, se coloca en una placa de cultivo multipocillos y se incuba en 1,2 ml de medio de cultivo (por ejemplo, R16) durante un máximo de 4 semanas a 37 °C con CO₂ al 5%. Se usa tinción inmunocitoquímica para la opsina de secciones fijas (por ejemplo, paraformaldehído al 4%) a fin de evaluar la degeneración y el rescate de las células fotorreceptoras. En los ratones con mutación rd, la capa nuclear externa (células fotorreceptoras) degenera después de 2 a 4 semanas en cultivo. Los medios se pueden complementar con un intervalo de dosis de SEQ ID NO: 8 a fin de provocar un efecto en la función celular retiniana, como el rescate de la capa nuclear externa de la degeneración. Los efectos de supervivencia también se pueden demostrar usando el método TUNEL en secciones de la retina analizadas en los modelos que se han descrito anteriormente.

Ejemplo 10

Procedimiento para determinar la eficacia de una proteína de fusión a fin de prevenir la neovascularización de la retina

Para confirmar el efecto angiostático *in vitro* que se observó en ensayos de cultivos celulares, se evaluó la SEQ ID NO: 10 en distintos modelos de animales de angiogénesis ocular. El primer modelo que se estudió fue la angiogénesis fisiológica retiniana en ratas recién nacidas. La retina de las ratas no presenta vascularidad al nacer, lo que supone una oportunidad a la hora de evaluar el potencial angiostático del fármaco.

La SEQ ID NO: 10 se inyectó en un ojo, mientras que en el ojo contralateral de la misma rata se inyectó BA-304 (SEQ ID NO: 81), una versión inactiva de la proteína, en el día cuatro después del nacimiento. La SEQ ID NO: 10 inhibió de forma significativa la angiogénesis fisiológica en la retina de las crías de rata después de administrar una inyección intravítrea de 0,1 μ g si se compara con el ojo en que se inyectó la proteína inactiva (Figura 10). Las dosis inferiores no provocaron una disminución de la extensión de la vascularización, ni tampoco cambió la cubierta de pericitos de los vasos retinianos con el tratamiento de SEQ ID NO: 10 (no se muestran los resultados).

A fin de estudiar el efecto de la inactivación de Rho en la angiogénesis patológica, la neovascularización corneal fue inducida mediante quemaduras por sustancias alcalinas en ratones C57. A los animales se les dosificó por vía tópica 3 veces al día, desde el día 3 hasta el día 8 después de la lesión, o bien con solución salina, BA-304 (SEQ ID NO: 81) o SEQ ID NO: 10. En todos los ratones lesionados, se observó una invasión de nuevos vasos sanguíneos en la córnea normalmente avascular (Figura 11). Sin embargo, la aplicación repetida de SEQ ID NO: 10 a 2 μ g/ μ l redujo significativamente el área vascularizada de la córnea. La proteína inactiva BA-304 (SEQ ID NO: 81) no tuvo ningún efecto en el crecimiento vascular.

La neovascularización coroidea es una de las causas principales de pérdida de visión central en pacientes con DMAE. En respuesta a un aumento de los factores angiogénicos producidos localmente, como el VEGF, en una zona lesionada, los vasos se extienden entre la membrana de Bruch y el EPR, así como en el espacio subretiniano. Para completar la prueba preliminar de eficacia para el uso de SEQ ID NO: 10 como inhibidor de la angiogénesis en los ojos, se usó una ruptura inducida por láser de la membrana de Bruch. Este método ofrece un modelo muy fiable para la neovascularización que se origina en la coroides. El láser se aplicó en ambos ojos de cuatro ratones y, 3 días

más tarde, se inyectó SEQ ID NO: 10 en el ojo derecho, mientras que el izquierdo recibía la misma dosis de proteína inactiva. Se obtuvieron imágenes de las secciones que contenían la respuesta neovascular máxima en cada aplicación de láser, y la zona de vascularización se midió 10 días después de la lesión.

5 En la Figura 12 se observa que la SEQ ID NO: 10 inhibía significativamente la expansión de vasos subretinianos inducida por la fotocoagulación láser con las dos dosis analizadas (1 y 0,2 µg), en comparación con las inyecciones de BA-304 (SEQ ID NO: 81) en los mismos animales. En la Figura 12 se muestran las imágenes representativas de las lesiones en ambos ojos del mismo animal tratados con 1 µg.

10 Así pues, los resultados de los estudios *in vitro* en células endoteliales quedaron confirmados en modelos animales, puesto que la SEQ ID NO: 10 inhibió la angiogénesis en todos los modelos (ratas y ratones) usados en estudios preclínicos. La inhibición de neovascularización subretiniana indica claramente que la SEQ ID NO: 10 penetra en la retina para llegar al lugar de expansión de los vasos coroideos. Además, demuestra que existe un potente efecto continuo en la formación de vasos patológicos tras una única dosis.

15 La angiogénesis retiniana no controlada puede contribuir a la patología de degeneración macular húmeda. La producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) aumenta por hipoxia en la retina, lo que induce la neovascularización de la retina.

20 Un modelo murino de neovascularización retiniana inducida por isquemia incluye ratones C57BL/6J recién nacidos a los que se expone a O₂ al 75% desde el día (P) 7 al P12 después de nacer, junto con las madres lactantes, seguido de una vuelta al oxígeno ambiental. Para llevar esto a cabo, se pesa a los ratones y el día P7 se colocan en una caja de plexiglás que sirve de cámara de oxígeno, junto con comida y agua suficiente para 5 días, hasta el P12. Durante los 5 días se mantiene un caudal de oxígeno de 1,5 l/min en la caja. El caudal se comprueba dos veces al día con un analizador de oxígeno Beckman (modelo D2, Irvine CA). La cámara no se abre durante los 5 días de hiperoxia. El día P12 se administra una inyección intraocular de una proteína de fusión (por ejemplo, la SEQ ID NO: 8), y se traslada a los ratones al oxígeno ambiental, lo que provoca hipoxia. El día P17 se sacrifica a los animales mediante perfusión cardíaca con solución salina seguida de paraformaldehído (PF) al 4%, y los ojos se extraen y fijan en PF durante la noche. A continuación, los ojos se aclaran, se les pasa por una serie de alcoholes con distintas graduaciones y se cortan en secciones radiales de 6 µm de grosor. Las secciones que atraviesan la cabeza del nervio óptico se tiñen con ácido peryódico/reactivo de Schiff y hematoxilina. Las secciones con una distancia de 30 µm entre sí se evalúan durante un recorrido de 300 µm a través de la retina. En cada sección se cuentan todos los núcleos vasculares retinianos anteriores a la membrana interior limitante. Se determina la media de 10 secciones contadas para conocer el número promedio de núcleos neovasculares por sección y ojo. No se observa ningún núcleo celular vascular anterior a la membrana limitante en animales normales, que no han sido manipulados. La administración de una proteína de fusión reduce significativamente el número de núcleos vasculares retinianos en relación con el número observado en ausencia de proteína de fusión.

Ejemplo 11

35 La inyección intravítrea de SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 43 estimula la regeneración del nervio óptico

Para evaluar si el tratamiento de los cuerpos celulares de las células ganglionares retinianas fomenta la regeneración *in vivo*, se pueden inyectar antagonistas de Rho en el vítreo inmediatamente después de microlesionar el nervio óptico 1 mm por detrás del disco óptico. En un primer experimento, se usa la SEQ ID NO: 4 ($n = 4$). Los animales de control reciben una inyección de PBS ($n = 5$) o se someten a una única microlesión ($n = 5$). La regeneración axónica del nervio óptico se evalúa a los 14 días, después de administrar una inyección del marcador anterógrado CTβ.

45 Dos semanas después de la microlesión, no se detecta prácticamente ningún axón con CTβ en los animales del control (Figura 13A), mientras que se observa un gran número de axones detrás del lugar de la lesión en ratas tratadas con la SEQ ID NO: 44 (Figura 13B) y la SEQ ID NO: 43 (Figura 13C). El modelo de lesión por microaplastamiento proporciona un lugar de lesión claramente definido con poca o ninguna cavitación, que se identifica mediante microscopia de campo oscuro y/o tinción con CTβ. A continuación, se cuenta el número de axones presentes a varias distancias detrás del lugar de lesión. Los animales tratados con SEQ ID NO: 44 (Figura 13D) o SEQ ID NO: 43 (Figura 13E) presentan un número significativamente mayor de axones regenerándose por sección que los controles, a distancias de 50, 100 y 250 µm del lugar de lesión. La regeneración en animales a los que se ha inyectado SEQ ID NO: 43 es similar a la de los animales tratados con SEQ ID NO: 44, pero se observa un número mayor de axones más largos en algunos animales tratados con la SEQ ID NO: 43, mucho más purificada (Figura 13C). La SEQ ID NO: 44 también se usa para evaluar la regeneración 4 semanas después de realizar la microlesión. Los resultados indican que la aplicación de antagonistas de Rho, las SEQ ID NO: 44/43 a los cuerpos celulares de las células ganglionares retinianas puede fomentar la regeneración del nervio óptico tras una microlesión. Para examinar si el tratamiento provoca un efecto sostenido sobre el crecimiento axónico, se puede comparar la longitud promedio del axón más largo de los nervios ópticos tratados 2 y 4 semanas después de la axotomía. No se detectó ninguna diferencia significativa en la longitud de los axones al cabo de 4 semanas y de 2 semanas (no se muestran los datos), lo que indica que un único tratamiento no conlleva un crecimiento sostenido a largo plazo. Para examinar la ubicación de la SEQ ID NO: 43 tras administrar la inyección en el ojo, se inyectaron

5 µg de SEQ ID NO: 43 en el ojo tras realizar la microlesión del nervio óptico. Los homogeneizados de nervio óptico y retina se preparan para inmunoelectrotransferencia (western blot) 3 días después y se analizan con un anticuerpo anti-C3. La banda específica de la SEQ ID NO: 43 se compara con la proteína SEQ ID NO: 43 recombinante que se ejecuta en una banda independiente (no se muestran los datos).

5 Ejemplo 12

El tratamiento diferido con SEQ ID NO: 43 estimula la regeneración en la cicatriz de la lesión

Para determinar si un tratamiento diferido con SEQ ID NO: 43 estimula la regeneración de células ganglionares retinianas en la cicatriz de la lesión, la SEQ ID NO: 43 se puede inyectar ($n = 8$) en el vítreo 4 días tras la microlesión del nervio óptico, y la regeneración se examina 10 días después. Los animales del control recibieron inyecciones de PBS ($n = 5$). Se puede observar un gran número de axones con CTβ detrás del lugar de lesión en animales tratados, mientras que se observan muy pocos en los controles que han recibido PBS (Figura 14A). Los animales tratados con SEQ ID NO: 43 presentan un número significativamente mayor de axones regenerándose por sección que los controles, a distancias de 50, 100, 250 y 500 µm del lugar de lesión (Figura 14B). Al comparar el número de axones por sección, se observan cantidades similares de axones regenerándose en animales tratados de forma inmediata (Figura 13D) o diferida (Figura 14B) con una inyección de SEQ ID NO: 43. El axón más largo promedio es significativamente más largo en los animales que han recibido o bien un tratamiento inmediato, o bien un tratamiento diferido con la SEQ ID NO: 43, que en los controles que han recibido PBS (Figura 14C). Estos resultados demuestran la existencia de un margen terapéutico para el tratamiento con antagonistas de Rho tras una lesión del nervio óptico, e indican que la inactivación de Rho permite que los axones de las células ganglionares retinianas se extiendan por la cicatriz de la lesión.

Ejemplo 13

La inyección intravítrea de SEQ ID NO: 43 aumenta la supervivencia de las células ganglionares retinianas

Tras una lesión en el nervio óptico, aproximadamente la mitad de las células ganglionares retinianas mueren por apoptosis al cabo de 1 semana. Para determinar si una única inyección intravítrea de SEQ ID NO: 43 protege a las células ganglionares retinianas de la muerte celular, la supervivencia de las células ganglionares retinianas se puede examinar en piezas retinianas completas. Las células ganglionares retinianas se marcan de forma retrógrada con Fluorogold 1 semana antes de la axotomía del nervio óptico, y las células ganglionares retinianas que han sobrevivido se cuentan 7 o 14 días después en animales tratados con SEQ ID NO: 43 ($n = 7$ el día 7; $n = 5$ el día 14) o con un vehículo de control ($n = 3$ el día 7; $n = 4$ el día 14). El tratamiento con SEQ ID NO: 43 rescata por completo las células ganglionares retinianas 1 semana después de la axotomía, en comparación con el 40% de supervivencia en animales a los que se ha inyectado el vehículo (Figura 15). La supervivencia de las células ganglionares retinianas tras una única inyección no es sostenida, ya que las cantidades de células ganglionares retinianas disminuyen después de 1 semana. Sin embargo, a los 14 días, la supervivencia celular aún es significativamente mejor con el tratamiento de SEQ ID NO: 43, con más de dos veces el número de células ganglionares retinianas en animales tratados que en los controles.

Ejemplo 14

La administración repetida de un antagonista de Rho aumenta la supervivencia de las células ganglionares retinianas

Se pueden cuantificar las densidades de células ganglionares retinianas al cabo de 2 semanas tras la axotomía en ojos a los que se administró 1, 2 o 3 inyecciones de 1 µg de C3-11. Se pueden aplicar los siguientes regímenes terapéuticos con la SEQ ID NO: 43: (i) una única inyección en el momento en que se realiza la lesión en el nervio óptico (día 0); (ii) 2 inyecciones (día 0 y día 5 tras la lesión en el nervio), y (iii) 3 inyecciones (días 0, 5 y 10). El número de punciones en la esclerótica se limita a un máximo de 2 eligiendo el mismo lugar de inyección para todas las inyecciones realizadas después del día 0. Esto es importante, ya que las lesiones retinianas, como los cortes o las punciones en la retina, pueden aumentar el nivel de ARNm para el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y el receptor 1 del FGF (FGFR-1) en roedores; se ha observado que tanto el CNTF como el bFGF fomentan la supervivencia o la regeneración de las células ganglionares retinianas tras una lesión en el nervio óptico.

Ejemplo 15

La administración repetida de un antagonista de Rho aumenta la regeneración de las células ganglionares retinianas

Para determinar si la administración repetida de inyecciones del inhibidor de Rho fomenta aun más la regeneración axónica, se ha establecido un protocolo experimental en el que se administran inyecciones múltiples de SEQ ID NO: 43 (1 µg) durante un período de 2 semanas. La microlesión del nervio óptico se efectúa el día 0; los grupos de tratamiento son: (i) 3 inyecciones (días 0, 5 y 10 tras la lesión del nervio); (ii) 2 inyecciones tardías (días 4 y 10), y (iii) 2 inyecciones tempranas (días 0 y 5). El diseño del protocolo de 2 inyecciones se basa en un calendario de administraciones tempranas y tardías, ya que se ha observado con anterioridad que el alcance de la regeneración es

similar cuando se administra una única inyección el día 0 que cuando se administra el día 4 (Bertrand *et al.*, 2005, J Neurosci, 25: 1113-1121).

Ejemplo 16

Actividad de las variantes BA

- 5 Se evaluó la actividad de la GH en las variantes pegiladas tal como se ha descrito anteriormente. Se llevó a cabo una evaluación semicuantitativa de la capacidad de ribosilación del ADP de Rho de las variantes PEGiladas de la SEQ ID NO: 10 mediante células PC-12 en cultivo (Tabla 8). A nivel molecular, el tratamiento con la exoenzima C3 de células *in vitro* da lugar a la ribosilación del ADP de RhoA a 41Asn, lo que conlleva una inactivación irreversible.
- 10 Tal como se ha indicado en la Tabla 3, existe una correlación entre la actividad de la GH de la variante C3 y su capacidad para fomentar la neuritogénesis de las células NG108. Esta correlación se confirmó mediante la C3 inactivada térmicamente, que había perdido su capacidad de ADP-ribosilación y de GH y, consecuentemente, no había logrado fomentar la neuritogénesis. Se han observado hallazgos similares *in vivo*, en los que una variante mutante de C3 a la que se le había extraído la capacidad tanto de ADP-ribosilación como de GH fue incapaz de ofrecer neuroprotección o neuroregeneración tras una lesión en el nervio óptico.
- 15 Para evaluar la ADP-ribosilación, se puede obtener ventaja del hecho de que el grupo ADP-ribosa enlazado de forma covalente aumenta el peso molecular aparente de las Rho GTPasas en SDS-PAGE, y se puede observar fácilmente en inmunoelectrotransferencias (western blots) usando anticuerpos anti-Rho. El cambio en el peso molecular aparente de la Rho GTPasa confirma la adición esperada de un grupo ADP-ribosa a las moléculas de Rho. Todas las variantes de PEG-SEQ ID NO: 10 mostraron una banda de peso molecular alto de RhoA ADP-ribosilado, lo que indica que conservaron su capacidad inherente de ADP-ribosilación junto con la capacidad de
- 20 penetrar en las células PC-12

Tabla 8

Actividad de la GH en las variantes PEGiladas

Variante PEG-SEQ ID NO: 10	Actividad específica de la GH, U	ADP-ribosilación
SEQ ID NO: 10	31,8	+
BA-220	26,9	+
BA-225	25,9	+
BA-230	27,5	+
BA-231	27,2	+
BA-235	30,4	+
BA-236	22,5	+/-
BA-240	28,2	+

25

Ejemplo 17

Aplicaciones *in vivo* de las variantes PEGiladas de la SEQ ID NO: 10

- La SEQ ID NO: 10 proporciona neuroprotección de las células retinianas en varios modelos animales de glaucoma y degeneración macular asociada a la edad (DMAE). En relación con la Figura 18, los estudios de farmacocinética ocular realizados con ratas Sprague-Dawley demuestran que la SEQ ID NO: 10 inyectada intraocularmente se distribuyó rápidamente en el tejido retiniano con concentraciones máximas alcanzadas en un plazo de 1 hora tras la administración. A las 24 horas, la proteína ya casi no se podía detectar en la retina. A fin de desarrollar tratamientos viables con inyecciones intraoculares para enfermedades que avanzan lentamente a lo largo de los años, será necesario disponer de formulaciones de liberación sostenida o duradera. Un posible medio para lograr esto consistiría en prolongar el tiempo de permanencia biológica de las proteínas inyectadas mediante PEGilación. El caso de Macugen®, un aptámero terapéutico PEGilado que ha sido comercializado recientemente para la DMAE húmeda, demuestra la utilidad de esta estrategia. Teniendo esto en mente, las formas PEGiladas de la SEQ ID NO:
- 30
- 35

10 se prueban en estudios de farmacocinética ocular con ratas para evaluar si las modificaciones darían lugar a tiempos más largos de permanencia en la retina.

En el primer conjunto de experimentos en los que se evalúan las variantes pegiladas de la SEQ ID NO: 10, las retinas se extraen 24 horas después de administrar una inyección intraocular (en el humor vítreo de la cámara posterior con una jeringa Hamilton de 10 µl) de 10 µg de cada proteína diluida en solución salina isotónica de 5 µl (3 ratas en cada grupo). En los ojos del control se inyectó el vehículo (solución salina isotónica). Se sacrificó a los animales mediante sobredosis anestésica y se perfundieron con solución salina; se extrajeron los ojos y se prepararon para disección. Se homogeneizaron las retinas y se extrajeron las proteínas en un amortiguador de solubilización. Las concentraciones de proteínas de cada extracto se determinaron mediante un ensayo de Lowry modificado. Los niveles tisulares de las variantes se midieron con un ELISA sensible de tipo sándwich. Brevemente, se absorbe un anticuerpo de captura policlonal específico de la SEQ ID NO: 10 y se coloca en una microplaca para crear la fase sólida. Después de bloquear la placa con albúmina sérica bovina (ASB), las muestras de prueba, los estándares y los controles de calidad se incuban junto con el anticuerpo de fase cubierta que captura la variante presente en la solución. Tras la incubación con el mismo anticuerpo policlonal conjugado a biotina, la detección se lleva a cabo con estreptavidina HRP y su solución sustrato (por ejemplo, tetrametilbenzidina (TMB)/peróxido de hidrógeno). El desarrollo del color es proporcional a la cantidad de variante BA unido, y la intensidad del color se cuantifica mediante espectrofotometría.

Las concentraciones de proteína medidas para BA-220 y BA-225 son equivalentes a las de SEQ ID NO: 10, lo que indica perfiles farmacocinéticos similares. Por el contrario, BA-231 muestra un aclaramiento tisular menor y, por tanto, un tiempo de permanencia mayor (figura 16). Este resultado alentador dio lugar a la síntesis de aductos PEG más largos de SEQ ID NO: 10.

Ejemplo 18

Perfil farmacodinámico de la SEQ ID NO: 10 y variantes PEGiladas

Para estudiar el perfil farmacodinámico de la SEQ ID NO: 10 y las variantes PEGiladas respecto a su diana biológica Rho, se visualiza la ADP-ribosilación de la RhoA retiniana usando el ensayo de cambio de gel (descrito anteriormente). Respecto a la Figura 17, los tejidos se recolectan como se ha descrito anteriormente para los ELISA, y las proteínas retinianas se extraen por lisis en un tampón RIPA que contiene inhibidores de proteasas. Los extractos posnucleares se obtienen por centrifugación y se resuelven (muestras de 30 µg) con el SDS-PAGE (Laemmli 1970) en geles de poli(acrilamida) al 12,5%. Todas las variantes estudiadas tienen capacidad para la ADP-ribosilación de la Rho intracelular, lo que indica que conservaron la actividad biológica además de penetrar en los tejidos y las células (Figura 17).

A fin de comparar los perfiles farmacocinéticos entre la proteína precursora y las variantes pegiladas, se inyectaron 10 µg de cada proteína en una solución salina de 5 µl (3 ratas en cada grupo) y se recolectaron los tejidos retinianos, tal como se ha descrito anteriormente, en momentos predeterminados para los ELISA.

Los períodos comparativos de aclaramiento retiniano se analizaron con di-PEG-21 kDa-BA-231. En todos los momentos evaluados, esta variante mostró una mayor retención tisular que la proteína precursora (Figura 18). Por lo tanto, la pegilación aumenta significativamente el tiempo de permanencia total de la SEQ ID NO: 10 en el ojo, al menos hasta las 48 horas.

También se puede estudiar el perfil farmacocinético de otros diversos aductos con un peso molecular mayor tal como se ha descrito anteriormente (variante de 10 µg en una solución salina de 5 µl con 3 ratas en cada grupo). La adición de grupos PEG de 21, 30 y 40 kDa a la SEQ ID NO: 10 aumenta de forma significativa los niveles de tejido retiniano tanto a las 24 horas como a las 48 horas, en comparación con la variante no pegilada (Figura 19).

Las mismas muestras de tejido se pueden analizar con un ensayo de cambio de gel, como el descrito anteriormente, para confirmar la actividad biológica *in vivo* de las variantes. Todas las variantes analizadas tienen capacidad para la ADP-ribosilación de Rho en los dos momentos evaluados (Figura 20).

Ejemplo 19

Capacidad neuroprotectora de BA-231 (variante PEGilada de SEQ ID NO: 10)

Se puede evaluar la posible capacidad neuroprotectora de BA-231 en una cepa murina que sea propensa a sufrir una degeneración retiniana lenta. El ratón *rds* presenta una forma espontánea y heredada de retinitis pigmentaria que guarda relación con las mutaciones humanas dentro del gen fotorreceptor de la periferina-RDS. La degeneración en este modelo comienza tempranamente y avanza despacio; a los 4 meses se conservan alrededor del 50% de los fotorreceptores. Estos ratones representan un modelo *in vivo* bien caracterizado y reproducible para estudiar el potencial neuroprotector de las variantes BA en el modelo de degeneración retiniana.

0,1 µg de SEQ ID NO: 10 o BA-231 se inyectan en el ojo derecho de los ratones (5 en cada grupo) en el momento del destete (3 semanas) y cada 2 o 3 semanas hasta que los ratones tienen 4 meses de edad. En el ojo izquierdo se

administra el mismo programa con inyecciones salinas repetidas para que sirva de control. Tras anestesiarnos con isoflurano, se aplican inyecciones intraoculares con un microinyector a un volumen de dosis de 1 µl. Se sacrifica a los animales mediante sobredosis anestésica, y los ojos se extraen y se incuban en fijador de Bouin antes de meterlos en parafina. Los globos oculares se cortan en secciones seriadas de 5 µm y se tiñen con hematoxilina y eosina. Se fotografian las secciones retinianas realizadas cerca del nervio óptico y se cuentan los fotorreceptores en 6 a 8 imágenes distintas por animal para cada estado. Los recuentos deben ser representativos de cada hemisferio de la retina en un área de 100 x 100 µm de longitud (de 3 a 4 áreas por hemisferio).

Tal como se indica en la tabla que viene a continuación (Tabla 9), la variante PEGilada, en comparación con la SEQ ID NO: 10 no modificada, mejora de forma significativa la supervivencia de los fotorreceptores periféricos en las retinas de los ratones mutantes rds (los resultados se expresan como porcentaje de la supervivencia de los fotorreceptores entre los ojos tratados y los ojos del control de cada ratón). Estos datos respaldan que la variante PEGilada de la SEQ ID NO: 10, con un mayor tiempo de permanencia ocular, ofrece un potencial terapéutico beneficioso de una mayor neuroprotección en un modelo crónico que requiere una dosificación repetida y la exposición continua al fármaco.

Tabla 9

Neuroprotección de fotorreceptores mediante inyecciones intraoculares repetidas en un modelo murino de degeneración retiniana progresiva (rds).

Variante BA	Régimen terapéutico	% del aumento en la supervivencia de los fotorreceptores periféricos frente al ojo inyectado con vehículo
SEQ ID NO: 10	0,01 µg cada 2 semanas	0
	0,01 µg cada 3 semanas	0
BA-231	0,01 µg cada 2 semanas	13% (p < 0,05)
	0,01 µg cada 3 semanas	15% (p < 0,05)

Ejemplo 20

Método general de captación de timidina tritiada como medida de proliferación celular, útil para demostrar que la proteína de fusión de la SEQ ID NO: 43 reduce la proliferación de las células cancerosas.

Antes de comenzar los estudios, se analizaron las líneas celulares para detectar micoplasma y se obtuvieron resultados negativos. Las líneas celulares se obtienen de ATCC. La línea HEC-1B se cultiva en E-MEM complementado con FBS al 10% y HEPES al 1%. La línea Caco-2 se cultiva en E-MEM complementado con FBS al 20%, HEPES al 1%, 1 mM de piruvato sódico y 0,1 mM de aminoácido no esencial. La línea SK-MEL-1 se cultiva en McCoy y se complementa con FBS al 10% y HEPES al 1%.

Volúmenes de 100 µl de cada solución de trabajo 2X de proteína de fusión, controles de vehículo y positivos se colocan por triplicado en placas de 96 pocillos de microvaloración que contienen células (4 x 10³ / 100 µl), siendo el volumen final de 200 µl. Las placas se colocan en el incubador a 37 °C con una humedad del 100% y CO₂ al 5%. Después de aproximadamente 54 horas de incubación, se añade a cada pocillo un volumen de 20 µl de timidina tritiada (3H-timidina) (ICN, Montreal, Canadá) que contiene 1,0 µCi. La ³H-timidina se prepara en RPMI-1640 complementado con FBS al 10%. Los cultivos se incuban en las mismas condiciones que las descritas anteriormente durante otras 18 horas. Al final de la incubación, las células se cosechan con una cosechadora de cultivo celular automatizada (Tomtec), y los recuentos por minuto (cpm) incorporados de ³H-timidina se miden con un contador de centelleo para microplacas (TopCount NXT, Packard).

La demostración de que una proteína de fusión de esta invención, tal como SEQ ID NO: 43, puede influir en múltiples aspectos de los fenotipos de las células malignas se obtiene monitorizando la incorporación de timidina tritiada en las células que están proliferando y creciendo, donde la timidina tritiada añadida al medio de cultivo celular entra en las células y se convierte en parte de la mezcla de trifosfato de timidina allí presente, que cada célula usa para sintetizar el ADN. La timidina tritiada se incorpora de forma covalente a las macromoléculas de ADN en cada una de las células. En las células que no están creciendo o en las células que están muriendo por apoptosis o necrosis, o bien la timidina tritiada no entra en la célula, o bien se libera al medio celular tras la lisis celular. La incorporación de timidina tritiada se puede usar como una medida global del efecto que una proteína de fusión de esta invención, como la SEQ ID NO: 43, tiene sobre el crecimiento celular, la división celular, la estasis celular y la muerte celular. Las líneas celulares en las que SEQ ID NO: 43 induce un descenso de la 3H-timidina comprenden:

línea celular HEC 1B de cáncer endometrial humano, línea celular CaCo2 de cáncer colorrectal humano, línea celular SK-MEL-2 de cáncer de melanoma humano, y línea celular A-172 de cáncer del SNC humano (véanse las Figuras 21 a 28).

Ejemplo 21

5 SEQ ID NO: 10ADP-ribosila RhoA

El tratamiento con la exoenzima C3 de las células *in vitro* da lugar a la ADP-ribosilación de RhoA, B y C a ⁴¹Asn, lo que conlleva su consiguiente inactivación. El grupo ADP-ribosa unido de forma covalente aumenta el peso molecular aparente de las Rho GTPasas en SDS-PAGE, y se puede observar fácilmente por inmunoelectrotransferencia (western blot) usando anticuerpos anti-Rho. El cambio en el peso molecular aparente de la Rho GTPasa en las inmunoelectrotransferencias anti-RhoA de HUVEC tratadas con SEQ ID NO: 10 (Figura 30) indica la adición esperada de un grupo ADP-ribosa a las moléculas de Rho. Concentraciones iguales de SEQ ID NO: 10 tan bajas como 1 µg/ml, junto con duraciones de tratamiento de 30 minutos, son suficientes para producir una ADP-ribosilación completa de RhoA. Estos hallazgos demuestran claramente que dosis relativamente bajas de SEQ ID NO: 10 son suficientes para penetrar con eficacia en el citoplasma de las HUVEC cultivadas.

15 Ejemplo 22

La SEQ ID NO: 10 disminuye la formación tubular *in vitro* por parte de las HUVEC

Haciendo referencia a la Figura 31, para evaluar la importancia de la vía de señalización Rho-Rock en la angiogénesis, se usa tranilast (10 µg/ml y 50 µg/ml) como control positivo. Se sabe que tranilast bloquea una de las rutas principales de la angiogénesis, es decir, la vía del VEGF. La unión del VEGF con el VEGF-R estimula la autofosforilación de la tirosina de uno de los receptores que inician una vía de señalización, en parte, mediante la PKC. El tranilast actúa inhibiendo la activación de la PKC dependiente del VEGF. En la Figura 31A se observa que las HUVEC no tratadas (Ctl) formaron estructuras similares a capilares en cuanto al grosor y bien cerradas. SEQ ID NO: 10, con las dos concentraciones estudiadas, produjo tubos inmaduros que eran delgados y no estaban completamente cerrados, en comparación con los encontrados en las células de control (Figura 31A). Se obtuvo una morfología similar con el inhibidor de ROCK Fasudil, con las dos concentraciones estudiadas. Tranilast, tal como se esperaba, produjo con ambas concentraciones un descenso en la formación tubular, caracterizada también por estructuras capilares inmaduras y muchas colonias sin elongación. La medición de la longitud capilar mostró que la SEQ ID NO: 10 y tranilast provocaron un descenso significativo ($p < 0,05$ o $p < 0,01$) de al menos el 51% de la longitud de los tubos, dependiendo de la concentración, mientras que Fasudil provocó un descenso significativo ($p < 0,05$) en la formación tubular del 58%, pero solo con una dosis alta (50 µM) (Figura 31B).

Todos los resultados presentados anteriormente indican que Rho puede actuar sobre la angiogénesis mediante su capacidad de regular el citoesqueleto en mayor medida que sobre sus efectos en la proliferación y la migración.

Ejemplo 23

La SEQ ID NO: 10 disminuye la angiogénesis en anillos aórticos de rata

Las aortas torácicas de las ratas (Sprague-Dawley) se cortaron en pequeños anillos de 1 mm de grosor, se envolvieron con Ecmatrix[®] solidificada (matrigel) y, a continuación, se incubaron sin (Ctl) o con 10 µg/ml de la SEQ ID NO: 10, desde el día 0 hasta el día 7-8, en medios basales endoteliales-2 (EBM-2) complementados con hEGF, GA-1000, VEGF, hFGF-B, r³-IGF-1, ácido ascórbico y heparina (correspondiente a EGM-2 menos FBS e hidrocortisona). El día 4 se reabastecieron los medios (sin y con SEQ ID NO: 10). La angiogénesis de los anillos se observó en microscopio invertido de contraste de fases con una ampliación de 25 X (panel superior) y 100 X (panel inferior). Las imágenes se obtuvieron con las ampliaciones indicadas usando el software Northern Eclipse. Los análisis microscópicos de contraste de fases con una ampliación baja (25 X) mostraron excrecencias celulares extensas en los anillos de control (Figura 29A, panel 1). Con una ampliación mayor (100 X) se veían claramente estructuras similares a capilares, bien formadas, compuestas por cadenas y cordones de células elongadas unidas (Figura 29A, panel 3). Por el contrario, una visión con una ampliación baja de los anillos tratados con la SEQ ID NO: 10 mostró considerablemente menos excrecencias celulares (Figura 29A, panel 2) que en los anillos de control. Con una ampliación mayor, se observó que la red capilar estaba gravemente afectada, compuesta por túbulos mucho más cortos y delgados (Figura 29A, panel 4) que los de los anillos de control.

La longitud de los túbulos se midió y registró como la media ± EEM (Figura 29B). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes analizados como mínimo por triplicado. El símbolo * indica una diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto a los anillos de control. Estos análisis cuantitativos de longitud tubular indicaron una disminución del 30% ($p < 0,05$) en la longitud de los vasos, causada por el tratamiento con la SEQ ID NO: 10. En conjunto, estos datos muestran claramente que la SEQ ID NO: 10 puede ser un mediador en la inhibición de la angiogénesis en un modelo *ex vivo* robusto.

55 Ejemplo 24

La SEQ ID NO: 10 tiene efectos mínimos sobre la proliferación y migración de las HUVEC

En los cultivos de HUVEC sembradas en pocillos recubiertos de colágeno, la SEQ ID NO: 10, incluso en dosis muy altas (hasta 100 µg/ml durante 72 horas) no produce ningún efecto discernible en la tasa de proliferación, evaluada con tinción azul de Alamar (Figura 32). Por comparación, tanto el inhibidor de cinasas Rho Fasudil, como tranilast, provocan reducciones significativas ($p < 0,01$) en la proliferación de las HUVEC a las 24 horas y a las 72 horas. Dado que la SEQ ID NO: 10 ribosila con eficacia RhoA y, por tanto, inhibe su actividad en estas condiciones, parece que la proliferación de las HUVEC en este sistema, junto con esta parte de la secuencia angiogénica, tiene lugar independientemente de la actividad de RhoA. Por el contrario, parece que la proliferación de las HUVEC depende de la actividad de cinasas Rho, así como de la actividad de estas dianas, incluido posiblemente la proteína cinasa C, bloqueada por Tranilast.

Otra función celular y parte del proceso angiogénico que queda perturbado por la inhibición de la Rho GTPasa es la migración celular endotelial. A fin de evaluar el efecto de la SEQ ID NO: 10 sobre la migración de las HUVEC, las células se siembran en el lado superior de una inserción transpocillo, junto con los componentes de prueba deseados; a continuación, se induce la migración con 10 ng/ml de VEGF en el lado inferior del inserto. Tras 20 horas de migración, las células que atraviesan la membrana de la inserción se marcan con una sonda de calceína-AM y se detectan mediante fluorescencia. Tal como se esperaba, 10 ng/ml de VEGF estimulan significativamente ($p < 0,001$) la migración de las HUVEC en 2,2 veces (Figura 33A), en comparación con las células del control que no han recibido ningún tratamiento. Tranilast, un control positivo que inhibe la migración inducida por VEGF, disminuye significativamente la migración de las HUVEC a 10 µg/ml (45%, $p < 0,05$) y 50 µg/ml (72%, $p < 0,001$). SEQ ID NO: 10 apenas disminuye la migración de las HUVEC en las dos concentraciones evaluadas, mientras que 50 µM de Fasudil disminuyen la migración en un 66% ($p < 0,001$). Solo después de un tratamiento previo de 24 horas con 50 µg/ml de SEQ ID NO: 10, se observa un descenso (17%, $p < 0,05$) en la migración de las HUVEC dependiente del VEGF (Figura 33B). Las notables diferencias entre inhibir o bien las Rho GTPasas, o bien la Rho cinasa, con respecto tanto a la proliferación como a la migración de las HUVEC indica la participación de vías celulares distintas.

Combinados, estos resultados, que implican la inactivación de Rho con la SEQ ID NO: 10, indican que la proliferación y la migración dependiente del VEGF de las células endoteliales no son los principales acontecimientos que regulan la disminución de la formación tubular *in vitro* de las HUVEC. Presumiblemente, otros pasos del proceso de angiogénesis se deben ver afectados tras la inhibición de la Rho GTPasa o la Rho cinasa.

Ejemplo 25Método general para demostrar el efecto que una proteína de fusión provoca en la inhibición de la proliferación de las células cancerosas

Se ha desarrollado un ensayo de tinción de proteínas con sulforodamina B (SRB, disponible en Molecular Probes) para la medición *in vitro* del contenido de proteína celular, que, por consiguiente, fue adoptado para su uso rutinario en la detección antitumoral *in vitro* del NCI (Skehan *et al.*, 1990). La SRB se une a los aminoácidos básicos de la proteína celular; la evaluación colorimétrica ofrece una estimación de la masa de proteína total que guarda relación con el número de células. Este ensayo está basado en la premisa de que las células muertas o lisan y son eliminadas durante el procedimiento o, por el contrario, no contribuyen al criterio de valoración colorimétrico. El ensayo con SRB puede sobrestimar la fracción de células que sobreviven.

Protocolo para el ensayo con SRB

Estos análisis se llevan a cabo con un panel de 60 líneas celulares del NCI. Las células se cultivan en medios RPMI-L 640 complementados con suero de feto de bovino al 5% y L-glutamina de conformidad con las recomendaciones de la ATCC para cada línea celular. Las células en crecimiento logarítmico se tripsinizan y se cuentan. Las células se inoculan en una microplaca de 96 pocillos, dependiendo del tiempo de duplicación de cada línea celular en 100 µl de medios de crecimiento. Las microplacas se incuban a 37 °C, con CO₂ al 5% y una humedad relativa del 100% durante 24 horas, a fin de que se reanude el crecimiento exponencial. Después de 24 horas, dos placas de cada línea celular se fijan *in situ* con TCA para representar una medición de la población celular de cada línea celular en el momento de añadir la sustancia de prueba (T₀). Se extrae el TCA y las placas se incuban a temperatura ambiente durante un mínimo de 24 horas para que se sequen.

Se prepara una proteína de fusión de esta invención y se conserva congelada como polvo liofilizado. Se puede reconstituir con agua estéril para formar una composición farmacéutica a alrededor de 4,42 microgramos de proteína de fusión por microlitro en 10 mM de fosfato sódico, tampón a pH 7,4. En cada momento de dosificación, se preparan diluciones en serie de la solución madre con un medio completo que contiene 50 µg/ml de gentamicina para ofrecer una proteína de fusión a 200 µg/ml, 20 µg/ml, 2 µg/ml, 0,2 µg/ml y 0,02 µg/ml. Las alícuotas de 100 µl de estas diluciones con sustancia de prueba se añaden a un pocillo adecuado que ya contenga 100 µl de medio para lograr una serie de dosis de diluciones logarítmicas finales para la proteína de fusión.

Después de añadir la proteína de fusión (es decir, el fármaco), las microplacas se incuban durante un período adicional a 37 °C, CO₂ al 5% y una humedad relativa del 100%. El ensayo termina tras fijar la proteína de las células en el fondo de los pocillos con ácido tricloroacético (TCA). Se secan las placas y, a continuación, se añaden a cada

5 pocillo 100 µl de solución con SRB a 0,4% (m/v) en ácido acético al 1%. Las placas se incuban con la tinción de unión a las proteínas durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Tras la tinción, el colorante que no se ha unido se elimina lavando con ácido acético al 1%, y las placas se secan. El colorante unido se solubiliza añadiendo 200 µl de 10 mM de base Trizma, mientras las placas se mezclan con suavidad. La cantidad de colorante se mide leyendo la densidad óptica con un lector de microplacas a una longitud de onda de 515 nm.

Los datos se analizan en una hoja de cálculo de Excel.

T_0 = Absorbancia media en el momento de añadir la proteína de fusión (tiempo 0);

C = Absorbancia media para el control (ninguna sustancia de prueba que contenga fármaco);

10 T_i = Absorbancia media para la sustancia con la proteína de fusión (distintos momentos de dosificación en series de dilución);

GI = Inhibición del crecimiento;

TGI = Inhibición total del crecimiento;

CL_{50} = Concentración letal (letal para el 50% de la población total).

15 Se calcula el porcentaje del crecimiento para cada una de las concentraciones de la sustancia de prueba:

$$\% \text{ de crecimiento} = \left[\frac{(T_i - T_0)}{(C - T_0)} \right] \times 100$$

para concentraciones donde $T_i > T_0$

$$\% \text{ de inhibición del crecimiento} = \left[\frac{(T_i - T_0)}{(T_0)} \right] \times 100$$

para concentraciones donde $T_i < T_0$.

20 El % de la inhibición del crecimiento se puede usar para preparar un gráfico en el que se compare el efecto que producen dosis diferentes. Se trazan gráficas del porcentaje de crecimiento, y los puntos en los que las curvas de respuesta a las dosis cruzaron los valores PG de +50, 0 y -50 se usan para calcular la GI_{50} , TGI y CL_{50} . La GI_{50} , o concentración necesaria para inhibir el crecimiento en un 50%, es el parámetro relevante para la proteína de fusión.

Ejemplo 26

25 Uso específico del ensayo con SRB para demostrar la inhibición del crecimiento celular de las líneas celulares de cáncer humano

Tabla 10

GI_{50} (concentración para una inhibición del 50% del crecimiento celular) tras un tratamiento con proteína de fusión, medida mediante el ensayo con SRB

30

Línea celular	Tipo de cáncer	GI_{50} (µg/ml)
Caki-1	Renal	0,054
TK-10	Renal	0,52
SF-268	SNC	0,326
HOP-62	Carcinoma no microcítico de pulmón	0,269
NCI-H226	Carcinoma no microcítico de pulmón	48,2
HS 578T	Mama	36,6

Una proteína de fusión de esta invención, la SEQ ID NO: 43 produce un efecto sobre 4 de las 6 líneas celulares tumorales humanas analizadas con ³H-timidina, y un efecto sobre aproximadamente el 10% de las líneas celulares del espectro NCI. En la prueba con SRB, parecen observarse propiedades citostáticas; el crecimiento se encuentra inhibido en comparación con los controles, aunque la cantidad total de proteína no disminuye en comparación con la cantidad medida en el momento cero (Tz). Estos resultados concuerdan con los datos *in vivo* que demuestran que la transferasa C3 no tiene una gran toxicidad en animales. Los valores de GI₅₀ observados se encuentran en el intervalo nanomolar a micromolar, dado un peso molecular de aproximadamente 27 kDa para la proteína de fusión (Tabla 10).

Ejemplo 27

10 Detección de Rho activada mediante un ensayo de inmunoprecipitación

Las células NG108 se cultivan en cultivo celular en presencia de suero de feto de bovino (FBS) al 5% y penicilina-estreptomycin (P/S) al 1%. Después de que las células se hayan asentado (3-6 horas a 37 °C), se añade BA-05 a los cultivos. Para lisar las células, se lavan con solución salina tamponada con tris (TBS) enfriada en hielo y se lisan en un tampón RIPA modificado (50 mM de Tris con un pH de 7,2; Tritón X-100 al 1%; deoxicolato sódico al 0,5%; SDS al 0,1%; 500 mM de NaCl; 10 mM de MgCl₂; 10 µg/ml de leupeptina; 10 µg/ml de aprotinina, y 1 mM de fenilmetil-sulfonil fluoruro (PMSF)). Los lisados celulares se aclaran mediante centrifugación a 13.000 g, durante 10 minutos, a 4 °C, y se conservan a -80 °C.

El dominio de unión GST-Rho (GST-RBD) se purifica con los lisados celulares, que se descongelan y se vuelven a suspender en 500 µl de tampón RIPA por 1 millón de células. Para preparar el dominio de unión GST-Rho (GST-RBD), las bacterias que expresan el GST-RBD en un vector PGEX se cultivan en L-Broth (LB) con 100 µl/ml de ampicilina. Los cultivos, que se han dejado reposar toda la noche, se diluyen en una proporción 1:10 en 3600 ml de LB y se incuban en un incubador bacteriano con agitación a 37 °C durante 2 horas. A continuación, se añade isopropil-β-D-tiogalactopiranosida (0,5 mM) a los cultivos en incubación, durante 2 horas. Después, se recogen las bacterias mediante centrifugación a 5.000 g durante 15 minutos. Los sedimentos se vuelven a suspender en 40 ml de tampón de lisis (50 mM de Tris con un pH de 7,5; Tritón-X al 1%; 150 mM de NaCl; 5 mM de MgCl₂; 1 mM de DTT; 10 µg/ml de leupeptina; 10 µg/ml de aprotinina, y 1 mM de PMSF). Tras la homogeneización con ultrasonidos, los lisados se centrifugan a 14.000 rpm, durante 30 minutos, a 4 °C.

El cultivo celular congelado se homogeneiza en tampón RIPA (50 mM de tris con un pH de 7,2; Tritón X-100 al 1%; desoxicolato sódico al 0,5%; SDS al 0,1%; 500 mM de NaCl; 10 mM de MgCl₂; 10 µg/ml de leupeptina; 10 µg/ml de aprotinina, y 1 mM de PMSF). Los homogeneizados y lisados celulares se aclaran mediante dos centrifugaciones de 10 minutos a 13.000 g, a 4 °C. A continuación, se incuban durante 50 minutos a 4 °C con GST-RBD, hasta unirse en perlas de glutatión agarosa (Sigma, Oakville, Canadá). Las perlas se lavan 4 veces y se eluyen en tampón de muestra. La Rho unida a GTP y la Rho total presentes en los homogeneizados tisulares se detectan mediante inmunoelectrotransferencia (western blot). Las proteínas se transfieren a nitrocelulosa y se analizan con un anticuerpo monoclonal específico de RhoA (Santa Cruz, Santa Cruz, California). Las bandas se visualizan con anticuerpos secundarios unidos a la peroxidasa (Promega, Madison, Wyoming) y una reacción de quimioluminiscencia basada en HRP (Pierce, Rockford, Illinois). Se efectúa un análisis de densitometría para cuantificar la señal de cada banda.

Ejemplo 28

40 Uso del ensayo de inmunoprecipitación de Rho como diagnóstico para diagnosticar o determinar qué tumores pueden responder mejor a un tratamiento con proteína de fusión usando la SEQ ID NO: 43 como ejemplo

Se extraen muestras tumorales de biopsia mediante resección quirúrgica de un tejido de mamífero (por ejemplo, un paciente humano) para dejar tejido residual en el borde del tumor extirpado al extraer todo el tumor. Las muestras se congelan en nieve carbónica o en nitrógeno líquido. Las muestras del tejido extraído, de aproximadamente 5 mm², se homogeneizan en 500 µl de amortiguador RIPA (50 mM de Tris con un pH de 7,2; Tritón X-100 al 1%; 0,5% de deoxicolato sódico; 0,1% de SDS; 500 mM de NaCl; 10 mM de MgCl₂; 10 mg/ml de leupeptina; 10 mg/ml de aprotinina, y 1 mM de PMSF). Los homogeneizados se aclaran en dos centrifugaciones de 10 minutos a 13.000 g, a 4 °C, para disponer de muestras para análisis posteriores. A continuación, las muestras se incuban durante 50 minutos, a 4 °C, con GST-RBD, hasta unirse en micropérlas de agarosa de glutatión. La Rho unida a GTP y la Rho total presentes en los homogeneizados tisulares se detectan mediante inmunoelectrotransferencia (western blot).

Para detectar qué células de la muestra de biopsia tienen Rho activada, se preparan secciones criostatas. Los lisados bacterianos de RBD-GST se aclaran mediante centrifugación a 14.000 rpm, durante 30 minutos, a 4 °C. La Rho activada se detecta incubando la sección con el lisado bacteriano que contiene RBD-GST. Las criosecciones de muestra de biopsia (con un grosor aproximado de 16 µm) se incuban, tras una fijación posterior con PFA al 4%, con el lisado bacteriano, durante la noche, a 4 °C. A continuación, las secciones se lavan 3 veces en TBS, se bloquean en BSA al 3% durante 1 hora a temperatura ambiente y se incuban con anticuerpos anti-GST (señalización celular, New England Biolabs, Mississauga, Canadá) y con anticuerpos específicos del tipo celular. En caso de un tumor cerebral, se puede usar un anticuerpo específico de neuronas (NeuN) o un anticuerpo específico de astrocitos

(GFAP) para detectar el tipo celular con la Rho activada y ayudar a diagnosticar el tumor. Las secciones se lavan en TBS y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios conjugados con FITC, rojo de Texas o rodamina (Jackson ImmunoResearch, Mississauga, Canadá).

Ejemplo 29

5 Método general para detectar la reducción de la actividad de la metaloproteinasa (MMP)

La actividad de la metaloproteinasa se detecta mediante cimografía, en la que la actividad proteolítica de las enzimas se separa en geles de poliacrilamida en condiciones no reductoras. Para detectar la actividad de la metaloproteinasa, la actividad gelatinolítica en medios de cultivo de crecimiento de células de carcinoma de colon Caki-1 se detecta mediante cimografía de gelatina. Las células Caki-1 se incuban con SEQ ID NO: 43 a 0,1; 1,0 o 10 µg/ml o un tampón como control durante 24 horas. Una alícuota (25 µl) de los medios de cultivo se somete a SDS/PAGE con poliacrilamida al 7,5% que contiene 1 mg/ml de gelatina, y los polipéptidos se separan en condiciones no reductoras. Para evaluar la actividad de la MMP, se extrae el SDS mediante incubación durante 30 minutos, a temperatura ambiente, en Tritón X-100 al 2,5% (v/v). Este paso se repite, seguido de cinco aclarados con ddH₂O. Después, el gel se incuba durante 20 horas, a 37 °C, en un tampón que contiene 50 mM de tris-HCl, con un pH de 7,6; 0,2 M de NaCl; 5 mM de CaCl₂, y Brij-35 al 0,02% (v/v). El gel se tinte con azul brillante de Coomassie R-250, y se destinta. La actividad enzimática sobre el sustrato de gelatina se puede detectar como bandas transparentes en un fondo azul. La identidad de la enzima de MMP con la actividad de gelatinasa se evalúa con un control positivo, tal como, en estos experimentos, el HT-1080.

Ejemplo 30

20 Método general para tratar un margen tumoral extirpado

Se puede usar una composición de la invención que comprende una proteína de fusión, como la SEQ ID NO: 43, formulada en una crema farmacéuticamente aceptable, para tratar un lugar de extirpación en la piel. Un ejemplo es el tratamiento del melanoma maligno, en el que esta crema se aplica en la piel que rodea el lugar de extirpación del tumor. En un aspecto, esta formulación de una crema que contiene la proteína de fusión, como la SEQ ID NO: 43, se puede administrar en la piel antes de extraer el tumor y usar para tratar el tumor entre el período de la primera biopsia y antes del diagnóstico histológico positivo. La crema, cuando se aplica en el lugar del tumor, puede prevenir la diseminación y la metástasis del tumor.

Ejemplo 31

Prevención de un segundo tumor que crece en un margen tumoral

Se puede usar una composición de esta invención que comprende una proteína de fusión, como la SEQ ID NO: 43, por ejemplo, una solución acuosa como la descrita anteriormente o como la formulada en un gel adhesivo quirúrgico, como un adhesivo de fibrina o un hidrogel, para tratar el área de resección quirúrgica de un tumor. Un ejemplo es el tratamiento de un colon sano tras una colonectomía para un cáncer de colon. El tejido de colon sano que rodeaba la región tumoral antes de la extirpación del tumor se puede tratar con una composición de proteína de fusión como la SEQ ID NO: 43, tras la extirpación del tumor y el tejido asociado, en un gel quirúrgico como un sellador de fibrina, y será útil para prevenir la formación de lesiones adicionales en el tejido residual.

Ejemplo 32

Método general para demostrar la eficacia preclínica en un mamífero

Una línea celular de melanoma se implanta de forma subcutánea en un primer grupo de ratones atímicos (Charles River Laboratories). Los tumores se hacen crecer en ratones adultos del primer grupo de ratones, se extraen y trasplantan individualmente en cada ratón (un tumor por ratón) de un segundo grupo de ratones. Una inyección diaria de una composición farmacéutica de esta invención que comprende una dosis eficaz de una proteína de fusión, como la SEQ ID NO: 43, de la que se calcula que se encuentra en el intervalo de 10-100 µg/ml del volumen tumoral, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, se administra a cada ratón del segundo grupo de ratones. A los animales del control se les inyecta un vehículo como control. Se mide el crecimiento del tumor y se efectúa un examen histológico para medir los marcadores de queratinocitos malignos, como la inmunoproteína gamma 10 (IP10). La composición que comprende la proteína de fusión previene o inhibe sustancialmente el crecimiento de los tumores del segundo grupo de ratones.

Ejemplo 33

50 Uso de una composición que comprende una proteína de fusión aplicada a la superficie de un dispositivo mamario implantado para prevenir la recurrencia de un cáncer de mama

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de esta invención que comprende una proteína de fusión se aplica sobre la superficie de una implante mamario farmacéuticamente aceptable. Se extirpa un tumor del tejido mamario de un paciente, opcionalmente con administración conjunta (preoperatoria y/o

postoperatoria) de una composición farmacéutica de esta invención tal como se ha descrito anteriormente. El vacío creado por la extracción del tumor se rellena al menos en parte con el implante mamario recubierto con una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión, y se cierra la herida creada por la escisión y/o implante. Se previene o inhibe sustancialmente el crecimiento de un segundo tumor en el tejido del margen tumoral residual.

Ejemplo 34

Preparación de una composición farmacéutica para administración a un paciente

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar mezclando la SEQ ID NO: 10 (30 mg/ml de solución madre o solución diluida) con los cuatro componentes del kit Tisseel® (sellador de fibrina):

- Trombina liofilizada;
- 1 ml de CaCl₂/solución de reconstitución amortiguadora para reconstituir la trombina;
- Fibrinógeno liofilizado, y
- 1 ml de solución amortiguadora para reconstituir el fibrinógeno.

La solución madre de la SEQ ID NO: 10 se conserva a -20 °C, congelada hasta 1 hora antes de usar. La solución madre de la SEQ ID NO: 10 se descongela colocando el vial en la palma de las manos durante unos pocos minutos. Se extraen 0,3 ml de la solución madre de la SEQ ID NO: 10 con una jeringa de 1 ml, y se inyectan en un vial vacío. Se añaden 0,15 ml de agua estéril con una jeringa estéril. Se mezclan haciéndolos girar suavemente. Con una jeringa de 1 ml, se extraen 0,3 ml de la solución de CaCl₂ (del kit Tisseel®) y se desechan. Con la misma jeringa, se extraen 0,3 ml de la solución de trabajo apropiada de la SEQ ID NO: 10, se inyectan en el vial con CaCl₂, y se mezclan haciéndolos girar suavemente. Se extrae el volumen total del vial con CaCl₂/ SEQ ID NO: 10 con una jeringa de 1 ml, y se inyecta en el vial con la trombina reconstituída. La solución de trombina se conserva a 37 °C hasta su uso. El concentrado de proteína selladora Tisseel® se debe preparar y reconstituir conforme a las instrucciones del fabricante antes de su uso. Se extraen la trombina/SEQ ID NO: 10 y las soluciones con proteína selladora Tisseel®, con sus respectivas jeringas Duploject, y se realiza la aplicación de Tisseel® para la formación de coágulos.

Ejemplo 35

Distribución de la SEQ ID NO: 10 tras su aplicación extradural

Haciendo referencia a la Figura 34, la distribución de la SEQ ID NO: 10 se puede caracterizar en las médulas espinales de ratas normales y heridas. La penetración y distribución de la SEQ ID NO: 10 en los tejidos de la médula espinal se evalúan mediante inmunoelectrotransferencia (western blot) del tejido obtenido de cada rata (n = 3-5 ratas en cada experimento). En todas las inmunoelectrotransferencias se cargaron 50 µg de proteína en cada carril. Tras la separación en SDS-PAGE al 12%, las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa, se bloquearon y se analizaron con un anticuerpo policlonal dirigido contra la SEQ ID NO: 10. Las bandas se visualizaron con anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa (Promega) y una reacción de quimioluminiscencia basada en HRP (Pierce Chemical Co.). Se midió la densitometría de las inmunoelectrotransferencias con un densitómetro personal láser SI (Molecular Dynamics) y las imágenes de bandas se analizaron con el software ImageQuant, versión 5.0 (Molecular Dynamics). El software mide la densidad de píxeles en la imagen de bandas tras sustraer el fondo, y el valor de densitometría se proporciona en unidades arbitrarias.

Para la inmunohistoquímica, las médulas espinales introducidas en OCT se procesan en secciones de 10 µm sobre portas de vidrio Super Frost y, posteriormente, se fijan en PFA al 4%. Tras una incubación de una hora en solución bloqueadora (suero caprino normal al 5%, y BSA al 3% en PBS), la SEQ ID NO: 10 se detecta usando un anticuerpo monoclonal y se visualiza tras una incubación de una hora con anticuerpo secundario de cabra dirigido contra IgG de ratón, conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Los portaobjetos se examinan con un microscopio fluorescente Zeiss Axioskop 2. Las imágenes de las secciones tisulares se obtienen con el software Northern Eclipse. En este experimento se usan como control ratas a las que se solo se aplica PBS en Tisseel, a fin de evaluar la especificidad de anticuerpos y la interferencia de fondo.

En experimentos de evolución temporal, la capacidad de la SEQ ID NO: 10 (50 µg) de penetrar en el tejido de la médula espinal se verifica en combinación con Tisseel® al aplicarlo en la duramadre de ratas laminectomizadas sin lesiones. La duramadre se deja intacta y se extrae 1 cm de tejido del lugar de aplicación una hora después de la cirugía. Al contrario que el tipo C3 natural, que carece de la secuencia de transporte, se ha observado que la SEQ ID NO: 10 penetra rápidamente en la médula espinal (Figura 34A). La administración en bolo de la matriz Tisseel provocó niveles máximos y constantes en la médula espinal durante las 2 primeras horas posteriores a la aplicación, seguido de una fase de liberación lenta con niveles residuales que aún se detectaban al cabo de 7 días.

La Rho es una proteína ubicua, importante en el funcionamiento celular normal. Su inhibición sistémica podría dar lugar a efectos secundarios importantes. Por lo tanto, es preferible que la administración de la SEQ ID NO: 10 se restrinja localmente a la médula espinal lesionada, a fin de limitar la exposición sistémica. Tras la aplicación extradural, se detectaron niveles bajos de la SEQ ID NO: 10 en tejidos próximos al lugar de aplicación, como la piel y músculos de la espalda (menos del 5% de la dosis inicial). Sin embargo, cuando se administró por vía tópica con Tisseel[®], la SEQ ID NO: 10 (hasta 50 µg) no provocó ningún efecto demostrable en la cicatrización de heridas con las dosis empleadas. Se encontró una exposición limitada en la circulación sistémica (alrededor del 0,5% de la dosis inicial; C_{máx} al cabo de 1 hora) y no se observó que la proteína se concentrara en ningún sistema de órganos (no se muestran los datos). En otro experimento, se observó que el riñón era responsable de la eliminación (1% de la dosis inicial detectada en el tejido al cabo de 1 hora), y que la proteína se detecta en la orina durante las primeras horas posteriores a la aplicación. SEQ ID NO: 10 también se detecta en el hígado poco después de la dosificación, aunque en cantidades más pequeñas que las encontradas en el riñón.

Además, se evaluó la distribución dorsoventral y rostrocaudal de la SEQ ID NO: 10. Veinticuatro horas después de la administración, la proteína se detecta en la médula espinal contusionada tanto dorsal como ventral de las ratas tratadas que tenían o bien una duramadre intacta, o bien una duramadre abierta (Figura 34A). Se observó que el traumatismo de la médula espinal no influye en la distribución de la SEQ ID NO: 10 en las condiciones experimentales de los inventores. Dos horas después de la aplicación de 50 µg de SEQ ID NO: 10 en la médula espinal normal laminectomizada, se observó una difusión tanto caudal como rostral desde el lugar de la aplicación que cubría una distancia de aproximadamente 2 cm (Figura 34B). La inmunohistoquímica confirmó que 24 horas después de su aplicación en la médula espinal contusionada, la SEQ ID NO: 10 administrada de forma exógena se absorbe y distribuye dentro de la sustancia gris y blanca de la médula espinal. La inmunotinción se detecta en su mayoría en la parte dorsal, dentro de la duramadre y con intensidad en el epicentro de la lesión. Las secciones de médula espinal, extraídas de animales tratados con vehículo, no muestran ningún marcador (Figura 34C).

Ejemplo 36

Inactivación de Rho dependiente del tiempo y la dosis con un tratamiento de SEQ ID NO: 10

Haciendo referencia a la Figura 35, la ventaja terapéutica de la SEQ ID NO: 10 depende de su capacidad para bloquear la activación de Rho que se produce después de una LM. Por lo tanto, tras establecer la distribución de la SEQ ID NO: 10 en la médula espinal después de una aplicación extradural, los niveles de Rho activa se pueden medir en el tejido medular contusionado usando una precipitación por afinidad con el dominio de unión a RhoA de la proteína efectora rotequina, seguido de una detección de RhoA por inmunoelectrotransferencia (western blot). Los niveles de Rho activa se determinan más específicamente usando ensayos de inmunoprecipitación o inmunotransferencia. La densidad de píxeles de los niveles de Rho activa en los tejidos de médulas espinales contusionadas se usa para calcular los niveles de Rho activa normalizados de las muestras de médulas espinales tratadas. En los estudios de respuesta a la dosis y reversibilidad, el promedio de los resultados se calcula para 3 a 9 ratas por grupo.

Se obtiene una curva de respuesta a la dosis para la inactivación de Rho a fin de determinar la dosis eficaz mínima de la SEQ ID NO: 10. Las dosis de SEQ ID NO: 10 se aplican en Tisseel[®] sobre la médula espinal de las ratas inmediatamente después de la LM inducida mediante contusión moderada (se deja caer un peso de 10 g desde una altura de 25 mm), y los niveles de Rho activa (en estado de unión a GTP) se determinan a las 24 horas después de la lesión.

Tal como se ha mostrado anteriormente en el presente documento, la lesión por contusión produce una activación de Rho consistente en todas las ratas. Este nivel de activación se usa para normalizar los niveles de Rho activa observados en distintas condiciones. Se ha observado que el nivel de Rho unida a GTP en la médula espinal de ratas normales es de aproximadamente el 15% de la observada en ratas contusionadas. La cirugía de referencia (laminectomía) no induce de forma significativa la activación de Rho. La SEQ ID NO: 10 en Tisseel[®] bloquea la activación de Rho causada por la lesión de contusión a los niveles basales observados en la médula espinal de ratas normales sin lesiones o laminectomizadas. Esta inhibición de la activación de Rho es máxima al administrar una dosis única de 15 µg de la SEQ ID NO: 10. Se ha seleccionado la dosis de 15 µg para estudios de eficacia, ya que proporciona de forma constante una inactivación de Rho reproducible y consistente. El análisis de regresión de la curva de respuesta a la dosis ($r^2 = 0,97$) muestra que la dosis necesaria para obtener una inactivación de Rho del 50% en la médula espinal de ratas es de aproximadamente 2 µg.

Para determinar el tiempo que el fármaco permanece *in vivo* a niveles terapéuticos, la SEQ ID NO: (50 µg) se aplica en la duramadre sin lesionar la médula espinal. La herida se vuelve a abrir y la médula espinal se lesiona mediante hemisección en el lugar de administración de la SEQ ID NO: 10 en distintos momentos tras la aplicación de la SEQ ID NO: 10 (2 horas, 24 horas, 2 días, 4 días y 7 días). Se sacrifica a los animales 4 horas después. El tratamiento previo con la SEQ ID NO: 10 hasta 4 días antes de la LM permite prevenir la activación de Rho tras su aplicación extradural (Figura 35B). La inhibición es evidente en el grupo de tratamiento previo a las 2 horas, lo que resalta la absorción de la SEQ ID NO: 10 en la médula espinal después de su aplicación en Tisseel[®]. Los niveles terapéuticos de la SEQ ID NO: 10 se mantienen durante un mínimo de 4 días tras la administración, mientras que 7 días después de la aplicación, el tratamiento previo con la SEQ ID NO: 10 no previene la activación de Rho después de la LM.

Aunque la ADP-ribosilación de Rho catalizada por la SEQ ID NO: 10 es irreversible, el recambio proteínico normal de Rho en las células puede explicar la reversibilidad observada.

Ejemplo 37

El tratamiento diferido con la SEQ ID NO: 10 mejora la recuperación funcional en ratones

5 Haciendo referencia a la Figura 36, después de optimizar la SEQ ID NO: 10 permeable a las células, se repiten los experimentos en el modelo de ratón con hemisección y se demuestra que 1 µg es suficiente para fomentar la recuperación funcional. Los pacientes con LM suelen ser sometidos a cirugía para descomprimir y estabilizar o fijar la médula espinal hasta unos pocos días después de la lesión. Por lo tanto, es importante comprender el intervalo necesario para una intervención terapéutica. Debido a la recuperación funcional más rápida de los ratones y a la
10 facilidad de manipulación, se estudió en este modelo el intervalo para la administración de SEQ ID NO: 10 después de una LM. La recuperación conductual se evalúa mediante la puntuación de los movimientos de las extremidades traseras durante 2 semanas con una escala BBB modificada (Dergham *et al.*, 2002, J Neurosci, 22: 6570-6577). La SEQ ID NO: 10 en la función locomotriz tras una recuperación inmediata o diferida se compara usando una dosis de 1 µg administrada en Tisseel®. Más específicamente, la función motriz de los animales se evalúa usando la escala de valoración del aparato locomotor Open Field de Basso, Beattie y Bresnahan (BBB) en 11 ratas tratadas con 15 µg de la SEQ ID NO: 10, y 12 ratas del control. Dos observadores evalúan la puntuación de la BBB durante 4 minutos y otro observador graba la locomoción con una cámara de vídeo. Se calcula el promedio de las puntuaciones de ambas extremidades traseras para obtener la puntuación de cada sesión. La puntuación de la BBB se registra cada vez en hojas separadas, sin conocer los grupos de tratamiento. La recuperación locomotriz del movimiento de las
20 extremidades traseras en ratones se mide usando la puntuación de la BBB en 4 a 6 ratones por grupo de tratamiento. Al contrario que en las ratas, en los ratones no se observa arrastre de pies, y la escala BBB se ha modificado de 21 puntos para las ratas a 17 puntos.

Cada grupo de tratamiento tiene su propio control para tener en cuenta la variabilidad en la segunda cirugía diferida que requiere administrar el tratamiento a las 24 o 72 horas. La lesión inicial de la médula espinal se consideró día 0.

25 El grupo de animales con administración inmediata es sometido a una sola cirugía y recibe tratamiento con la SEQ ID NO: 10 o con PBS en Tisseel®. Existe una mejoría rápida durante las etapas postraumáticas tempranas de la recuperación en el grupo tratado, en un plazo de 24 horas, probablemente debido al efecto neuroprotector de la SEQ ID NO: 10. Dieciséis días después de la lesión, los animales tratados lograron una marcha automática plantar frecuente con apoyo de peso (BBB de 10), en comparación con el barrido con movimientos de 2-3 articulaciones (BBB de 6) en los ratones de control (Figura 36A).
30

Los animales tratados 24 horas después de la lesión fueron anestesiados; se abrieron la piel y los músculos, y el tratamiento se aplicó en la superficie lesionada de la médula espinal. Si el tratamiento se retrasa 24 horas, aún se observa en los ratones tratados una mejor recuperación funcional (Figura 36B). Los animales tratados con la SEQ ID NO: 10 muestran una mejoría significativa de 3 puntos respecto a los ratones del control, a los 16 días. Tal como se
35 ha observado en el grupo de tratamiento inmediato, esos animales también pueden lograr una marcha plantar con apoyo de peso consistente. Sin embargo, en este experimento, la fase de recuperación temprana no está tan marcada como en el grupo de tratamiento inmediato. Este efecto puede quedar oculto por el hecho de que los ratones sufrieron dos anestesiases generales en un plazo de 24 horas.

40 Los animales que recibieron SEQ ID NO: 10 setenta y dos horas después de la hemisección de la médula espinal mostraron una mejoría significativa transitoria hasta 3 días después de la administración diferida, y una tendencia general a lograr una mejor recuperación (Figura 36C). Sin embargo, tras esta mejoría inicial, la pendiente de recuperación decreció; las puntuaciones promedios finales muestran una diferencia significativa respecto a los ratones del control al cabo de 16 días (Figura 36C).

Ejemplo 38

El tratamiento extradural con el antagonista de Rho SEQ ID NO: 10 es bien tolerado

Haciendo referencia a la Figura 37, se pueden llevar a cabo experimentos con ratas para evaluar la seguridad y la recuperación funcional tras un tratamiento con SEQ ID NO: 10 o con las variantes descritas en las Figuras 3 y 4. A fin de evaluar la recuperación funcional después de una contusión en la médula espinal de las ratas, se operó a un total de 25 animales machos, que fueron asignados de forma aleatoria a dos grupos de tratamiento: vehículo (PBS
50 en Tisseel®) o 15 µg de SEQ ID NO: 10 en Tisseel®. Tras la cirugía, se realizaron cuidados postoperatorios que incluían la expresión manual de las vejigas dos veces al día hasta que se recuperó la función vesical. Todas las ratas recuperaron la función vesical autónoma el día 10 a 15, independientemente del grupo de tratamiento. El análisis del peso corporal muestra que todos los grupos (tratados con SEQ ID NO: 10 o con el vehículo) de animales ganaron peso de forma normal (Figura 37A). No se observa ninguna diferencia significativa entre los grupos. En otro conjunto de experimentos, en las ratas tratadas con una dosis de 50 µg también se observa que ganaron peso corporal de forma normal a lo largo de un período de observación de 1,5 meses.
55

Usando un conjunto separado de ratas, se verifica la seguridad a largo plazo de la aplicación extradural de la SEQ ID NO: 10 en Tisseel[®] sobre la médula espinal de ratas sometidas a una laminectomía vertebral similar al procedimiento necesario en los humanos. Se extrajo tejido 3 meses después de una única aplicación de 10 o 50 µg. El análisis histológico exhaustivo de las médulas espinales tratadas con SEQ ID NO: 10/Tisseel[®] no presenta ningún cambio celular o morfológico (médulas espinales normales, control con cirugía de referencia, tratadas con vehículo de control o con SEQ ID NO: 10, con duramadre abierta o intacta). Las Figuras 37B y 37C muestran un corte longitudinal representativo de una médula espinal de rata tras una cirugía y el tratamiento de un animal tratado con vehículo y con 50 µg de SEQ ID NO: 10 al cabo de 3 meses después de la cirugía.

Ejemplo 39

El tratamiento con SEQ ID NO: 10 mejora la recuperación locomotriz en ratas

Haciendo referencia a la Figura 38, se pueden realizar experimentos con ratas para evaluar la recuperación funcional tras un tratamiento con SEQ ID NO: 10 o con las variantes secuenciales descritas en las Figuras 3 y 4. La profundidad de la compresión en la médula espinal se monitoriza como medida de la reproducibilidad de la lesión de contusión. No se ha observado ninguna diferencia en la profundidad de compresión entre los grupos con SEQ ID NO: 10 y del control.

Se operó a los animales y se les asignó de forma aleatoria a dos grupos de tratamiento: el vehículo (PBS) (n = 12 ratas) y 15 µg de SEQ ID NO: 10 (n = 11 ratas). Todos los tratamientos se aplican en un sellador de fibrina. Los animales se someten a cuidados postoperatorios que incluyen la expresión manual de las vejigas dos veces al día hasta que se recupera la función vesical. Todas las ratas recuperaron la función vesical autónoma el día 10 a 15, independientemente del grupo de tratamiento. Un día después de la contusión, todas las ratas muestran parálisis flácida de las extremidades traseras asociada a una puntuación de BBB inferior a 1.

El análisis del peso corporal mostró que los dos grupos de tratamiento (tratados con SEQ ID NO: 10 o con vehículo) ganaron peso de forma normal (Figura 38A). No existe ninguna diferencia significativa entre los grupos en el peso ganado a lo largo del estudio de 8 semanas ($P = 0,98$; ANOVA bilateral con mediciones repetidas). En otro conjunto de experimentos, en las ratas tratadas con una dosis de 50 µg de SEQ ID NO: 10 también se observó que ganaron peso de forma normal a lo largo de un período de observación de 1,5 meses.

Existe una mejoría significativa en las puntuaciones de locomoción en las ratas tratadas con SEQ ID NO: 10, en comparación con los animales tratados con vehículo/PBS. La recuperación es típicamente más rápida en las ratas tratadas con SEQ ID NO: 10. Una semana después de la cirugía, los animales tratados obtuvieron una puntuación de BBB > 4, asociada a movimientos en las 3 articulaciones de cadera, rodilla y tobillo. En comparación, la puntuación de BBB es entre 2 y 3 para los animales del control, ya que solo se ha observado movimiento en dos articulaciones. La puntuación de BBB para los animales del control se estabilizó en la semana 4, mientras que las ratas tratadas siguen mejorando. Cinco o seis semanas después de la lesión, todas las ratas alcanzaron la mejoría máxima de la función locomotriz. La Figura 38C muestra una visión general de la velocidad de progresión y de las puntuaciones finales obtenidas, por ratas tratadas frente a ratas del control. En general, las ratas tratadas progresan más rápido y recuperan parte del uso funcional de las extremidades traseras. El porcentaje de ratas que logran una colocación plantar con apoyo del peso corporal a las 6 semanas con una puntuación de BBB > 9 es del 75% de las ratas tratadas en comparación con el 35% de los controles. Además, 6 semanas después de la lesión, las ratas tratadas son capaces de dar pasos plantares con apoyo de peso de forma ocasional (BBB = 10) o continua (BBB = 11), en comparación con ninguna de las ratas de control. Por el contrario, la mayoría de los animales del control muestran movimiento en solo 3 articulaciones y se mueven con barrido sin apoyo de peso (BBB < 9) (Figura 38C).

Ejemplo 40

LM y administración de antagonista de Rho en matriz de fibrina

Los animales se manipularon de conformidad con las directrices estipuladas por el Consejo Canadiense de Protección de los Animales. Los animales fueron alojados con un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad y acceso libre a agua y comida. Se utilizaron ratones hembra Balb-c (4 semanas).

Se anestesió a los ratones hembra Balb-c con 0,4 ml/kg de Hypnorm y 5 mg/kg de diazepam. Tras la laminectomía, se efectuó una hemisección dorsal de tres cuadrantes de médula (over-hemisection) a la altura de la T7 con tijeras de resorte. Se administró una única dosis en bolo de SEQ ID NO: 10 (1 µg en 4 µl) o vehículo (PBS) sobre la médula expuesta, en sellador de fibrina, mezclando 15 µl de trombina en 15 µl de fibrinógeno (kit de Tisseel[®] VH, Baxter Corporation, Ontario). Se deja que la solución polimerice unos pocos minutos antes de suturar la piel y los músculos.

Bajo anestesia con isoflurano (3-5%), las ratas son sometidas a una laminectomía a la altura de la T9. La LM se induce dejando caer una barra de 10 g de peso desde una altura de 25 mm sobre la médula espinal expuesta usando un impactador de contusión NYU. En los experimentos de inactivación de la Rho, se lesiona a algunas ratas mediante hemisección dorsal de tres cuadrantes de médula. Se registran la velocidad de la barra y la compresión obtenidas en el impactador. Esta técnica provoca parálisis de las extremidades traseras de forma gradual y reproducible. La operación de referencia consiste en una laminectomía solamente. SEQ ID NO: 10 (a diferentes

concentraciones) o el vehículo de control (PBS) en el mismo volumen de 5 µl se mezcla con 15 µl de trombina y 15 µl de fibrinógeno (kit de Tisseel® VH, Baxter Corporation, Ontario). Tras aplicar el compuesto de prueba, se suturan la piel y los músculos que recubren.

Para la evaluación morfológica, las ratas de los grupos de estudio conductual se sacrifican con una sobredosis anestésica y se perfunden cardíacamente con solución salina al 0,9%, seguido de paraformaldehído (PFA) al 4% tamponado con fosfatos. El tejido de la médula espinal en torno a la T9 se extrae de la columna y, posteriormente, se fija en PFA al 4% toda la noche. Diez segmentos de 1 mm de médula espinal, tanto en el lado rostral como en el caudal, se introducen en bloques de parafina y se seccionan transversalmente en un microtomo que se usa para medir áreas tisulares preservadas. Se extraen también los tejidos de la médula espinal y se incluyen en parafina para obtener cortes longitudinales tintados con hematoxilina y eosina en otro conjunto de experimentos. En los experimentos de inmunohistoquímica con cortes criostáticos, 1 cm de médula espinal (epicentro) se fija posteriormente en PFA al 4% y se transfiere a una solución de sacarosa al 30%. Al día siguiente, los tejidos se congelan rápidamente en isopentano frío y se introducen en OCT.

Para las inmunoelectrotransferencias (western blots) y los ensayos de inmunoprecipitación, se sacrifica a los animales con una sobredosis anestésica y se perfunden solamente con una solución salina al 0,9%. El tejido de la médula espinal se separa en la parte dorsal y la ventral, o en segmentos diferentes de las partes rostral a caudal. Los tejidos se lavan en solución salina y la duramadre se extrae. En los ensayos de inmunoprecipitación, el tejido medular de 8 mm se congela in situ vertiendo nitrógeno líquido en el lugar de la laminectomía. Las muestras congeladas de médula espinal se homogeneizan usando un homogeneizador Vari-Mix III (Dentsply Caulk, Toronto, Canadá) y se solubilizan en un amortiguador de lisis NP-40 helado para la inmunoelectrotransferencia (western blot).

Ejemplo 41

La SEQ ID NO: 10 reduce el volumen de la lesión en la médula espinal contusionada de ratas

Haciendo referencia a la Figura 39, el análisis histológico del tejido medular lesionado, tratado con SEQ ID NO: 10 o con las variantes proteínicas, se puede usar para medir la neuroprotección.

Se sacrifica a las ratas sometidas a evaluaciones a campo abierto y el tejido se prepara para histología. El área preservada de sustancias gris y blanca, y todo el área transversal de la médula espinal se miden usando tres cortes transversales de 5 µm por nivel. Se obtienen muestras de múltiples niveles a intervalos de 1 mm a lo largo de un área de 2 cm en torno al epicentro. Las imágenes se obtienen con Axioskop más microscopio óptico (Carl Zeiss, Alemania) y una cámara digital QICAM (Qimaging, BC, Canadá), y se analizan con el software Northern Eclipse (Empix, ON, Canadá). El área tisular preservada de sustancias gris y blanca se determina con la ecuación $S_{sp}\% = (G_{sp} + W_{sp})/T_s \times 100$, donde (G_{sp}) y (W_{sp}) son las áreas preservadas de sustancias gris y blanca, respectivamente, y (T_s) es el área total del corte espinal. El análisis se lleva a cabo sin conocer los grupos de tratamiento.

Tras la lesión de la médula espinal se produce una pérdida masiva de tejido, puesto que las cascadas de señalización desencadenan muerte celular apoptótica de neuronas y neuroglías. La amplitud de la pérdida tisular durante este proceso tiene lugar en los días posteriores a la lesión, y determina en gran medida el alcance de la recuperación funcional posterior a la lesión. Por este motivo, se evalúa si la SEQ ID NO: 10 posee propiedades neuroprotectoras y se verifica el tamaño de la lesión en el lugar de la contusión. El porcentaje de sustancias gris y blanca que permanecen se analiza 2 meses después de la lesión mediante estudios por imágenes de los cortes obtenidos a intervalos de 1 mm a lo largo de la médula espinal caudal y rostral, en una longitud total de 2 cm que cubren el lugar de lesión de 1 cm. Se incluye en el análisis a todas las ratas de los grupos de recuperación funcional ($n = 23$). Existe una diferencia significativa en el área total de lesión entre los grupos, donde los animales tratados con SEQ ID NO: 10 presentaron una disminución del 25% de pérdida tisular frente al grupo del control. Esta diferencia está más marcada en el lado rostral al epicentro (Figura 39A; 25%), mientras que los cambios producidos de forma caudal al lugar del impacto son menos pronunciados (10%). Dos meses después de la contusión, gran parte de la médula espinal a la altura de T9 de los animales de control está ocupada por una gran cavidad quística en la que no se observa sustancia gris y menos del 10% de sustancia blanca permanece en el epicentro (Figura 39A). Por el contrario, la médula espinal en el epicentro de las ratas tratadas presenta un aumento promedio del 10% en la sustancia blanca residual, que consiste en un margen periférico. Este aumento de sustancia blanca preservada en ratas tratadas alcanzó el 22% en los primeros 4 mm de forma rostral al epicentro. La sustancia gris también se preservó de forma significativa en las ratas tratadas a una distancia de entre 2 y 4 mm del epicentro de la lesión. Se observó una diferencia significativa global en la extensión del tejido medular que permanecía en el lugar de lesión, tanto de sustancia blanca ($P < 0,0001$) como de sustancia gris ($P = 0,038$), entre las ratas tratadas y las de control usando un ANOVA bidimensional con mediciones repetidas. La extensión de la lesión preservada se siguió caracterizando mediante el cálculo de las áreas bajo la curva para cada rata, a fin de representar el área total de la lesión. En la Figura 39B se observa que las ratas tratadas mostraron un descenso del 25% en el área ocupada por la lesión. De forma similar a los humanos, la formación de cavidades quísticas en el lugar de lesión tras una LM en las ratas es algo común. La tinción con azul de Luxol rápido mostró que las ratas tratadas tenían una mielina compacta más abundante en una cavidad más pequeña que la de los animales de control. Esto también se refleja en una menor longitud longitudinal de la lesión en las ratas tratadas ($10,3 \pm 0,7$ mm en los controles frente a $7,8 \pm 0,7$ mm en las ratas tratadas, $P < 0,01$, prueba de la t de Student para datos independientes) (no se muestran los

datos). Finalmente, el análisis de regresión lineal (Deming) muestra que existe una correlación significativa entre el área total de la lesión y las puntuaciones de BBB finales en las ratas tratadas con la SEQ ID NO: 10 ($P = 0,02$) (no se muestran los datos).

Ejemplo 42

5 El tratamiento de la SEQ ID NO: 10 no tuvo ningún efecto en la alodinia de las ratas

Haciendo referencia a la Figura 40, la SEQ ID NO: 10 o las variantes proteínicas se pueden evaluar en un modelo animal de dolor neuropático para estudiar los efectos secundarios indeseados. Se sabe que la gemación axonal anómala provoca el desarrollo de dolor neuropático tras un traumatismo de médula espinal. Se usa la retirada de extremidades en respuesta a los filamentos de Von Frey de diámetro creciente para analizar la sensibilidad a los
10 estímulos mecánicos. Las ratas se colocan en una caja de plexiglás sobre una pantalla metálica fina y elevada, y se aclimatan durante 60 minutos antes de la prueba. El filamento se aplica en la superficie plantar de cada extremidad trasera. El umbral del filamento de Von Frey (cantidad de gramos de fuerza) se registra como la fuerza necesaria para ocasionar una retirada tres a cuatro de cuatro veces. Se hace un promedio de los datos obtenidos para las extremidades traseras derecha e izquierda. Los observadores no conocen los grupos de tratamiento. En cada grupo
15 de tratamiento se evalúan entre 5 y 7 ratas.

Se puede examinar el efecto de la SEQ ID NO: 10 sobre la respuesta sensitiva de las ratas lesionadas. La prueba de Von Frey se usa para verificar si existe alguna diferencia en la sensibilidad a la estimulación mecánica después de que los animales hayan alcanzado su meseta de recuperación locomotriz 6 semanas tras una contusión grave. La respuesta de retirada de la pata a la estimulación sensorial se mide en ambas extremidades traseras con sondas
20 calibradas. En las ratas lesionadas se desarrolla el mismo nivel de alodinia táctil, independientemente del grupo de tratamiento al que pertenezcan. Los tratamientos con vehículo o con SEQ ID NO: 10 a 15 o 50 μg no tienen ningún efecto en el umbral de retirada de la pata seis semanas después de la lesión (Figura 40).

Ejemplo 43

La SEQ ID NO: 10 modifica la expresión y localización de cadherinas y ocludinas

La siguiente parte del proceso angiogénico que se estudió fue la de las uniones o los puntos de contacto intercelular, cuya función adecuada es necesaria para formar y mantener los túbulos capilares. La participación de Rho GTPasas en la integridad de las uniones entre célula y célula ha quedado demostrada (Hirase et al., 2001; Braga et al., 2002; Wojciak-Stothard y Ridley, 2003), especialmente en lo relativo a las proteínas de unión cadherina y ocludina. A fin de estudiar el estado de estas proteínas en los cultivos de HUVEC, se vuelven a colocar en portas cubiertos con
30 colágeno y se tratan con la SEQ ID NO: 10 (o PBS como control) durante 24 horas. A continuación, los portas se fijan e incuban con un anticuerpo específico de pan-cadherina, seguido de una incubación con un anticuerpo secundario fluorescente. La microscopia de inmunofluorescencia indica que en las HUVEC de control, las cadherinas se encuentran a lo largo de las zonas de contacto celular en densidades de siembra celular tanto bajas (2×10^3) como altas (2×10^4) (flechas pequeñas en la Figura 41A, panel de la izquierda). Sin embargo, en las incubaciones de 24 horas llevadas a cabo en presencia de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de SEQ ID NO: 10, parece que existe menos tinción de cadherina asociada a la membrana en general, así como menos zonas intercelulares de tinción de cadherina (flechas pequeñas en la Figura 41A, panel de la derecha), lo que es incluso más notable con una densidad baja de siembra celular. Además, las uniones intercelulares aparecen desorganizadas, especialmente con una densidad alta de siembra celular, lo que da lugar a huecos visibles entre las células (flechas largas en la Figura
40 41A, panel de la derecha). Por tanto, aunque aún se puede observar tinción de cadherina en algunas regiones de contacto intercelular en las HUVEC tratadas con SEQ ID NO: 10, la integridad de las fronteras intercelulares se encuentra dañada y presenta un aspecto más puntiforme que continuo, en comparación con las células sin tratar.

Un examen ulterior de las figuras revela que la intensidad de la señal de inmunofluorescencia de la cadherina es menos intensa en las células tratadas con SEQ ID NO: 10 que en las células del control. Este hallazgo indica que la
45 inactivación de la Rho GTPasa por parte de la SEQ ID NO: 10 puede cambiar no solo la localización de las cadherinas, sino también sus niveles de expresión. Esta hipótesis se estudia mediante inmunoelectrotransferencia (western blot) en extractos de HUVEC subconfluentes que han sido tratadas con 10 o 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de SEQ ID NO: 10 durante 24 horas. De nuevo, la inmunodetección se logra usando un anticuerpo específico de pan-cadherina. Aunque se cargan cantidades equivalentes de proteína de extracto celular en cada banda de los geles, la eficacia de
50 la transferencia de las proteínas desde los geles a las membranas se vigila usando un anticuerpo para las proteínas Erk, cuya expresión es independiente tanto de las cadherinas como de las Rho GTPasas. Ambas concentraciones de SEQ ID NO: 10 producen un descenso significativo ($\sim 40\%$ para 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y $\sim 70\%$ para 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$; $p < 0,001$) en el nivel de cadherina en comparación con las células del control (Figura 41B).

Se han llevado a cabo experimentos similares para estudiar los efectos que la SEQ ID NO: 10 produce en la
55 localización y expresión de la proteína de la unión oclusiva ocludina. Dado que la señal de inmunofluorescencia de la ocludina es relativamente débil, solo se estudian las HUVEC sembradas con una densidad celular alta (2×10^4 células). Los hallazgos son muy similares a los obtenidos con la cadherina y muestran que la ocludina está situada en una banda bastante continua a lo largo de las zonas de contacto celular en las HUVEC del control (indicado por

flechas en la Figura 42A, panel de la izquierda). Tras el tratamiento con 25 µg/ml de SEQ ID NO: 10 durante 24 horas, apenas se observa ninguna zona de contacto celular. Parece que la mayor parte de la señal de la ocludina se corresponde con una distribución intracelular (Figura 42A, panel de la derecha). Sin embargo, al contrario que en las cadherinas, no existe ningún descenso obvio en la intensidad de las ocludinas por inmunoelectrotransferencia (western blot) tras un tratamiento de las HUVEC, de 24 horas, con 25 µg/ml de la SEQ ID NO: 10 (Figura 42B, panel de la izquierda). Si el tratamiento con SEQ ID NO: 10 se extiende a 48 horas, se observa un descenso significativo (~ 40%; $p < 0,001$) en el nivel de ocludina en comparación con las células del control (Figura 42B, panel de la derecha). De nuevo, el control de transferencia/carga de Erk confirma que existen niveles celulares de proteína similares en las muestras.

En los experimentos de inmunofluorescencia mencionados anteriormente, las HUVEC se siembran en portas de cámara de 8 pocillos, cubiertos con colágeno I, que se dejan adherir durante 16-24 horas. Tras incubar con el agente del tratamiento, las células o bien se fijaron en formalina al 10% y después se permeabilizaron durante 30 minutos con Tritón X-100 al 0,2% (para visualizar la actina y cadherina), o bien se fijaron durante 5 minutos con MeOH enfriado en hielo al 100% (para visualizar la ocludina). Para teñir la actina, las células se bloquearon con BSA al 3% durante 45 minutos y después se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con faloidina conjugada a rodamina (1/300). Para teñir la cadherina, las células fijas se bloquearon durante 30 minutos con suero caprino al 10% y después se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra pan-cadherina (1/400). La detección se realiza mediante anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugado con FITC (1/400), durante 1 hora, a temperatura ambiente. Para teñir la ocludina, las células se fijaron y bloquearon al igual que para detectar la cadherina y después se incubaron durante 120 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra ocludina (1/50). La detección se realiza mediante anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de conejo conjugado con FITC (1/400). El glicerol SlowFade® antiatenuación se usa para disminuir la atenuación inmunofluorescente. Los portas se examinan con un microscopio de fluorescencia invertida (Carl Zeiss, Alemania Occidental). Se tomaron micrografías con el software Northern Eclipse.

Considerados junto con los resultados de la caderina, estos datos relativos a la ocludina indican que la inhibición mediada por la SEQ ID NO: 10 de la formación tubular *in vitro* de las HUVEC implica una interrupción de la integridad de la región de contacto intercelular en lo que respecta a las proteínas de unión cadherina y ocludina. Estas proteínas de unión no solo se distribuyen de forma diferente, sino que parece que sus niveles de expresión general disminuyen significativamente. Los hallazgos presentados aquí indican que la SEQ ID NO: 10 interfiere principalmente con la etapa de tubulogénesis de la angiogénesis, y que la reducción inducida por la SEQ ID NO: 10 en la tubulogénesis guarda relación con la pérdida de contactos intercelulares y con el descenso regulado de las moléculas de unión cadherina y ocludina.

REIVINDICACIONES

1. El polipéptido con SEQ ID NO: 10.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, donde dicho polipéptido está PEGilado.
3. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 y un portador farmacéuticamente aceptable.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, donde la composición farmacéutica es estéril Oesterilizable o está esterilizada.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 3 o 4, donde la composición farmacéutica está en un vial en una forma farmacéutica unitaria o en un múltiplo integral de una forma farmacéutica unitaria.
6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde la composición farmacéutica comprende una matriz.
7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, donde la composición farmacéutica está seca o comprende una matriz deshidratada o comprende una proteína de fusión en una matriz liofilizada.
8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, donde el portador comprende un adhesivo tisular, donde el adhesivo tisular es preferentemente fibrina o un sellador de fibrina, seleccionándose dicho sellador de fibrina opcionalmente del grupo compuesto por Tisseel®, Cebus®, Ateles®, Proleus®, Vivostat®, CryoSeal FS®, CoSeal®, Duraseal®, Poliphase®, Bioglue®, Avitene Flour®, Dermabond®, Hemaseel®, Beriplast-P®, Fibrocaps®, Crosseal®, Evicel® y Trombina.
9. Polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 para usar en el tratamiento de una lesión de médula espinal en un sujeto que lo necesite.
10. Polipéptido o composición de la reivindicación 9 para usar en el tratamiento de una lesión de médula espinal en un sujeto que lo necesite, donde
 - a) dicho sujeto tiene una enfermedad neurológica o neurodegenerativa, opcionalmente seleccionada del grupo compuesto por enfermedad de Stargardt, amaurosis congénita de Leber, enfermedad de Best, coroideremia, retinosquiasis, síndrome de Bardet-Biedl, neuropatía óptica isquémica anterior, retinopatía de Purtscher, neuritis óptica, edema de disco óptico, enfermedad de Coats y/o aneurisma miliar de Leber, neuropatía inmune y periférica, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, neuropatía axonal gigante, neuralgia del trigémino, neuralgia glosofaríngea, parálisis de Bell, miastenia grave, distrofia muscular, atrofia muscular progresiva, atrofia muscular bulbar progresiva hereditaria, síndromes por herniación, ruptura o prolapsos de discos vertebrales, espondilosis cervical, trastornos del plexo, síndromes de destrucción de la salida torácica, acrilamidas, gamma-dicetonas (neuropatía de adicción al pegamento), disulfuro de carbono, dapsona, garrapatas, porfiria, síndrome de Gullain-Barré, corea de Huntington, demencia por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), enfermedades priónicas y glaucoma; o
 - b) dicho sujeto tiene dañado el sistema nervioso como consecuencia de un accidente cerebral vascular, cirugía, infarto, infección, exposición a agentes tóxicos, síndromes de neoplasia maligna o paraneoplásicos, traumatismo o lesión accidental.
11. Polipéptido o composición de la reivindicación 9 para usar en el tratamiento de la lesión de médula espinal en un sujeto que lo necesite, donde dicho sujeto tiene una lesión cerebral traumática.
12. Polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 para usar en el tratamiento de la degeneración macular en un sujeto que lo necesite, o para usar en la inhibición o reducción de la tasa de neovascularización sub-retiniana y/o proliferación de tejido neovascular asociado a degeneración macular en el ojo de un sujeto que lo necesite, o para usar en la protección de fotorreceptores retinianos frente a la muerte celular asociada a degeneración macular en el ojo de un sujeto que lo necesite.
13. Polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 para usar en la prevención o tratamiento del cáncer, o para usar en la prevención o inhibición de la proliferación no controlada o diseminación o migración de una célula neoplásica metastásica de un cáncer en un sujeto, o para usar en la prevención o inhibición de la proliferación no controlada o diseminación o migración, dentro de un margen de resección de un tejido hospedador proximal al lugar de extirpación de un tumor de un cáncer en un sujeto, de una célula neoplásica metastásica que reside en el margen de resección, donde el polipéptido o la composición está adaptado opcionalmente para administrar directamente en la superficie del margen de resección o por debajo de la superficie del margen de resección o

dentro del tejido proximal al margen de resección que permanece en el sujeto; donde el cáncer es seleccionado del grupo compuesto por cáncer de mama, cerebral, de colon, de piel, renal y hepático.

- 5 14. Polipéptido o composición de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 para usar en el tratamiento de una lesión de médula espinal en un sujeto que lo necesite, donde el polipéptido o la composición está adaptado para administración mediante inyección, aplicación tópica o implantación.
15. Polipéptido o composición de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 para usar en el tratamiento de una lesión de médula espinal en un sujeto que lo necesite, donde el sujeto es un mamífero, preferentemente un ser humano.
- 10 16. Polipéptido o composición de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 para usar en el tratamiento de una lesión de médula espinal en un sujeto que lo necesite, donde se fomenta el crecimiento o regeneración axonal o neurítica, o se inhibe la angiogénesis, en dicho sujeto.
17. Polipéptido conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 para usar como un medicamento.

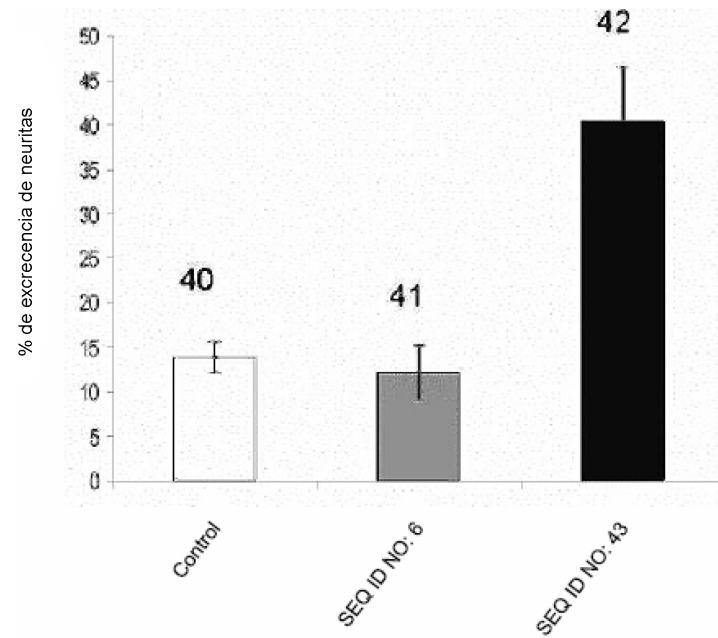


Fig. 1

↓

WT C3	<i>MKGLRKSILC</i>	<i>LVLSAGVIAP</i>	<i>VTSGMIQSPQ</i>	<i>KCYAYSINQK</i>	AYS	NTYQEFTNID	53	
SEQ ID NO: 44			MSRVALQACN	<i>AYSINQK</i>	AYS	NTYQEFTNID	30	
SEQ ID NO: 10					MS	AYS	NTYQEFTNID	15

Fig. 2A

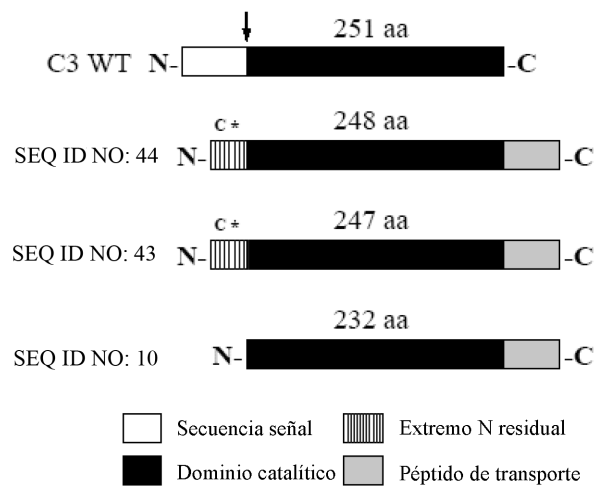


Fig. 2B

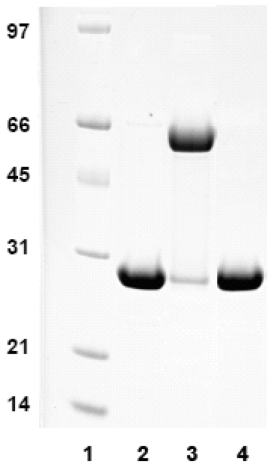


Fig. 2C

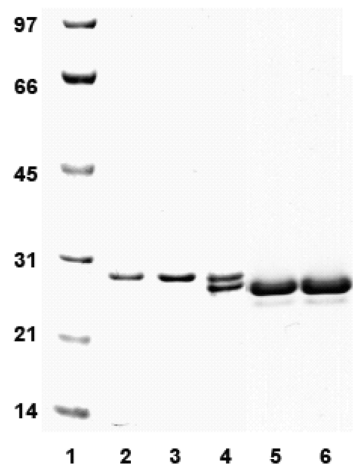


Fig. 2D

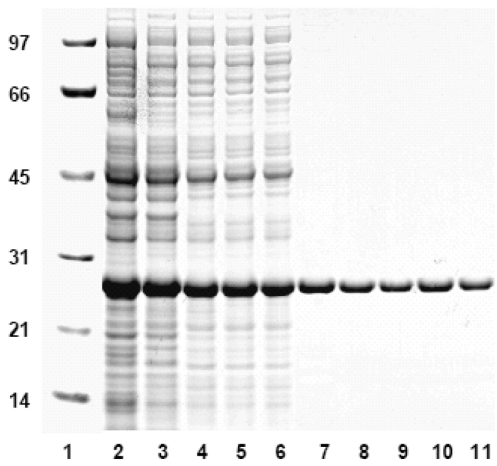


Fig. 2E

SEQ ID NO: 13	MSAYSNTYQE FTNIDQAKAW GNAQYKKYGL SKSEKEAIVS YTKSASEING KLRQNKGVIN	60
SEQ ID NO: 14	MSAYSNTYQE FTNIDQAKAW GNAQYKKYGL SKSEKEAIVS YTKSASEING KLRQNKGVIN	60
SEQ ID NO: 15	MSAYSNTYQE FTNIDQAKAW GNAQYKKYGL SKSEKEAIVS YTKSASEING KLRQNKGVIN	60
SEQ ID NO: 16	MSAYSNTYQE FTNIDQAKAW GNAQYKKYGL SKSEKEAIVS YTKSASEING KLRQNKGVIN	60
SEQ ID NO: 17	MSAYSNTYQE FTNIDQAKAW GNAQYKKYGL SKSEKEAIVS YTKSASEING KLRQNKGVIN	60
SEQ ID NO: 18	MSAYSNTYQE FTNIDQAKAW GNAQYKKYGL SKSEKEAIVS YTKSASEING KLRQNKGVIN GFPSNLIKQV ELLDKSFNKM KTPENIMLFR GDDPAYLGTE FQNTLLNSNG TINKTAFEKA	60 120
SEQ ID NO: 19	MSAYSNTYQE FTNIDQAKAW GNAQYKKYGL SKSEKEAIVS YTKSASEING KLRQNKGVIN GFPSNLIKQV ELLDKSFNKM KTPENIMLFR GDDPAYLGTE FQNTLLNSNG TINKTAFEKA	60 120
SEQ ID NO: 20	RHSTYHIDDM RLSSDGKQII ITATMMGTAI NPKEFVMNPA <u>NAQGRHTPGT RL</u>	232
SEQ ID NO: 21	RHSTYHIDDM RLSSDGKQII ITATMMGTAI NPKEFVMNPA <u>NAQGRHTPGT RL</u>	232
SEQ ID NO: 22	RHSTYHIDDM RLSSDGKQII ITATMMGTAI NPKEFVMNPA <u>NAQGRHTPGT RL</u>	232

Fig. 3

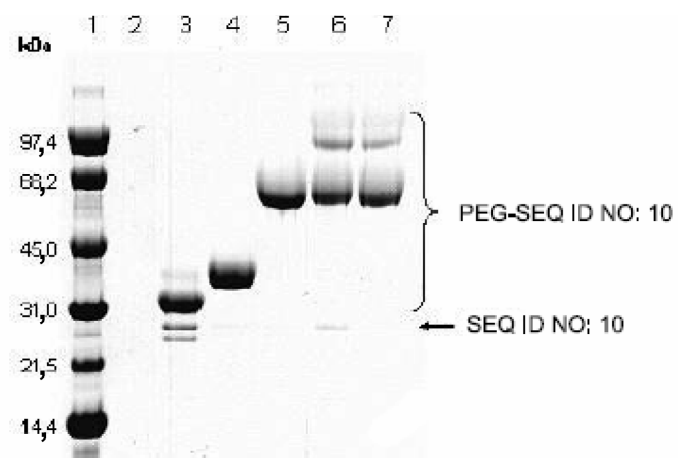


Fig. 4A

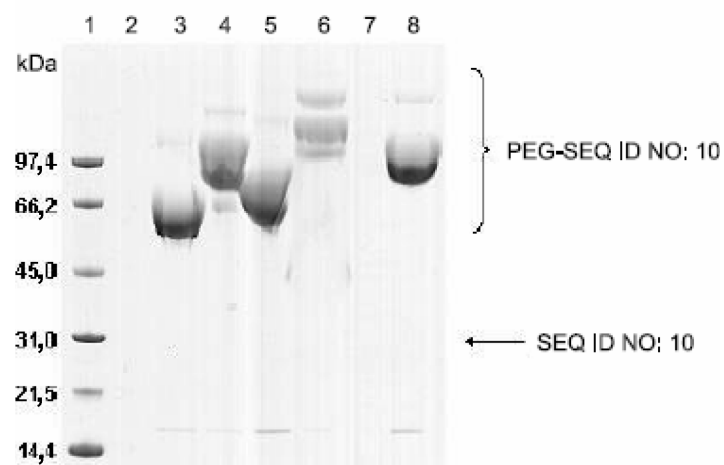


Fig. 4B

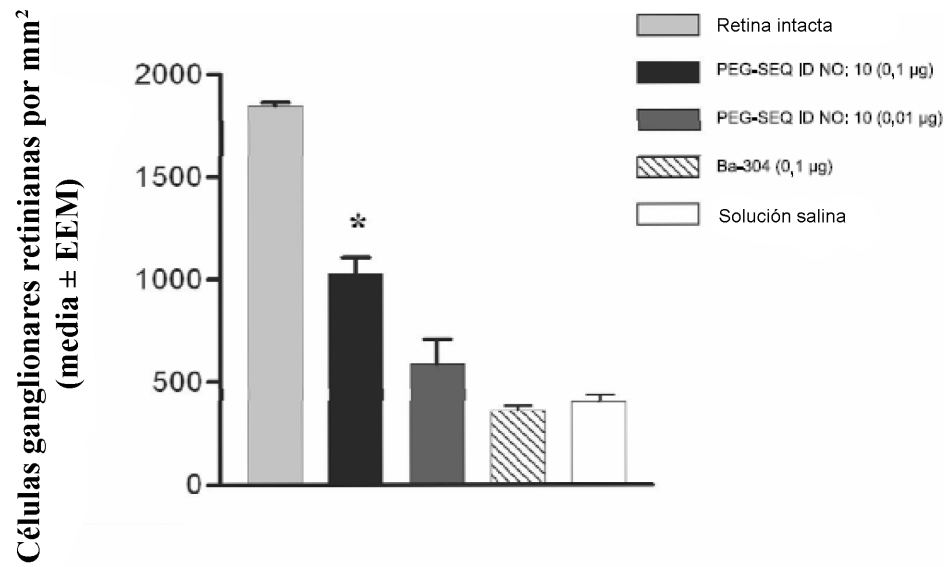


Fig. 5

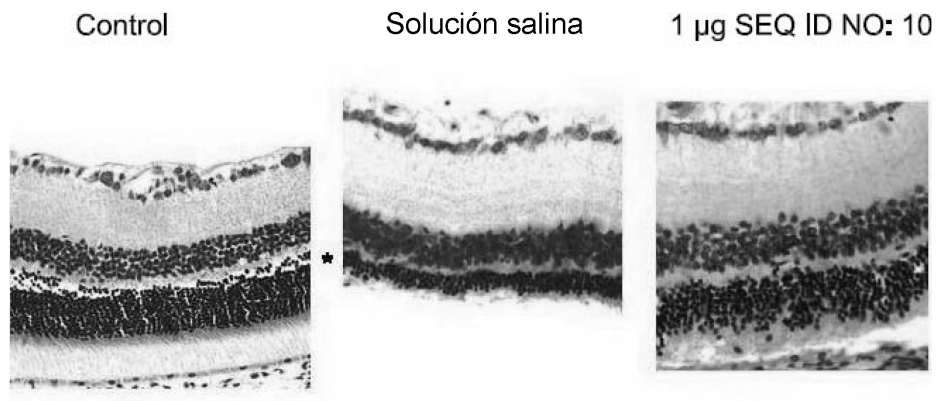


Fig. 6

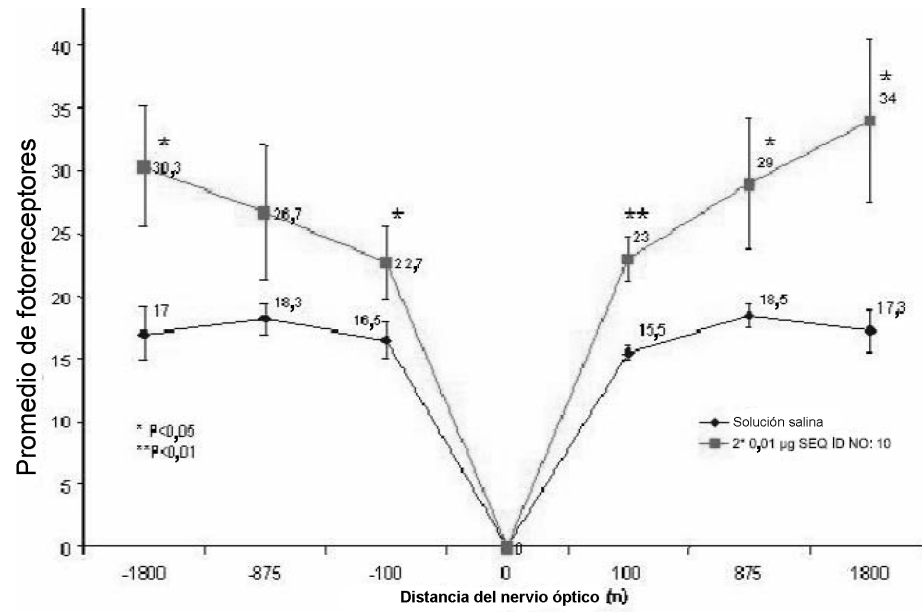


Fig. 7

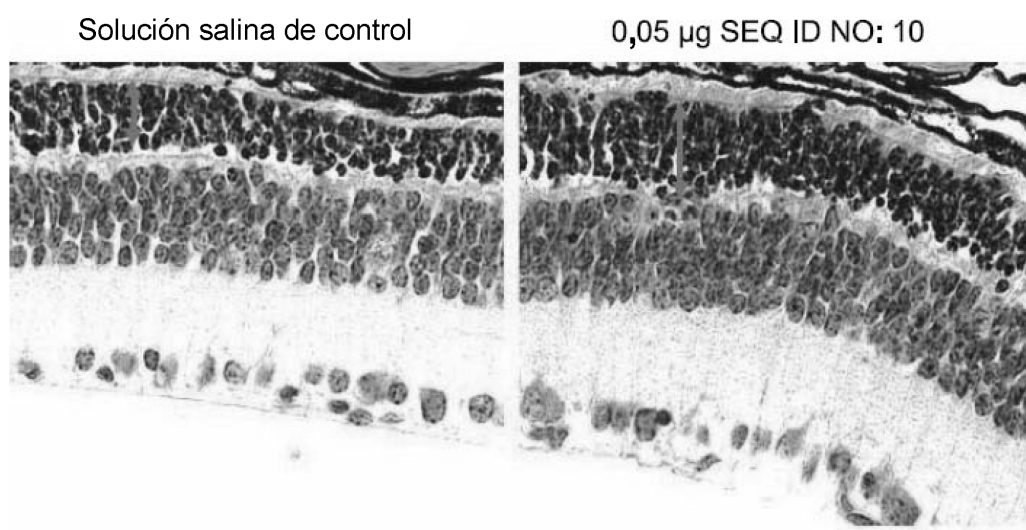


Fig. 8

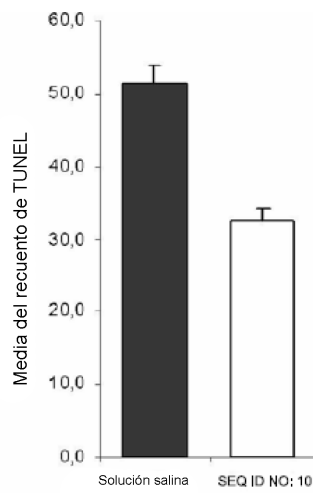


Fig. 9A

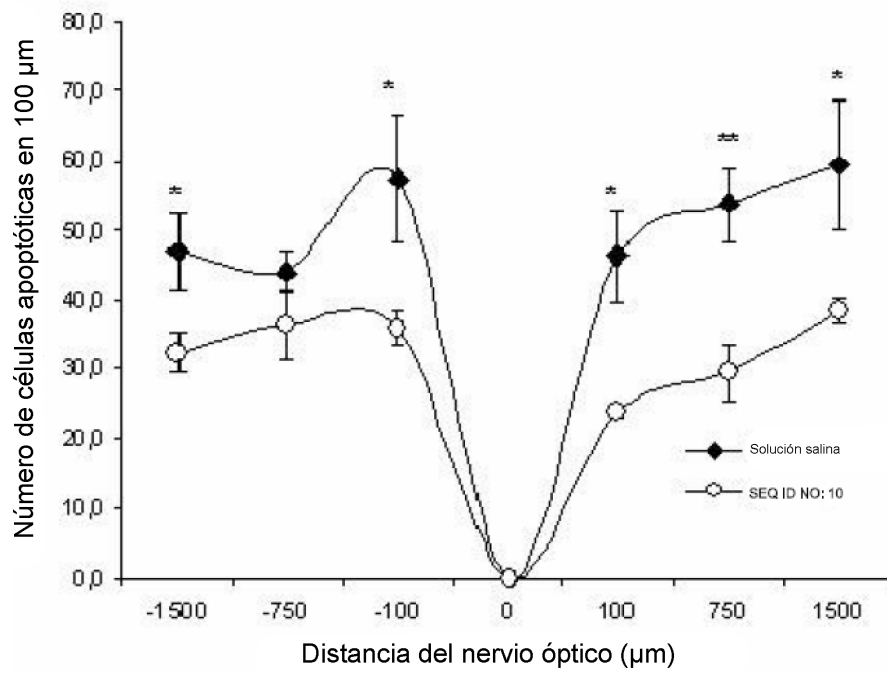


Fig. 9B

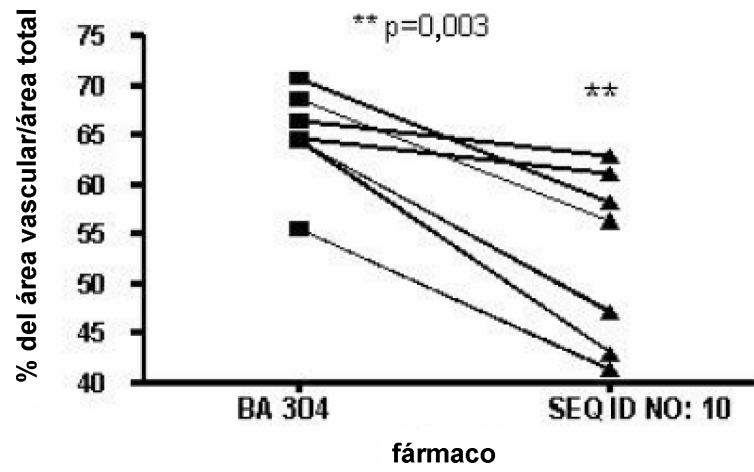


Fig. 10

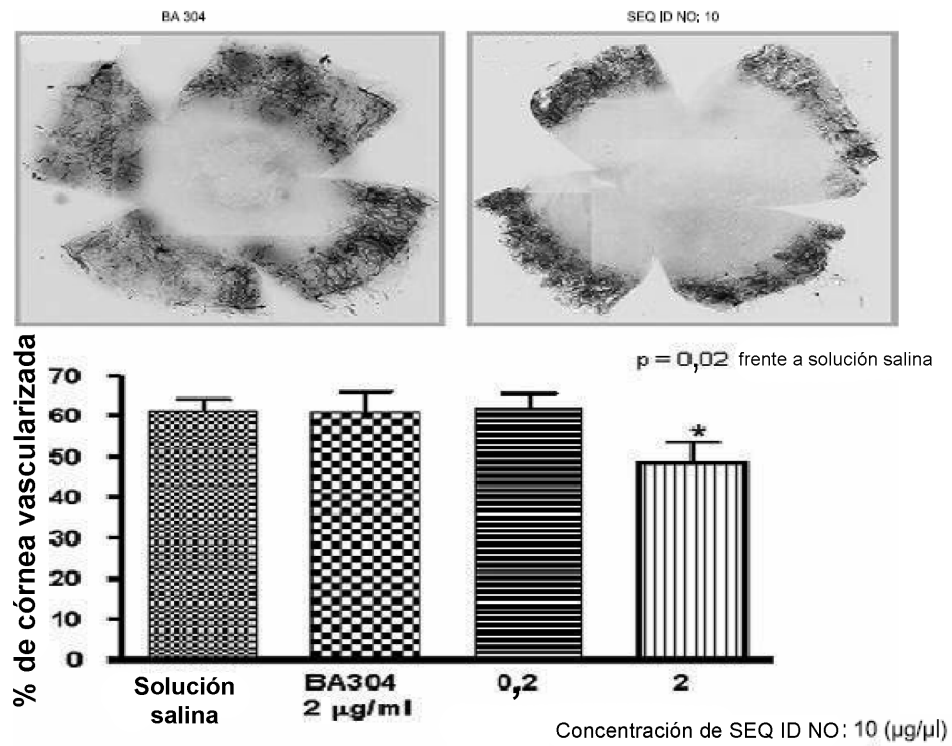


Fig. 11

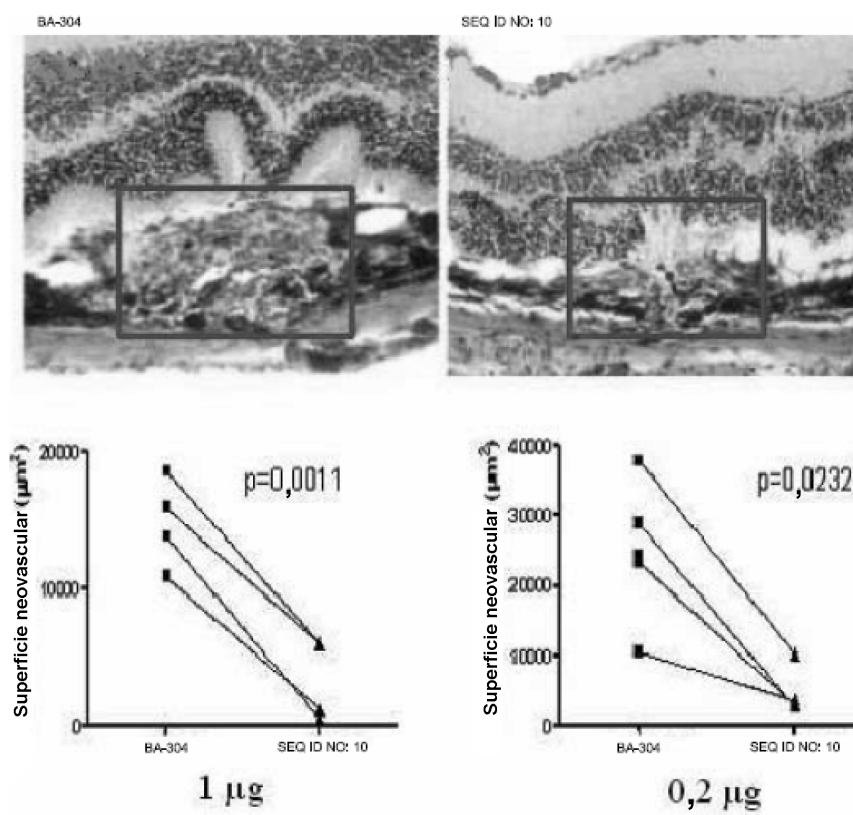


Fig. 12

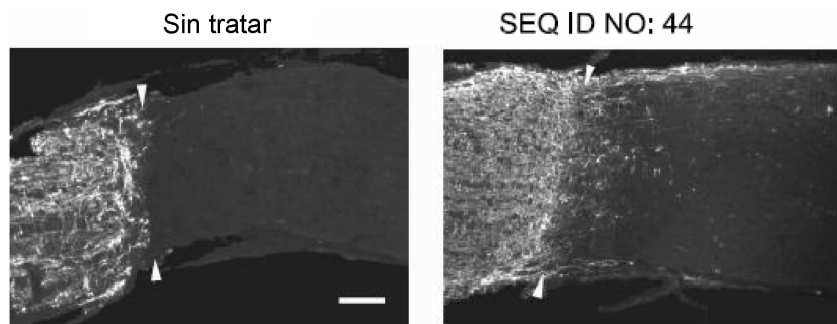


Fig. 13A

Fig. 13B

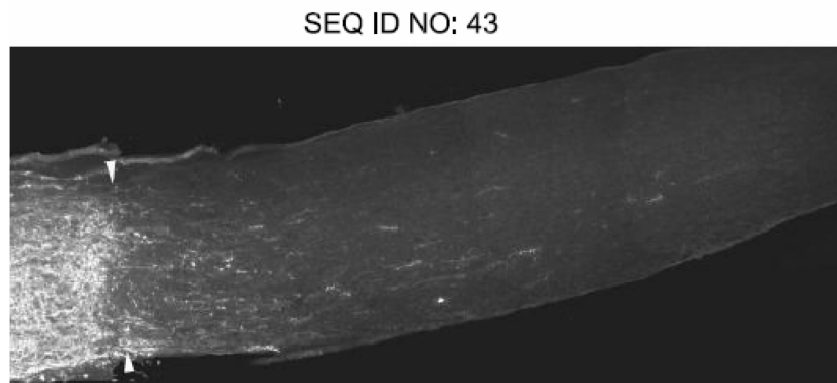


Fig. 13C

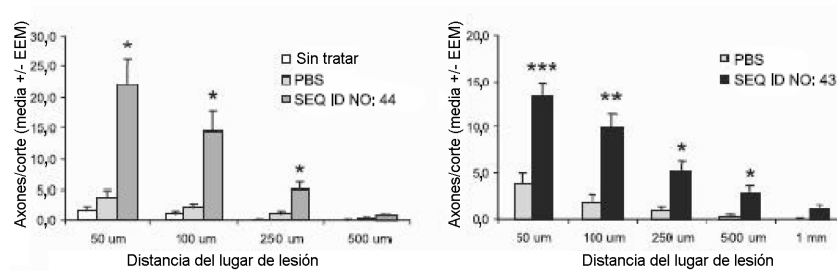


Fig. 13D

Fig. 13E

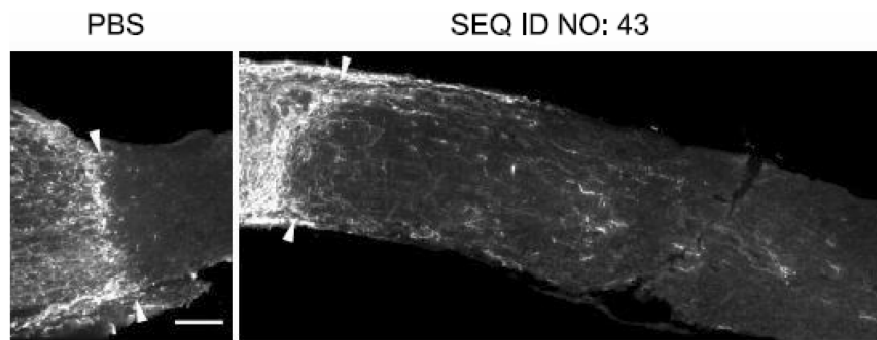


Fig. 14A

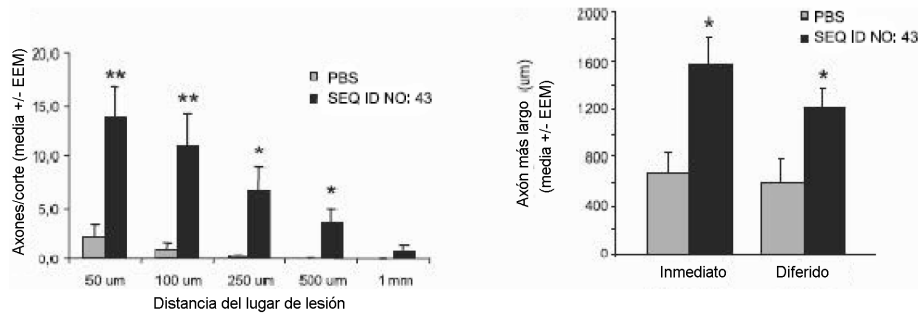


Fig. 14B

Fig. 14C

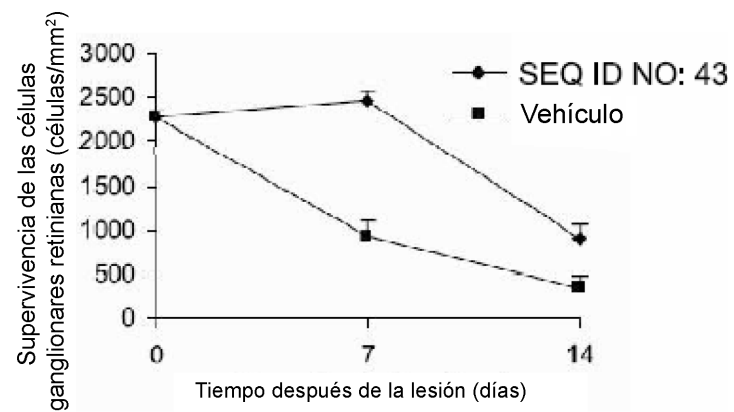


Fig. 15

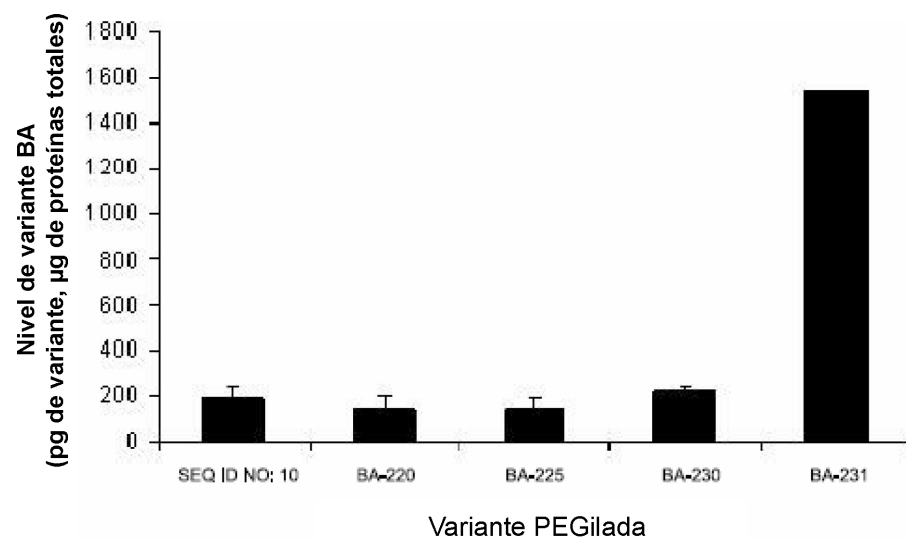


Fig. 16



Fig. 17

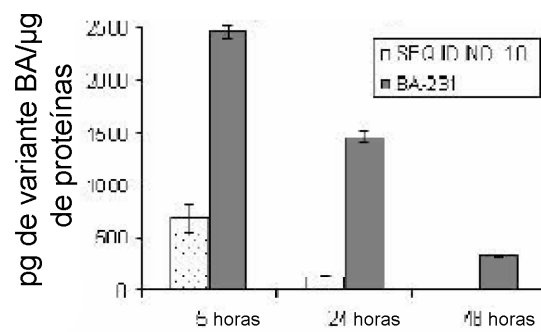


Fig. 18

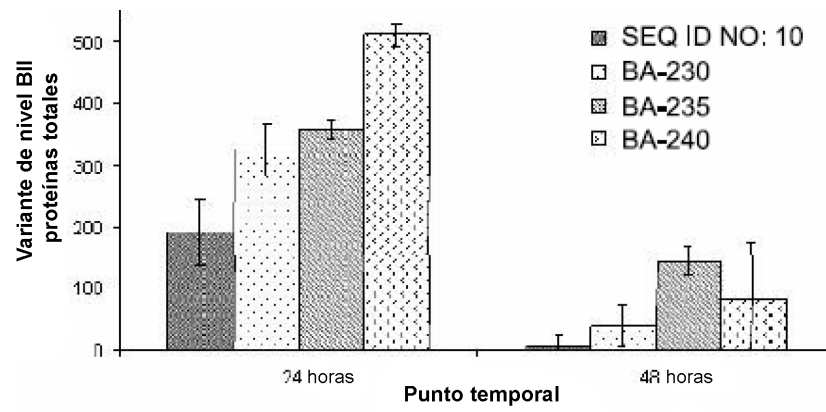


Fig. 19

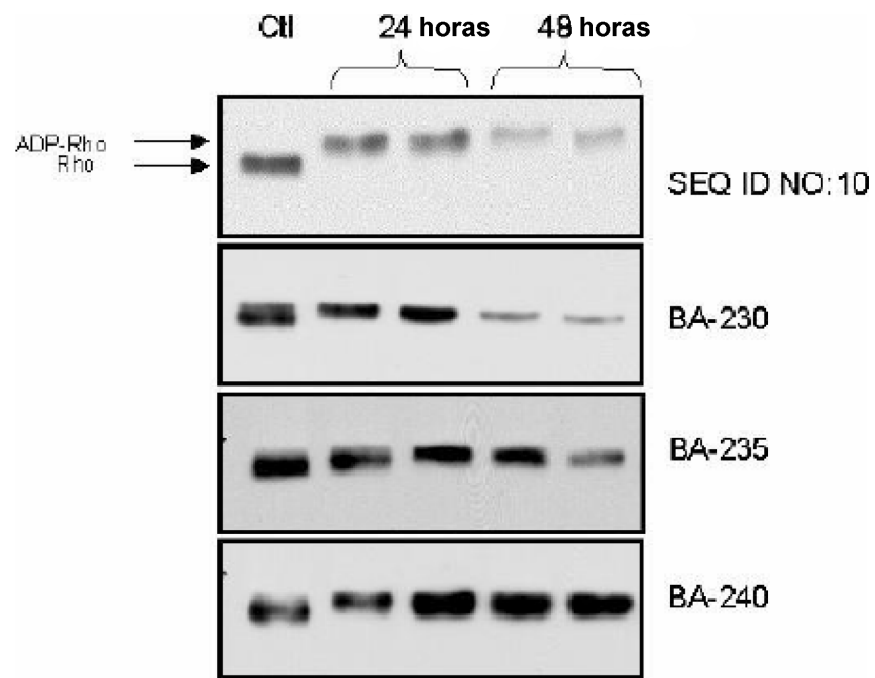


Fig. 20

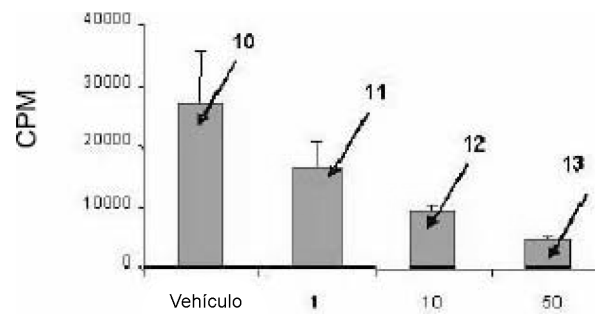


Fig. 21

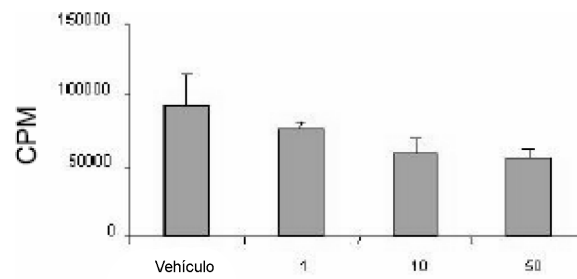


Fig. 22

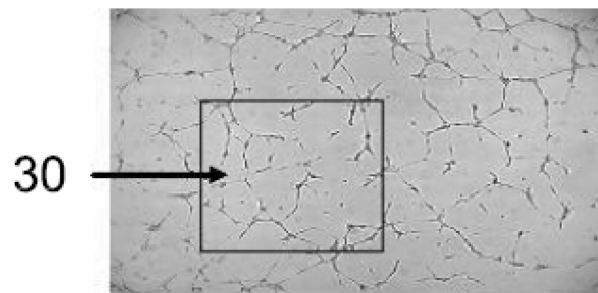


Fig. 23A

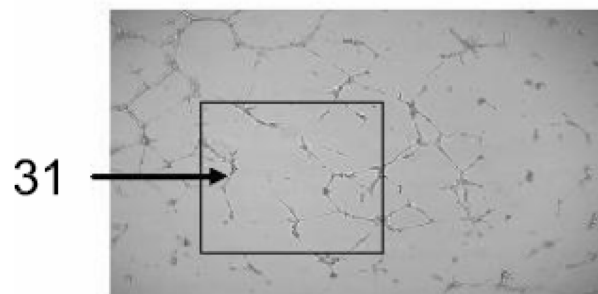


Fig. 23B

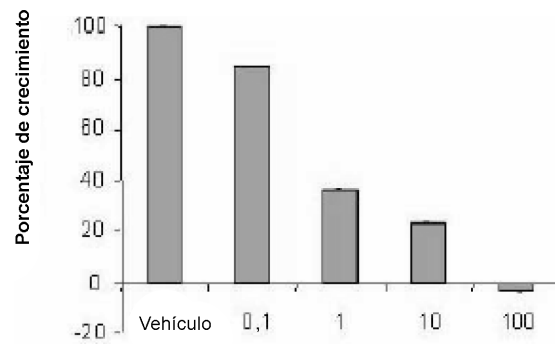


Fig. 24

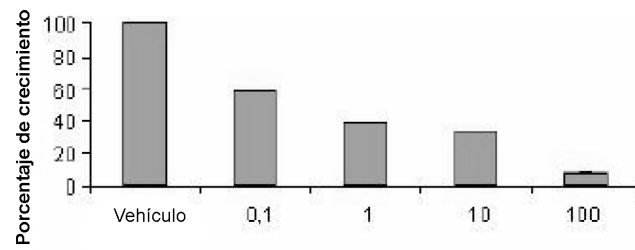


Fig. 25

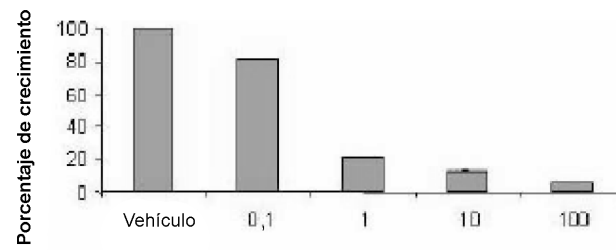


Fig. 26

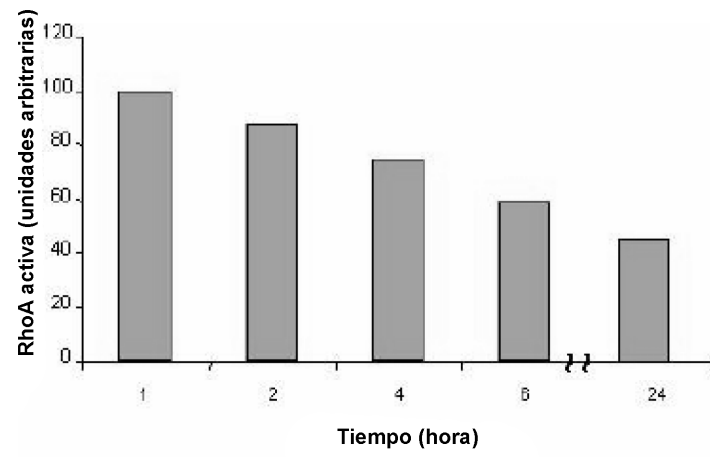


Fig. 27

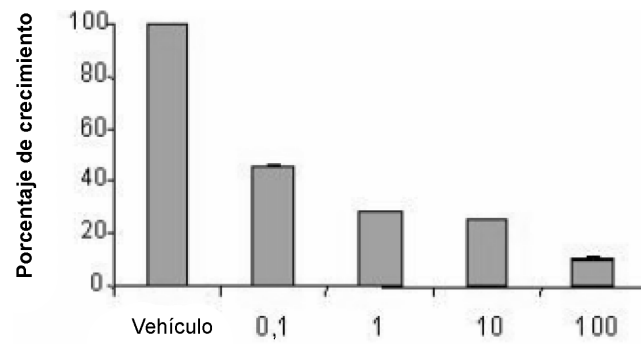


Fig. 28

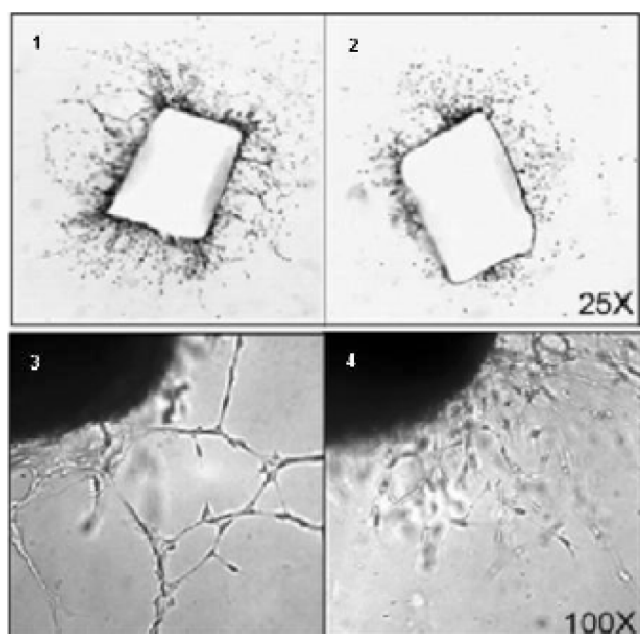


Fig. 29A

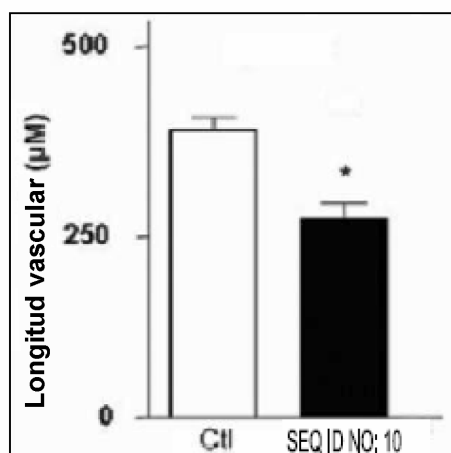


Fig. 29B

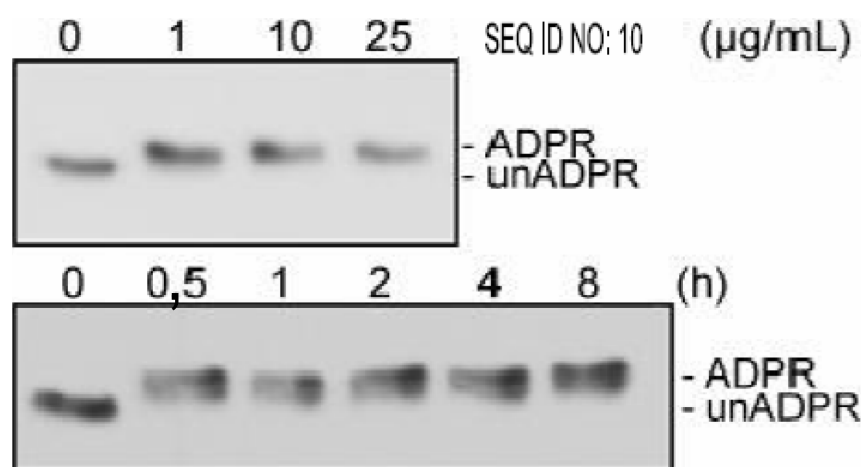


Fig. 30

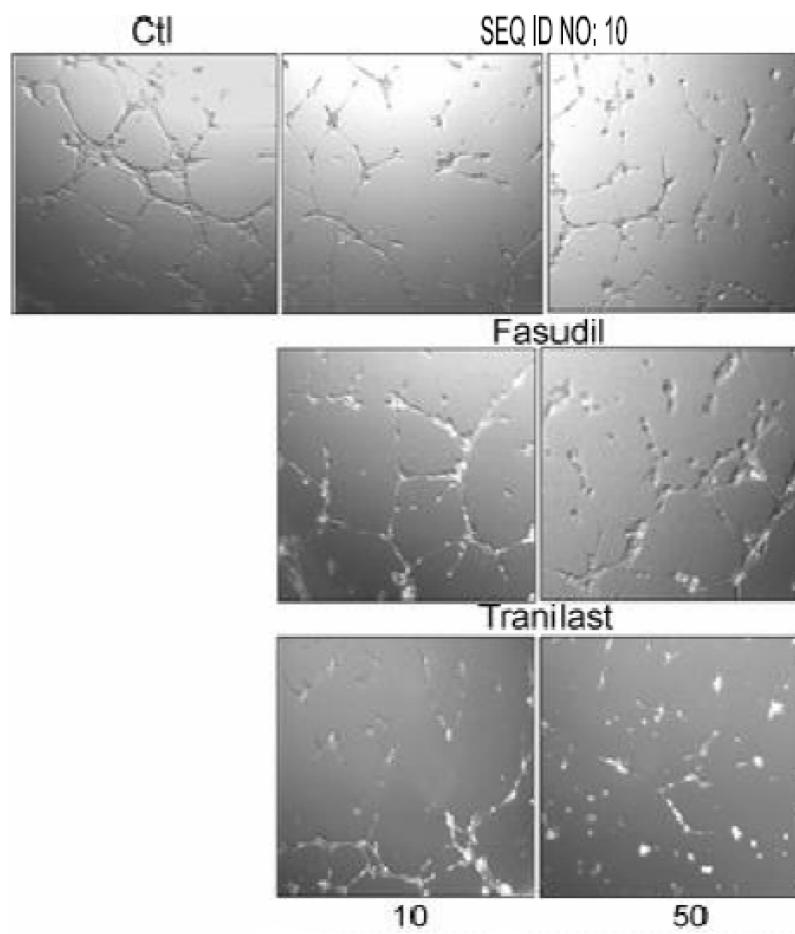


Fig. 31A

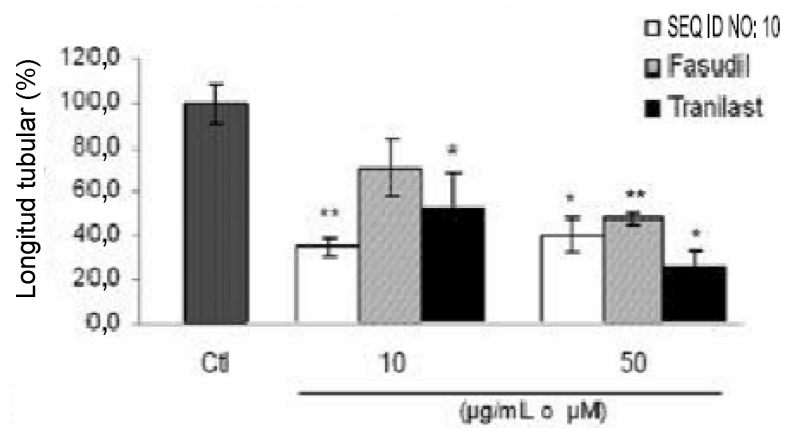


Fig. 31B

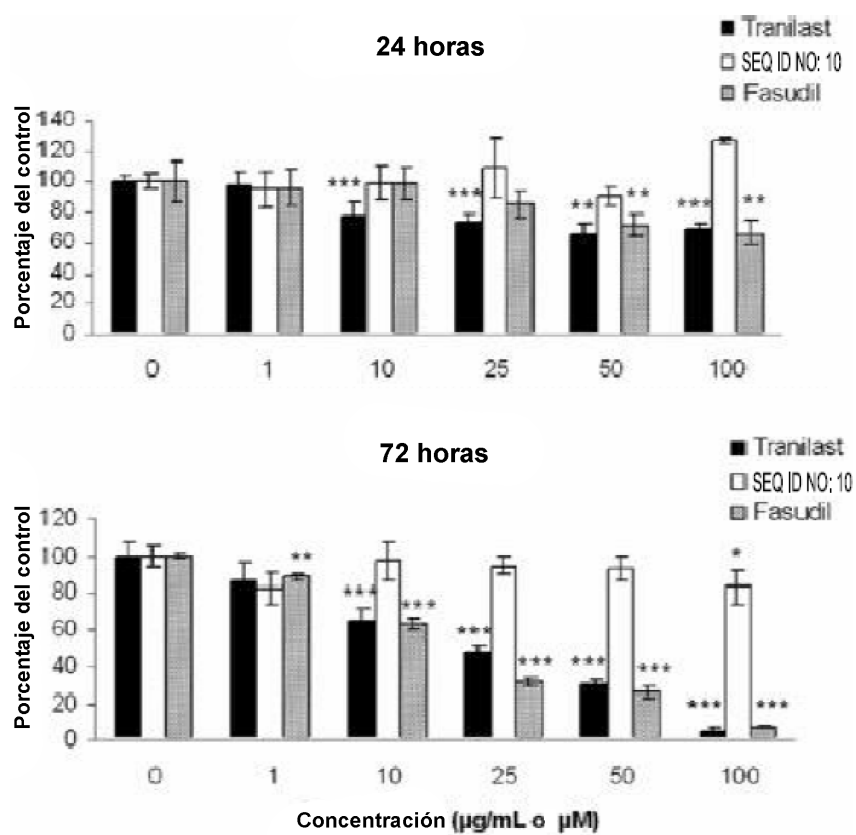


Fig. 32

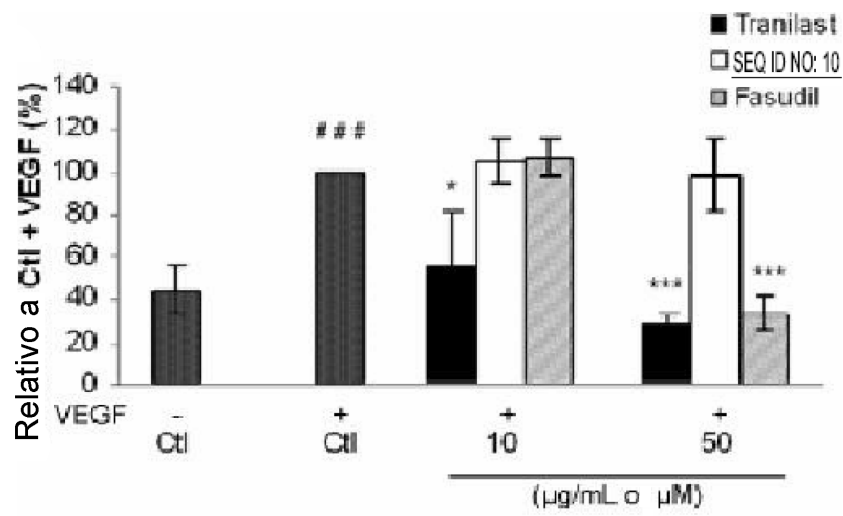


Fig. 33A

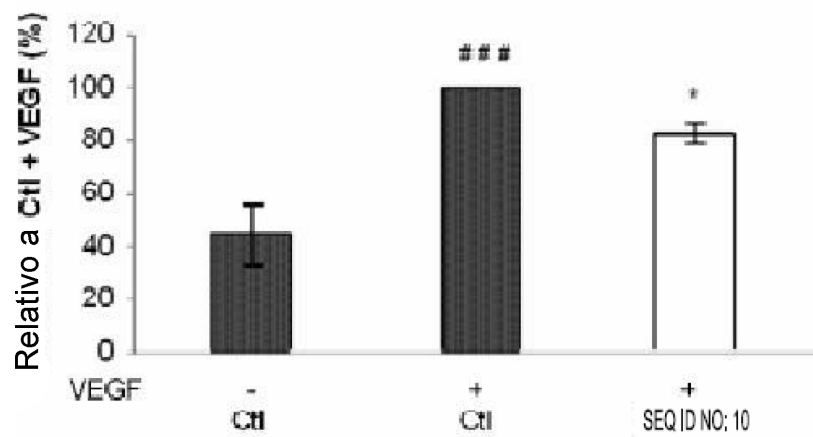


Fig. 33B

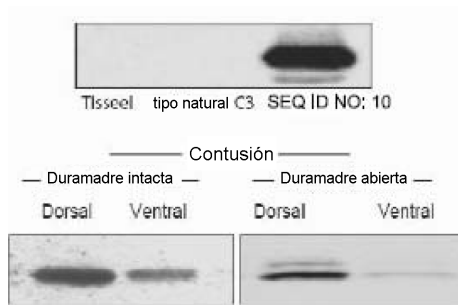


Fig. 34A

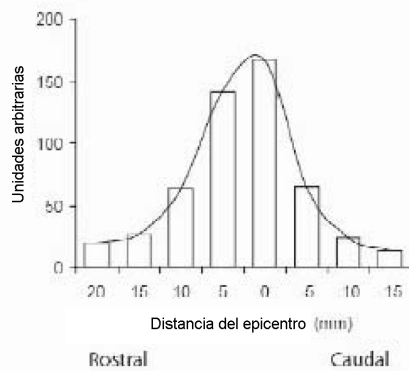


Fig. 34B

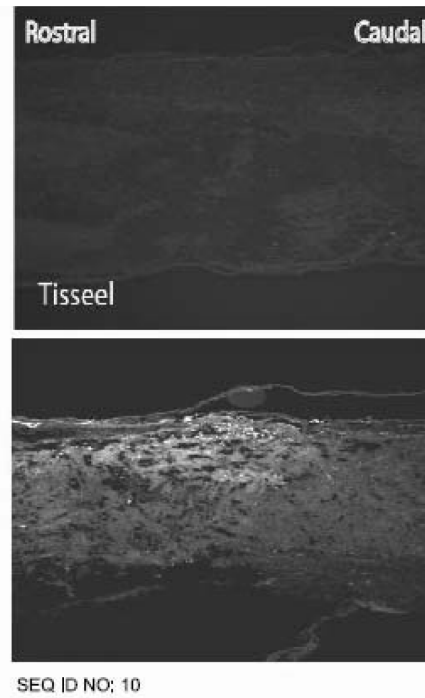


Fig. 34C

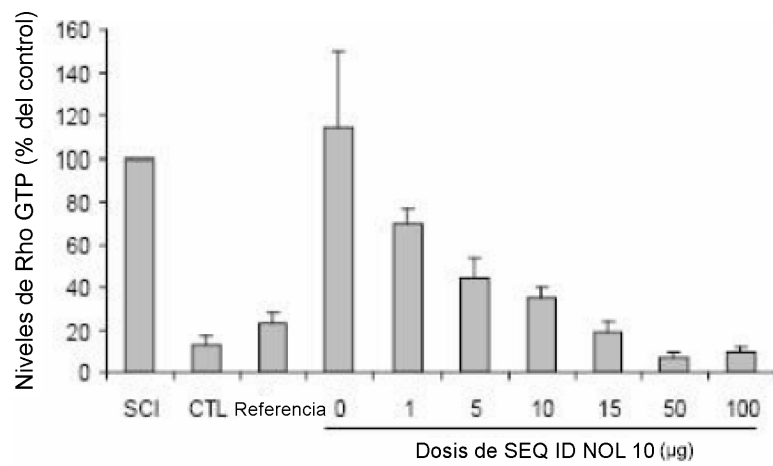


Fig. 35A

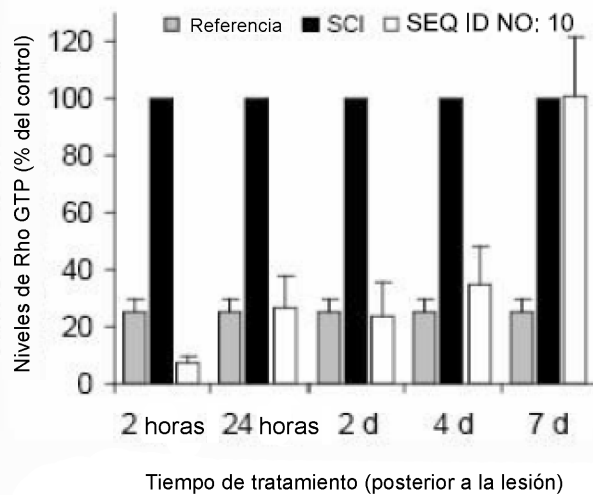


Fig. 35B

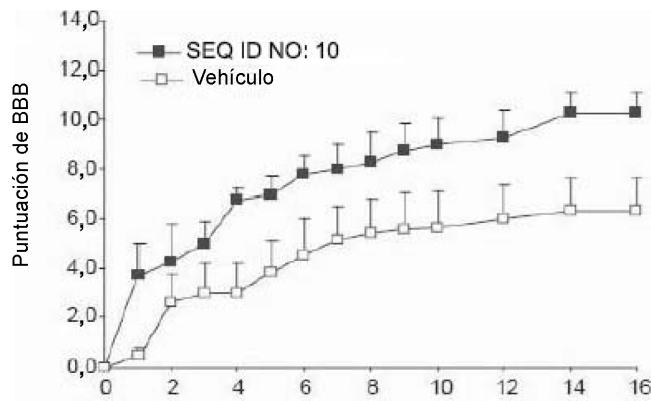


Fig. 36A

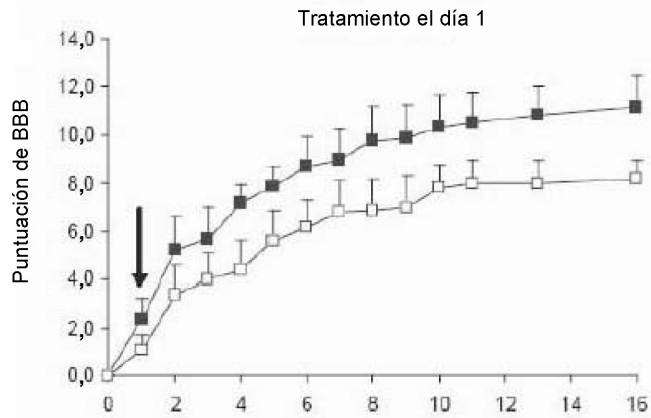


Fig. 36B

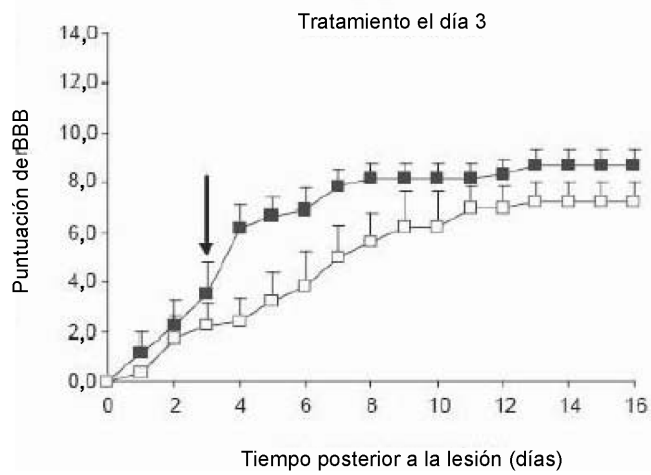


Fig. 36C

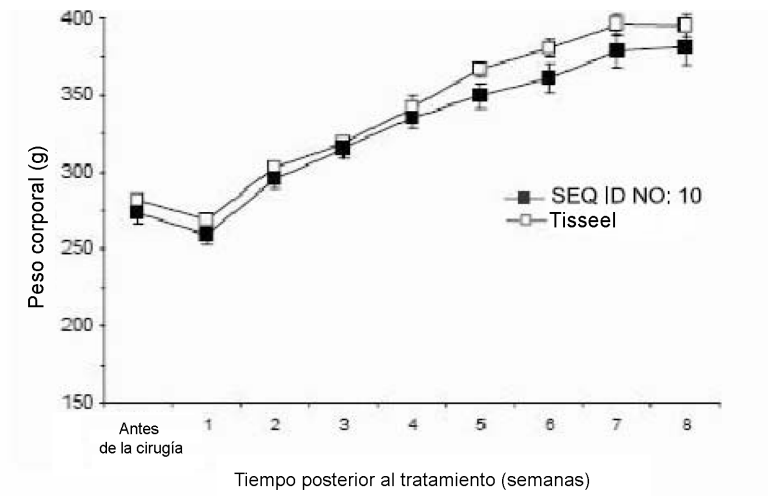


Fig. 37A

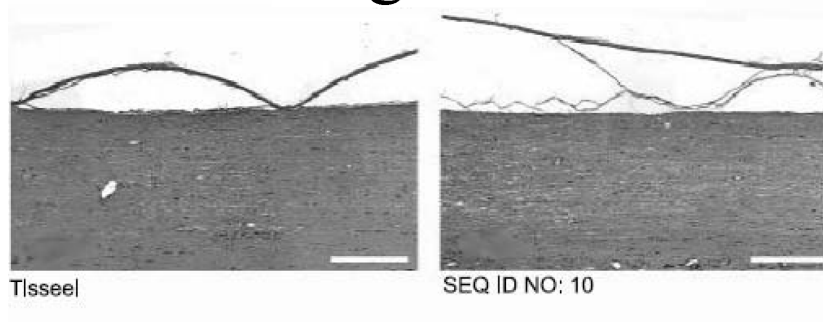


Fig. 37B

Fig. 37C

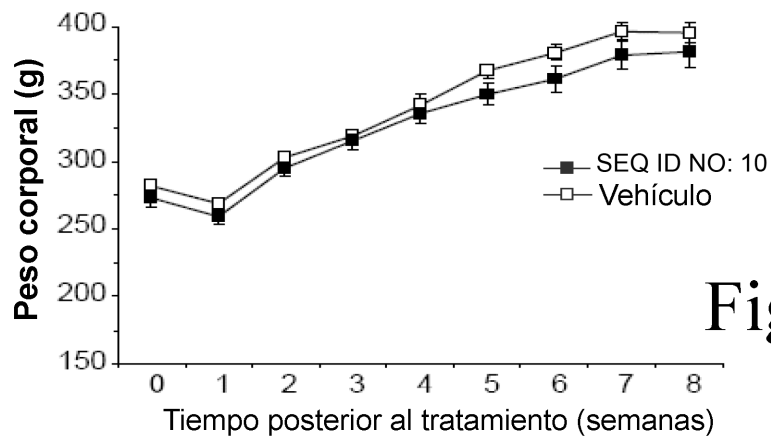


Fig. 38A

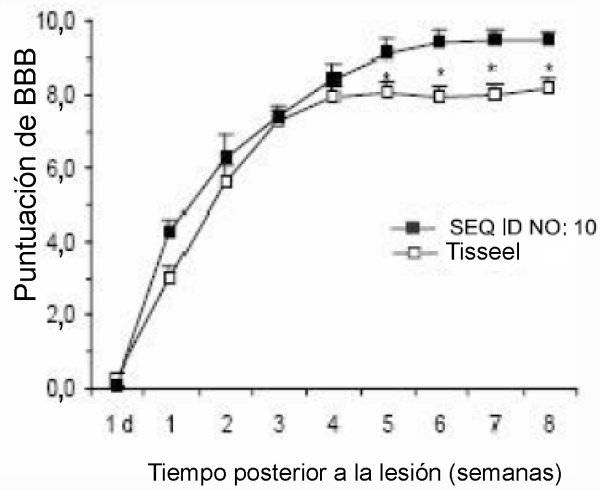


Fig. 38B

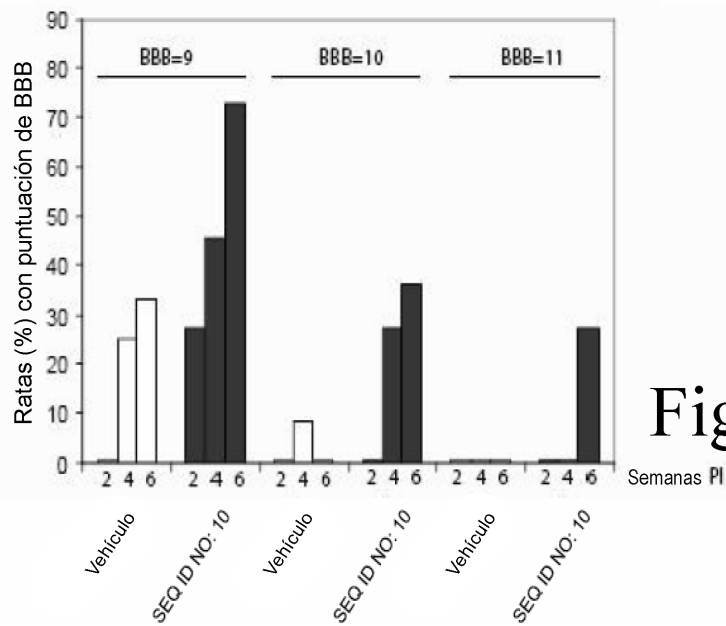


Fig. 38C

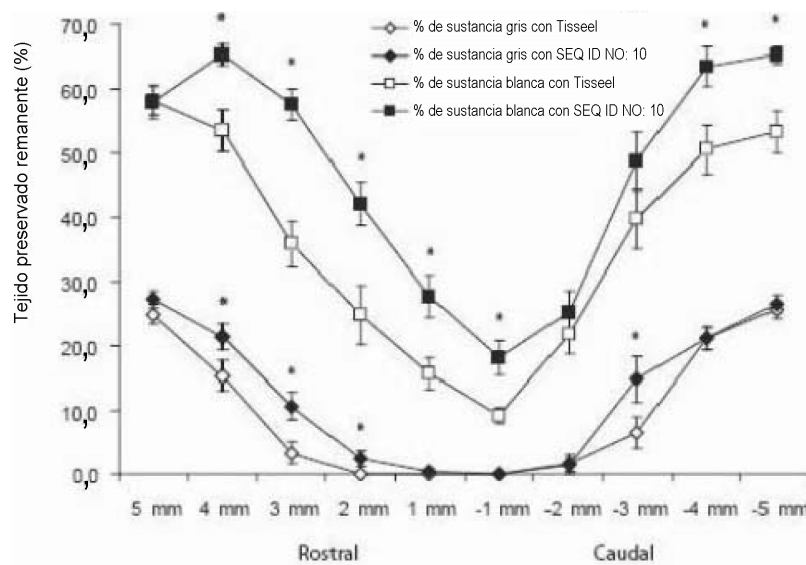


Fig. 39A

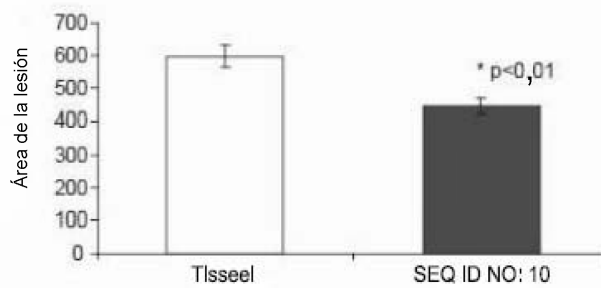


Fig. 39B

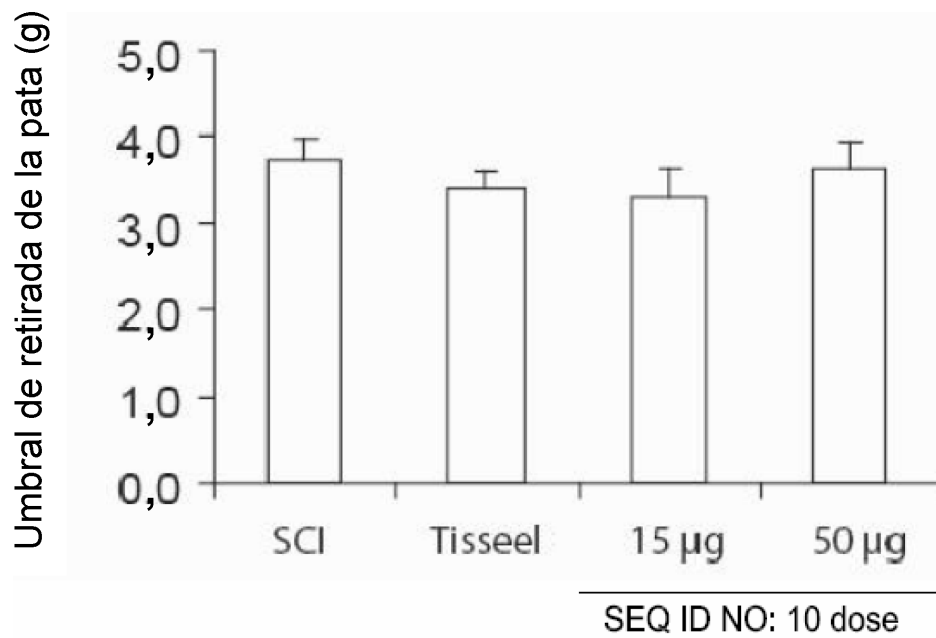


Fig. 40

Fig. 41

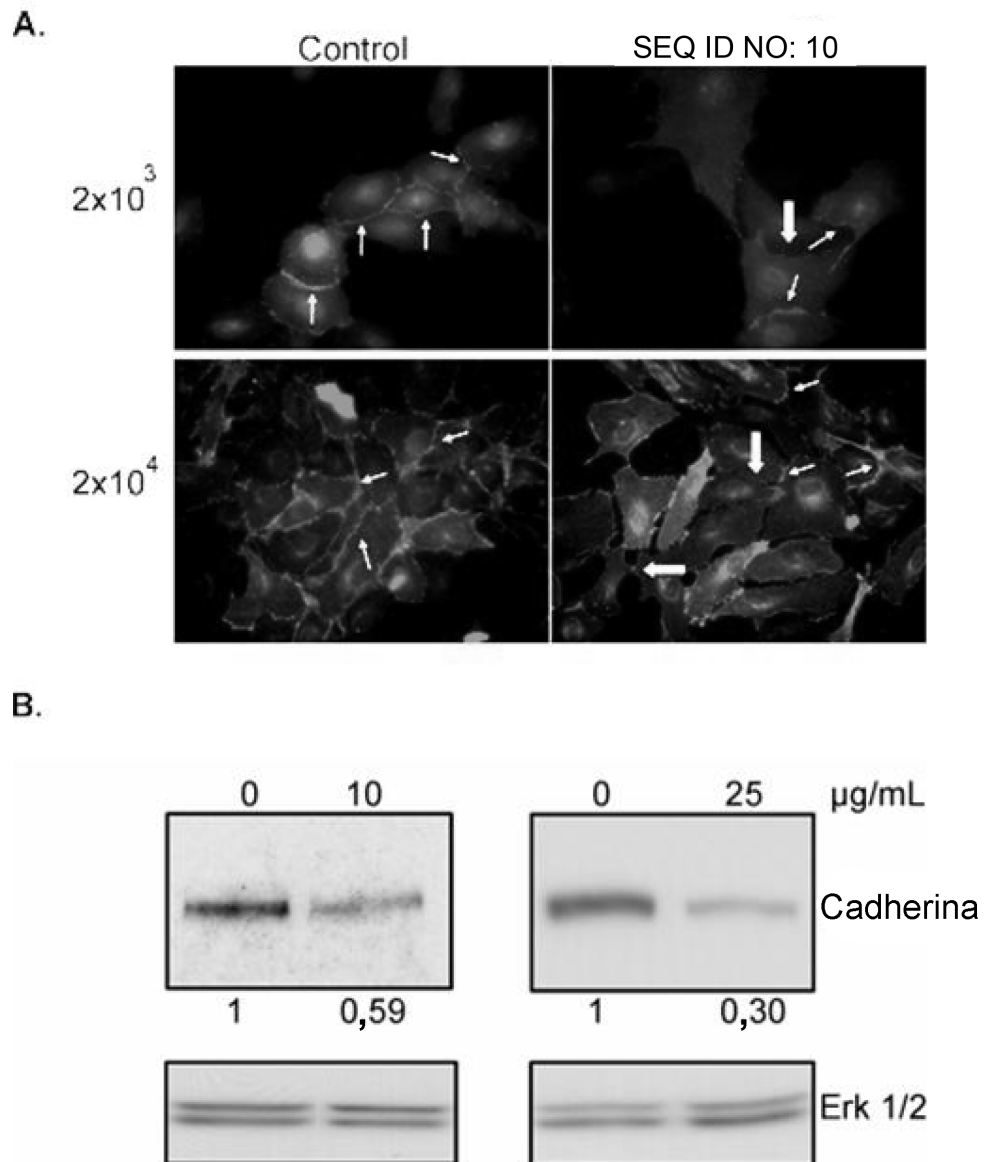
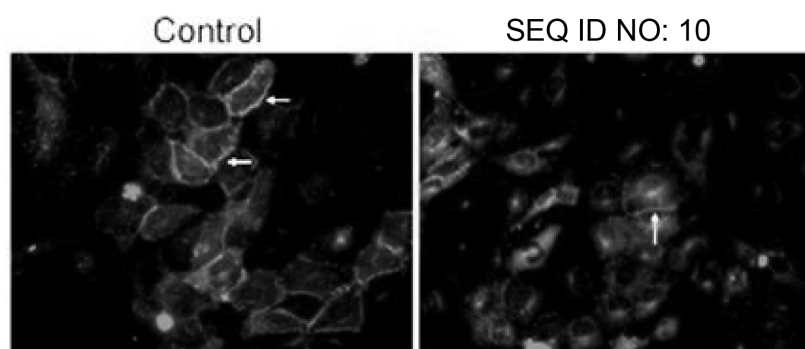


Fig. 42

A.



B.

