

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 497 641**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2007 E 12178894 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2548578**

54 Título: **Dirección a la regulación de VEGF-B de transportadores de ácidos grasos para modular enfermedades humanas**

30 Prioridad:

17.05.2006 US 801549 P

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

23.09.2014

73 Titular/es:

**THE LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER
RESEARCH (100.0%)
605 Third Avenue
New York, NY 10158, US**

72 Inventor/es:

ERIKSSON, ULF

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 497 641 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

Dirección a la regulación de VEGF-B de transportadores de ácidos grasos para modular enfermedades humanas

5 **Antecedentes de la invención**

Las proteínas de transporte de ácidos grasos (FATP) son proteínas unidas a membrana que transportan ácidos grasos libres (FFA) a través de la membrana plasmática, y son por lo tanto responsables de la captación celular de FFA del espacio extracelular. Chiu *et al.*, indican que la sobreexpresión transgénica de FATP1 en el corazón conduce a un aumento de la captación de lípidos, lipotoxicidad y miopatía cardiaca (Cira Res., 96: 225-233, 2005). Chiu *et al.* ilustran la necesidad crítica de una captación controlada de FFA en los tejidos. Los FFA acumulados que no se oxidan de forma apropiada pueden ser tóxicos para las células.

La familia de FATP de proteínas comprende seis miembros (FATP 1-6) con patrones de expresión definidos. Dos de los tejidos más relevantes para considerar con respecto a metabolismo de ácidos grasos y resistencia a insulina son tejido adiposo y músculo esquelético. La expresión de FATP1 es alta en ambos tejidos, mientras que FATP4 es mucho menor (siendo su sitio principal de expresión el intestino delgado), pero ambos se han ligado a la resistencia a insulina y parámetros asociados. FATP1 se ha ligado a resistencia a insulina y se expresa en tejido adiposo y músculo esquelético (Kim *et al.*, J. Clin. Invest., 113: 756- 763, 2004). FATP2 está localizada en peroxisomas del hígado y riñón y está implicada en la activación tanto de ácidos biliares como de ácidos grasos (Mihalik *et al.*, J. Biol. Chem., 277: 24771-24779, 2002). FATP4 también se ha ligado a parámetros relacionados con la resistencia a insulina y se expresa en los intestinos, hígado y tejido adiposo. FATP 2, 3 y 5 se expresan en el hígado y riñón. FATP6 se expresa casi exclusivamente en el corazón (Gimeno *et al.*, J. Biol. Chem., 278: 16039-16044, 2003).

También se ha sugerido que la acumulación de lípidos en tejidos particularmente de músculo esquelético, induce síndrome de resistencia a insulina (también conocido como el síndrome metabólico diabético). Se ha mostrado que FATP4 por análisis de enlace es un gen candidato en el síndrome de resistencia a insulina caracterizado por dislipidemia, hipertensión y el estado procoagulante (Gertow *et al.*, Clin. Endocrinol. Metab., 89: 392-399, 2004). De forma similar, FATP1 se ha ligado a lipemia postprandial elevada y alteraciones en la distribución de tamaños de partículas LDL (Gertow *et al.*, Atheroscler., 167: 265-273, 2003). Puede encontrarse una revisión de proteínas de transporte de ácidos grasos y su papel en la resistencia a insulina en Fisher *et al.*, Curr. Opin. Lipidol. 16: 173-178, 2005. La acumulación aberrante de lípidos está estrechamente relacionada con efectos lipotóxicos perjudiciales, resistencia a la insulina, alteraciones del metabolismo tanto de lípidos como de hidratos de carbono y otras características del síndrome metabólico (Unger *et al.*, Endocrinol., 144: 5159- 5164, 2004). Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos materiales y métodos para modular la expresión de FATP y/o actividad *in vivo*, para profilaxis o terapia de diversas enfermedades y afecciones que están influidas por las FATP.

La presente invención surge de estudios descritos adicionalmente en el presente documento que ligan de nuevo el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular B (VEGF-B) con la modulación de FATP.

La Solicitud de Patente publicada de los Estados Unidos 2006/088882A1 (Jain et al) propone el uso de anticuerpos para disminuir la actividad del receptor 1 de VEGF para su uso en la disminución del peso corporal total y el porcentaje de grasa corporal en un mamífero. Sin embargo, no proporciona indicios de dirigir específicamente VEGF-B para el tratamiento de cualquier forma de dislipidemia. De hecho, ha habido incertidumbre anteriormente acerca del papel de VEGF-B. Por el contrario, el inventor ha relacionado ahora VEGF-B con la expresión de componentes de la maquinaria de transporte de ácidos grasos y ha demostrado que ratones deficientes en VEGF-B tienen menos gotas lipídicas en el tejido cardíaco en comparación con ratones normales, lo que sugiere un papel de VEGF-B en el control de la captación de lípidos del torrente sanguíneo, por ejemplo, como ahora se reivindica en el presente documento.

50 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un inhibidor de VEGF-B para su uso en el tratamiento de una dislipidemia en un sujeto humano, incluyendo hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia, en donde dicho agente se selecciona de entre:

- (a) un anticuerpo anti VEGF-B o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y
- (b) un oligonucleótido antisentido que inhibe la transcripción o la traducción de VEGF-B, expresado opcionalmente a partir de un vector de expresión.

Dicho uso incluye además opcionalmente una o más etapas de controlar uno o más parámetros en el sujeto, para confirmar la seguridad y/o eficacia del tratamiento y/o para optimizar la dosificación. Por lo tanto, por ejemplo, el uso comprende además opcionalmente controlar marcadores lipídicos en una muestra biológica que comprende un tejido o fluido del sujeto. Los tejidos ejemplares incluyen biopsias de cualquier órgano (hígado, riñón, columna, corazón, vaso, intestino, etc.) o piel o pelo, por ejemplo. Los fluidos ejemplares incluyen sangre, líquido cefalorraquídeo, semen, saliva u otras secreciones o excreciones.

Los anticuerpos que inmunorreaccionan (se unen) con VEGF-B (también conocidos como anticuerpos de VEGF-B o anticuerpos anti VEGF-B); para su uso de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos que se unen a múltiples isoformas de VEGF-B, así como anticuerpos que muestran unión preferente o especificidad por una isoforma, tal como un anticuerpo de VEGF-B₁₆₇ o un anticuerpo de VEGF-B₁₈₆.

Las composiciones adecuadas para administración incluyen en la puesta en práctica de la invención uno o más componentes adicionales tales como diluyentes, adyuvantes, vehículos, conservantes, saporíferos farmacéuticamente aceptables, u otros aditivos convencionales descritos en el presente documento y/o conocidos en el campo.

Adicionalmente, un inhibidor de VEGF-B como se ha analizado anteriormente puede ser para su uso en coterapia. La administración de múltiples compuestos terapéuticos puede ser simultánea (en mezcla o separados), secuencial, o separada en el tiempo durante un periodo de tratamiento.

Descripción detallada de la invención

El inventor ha demostrado que varias FATP y LPL endoteliales están regulados negativamente en animales deficientes en VEGF-B, y por el contrario algunas FATP y LPL están regulados positivamente en condiciones de sobreexpresión de VEGF-B. Estos datos sugieren que VEGF-B modula la expresión de FATP y LPL, y de este modo tanto la hidrólisis de triglicéridos en situación, así como la captación de FFA del torrente sanguíneo a diversos parénquimas. El análisis directo de la acumulación de lípidos en corazones de ratón normales y deficientes en VEGF-B por tinción con Oil Red O han verificado esta posibilidad, ya que se visualizan gotas lipídicas abundantes en secciones tisulares de animales normales, mientras que las secciones tisulares de animales deficientes en VEGF-B contienen muy pocas, si contienen alguna, gotas lipídicas. Se postula que la expresión controlada por VEGF-B de FATP y expresión de LPL tienen implicaciones en varias enfermedades importantes como cáncer, diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares y enfermedades degenerativas neurológicas, como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

En cáncer, la expresión (o sobreexpresión) de VEGF-B puede controlar el estado de energía de las células tumorales proporcionando combustible de alta energía como FFA, y afectando de este modo a la velocidad de crecimiento, así como otros parámetros fisiológicos de tumores (tanto células tumorales como estroma). Además, VEGF-B puede tener un papel en el síndrome de debilitamiento muscular, denominado caquexia, que afecta aproximadamente al 50% de todos los pacientes con cáncer y se ve frecuentemente en pacientes con insuficiencias cardíacas o renales. En pacientes con caquexia, se postula que la terapia con VEGF-B para mejorar la captación de FFA tiene un valor terapéutico.

En diabetes, VEGF-B puede modular la captación de lípidos en sangre a las células endoteliales, y la expresión aberrante (especialmente sobreexpresión) puede dar como resultado dislipidemia, una afección hallada en muchos pacientes diabéticos como parte del síndrome metabólico. En estados resistentes a insulina tales como obesidad, el metabolismo de ácidos grasos y la homeostasis están claramente alterados. La eliminación de ácidos grasos y capacidad de almacenamiento en tejido adiposo están alterados, y los ácidos grasos pueden acumularse en la circulación y en tejidos no adiposos tales como músculo esquelético del hígado en forma de triacilglicerol, diacilglicerol, ceramidas y acil-CoA grasos. Dicha acumulación de lípidos ectópicos está estrechamente relacionada con efectos lipotóxicos deletéreos, resistencia a insulina, alteraciones del metabolismo tanto de lípidos como de carbohidratos y otras características del síndrome metabólico (Unger *et al.*, *Endocrinol.*, 144: 5159-5164, 2004).

En enfermedad cardiovascular, se sabe que VEGF-B estimula la revascularización después de un infarto de miocardio (véase Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N°: 2003-0008824) y VEGF-B puede tener este efecto estimulando la captación de FFA al miocardio y estimulando indirectamente la revascularización proporcionando un mejor estado de energía en el miocardio.

En enfermedades neurodegenerativas como enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson, pruebas crecientes sugieren que parte de la patofisiología de estas enfermedades es un defecto cerebrovascular que puede manifestarse en aporte nutricional reducido a las neuronas, y posterior muerte neuronal. Dado que VEGF-B se expresa abundantemente en el cerebro y puede ser responsable de al menos un aspecto de la captación de nutrientes a las células, es decir, FFA, se postula que la pérdida, o regulación negativa de VEGF-B puede alterar la captación de FFA en las neuronas, y provocar de este modo insuficiencia nutricional de las neuronas que conduce a muerte neuronal. Otras enfermedades neuronales, como ALS, también pueden estar causadas por un defecto cerebrovascular (Storkebaum *et al.*, *Nat. Neurosci.*, 8: 85-92, 2005; Storkebaum *et al.*, *Bioessays*, 26: 943-943, 2004; Storkebaum *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 113: 14-18, 2004).

El factor de crecimiento endotelial vascular B (VEGF-B) se expresa abundantemente en varios órganos con una alta renovación metabólica, como el corazón, músculo esquelético, grasa parda, córtex cerebral y en células parietales secretoras gástricas. Se ha documentado bien que todos estos órganos y células usan ácidos grasos libres (FFA) como su principal fuente para la producción de energía en condiciones fisiológicas normales. La fuente final de FFA

para la mayoría de las células es el plasma en el que la albúmina del suero es la proteína de transporte principal. El FFA derivado de plasma tiene que atravesar la pared de los vasos sanguíneos para usarse por las células parenquimales que requieren energía del corazón, músculos, grasa parda, cerebro, etc. (Van der Vusse *et al.*, Adv. Exp. Med. Biol., 441: 181-191, 1998).

5 VEGF- B se une al receptor de VEGF 1 (VEGFR- I) que se expresa principalmente por células endoteliales de la pared de los vasos sanguíneos. Los animales deficientes en VEGF-B son principalmente normales, lo que sugiere que VEGF-B no tiene un papel importante en el desarrollo del sistema vascular durante la embriogénesis, ni tiene un papel esencial en el mantenimiento del sistema vascular en animales adultos. En ciertas situaciones de tensión (por ejemplo, después de un infarto de miocardio inducido de forma experimental), sin embargo, los animales deficientes en VEGF-B no se recuperan ni revascularizan la zona infartada del corazón tan bien como los ratones normales (Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2005/0214280).

15 El término "VEGF-B" como se usa en el presente documento abarca los polipéptidos identificados como VEGF-B en la Patente de Estados Unidos N° 6.331.301, así como la Solicitud de Estados Unidos publicada N° 2003/0008824. Un ADNc de VEGF-B humano y secuencia de aminoácidos deducida se exponen en la SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente.

20 VEGF- B comprende, pero sin limitación, las isoformas tanto del VEGF- B₁₆₇ (SEC ID N°: 3) como de VEGF- B₁₆₇ de ratón (SEC ID N°: 7) y/o VEGF- B₁₈₆ humano (SEC ID N°: 4) y VEGF- B₁₈₆ de ratón (SEC ID N°: 8) o un fragmento o análogo de las mismas que tenga la capacidad de unirse a VEGFR-I. Los análogos activos pueden mostrar al menos 85% de identidad de secuencia, preferentemente al menos 90% de identidad de secuencia, particularmente preferentemente al menos 95% de identidad de secuencia, y especialmente preferentemente al menos 98% de identidad de secuencia con los polipéptidos de VEGF-B naturales, como se determina por análisis de BLAST. La sustancia activa típicamente incluirá la secuencia de aminoácidos Pro- Xaa- Cys- Val- Xaa- Xaa- Xaa- Arg- Cys- Xaa- Gly-Cys-Cys (donde Xaa puede ser cualquier aminoácido) (SEC ID N°: 9) que es característica de VEGF-B. Los ejemplos describen ensayos *in vitro* e *in vivo* para confirmar que cualquier análogo de VEGF-B seleccionado tenga actividad moduladora de FATP. También se contempla que neuropilina-1 tiene actividad moduladora de FATP ya que es un correceptor para la unión de VEGF-B con VEGFR-1.

30 **A. Preparación de ADN que codifica polipéptidos de VEGF-B**

Puede obtenerse fácilmente una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de VEGF-B de una diversidad de maneras, incluyendo, sin limitación, síntesis química, exploración de biblioteca de ADNc o genómica, exploración de biblioteca de expresión y/o amplificación por PCR de ADNc. Estos métodos y otros útiles para aislar dicho ADN se exponen, por ejemplo, en Sambrook, *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989), en Ausubel, *et al.*, eds., "Current Protocols In Molecular Biology," Current Protocols Press (1994), y en Berger y Kimmel, "Methods In Enzymology: Guide To Molecular Cloning Techniques," vol. 152, Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (1987). En una realización, las secuencias de ácido nucleico que codifican VEGF-B son secuencias de mamífero. Específicamente, las secuencias de ácido nucleico que codifican VEGF-B son humanas y de otros primates.

45 Puede conseguirse síntesis química de una molécula de ácido nucleico de VEGF-B usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como los expuestos por Engels, *et al.*, Angew. Chem. Intl. Ed., 28: 716-734 (1989). Estos métodos incluyen, entre otros, los métodos de síntesis de ácido nucleico de fosfotriéster, fosforamidita y H-fosfonato. Típicamente, la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de VEGF-B de longitud completa será de varios cientos de pares de bases (pb) o nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos mayores de aproximadamente 100 nucleótidos de longitud pueden sintetizarse como varios fragmentos, siendo cada fragmento de hasta aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. El fragmento puede después ligarse, como se describe posteriormente, para formar un ácido nucleico de longitud completa que codifique el polipéptido de VEGF-B. Un método es la síntesis apoyada por polímeros usando química de fosforamidita convencional.

50 Como alternativa, el ácido nucleico que codifica un polipéptido de VEGF-B puede obtenerse explorando una biblioteca de ADNc apropiada preparada de una o más fuentes tisulares que expresen el polipéptido, o una biblioteca genómica de cualquier subespecie. La fuente de la biblioteca genómica puede ser cualquier tejido o tejidos de cualquier mamífero u otra especie que se cree que alberga un gen que codifica VEGF-B o un homólogo de VEGF-B.

60 La biblioteca puede explorarse con respecto a la presencia del gen/ADNc de VEGF-B usando una o más sondas de ácido nucleico (oligonucleótidos, ADNc o fragmentos de ADN genómico que poseen un nivel aceptable de homología con el ADNc de VEGF-B u homólogo de VEGF-B o el gen para clonar) que hibridarán selectivamente con ADNc de VEGF-B u homólogo de VEGF-B o gen o genes que están presentes en la biblioteca. Las sondas son preferentemente complementarias de o codifican una región pequeña de la secuencia de ADN de VEGF-B de la misma o una especie similar a la especie de la que se preparó la biblioteca. Como alternativa, las sondas pueden generarse, como se analiza posteriormente.

65

5 Cuando se usan fragmentos de ADN (tales como ADNc) como sondas, son condiciones de hibridación típicas las expuestas por ejemplo en Ausubel, *et al.*, eds., mencionado anteriormente. Después de la hibridación, la mancha de transferencia que contiene la biblioteca se lava a una rigurosidad adecuada, dependiendo de varios factores tales como tamaño de la sonda, homología esperada de la sonda con el clon, tipo de biblioteca que se explora, número de clones que se exploran y similares. Son ejemplos de soluciones de lavado rigurosas (que son habitualmente de fuerza iónica baja y se usan a temperaturas relativamente altas) las siguientes. Uno de dichos lavados rigurosos es NaCl 0,015 M, Na Citrato 0,005 M y SDS 0,1 por ciento a 55-65 °C. Otro de dichos tampones rigurosos es Na₂ EDTA 1 mM, NaHPO₄ 40 mM, pH 7,2 y SDS 1% a aproximadamente 40-50 °C. Otro lavado riguroso es SSC 0,2 x y SDS 0,1% a aproximadamente 50-65 °C. Dichas condiciones de hibridación son aplicables a cualquier polinucleótido que codifique uno o más de los factores de crecimiento de la presente invención.

15 Otro método adecuado para obtener un ácido nucleico que codifica un polipéptido de VEGF-B es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este método, se extrae ARN poli(A)+ o ARN total de un tejido que expresa VEGF-B. Se prepara después ADNc a partir del ARN usando la enzima transcriptasa inversa. Después se añaden dos cebadores típicamente complementarios de dos regiones separadas del ADNc de VEGF-B (oligonucleótidos) al ADNc junto con una polimerasa tal como Taq polimerasa, y la polimerasa amplifica la región de ADNc entre los dos cebadores.

20 B. Preparación de un vector para la expresión de VEGF-B

Después de clonar, se ha aislado el ADNc o gen que codifica un polipéptido de VEGF-B o fragmento del mismo, se inserta preferentemente en un vector de amplificación y/o expresión para aumentar el número de copias del gen y/o para expresar el polipéptido en una célula hospedadora adecuada y/o para transformar las células en un organismo diana (para expresar VEGF-B *in vivo*). Son adecuados numerosos vectores disponibles en el mercado, aunque también pueden usarse vectores "hechos a petición". El vector se selecciona para ser funcional en una célula hospedadora o tejido hospedador particular (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula hospedadora de modo que pueda producirse amplificación del gen de VEGF-B y/o expresión del gen). El polipéptido de VEGF-B o fragmento del mismo puede amplificarse/expresarse en células hospedadoras procariotas, de levadura, de insecto (sistemas de baculovirus) y/o eucariotas. La selección de la célula hospedadora dependerá al menos en parte de si el polipéptido de VEGF-B o fragmento del mismo debe glicosilarse. De ser así, son preferibles células hospedadoras de levadura, insecto o mamífero; las células de levadura glicosilarán el polipéptido si está presente un sitio de glicosilación en la secuencia de aminoácidos de VEGF-B.

35 Típicamente, los vectores usados en cualquiera de las células hospedadoras contendrán una secuencia flanqueante 5' y otros elementos reguladores así como potenciador o potenciadores, un elemento de origen de replicación, un elemento de terminación de la transcripción, una secuencia intrónica completa que contiene un sitio de corte y empalme donador y aceptor, una secuencia de péptido señal, un elemento de sitio de unión a ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región polienlazadora para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido para expresar, y un elemento marcador seleccionable. Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia "marcadora", es decir, una secuencia oligonucleotídica localizada en el extremo 5' o 3' de la secuencia codificadora de VEGF-B que codifica poliHis (tal como hexaHis) u otra secuencia inmunogénica pequeña. Este marcador puede expresarse junto con la proteína, y puede actuar como un marcador de afinidad para purificación del polipéptido de VEGF-B de la célula hospedadora. Opcionalmente, el marcador puede retirarse posteriormente del polipéptido de VEGF-B purificado por diversos medios tales como, por ejemplo, usando una peptidasa seleccionada.

45 El vector/construcción de expresión puede contener opcionalmente elementos tales como una secuencia flanqueante 5', un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia de marcador seleccionable, un sitio de unión a ribosoma, una secuencia señal y una o más secuencias intrónicas. La secuencia flanqueante 5' puede ser homóloga (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula hospedadora), heteróloga (es decir, de especies distintas de la especie o cepa de células hospedadoras), híbrida (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes p5' de más de una fuente), sintética, o puede ser la secuencia flanqueante 5' de VEGF-B nativa. Como tal, la fuente de la secuencia flanqueante 5' puede ser cualquier organismo unicelular procariota o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, siempre que la secuencia flanqueante 5' sea funcional en, y pueda activarse por, la maquinaria de la célula hospedadora.

50 Un origen de replicación es típicamente una parte de los vectores de expresión procariotas comerciales, y ayuda en la amplificación del vector en una célula hospedadora. La amplificación del vector a un cierto número de copias puede, en algunos casos, ser importante para la expresión óptima del polipéptido de VEGF-B. Si el vector elegido no contiene un sitio de origen de replicación, puede sintetizarse químicamente uno basándose en una secuencia conocida, y ligarse en el vector.

65 Un elemento de terminación de la transcripción se localiza típicamente 3' del extremo de la secuencia codificante del polipéptido VEGF-B y actúa para terminar la transcripción del polipéptido de VEGF-B. Habitualmente, el elemento de terminación de la transcripción en células procariotas es un fragmento rico en G-C seguido de una secuencia de poli T. Dichos elementos pueden clonarse de una biblioteca, obtenerse comercialmente como parte de un vector, y sintetizarse fácilmente.

Los genes marcadores seleccionables codifican proteínas necesarias para la supervivencia y crecimiento de una célula hospedadora cultivada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren una resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina o kanamicina para células hospedadoras procariontas, (b) complementan las deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos.

Es necesario un elemento de unión a ribosoma, habitualmente llamado la secuencia Shine- Dalgarno (procariontas) o la secuencia Kozak (eucariotas), para el inicio de la traducción de ARNm. El elemento está localizado típicamente 3' del promotor y 5' de la secuencia codificante del polipéptido para sintetizar. La secuencia Shine- Dalgarno varía pero es típicamente una polipurina (es decir, que tiene un alto contenido de A-G). Se han identificado muchas secuencias Shine- Dalgarno, cada una de las cuales puede sintetizarse fácilmente usando métodos expuestos anteriormente.

Todos los elementos expuestos anteriormente, así como otros útiles en la presente invención, se conocen bien por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Sambrook, *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) y Berger, *et al.*, eds., "Guide To Molecular Cloning Techniques," Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (1987).

Cuando debe secretarse el VEGF-B recombinante, se incluye preferentemente una secuencia señal para dirigir la secreción de la célula en la que se sintetiza. Típicamente, la secuencia señal se posiciona en la región codificante del transgén hacia o en el extremo 5' de la región codificante. Se han identificado muchas secuencias señal, y cualquiera de ellas que sea funcional en el tejido transgénico puede usarse junto con el transgén. Por lo tanto, la secuencia señal puede ser homóloga o heteróloga, del transgén, y puede ser homóloga o heteróloga del mamífero transgénico. Adicionalmente, la secuencia señal puede sintetizarse químicamente usando métodos expuestos anteriormente. Sin embargo, para fines del presente documento, las secuencias señal preferidas son las que aparecen de forma natural con el transgén (es decir, son homólogas del transgén).

En muchos casos, la transcripción génica aumenta por la presencia de uno o más intrones en el vector. El intrón puede ser de origen natural dentro de la secuencia transgénica, especialmente cuando el transgén es de longitud completa o un fragmento de una secuencia de ADN genómico. Cuando el intrón no es de origen natural dentro de la secuencia de ADN (como para la mayoría de los ADNc), el intrón o los intrones pueden obtenerse de otra fuente. El intrón puede ser homólogo o heterólogo del transgén y/o del mamífero transgénico. La posición del intrón con respecto al promotor y el transgén es importante, ya que el intrón debe transcribirse para ser eficaz. Como tal, cuando el transgén es una secuencia de ADNc, la posición preferida para el intrón es 3' del sitio de inicio de la transcripción, y 5' de la secuencia de terminación de la transcripción poliA. Preferentemente para transgenes de ADNc, el intrón se localizará en un lateral o el otro (es decir, 5' o 3') de la secuencia transgénica de modo que no interrumpa la secuencia transgénica. Puede usarse cualquier intrón de cualquier fuente, incluyendo cualquier organismo viral, procarionta y eucariota (planta o animal), para expresar VEGF-B, siempre que sea compatible con la célula o las células hospedadoras en las que se inserta. También se incluyen en el presente documento intrones sintéticos. Opcionalmente, puede usarse más de un intrón en el vector.

Son vectores preferidos para la expresión recombinante de proteína de VEGF-B los que son compatibles con células hospedadoras bacterianas, de insectos y de mamíferos. Dichos vectores incluyen, entre otros, pCRII (Invitrogen Company, San Diego, Calif.), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, Calif.), y pETL (BlueBaclI; Invitrogen).

Después de que se haya construido el vector y se haya insertado un ácido nucleico de VEGF-B en el sitio apropiado del vector, el vector completado puede insertarse en una célula hospedadora adecuada para amplificación y/o expresión del polipéptido de VEGF-B. Las células hospedadoras típicamente usadas incluyen, sin limitación: células procariontas tales como células gram negativas o gram positivas, es decir, cualquier cepa de *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Salmonella*, y similares; células eucariotas tales como células CHO (ovario de hámster Chino), células 293 de riñón humano, células COS-7; células de insecto tales como Sf4, Sf5, Sf9 y Sf21 y High 5 (todas de Invitrogen Company, San Diego, Calif.); y diversas células de levadura tales como *Saccharomyces* y *Pichia*.

La inserción (también denominada como la "transformación" o "transfección") del vector en la célula hospedadora seleccionada puede conseguirse usando métodos tales como el método de cloruro de calcio, electroporación, microinyección, lipofección o DEAE-dextrano. El método seleccionado será en parte en función del tipo de célula hospedadora para usar. Estos métodos y otros métodos adecuados se conocen bien por el experto en la materia, y se exponen, por ejemplo, en Sambrook, *et al.*, mencionado anteriormente.

Las células hospedadoras que contienen el vector (es decir, transformadas o transfectadas) pueden cultivarse usando medios convencionales bien conocidos por los expertos en la materia. Los medios contendrán habitualmente todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y supervivencia de las células. Los medios adecuados para cultivar células de *E. coli* son, por ejemplo, Caldo de Luria (LB) y/o Caldo Terrific (TB). Son medios adecuados para cultivar células eucariotas RPM11640, MEM, DMEM, todos los cuales pueden complementarse con suero y/o factores de crecimiento según se requiera por la línea celular particular que se cultive. Un medio adecuado para

cultivos de insecto es medio de Grace complementado con yeastolate, hidrolizado de lactalbúmina y/o suero de ternero fetal según sea necesario.

5 Típicamente, un antibiótico u otro compuesto útil para el crecimiento selectivo de las células transformadas solamente se añade como un complemento al medio. El compuesto para usar se dictaminará por el elemento marcador seleccionable presente en el plásmido con el que se transformó la célula hospedadora. Por ejemplo, cuando el elemento marcador seleccionable sea resistencia a kanamicina, el compuesto añadido al medio de cultivo será kanamicina.

10 La cantidad de polipéptido de VEGF-B producido en la célula hospedadora puede evaluarse usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, sin limitación, análisis de transferencia de Western, electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, electroforesis en gel no desnaturizante, separación por HPLC, inmunoprecipitación y/o ensayos de actividad tales como ensayos de unión a VEGFR-1 o ensayos de estimulación de células.

15 **C. Purificación de polipéptidos de VEGF-B**

Los polipéptidos de VEGF- B se expresan y purifican preferentemente como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.331.301.

20 Si el polipéptido de VEGF-B se diseña para que se secrete de las células hospedadoras, la mayor parte del polipéptido probablemente se encuentre en el medio de cultivo celular. Si, sin embargo, el polipéptido de VEGF-B no se secreta de las células hospedadoras, estará presente en el citoplasma (para eucariotas, bacterias gram positivas y célula hospedadoras de insectos) o en el periplasma (para células hospedadoras bacterianas gram negativas).

25 Para VEGF-B intracelular, las células hospedadoras se alteran en primer lugar de forma mecánica u osmótica para liberar los contenidos del citoplasma en una solución tamponada. El polipéptido se aísla después de esta solución.

30 La purificación de polipéptido de VEGF-B de la solución puede conseguirse usando una diversidad de técnicas. Si el polipéptido se ha sintetizado de modo que contenga un marcador tal como Hexahistidina (VEGF- B/ hexaHis) u otro péptido pequeño en su extremo carboxilo o amino terminal, puede purificarse esencialmente en un procedimiento de una etapa pasando la solución a través de una columna de afinidad en la que la matriz de columna tiene una alta afinidad por el marcador o por el polipéptido directamente (es decir, un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente VEGF-B). Por ejemplo, la polihistidina se une con gran afinidad y especificidad al níquel, por lo tanto puede usarse una columna de afinidad de níquel (tal como las columnas de níquel Qiagen) para purificación de VEGF-B/poliHis. (Véase, por ejemplo, Ausubel, *et al.*, eds., "Current Protocols In Molecular Biology," Sección 10.11.8, John Wiley & Sons, Nueva York (1993)).

40 La fuerte afinidad de VEGF-B por su receptor VEGFR-1 permite la purificación de afinidad de VEGF-B usando una matriz de afinidad que comprende dominio extracelular de VEGFR-1. Además, cuando el polipéptido de VEGF-B no tiene marcador y no están disponibles anticuerpos, pueden usarse otros procedimientos bien conocidos para purificación. Dichos procedimientos incluyen, sin limitación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de tamiz molecular, HPLC, electroforesis en gel nativo en combinación con elución en gel, e isoelectroenfoque preparatorio (máquina/técnica "Isoprime", Hoefer Scientific). En algunos casos, pueden combinarse dos o más de estas técnicas para conseguir pureza aumentada. Los métodos preferidos para purificación incluyen marcaje con poliHistidina y cromatografía de intercambio iónico en combinación con isoelectroenfoque preparatorio.

50 El polipéptido de VEGF-B hallado en el espacio periplásmico de las bacterias o el citoplasma de células eucariotas, los contenidos del periplasma o citoplasma, incluyendo cuerpos de inclusión (bacterias) si el polipéptido procesado ha formado dichos complejos, pueden extraerse de la célula hospedadora usando cualquier técnica convencional conocida por el experto en la materia. Por ejemplo, las células hospedadoras pueden lisarse para liberar los contenidos del periplasma por prensa francesa, homogeneización y/o sonicación. El homogeneizado puede después centrifugarse.

55 Si el polipéptido de VEGF-B ha formado cuerpos de inclusión en el periplasma, los cuerpos de inclusión pueden con frecuencia unirse a las membranas celulares interna y/o externa y por lo tanto se encontrarán principalmente en el material de sedimento después de centrifugación. El material de sedimento puede después tratarse con un agente caotrópico tal como guanidina o urea para liberar, descomponer y solubilizar los cuerpos de inclusión. El polipéptido de VEGF-B en su forma ahora soluble puede después analizarse usando electroforesis en gel, inmunoprecipitación o similares. Si se desea aislar el polipéptido de VEGF-B, puede conseguirse aislamiento usando métodos convencionales tales como los expuestos posteriormente y en Marston, *et al.*, Meth. Enz., 182: 264-275 (1990).

65 Si no se forman cuerpos de inclusión de polipéptido de VEGF-B en un grado significativo en el periplasma de la célula hospedadora, el polipéptido de VEGF-B se encontrará principalmente en el sobrenadante después de centrifugación del homogeneizado celular, y el polipéptido de VEGF-B puede aislarse del sobrenadante usando métodos tales como los expuestos posteriormente.

En las situaciones en las que sea preferible aislar parcial o completamente el polipéptido de VEGF-B, puede conseguirse purificación usando métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos métodos incluyen, sin limitación, separación por electroforesis seguida de electroelución, diversos tipos de cromatografía (inmunoafinidad, tamiz molecular y/o intercambio iónico) y/o cromatografía líquida de alta presión. En algunos casos, puede ser preferible usar más de uno de estos métodos para purificación completa.

D. Anticuerpos anti-VEGF-B terapéuticos

Se contemplan anticuerpos anti VEGF-B como se describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.331.301 para su uso en la práctica de la presente invención. Dichos anticuerpos pueden usarse para purificación de VEGF-B, o terapéuticamente cuando se desee inhibición de VEGF-B. Véase también los documentos WO 2005/087812, WO 2005/087808, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2005- 0282233 y Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2006- 0030000.

Pueden prepararse anticuerpos anti VEGF-B policlonales o monoclonales terapéuticos útiles en la práctica de la invención en animales de laboratorio o por técnicas de ADN recombinante usando los siguientes métodos. Los anticuerpos policlonales para la molécula de VEGF-B o un fragmento de la misma que contienen la secuencia de aminoácidos diana generalmente se inducen en animales por inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de la molécula de VEGF-B en combinación con un adyuvante tal como adyuvante de Freund (completo o incompleto). Para potenciar la inmunogenicidad, puede ser útil conjugar en primer lugar la molécula de VEGF-B o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos diana con una proteína que es inmunogénica en la especie para inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, maleimidobenzoil sulfosuccinimida éster (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOC_1 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en la que R y R^1 son grupos alquilo diferentes. Como alternativa, pueden producirse conjugados inmunogénicos de VEGF-B de forma recombinante como proteínas de fusión.

Los animales se inmunizan contra los conjugados de VEGF-B inmunogénicos o derivados (tales como un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos diana) combinando aproximadamente 1 mg o aproximadamente 1 microgramo de conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con aproximadamente 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Aproximadamente de 7 a 14 días después, se extrae sangre de los animales y el suero se ensaya con respecto a título anti VEGF-B. Los animales se refuerzan con antígeno repetidas veces hasta que el título alcanza una meseta. Preferentemente, el animal se refuerza con la misma molécula de VEGF-B o fragmento de la misma que se usó para la inmunización inicial, pero conjugada con una proteína diferente y/o a través de un agente de entrecruzamiento diferente. Además, se usan agentes agregantes tales como alumbre en las inyecciones para potenciar la respuesta inmunitaria.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales recuperando células del bazo de animales inmunizados e inmortalizando las células de manera convencional, por ejemplo mediante fusión con células de mieloma. Los clones después se exploran con respecto a los que expresan el anticuerpo deseado. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal es específico para VEGF-B. En otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal reacciona de forma cruzada con otros miembros de la familia de VEGF/PDGF.

Puede conseguirse preparación de anticuerpos usando métodos de ADN recombinante, tales como el método de presentación de fagémidos, usando kits disponibles en el mercado, como por ejemplo, el Sistema de Anticuerpo de Fagémido Recombinante disponible de Pharmacia (Uppsala, Suecia), o el sistema de presentación de fagos SurfZAP™ (Stratagene Inc., La Jolla, Calif.).

Preferentemente, los anticuerpos para administración a seres humanos, aunque estén preparados en un animal de laboratorio tal como un ratón, serán "humanizados", o quiméricos, es decir hechos para ser compatibles con el sistema inmunitario humano de modo que un paciente humano no desarrolle una respuesta inmunitaria al anticuerpo. Aún más preferentemente, los anticuerpos humanos que pueden prepararse ahora usando métodos tales como los descritos por ejemplo en Lonberg, *et al.*, Nature Genetics, 7: 13-21 (1994) se prefieren para administración terapéutica a pacientes.

1. Humanización de anticuerpos monoclonales anti VEGF-B

Los anticuerpos neutralizantes de VEGF-B comprenden una clase de compuestos terapéuticos útiles como antagonistas de VEGF-B. A continuación hay protocolos para mejorar la utilidad de anticuerpos monoclonales anti VEGF-B como compuestos terapéuticos en seres humanos, "humanizando" los anticuerpos monoclonales para mejorar su semivida en suero y hacerlos menos inmunogénicos en hospedadores humanos (es decir, para evitar la respuesta de anticuerpos humanos a anticuerpos anti VEGF-B no humanos).

Los principios de humanización se han descrito en la bibliografía y se facilitan por la disposición modular de

proteínas de anticuerpo. Para minimizar la posibilidad de unión del complemento, se prefiere un anticuerpo humanizado del isotipo IgG₄.

Por ejemplo, se consigue un nivel de humanización generando anticuerpos quiméricos que comprenden los dominios variables de proteínas de anticuerpo no humano de interés, tales como los anticuerpos monoclonales anti VEGF-B descritos en el presente documento, con los dominios constantes de moléculas de anticuerpo humanas. (Véase, por ejemplo, Morrison y Oi, *Adv. Immunol.*, 44: 65-92 (1989)). Los dominios variables de anticuerpos anti VEGF-B neutralizadores de VEGF-B se clonan a partir del ADN genómico de un hibridoma de linfocitos B o de ADNc generado a partir de ARNm aislado del hibridoma de interés. Los fragmentos génicos de región V se ligan a exones que codifican dominios constantes de anticuerpo humano, y la construcción resultante se expresa en células hospedadoras de mamífero adecuadas (por ejemplo, células de mieloma o CHO).

Para conseguir un nivel aún mayor de humanización, solamente se clonan en secuencias de anticuerpos humanos las partes de los fragmentos del gen de región variable que codifican regiones determinantes de complementariedad ("CDR") de unión a antígeno de los genes de anticuerpo monoclonal no humano (véase, por ejemplo, Jones, *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann, *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen, *et al.*, *Science*, 239: 1534-36 (1988); y Tempest, *et al.*, *BiolTechnology*, 9: 266-71 (1991)). Si es necesario, el armazón de lámina beta del anticuerpo humano que rodea las regiones CDR3 también se modifica para reflejar más estrechamente la estructura tridimensional del dominio de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal original (véase, Kettleborough, *et al.*, *Protein Engin.*, 4: 773-783 (1991); y Foote, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 224: 487-499 (1992)).

En un enfoque alternativo, la superficie de un anticuerpo monoclonal no humano de interés se humaniza alterando restos de superficie seleccionados del anticuerpo no humano, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida, conservando a la vez todos los restos internos y en contacto del anticuerpo no humano. Véase Padlan, *Molecular Immunol.*, 28 (4/5): 489-98 (1991).

Los enfoques anteriores se emplean usando anticuerpos monoclonales anti VEGF-B neutralizantes de VEGF-B y los hibridomas que los producen para generar anticuerpos neutralizantes de VEGF-B humanizados útiles como compuestos terapéuticos para tratar o aliviar afecciones en las que la expresión de VEGF-B es perjudicial.

2. Anticuerpos neutralizantes de VEGF-B humanos de presentación de fagos

Se generan anticuerpos neutralizantes de VEGF-B humanos mediante técnicas de presentación de fagos tales como las descritas en Aujame, *et al.*, *Human Antibodies*, 8(4): 155-168(1997); Hoogenboom, *TIBTECH*, 15: 62-70(1997); y Rader, *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8: 503- 508 (1997).

Por ejemplo, las regiones variables de anticuerpo en forma de fragmentos Fab o fragmentos Fv monocatenarios ligados se fusionan con el extremo amino terminal o proteína de recubrimiento menor de fago filamentoso pIII. La expresión de la proteína de fusión e incorporación de la misma en el recubrimiento de fago maduro da como resultado partículas de fago que presentan un anticuerpo en su superficie y contienen el material genético que codifica el anticuerpo. Una biblioteca de fagos que comprende dichas construcciones se expresa en bacterias, y la biblioteca se selecciona (se explora) con respecto a anticuerpos de fago específicos de VEGF-B usando VEGF-B marcado o inmovilizado respectivamente como sonda antigénica.

3. Anticuerpos neutralizantes de VEGF-B humanos de ratones transgénicos

Se generan anticuerpos neutralizantes de VEGF-B humanos en ratones transgénicos esencialmente como se describe en Bruggemannand y Neuberger, *Immunol. Today*, 17(8): 391-97(1996) y Bruggemannand Taussig, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8: 455-58(1997). Los ratones transgénicos que portan segmentos génicos V humanos en configuración de línea germinal y que expresan estos transgenes en sus tejidos linfoides se inmunizan con composición de VEGF-B usando protocolos de inmunización convencionales. Se generan hibridomas usando linfocitos B de los ratones inmunizados usando protocolos convencionales y se exploran para identificar hibridomas que secretan anticuerpos humanos anti VEGF-B (por ejemplo, como se han descrito anteriormente).

4. Anticuerpos biespecíficos

Los Anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente con una proteína (por ejemplo, VEGF-B) y que se unen específicamente con otros antígenos relevantes para la patología y/o tratamiento se producen, aíslan y ensayan usando procedimientos convencionales que se han descrito en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Pluckthun & Pack, *Immunotechnology*, 3: 83-105 (1997); Carter, *et al.*, *J. Hematotherapy*, 4: 463-470 (1995); Renner & Pfreundschuh, *Immunological Reviews*, 1995, N° 145, pp. 179-209; Pfreundschuh Patente de Estados Unidos N° 5.643.759; Segal, *et al.*, *J. Hematotherapy*, 4: 377-382 (1995); Segal, *et al.*, *Immunobiology*, 185: 390-402 (1992); y Bolhuis, *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 34: 1-8 (1991); Por ejemplo, en una realización, se contemplan anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a VEGF-B y se unen específicamente a VEGF-A o P1GF.

E. Moléculas antisentido y terapia

Otra clase de inhibidores de VEGF-B útiles en la presente invención son moléculas de ácido nucleico antisentido aislado que hibridan con, o son complementarias a, la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de VEGF-B, o fragmentos, análogos o derivados del mismo. Un ácido nucleico "antisentido" comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico "con sentido" que codifica una proteína (por ejemplo, complementaria a la hebra codificante de una molécula de ADNc bicatenaria o complementaria a una secuencia de ARNm). (Véase, por ejemplo, Uhlmann, *et al.* Antisense oligonucleotides: A new therapeutic principle. Chemical Reviews 1990, 90: 543-584; Crooke, *et al.* "Antisense Research and Applications", CRC Press (1993); Mesmaekar, *et al.* "Antisense Oligonucleotides", Acc. Chem. Res. 1995, 28: 366-374; Stein. "The experimental use of antisense oligonucleotides: a guide for the perplexed". J. Clin. Invest. 2001, 108, 641-644, y las Patentes de los Estados Unidos N°: 6.117.992, 6.127.121, 6.235.887, 6.232.463, 6.579.704, 5.596.091, 6.031.086 y 6.117.992). En aspectos específicos, se proporcionan moléculas de ácido nucleico antisentido que comprenden una complementariedad de secuencia de al menos 10, 25, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos o una hebra codificante de VEGF-B completa, o solo a una porción de la misma. También se proporcionan fragmentos codificantes de moléculas de ácido nucleico, homólogos, derivados y análogos de ácidos nucleicos antisentido de VEGF-B complementarios a una secuencia de ácido nucleico de VEGF-B.

En una realización, una molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido con una "región codificante" de la hebra codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína VEGF-B. La expresión "región codificante" se refiere a la región de la secuencia de nucleótidos que comprende codones que se traducen en restos de ácidos nucleicos. En otra realización, la molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido con una "región flanco" de la hebra codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína VEGF-B. La expresión "región flanco" se refiere a secuencias 5' y 3' que flanquean a la región codificante y que no se traducen en aminoácidos (es decir, también citadas como regiones 5' y 3' no traducidas).

Dadas las secuencias de hebra codificante que codifican la proteína VEGF-B divulgada en el presente documento, los ácidos nucleicos antisentido de la invención pueden designarse de acuerdo con las reglas de Watson y Crick o de emparejamiento de bases de Hoogsteen. La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria a la región codificante completa del ARNm de VEGF-B, pero más preferentemente es un oligonucleótido que es antisentido solo a una porción de la región codificante o no codificante de ARNm de VEGF-B. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementario a la región que rodea el sitio de inicio de la traducción del ARNm de VEGF-B. Un oligonucleótido antisentido puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud. Un ácido nucleico antisentido de la invención puede construirse usando reacciones de síntesis química o de ligación enzimática usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados de maneras diversas diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del doblete formado entre los ácidos nucleicos con sentido y antisentido (por ejemplo, pueden usarse derivados de fosforotioato y de acridina sustituidos).

Los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden usarse para generar el ácido nucleico antisentido incluyen: 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxilmetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N-6-isopenteniladenina, ácido uracilo-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster de ácido uracilo-5-oxiacético, ácido uracilo-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina. Como alternativa, el ácido nucleico antisentido puede producirse biológicamente usando un vector de expresión en el cual se ha subclonado un ácido nucleico en orientación antisentido (es decir, el ARN transcrito a partir del ácido nucleico insertado será de una orientación antisentido para un ácido nucleico diana de interés, descrito en detalle en la sección siguiente).

Las moléculas de ácido nucleico antisentido para su uso de acuerdo con la invención se administran típicamente a un sujeto o se generan in situ de tal forma que hibridan con o se unen al ARNm celular y/o ADN genómico que codifica VEGF-B para de este modo inhibir la expresión de la proteína (por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o la traducción). La hibridación puede ser mediante complementariedad de nucleótidos convencional para formar un doblete estable o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se una a dobletes de ADN, mediante interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. Un ejemplo de una ruta de administración de moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención incluye la inyección directa en un sitio de tejido. Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico antisentido pueden modificarse para dirigirse a células seleccionadas y a continuación administrarse de manera sistémica. Por ejemplo, para administración sistémica, las moléculas antisentido pueden modificarse de tal forma que se unan específicamente a receptores o antígenos expresados en la superficie de una célula seleccionada (por ejemplo, uniendo las moléculas de ácido nucleico antisentido a péptidos o anticuerpos que se unen a receptores celulares de superficie o antígenos). Las moléculas de ácido nucleico antisentido también pueden suministrarse a células usando los vectores descritos en el presente documento. Para lograr suficientes moléculas de ácido nucleico, se prefieren construcciones de vector en las que la

molécula de ácido nucleico antisentido se coloca bajo el control de un promotor fuerte pol II o pol III.

Una molécula de ácido nucleico antisentido para su uso de acuerdo con la invención puede ser una molécula de ácido nucleico alfa-anomérico. Una molécula de ácido nucleico alfa-anomérico forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en los que, al contrario de las unidades alfa usuales, las hebras son paralelas entre sí. Véase, por ejemplo, Gaultier, *et al.*, Nucl. Acids Res., 15:6625-6641 (1987). La molécula de ácido nucleico antisentido también puede comprender un 2'-o-metilribonucleótido (véase, por ejemplo, Inoue, *et al.*, Nucl. Acids Res., 15:6131-6148 (1987)) o un análogo de ADN de ARN quimérico (véase, por ejemplo, Inoue, *et al.*, FEBS Lett., 215:327-330 (1987)).

La producción y suministro de moléculas antisentido se facilitan proporcionando un vector que comprende una secuencia de nucleótido antisentido complementaria a al menos una parte de la secuencia de ADN de VEGF-B. De acuerdo con otro aspecto adicional de la invención, dicho vector que comprende una secuencia antisentido puede usarse para inhibir, o al menos mitigar, la expresión de VEGF-B. El uso de un vector de este tipo para inhibir la expresión de VEGF-B se favorece en casos en los que la expresión de VEGF-B se asocia con un estado de enfermedad concreta.

Tratamiento de dislipidemias

La categoría de sujetos a tratar de acuerdo con la invención reivindicada en el presente documento son sujetos con dislipidemias. Como se usa en el presente documento, dislipidemia es un perfil lipídico anormal en suero, plasma o sangre en un sujeto. Un perfil lipídico anormal puede caracterizarse por niveles de colesterol total, colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL), triglicéridos, apolipoproteína (apo)-B o Lp(a) por encima del percentil 90º para la población general o niveles de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) o apo A-1 por debajo del percentil 10º para la población general. La dislipidemia puede incluir hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia. Los sujetos humanos hipercolesterolémicos y sujetos humanos hipertrigliceridémicos se asocian con una incidencia aumentada de trastornos cardiovasculares. Un sujeto hipercolesterolémico tiene un nivel de colesterol de LDL de > 160 mg/dl, o >130 mg/dl y al menos dos factores de riesgo seleccionados del grupo que consiste en género masculino, historial familiar de enfermedad coronaria prematura, fumador, hipertensión, bajo HDL (< 35 mg/dl), diabetes melitus, hiperinsulinemia, obesidad abdominal, lipoproteínas elevadas, e historial personal de un evento cardiovascular. Un sujeto humano hipertrigliceridémico tiene un nivel de triglicéridos (TG) de > 200 mg/dl.

Las dislipidemias a tratar de acuerdo con la invención incluyen dislipidemias causadas por defectos génicos simples, dislipidemias que son multifactoriales o poligénicas en origen, así como dislipidemias que son secundarias a otros estados de enfermedad o secundarias a agentes farmacológicos. Los ejemplos de dislipidemias genéticas incluyen hipercolesterolemia familiar, deficiencia familiar de apoproteína CII, deficiencia de lipasa hepática, hiperlipidemia familiar combinada, disbetalipoproteinemia, y deficiencia familiar de lipoproteína lipasa.

Los compuestos anti VEGF-B para uso de acuerdo con la invención pueden administrarse solos o en combinación con una o más sustancias farmacológicamente activas adicionales que tienen, por ejemplo, efectos favorables en perturbaciones o trastornos metabólicos frecuentemente asociados con las mismas. Son ejemplos de dichos medicamentos los medicamentos que reducen la glucosa en sangre, antidiabéticos, principios activos para el tratamiento de dislipidemias, medicamentos antiateroscleróticos, agentes antiobesidad, principios activos antiinflamatorios, principios activos para el tratamiento de tumores malignos, principios activos antitrombóticos, principios activos para el tratamiento de presión sanguínea alta, principios activos para el tratamiento de insuficiencia cardíaca y principios activos para el tratamiento y/o prevención de complicaciones provocadas por diabetes o asociadas con diabetes.

Además, los compuestos anti VEGF-B pueden administrarse en combinación con uno o más agentes antihipertensivos. Son ejemplos de agentes antihipertensivos los β -bloqueantes tales como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol y metoprolol, inhibidores de ACE (enzima convertidora de angiotensina) tales como benazeprilo, captoprilo, alatrioprilol, enalaprilol, fosinoprilol, lisinoprilol, quinaprilol y ramiprilol, bloqueadores de canales de calcio tales como nifedipina, felodipina, nicaldipina, isradipina, nimodipina, diltiazem y verapamilol, y bloqueadores α tales como doxazosina, urapidilo, prazosina y terazosina.

Una o más sustancias farmacológicamente activas adicionales pueden combinarse con compuestos anti VEGF-B para su uso de acuerdo con la invención, en particular para una mejora sinérgica en el efecto. La administración de la combinación de principios activos puede tener lugar por administración separada de los principios activos al paciente o en forma de productos de combinación.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Materiales y métodos

A. Expresión de proteínas de transporte de ácidos grasos en corazones de ratones deficientes en VEGF-B

Se aisló ARN celular total de corazones de ratones normales y VEGF-B $-/-$ (Aase *et al.*, Circ, 104: 358- 364, 2001) usando el kit RNeasy (Qiagen). La integridad de los ARN totales se analizó en geles de formaldehído desnaturalizantes. Se preparó ADN complementario a partir de 3 μ g de ARN tratado con DNasa y Transcriptasa Inversa SuperScript II (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó PCR en transcritos inversos usando pares de cebadores enumerados en a Tabla 1. Todas las secuencias se comprobaron con respecto a especificidad usando análisis de BLAST.

Se realizó PCR en tiempo real cuantitativa por duplicado usando muestras de 5 μ l de ADNc y 12,5 μ l de Supermezcla Verde SYBR Platinum 2 x (Invitrogen) en una reacción total de 25 μ l que contenía 200 nM de cebador directo e inverso. Las reacciones se procesaron y se analizaron usando Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Research). Se procesaron curvas de fusión en todas las reacciones para asegurar la amplificación de un único producto (datos no mostrados). Las muestras se normalizaron a reacciones paralelas usando cebadores específicos para actina (Tabla 1). La proporción de aumento/reducción de proteínas de transporte de ácidos grasos en VEGF-B $-/-$ en relación con corazones normales se determinó usando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak *et al.*, Methods, 25: 402-406,2001). Los valores medios y las desviaciones típicas se basaron en tres experimentos independientes.

B. Expresión proteica de proteínas de manipulación de ácidos grasos en ratones deficientes en VEGF-B

Se homogeneizaron corazones de ratones VEGF-B $+/+$ y $-/-$ en tampón de lisis que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, desoxicolato 0,5%, SDS 0,1%, 0,5 mmol/l e inhibidores de proteasa (Complete; Roche). Los lisados de corazón se incubaron a 4 °C durante 30 minutos y los sobrenadantes se recogieron en dos etapas de centrifugación a 10.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. Las alícuotas se sometieron a electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) (15%) en condiciones reductoras. Se realizó inmunotransferencia usando un anticuerpo policlonal de conejo inducido contra los aminoácidos 41-140 de FATP4 de origen humano (Santa Cruz Biotechnology Inc., 1 μ g Ig/ml) o un anticuerpo policlonal de conejo inducido contra los aminoácidos 19-32 de lipasa Endotelial humana (Cayman Chemical, 1,5 μ g Ig/ml) seguido de detección con un anticuerpo secundario acoplado a HRP (Amersham Biosciences). Los anticuerpos unidos se visualizaron usando ECL+ (Amersham Biosciences). Como control de carga, se visualizó la proteína del RE calnexina usando un antisuero de conejo contra calnexina humana.

C. Expresión de FATP4 y LPL en corazones de cerdos que sobreexpresan VEGF-B-186

Se recibieron corazones de cerdos transducidos con un LacZ o hVEGF-B₁₈₆ codificado en adenovirus de Seppo Hertuala. Se aisló ARN celular total de los corazones de cerdos transducidos y se realizó PCR en tiempo real cuantitativa como se ha descrito anteriormente. Los pares de cebadores usados se enumeran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1

Nombre	Oligonucleótidos	Identificador de secuencia
mFATP1	Sentido: 5'-tcaatgtaccaggaattacagaagg-3'	10
	Antisentido: 5'-tctccaggctcagagtcagaag-3'	11
mFATP2	Sentido: 5'-ttcctgaggatacaagataccattg-3'	12
	Antisentido: 5'-ttcttctggaaatgtcatgagc-3'	13
mFATP3	Sentido: 5'-ctctgaacctggcagctcta-3'	14
	Antisentido: 5'-tcaaggctcagacaggag-3'	15
mFATP4	Sentido: 5'-gcaagtcccatcagcaactg-3'	16
	Antisentido: 5'-gggggaaatcacagcttctc-3'	17
mFATP5	Sentido: 5'-gctataccagcatgtccgctc-3'	18
	Antisentido: 5'-gtggcagagattccaggttc-3'	19
mFATP6	Sentido: 5'-tacaaccaagtgggacatctctg-3'	20
	Antisentido: 5'-aatctctcggatgggac-3'	21

Nombre	Oligonucleótidos	Identificador de secuencia
mLPL	Sentido: 5'-gcgagaacattccctcacc-3'	22
	Antisentido: 5'-aacactgctgagtcctttccc-3'	23
mCD36	Sentido: 5'-gatgagcataggacatacttagatgtg-3'	24
	Antisentido: 5'-caccactccaatcccaagtaag-3'	25
mp-actina	Sentido: 5'-actctccagccttcctc-3'	26
	Antisentido: 5'-atctcctctgcatcctgtc-3'	27
mVEGFR-1	Sentido: 5'-tgaggagcttcaccgaac-3'	28
	Antisentido: 5'-ggaggagtacaacaccacgg-3'	29
mVEGFR-2	Sentido: 5'-agtaaaagcagggagtctgtgg-3'	30
	Antisentido: 5'-agcacctctctgtgattcc-3'	31
pFATP4	Sentido: 5'-tgggccgtgtcaacgagg-3'	32
	Antisentido: 5'-ggtggacacgttctcgcc-3'	33
pp-actina	Sentido: 5'-atggaatcctgcggcatc-3'	34
	Antisentido: 5'-gcttgctgstccacatctgc-3'	35
p-LPL	Sentido: 5'-catcccttcaccctgcc-3'	36
	Antisentido: 5'-tgtcgggcattcacaac-3'	37
pPECAM	Sentido: 5'-agcaccactctgaactccaac-3'	38
	Antisentido: 5'-ctgctctgcggtcctaagtc-3'	39

Se prepararon muestras proteicas de corazones de cerdo transducidos con LacZ o hVEGF-B₁₈₆ como se ha descrito anteriormente y se analizaron en SDS-PAGE al 15% seguido de análisis de transferencia de Western usando anticuerpos policlonales anti-FATP4 o LPL.

5

D. Expresión de proteínas de transporte de ácidos grasos en células endoteliales

Las células endoteliales de islotes pancreáticos MILE SVEN 1 (MS1) (Arbiser *et al.*, Am. J. Pathol., 156: 1469-1476, 2000) se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía FCS al 10%, glutamina y antibióticos. El medio de cultivo se cambió cada segundo día y las células se cultivaron hasta la confluencia. Se aisló ARN total de las células MS1 usando el kit RNeasy (Qiagen). La integridad del ARN total se analizó en geles de formaldehído desnaturalizantes. Se preparó ADN complementario a partir de 3 µg de ARN tratado con DNasa y Transcriptasa Inversa SuperScriptII (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó Q-PCR en transcritos inversos usando pares de cebadores enumerados en la Tabla 1. Todas las secuencias se comprobaron con respecto a especificidad usando análisis de BLAST. Para estimulación con VEGF-B, los cultivos se lavaron con PBS y las células MS1 se privaron de alimento en DMBM que contenía FCS al 0,5% durante 24 horas. Después de la privación de alimento, el medio se reemplazó con DMEM que contenía FCS al 0,5% que contenía 50 ng/ml, o 100 ng/ml de VEGF-B₁₆₇ recombinante humano y las células se incubaron adicionalmente durante seis o veinticuatro horas adicionales. Se aisló ARN total y se analizó la integridad del ARN como se ha descrito anteriormente. Se preparó ADN complementario a partir de 3 µg de ARN tratado con DNasa y Transcriptasa Inversa SuperScriptII de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Se realizó PCR en tiempo real cuantitativa por duplicado usando muestras de 5 µl de ADNc y 12,5 µl de Supermezcla Verde SYBR Platinum 2 x (Invitrogen) en una reacción total de 25 µl que contenía 200 nM de cebadores directos e inversos. Se procesaron y analizaron reacciones usando Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Research). Se procesaron curvas de fusión en todas las reacciones para asegurar la amplificación de un único producto (datos no mostrados). Las muestras se normalizaron a reacciones paralelas usando cebadores específicos para actina (Tabla 1). La proporción de aumento/reducción de ARNm de FATP4 en células tratadas con VEGF-B en relación con no tratadas se determinó

25

usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$ (Arbiser, mencionado anteriormente).

E. Tinción con Oil red O en corazones de ratones VEGF-B $+/+$ y $-/-$

5 Se diseccionaron cuidadosamente corazones de ratones VEGF-B $+/+$ y $-/-$, sin ninguna grasa y sangre visibles, se lavaron en PBS y se incluyeron en Tek Tisular (Sakura Finetek). Se montaron secciones en serie (de 8-12 μm) en portaobjetos de vidrio Superfrost⁺. Se disolvió Oil red O (Sigma Aldrich) en una solución de reserva añadiendo 2,5 g de Oil red O a 400 ml de 2-isopropanol. Antes de la tinción, se preparó una solución de trabajo que contenía 18 ml de solución de reserva de Oil red O y 12 ml de agua desionizada. Esta solución se pasó a través de un filtro de 0,45 μm (Sarstedt) para retirar Oil red O cristalizado. Las secciones del corazón se incubaron en solución de trabajo de Oil red O durante 5 minutos a TA y se lavaron en 10 minutos con agua corriente del grifo. Para visualizar núcleos los portaobjetos de vidrio se contratiñeron en solución de Hematoxilina de Mayer durante 15 segundos seguido de un aclarado rápido en solución de carbonato de litio saturada. Los portaobjetos se aclararon cuidadosamente en agua del grifo y las secciones teñidas se incluyeron en medio de montaje soluble en agua y se analizaron usando microscopía de campo claro.

F. Expresión de proteínas de transporte de ácidos grasos en tumores que sobreexpresan VEGF-B

20 La línea celular de fibrosarcoma T241 se transfectó con un vector de expresión de mamíferos que codificaba VEGF-B₁₆₇ o VEGF-B₁₈₆, o vector vacío (simulación) usando reactivo de lípidos catiónicos. Se seleccionaron diversos clones estables, se expandieron y se analizaron con respecto a la expresión de VEGF-B exógeno. Se seleccionaron dos clones de cada vector de expresión para los experimentos posteriores. Se inyectaron 10^6 células de los diversos clones por vía subcutánea en la espalda de ratones singénicos. Después de 15 días los tumores crecidos se escindieron e inmediatamente se congelaron de forma instantánea (Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2005-0214280, la divulgación de la cual se incorpora en el presente documento por referencia). Se aisló ARN total de los tumores usando reactivo TRIzol (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La integridad de las preparaciones de ARN totales se analizó en geles de formaldehído desnaturalizantes. Se preparó ADN complementario a partir de 3 μg de ARN tratado con DNasa y Transcriptasa Inversa SuperScriptII (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La integridad de las preparaciones de ARN totales se analizó en geles de formaldehído desnaturalizantes. Se preparó ADN complementario a partir de 3 μg de ARN tratado con DNasa y Transcriptasa Inversa SuperScriptIII (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

35 Se analizó PCR en tiempo real cuantitativa por duplicado usando muestras de 5 μl de ADNc y 12,5 μl de Supermezcla Vede SYBR Platinum 2 x (Invitrogen) en una reacción total de 25 μl que contenía 200 nM de cebador directo e inverso. Las reacciones se procesaron y se analizaron usando Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Research). Se procesaron curvas de fusión en todas las reacciones para asegurar la amplificación de un único producto. Las muestras se normalizaron a reacciones paralelas usando cebadores específicos para actina (véase Tabla 1). La proporción de aumento/reducción de proteínas de manipulación de ácidos grasos en los tumores que sobreexpresan VEGF-B en relación con la simulación se determinó usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$ (Arbiser, mencionado anteriormente).

40 Los valores medios y desviaciones típicas se basaron cada uno en un grupo de cuatro tumores diferentes.

Ejemplo 2 – Expresión de componentes de la maquinaria de transporte de ácidos grasos en ratones normales y transgénicos

45 Para investigar si los genes que están implicados en captación de ácidos grasos y transporte son dianas corriente abajo potenciales para VEGF-B, su expresión se analizó en corazones de ratones normales, deficientes en VEGF-B y transgénicos con sobreexpresión específica de corazón de VEGF-B.

50 Se usó PCR convencional para establecer los patrones de expresión génica de diversos miembros de FATP y CD36 en corazón de ratón normal. Se detectaron transcritos para FATP1, 2, 3, 4 y 6, así como CD36, el correceptor de FATP (Greenwalt *et al.*, J. Clin. Invest., 96: 1382-1388,1995) en el corazón murino. No se encontró transcrito para FATP5 en el corazón murino. Sin embargo, se ha indicado que FATP5 se expresa exclusivamente en el hígado (Hirsch *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 8625-8629,1998). Se usó RT-PCR en tiempo real cuantitativa (Q-PCR) para comparar la abundancia de transcrito absoluto de FATP, CD36 y LPL en corazones de ratones normales y VEGF-B $-/-$. En corazones sin VEGF-B, el ARNm de FATP4 se redujo a aproximadamente el 50%. FATP1, 3 y 6 también estaban regulados negativamente, sin embargo, en un menor grado (expresión reducida a aproximadamente 70-80%). Por el contrario, no se detectaron cambios significativos en los niveles de expresión de FATP2 y CD36. El análisis de ARNm de LPL demostró que este transcrito también está regulado negativamente en corazones deficientes en VEGF-B (expresión reducida a aproximadamente el 60%).

60 Para analizar si la sobreexpresión de VEGF-B en corazón de ratón dio como resultado aumento de la expresión de las FATP y en CD36, los inventores analizaron la abundancia de transcrito de FATP4 en ratones transgénicos específicos de corazón de VEGF-B por Q-PCR. Estos animales expresan VEGF-B humano bajo el promotor de cadena pesada de α -miosina (referencia para añadir) que proporciona una expresión específica de corazón del transgén. Los análisis de corazones de hembras y machos con una (heterocigotos) o dos copias del transgén

(homocigotos), demostraron que la expresión de FATP4 se controla de una manera específica de dosis génica en ambos sexos con regulación positiva 3x en los animales homocigotos, y de regulación positiva 1,5x en los animales heterocigotos.

5 Para analizar si los niveles de expresión proteica de FATF, ejemplificados por FATP4 y LPL se regulaban de acuerdo con los niveles de transcrito correspondientes como se mide por los análisis de QPCR, se sometieron alicuotas de proteínas de corazones normales y deficientes en VEGF-B a análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos específicos para FATP4 y LPL, respectivamente. Como un control de carga las manchas de transferencia se volvieron a explorar con anticuerpos para calnexina.

10 Los resultados demuestran que tanto la proteína FATP4 como la proteína LPL estaban reguladas negativamente en animales deficientes en VEGF-B.

15 **Ejemplo 3 – Expresión de FATP4 y LPL en corazones de cerdos transducidos con adenovirus que codifican VEGF-B**

La proteína de VEGF-B o VEGF- B generada de adenovirus tiene una capacidad notable para estimular la neovascularización en corazón de ratón (véase Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2005- 0214280) y en corazón de cerdo. El corazón de cerdo recibe varias inyecciones de adenovirus (en total 1×10^{12} partículas) usando un sistema basado en catéter. Siete días después de la inyección los cerdos se sacrifican y los corazones se retiran para análisis. El análisis de miocardio transducido por Q-PCR reveló que el ARNm de FATP4 está regulado positivamente aproximadamente 30 veces en corazones transducidos con VEGF-B en comparación con corazones que recibieron una inyección idéntica de adenovirus que expresaban solamente lacZ. A medida que las células endoteliales se hacen más abundantes en los corazones transducidos con VEGF-B debido a la neovascularización, los análisis de control por Q-PCR de la expresión de PECAM, un marcador celular endotelial, mostraron una regulación positiva de aproximadamente 3x. Por lo tanto, si toda la regulación positiva de ARNm de FATP4 se produce en las células endoteliales del corazón, la regulación positiva específica en este compartimento celular es en consecuencia 9-10 veces.

30 Análisis similares de expresión de LPL por análisis de Q-PCR mostraron que el ARNm de LPL está regulado positivamente. El análisis de los niveles de proteína FATP4 y LPL por inmunotransferencia demostró que ambas proteínas estaban notablemente reguladas positivamente en miocardio transducido con VEGF-B 186. En conclusión, estos análisis confirman y amplían los datos previos que muestran que las FATP y LPL están ambos regulados por VEGF-B.

35 **Ejemplo 4 – Expresión de transportadores de ácidos grasos y LPL en células endoteliales.**

Para que se capten por las células parenquimales que requieren energía del corazón, músculo esquelético, cerebro, estómago e intestinos, los ácidos grasos derivados de plasma deben en primer lugar atravesar la capa celular endotelial, y este transporte transcelular está mediado por transportadores de ácidos grasos específicos (Van der Vusse *et al.*, Adv. Exp. Med. Biol., 4441: 181-191, 1998). La línea celular endotelial MS1 se usó para investigar la expresión de FATP, CD36 y LPL en el endotelio capilar. La presencia de los receptores de VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2, en células MS1 se confirmó por PCR convencional de ADNc generado a partir de células MS1. Se descubrió que ambos receptores se expresaban en células MS1. De los diversos transportadores de ácidos grasos que se analizaron, FATP1, 3 y 4 se detectaron fácilmente en células MS1 y por lo tanto pueden ser una diana corriente abajo potencial para VEGF-B. CD36 no se expresaba en células MS1. Se ha indicado que la aparición de CD36 en el endotelio es específica de tejido con la expresión restringida a los capilares de tejido adiposo y músculo cardiaco y esquelético (Greenwalt, mencionado anteriormente).

50 **Ejemplo 5 – Estimulación de la expresión de FATP y LPL en células endoteliales con VEGF-B**

Para investigar si la expresión de FATP1, 3 y 4 en células Endoteliales MS1 está regulada directamente por VEGF-B, se incubaron células MS1 con VEGF-B recombinante humano durante 20 horas. Mediante análisis de Q-PCR se comparó la expresión relativa de ARNm de FATP en células MS1 tratadas y no tratadas con VEGF-B (Figura 9, 10). La expresión del ARNm de FATP4 aumentó 3,3 veces en células MS1 tratadas con VEGF-B, en comparación con el control no tratado, lo que sugiere que VEGF-B puede de hecho estimular la expresión de FATP4 en células endoteliales. Análisis similares de ARNm de FATP1 y 3 revelaron una inducción de 5,0 y 2.5 veces, respectivamente. Por lo tanto, todas las FATP expresadas en las células MS1 se inducen por tratamiento con VEGF-B.

60 El análisis de la expresión de LPL por Q-PCR mostró de forma similar una inducción de 2,5 veces en las células MS1 tras tratamiento con VEGF-B. Para analizar la especificidad de la inducción mediada por VEGF-B de ARNm de FATP4, se aplicaron varias VEGF incluyendo VEGF-B, PIGF, VEGF-A y VEGF-E, a células MS1 y se midió la inducción de ARNm de FATP4 como anteriormente. Los resultados demuestran que VEGF-B ejerce un efecto específico en la inducción de ARNm de FATP4 ya que los otros ligandos de VEGFR-1, PIGF y VEGF-A, no indujeron ARNm de FATP4. VEGF-E, que es un ligando específico de VGFR-2, tampoco indujo ARNm de FATP4. En resumen

estos datos demuestran que VEGF-B ejerce un efecto específico en la inducción de las FATP y que su función es distinta de los otros ligandos de VEGFR-1.

Ejemplo 6 – Expresión de transportadores de ácidos grasos en tumores que sobreexpresan VEGF-B

Para establecer adicionalmente una relación entre las FATP y VEGF-B, se investigó la expresión de proteínas de transporte de ácidos grasos en tumores que sobreexpresan dos isoformas biológicas de VEGF-B; VEGF-B₁₆₇ y VEGF-B₁₈₆. Los tumores que sobreexpresan VEGF-B₁₈₆ crecen de forma significativamente más rápida que los tumores transfectados con VEGF-B₁₆₇, o transfectados con simulación.

Por análisis de Q-PCR se comparó la expresión relativa de diversas FATP y CD36 en los tumores que sobreexpresaban VEGF-B. La expresión de FATP1 aumentó 2-2,5 veces en tumores que sobreexpresaban VEGF-B₁₈₆. No se encontró regulación positiva significativa para FATP2, 3, 4 o 6 o para CD36 en los tumores que sobreexpresaban VEGF-B. Esto sugiere que VEGF-B puede dirigirse a diversos miembros de la familia de FATP y esto puede depender del tejido.

Ejemplo 7 – Pruebas de un papel directo de VEGF-B en la acumulación tisular de lípidos

Todas las pruebas presentadas hasta la fecha sugieren un papel importante de VEGF-B en la captación tisular de ácidos grasos controlando la expresión de FATP y LPL en células endoteliales. Para demostrar directamente que esto es así, se tiñeron secciones tisulares de animales normales y deficientes en VEGF-B con Oil Red O, un colorante que se incorpora en gotas lipídicas y tinte con color rojo intenso.

El número de gotas lipídicas teñidas con Oil red O en tejidos cardíacos de ratones normales y deficientes en VEGF-B se cuantificó mediante recuento manual del número de gotas teñidas en campos representativos del microscopio. Los resultados demuestran que los animales deficientes en VEGF-B han perdido más del 60% del número de gotas lipídicas en tejido cardíaco en comparación con ratones normales. También se observa que el diámetro medio de las gotas en los ratones deficientes en VEGF-B es mucho más pequeño. En resumen, esto muestra que VEGF-B controla la acumulación de lípidos en el tejido cardíaco regulando las FATP y otros componentes en la maquinaria que controla la captación de lípidos del torrente sanguíneo.

Ejemplo 8 – Expresión de FATP en hígado de ratones normales y deficientes en VEGF-B

Puesto que el hígado es el principal órgano metabolizador de lípidos en el cuerpo, tenía interés comparar los niveles de expresión de las FATP en ratones normales y deficientes en VEGF-B. Los análisis por QPCR mostraron que la expresión relativa de la mayoría de las FATP estaba regulada negativamente en los ratones deficientes en VEGF-B. La excepción fue FATP1 que no tenía cambios. La expresión de CD36 estaba ligeramente regulada positivamente en ratones deficientes en VEGF-B.

Como muchas de las FATP estaban reguladas negativamente en hígados de ratones deficientes en VEGF-B, la acumulación de lípidos en el hígado se examinó mediante tinción con Oil Red O de criosecciones. Los resultados muestran que la acumulación de lípidos se reduce drásticamente en hígados de animales deficientes en VEGF-B. La cuantificación de los píxeles rojos en varias microfotografías representativas usando el software gráfico Photoshop (Adobe Inc.) demostró que los hígados de ratones deficientes en VEGF-B tienen 70-80% menos de lípidos.

Ejemplo 9 – Expresión de un transportador de glucosa, Glut4, en el corazón de ratones normales y deficientes en VEGF-B

Se conoce bien en la bibliografía que la privación de lípidos en tejidos metabólicamente muy activos, como el corazón, obligará a estos tejidos a cambiar su metabolismo energético de estar basado principalmente en lípidos a un metabolismo basado en carbohidratos/glucosa. Por el contrario, la privación de carbohidratos/glucosa obliga al tejido a cambiar el metabolismo energético para basarse en lípidos. Puesto que la pérdida de VEGF-B conduce aparentemente a acumulación tisular de lípidos drásticamente reducida se contempla que los genes implicados en el metabolismo de carbohidratos/glucosa deberían estar regulados positivamente. Para ensayar esta hipótesis, se analizó la expresión de un transporte de glucosa principal en corazón, transportador de glucosa 4 (Glut4). El análisis de la expresión de Glut4 en corazones normales y deficientes en VEGF-B por QPCR reveló una regulación positiva significativa de transcritos de Glut4 en animales deficientes en VEGF-B. Los cebadores usados en el análisis fueron: directo 5' CTGTGCGTGGTTTCTCCAAC-3' (SEC ID N°: 40) e inverso 5' AAGGGAAGGTGTCCGTCG 3' (SEC ID N°: 41). En conclusión, los resultados demuestran que se produjo un cambio metabólico predicho en los animales deficientes en VEGF-B porque convierten su metabolismo para ser más dependientes de carbohidratos/glucosa que sus homólogos normales. La razón para esto es la aparente incapacidad de los animales deficientes en VEGF-B para acumular cantidades suficientes de lípidos de la circulación para apoyar la producción de energía eficaz.

Ejemplo 10 – FATP en el cerebro

VEGF-B se expresa abundantemente en el cerebro y es de interés investigar la expresión de las FATP en este

Identificador de secuencias	Descripción	Secuencia
	Nº de referencia de Genbank: NM_011697	<p> ogggtccocgggcccgcgccaaggggctctggctgccgcgcccc coaogccgcccgggctagggccatgogggcgctcccggcgctcgc cccccgggaccatgagccccctgctccgtgcctgctgctgtt gcactgctgcagctggctcgcaccaggccccctgtgtcccagttga tggcccagccaccagaagaagtgggtccatggatagacgttatg caogtgccacatgccagcccaggagggtgggtgctctgagcat ggaactcatgggcaatgtggtcaacaactagtgccoagctgtgtga ctgtgcagcgtgtgtggctgctgcctgacgatggcctggaatgt gtgccoactgggcaacaccaagtccgaatgcagatcctcatgatcca gtacccgagcagtcagotgggggagatgacctggangaacacag ccaatgtgaatgcagaccaaaaaaaaaaggagagtgtgtgaagcca gacagggtgccataccccaccaccgtcccagccccgctctgttcc gggctgggactctacc ccgggagcatcolcccagctgacatcatcccactccagcccc aggalcctctgcccgcctgaccccagcggcctcaogccctgao cccggacctgccgctgcccgtgcagacggcggcctctccatg coaaggcggggcttagagctcaaccoagacacctgtagggtccg gaagccgcgaaagtgacaagotgctttccagactccacgggccc gctgtttatggcctgctcacagggagaaagagtgagcacagggc gaaactctcagctgggaggctactgcccaggaotggaccttta gagagctctctgccaatctttatctcccagagctgccaatcaacaattg tcaaggaaacctoatgtctcacctcaggggccagggtactctctcact aaccacctgtcaagtgaacatctctggctggctgtctcccctcact atgaaaaccccaactctaccaataacgggatttgggtctgtatga taactgtgacacacacacactcacactctgataaagagatggaa gacactaac </p>
6.	AA de VEGF-B (ratón) Nº de referencia de Genbank: NM_011697	<p> MSPLLRRLLLVALLQLARTQAPVSQFDGPS HQKKVVPWIDVYARATCQPREVVVPLSME LMGNVVKQLVPSCVTVQRCGGCCPDDGLE CVPTGQHQVRMQILMIQYPSSQLGEMSLBB HSQCECRPKKKESAVKPDRVAIPHHRPQPRS VPGWDSTPGASSPADIIHPTAPGSSARLAPS AVNALTPGPAAAAADAASSIAKGA </p>
7.	AA de VEGF-B ₁₆₇ (ratón)	<p> MSPLLRRLLLVALLQLARTQAPVSQFDGPS HQKKVVPWIDVYARATCQPREVVVPLSME LMGNVVKQLVPSCVTVQRCGGCCPDDGLE CVPTGQHQVRMQILMIQYPSSQLGEMSLBB HSQCECRPKKKESAVKPDSPRILCPPCTQRR QRPDPRTCRCRCRRRFLHCQGRGLELNPDT TCRCKPRK </p>
8.	AA de VEGF-B ₁₈₆ (ratón) Nº de referencia de Genbank: U52820	<p> MSPLLRRLLLVALLQLARTQAPVSQFDGPS HQKKVVPWIDVYARATCQPREVVVPLSME LMGNVVKQLVPSCVTVQRCGGCCPDDGLE CVPTGQHQVRMQILMIQYPSSQLGEMSLBB HSQCECRPKKKESAVKPDRVAIPHHRPQPRS VPGWDSTPGASSPADIIHPTAPGSSARLAPS AVNALTPGPAAAAADAASSIAKGA </p>

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSTITUTO LUDWIG PARA LA INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER

5

<120> DIRECCIÓN A LA REGULACIÓN DE VEGF-B DE TRANSPORTADORES DE ÁCIDOS GRASOS PARA MODULAR ENFERMEDADES HUMANAS

<130> 029065.58991 WO

10

<140>

<141>

ES 2 497 641 T3

<150> 60/801.549
 <151> 17-05-2006

<160> 42

5

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 1172

10

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gcgatgcggg cgcccccggc gggcggcccc ggcgggcacc atgagccctc tgctccgccg 60
cctgctgctc gccgcactcc tgcagctggc ccccgcccag gccctgtct cccagcctga 120
tgcccctggc caccagagga aagtgggtgtc atggatagat gtgtatactc gcgctacctg 180
ccagccccgg gaggtggtgg tgcccctgac tgtggagctc atgggcaccg tggccaaca 240
gctggtgcc agctgcgtga ctgtgcagcg ctgtggtggc tgctgccctg accatggcct 300
ggagtgtgtg cccactgggc agcaccagt ccggatgcag atcctcatga tccggatacc 360
gagcagtcag ctgggggaga tgtccctgga agaacacagc cagtgtgaat gcagacctaa 420
aaaaaaggac agtgctgtga agccagacag ggtgccaact ccccaccacc gtccccagcc 480
ccgttctgtt ccgggctggg actctgcccc cggagcacc tccccagctg acatcaccca 540
tcccactcca gccccaggcc cctctgccc cgctgcaccc agcaccacca gcgccctgac 600
ccccggacct gccgctgcc ctgcccagcg cgcagcttcc tccgttgcca agggcggggc 660
ttagagctca acccagacac ctgcaggtgc cggaaagctgc gaaggtgaca catggctttt 720
cagactcagc agggtgactt gcctcagagg ctatatccca gtgggggaac aaagaggagc 780
ctggtaaaaa acagccaagc cccaagacc tcagcccagg cagaagctgc tctaggacct 840
ggcctctca gagggctctt ctgccatccc ttgtctccct gaggccatca tcaaacagga 900
cagagttgga agaggagact gggaggcagc aagaggggtc acataccagc tcaggggaga 960
atggagtact gtctcagttt ctaaccactc tgtgcaagta agcatctac aactggctct 1020
tcctcccctc actaagaaga cccaaacctc tgcataatgg gatttgggct ttggtacaag 1080
aactgtgacc cccaaccctg ataaaagaga tggaggaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1172
    
```

15

<210> 2

<211> 207

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 497 641 T3

Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
 20 25 30
 Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
 35 40 45
 Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
 50 55 60
 Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
 65 70 75 80
 Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
 85 90 95
 Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
 100 105 110
 Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
 115 120 125
 Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Arg Ala Ala Thr Pro His His Arg
 130 135 140
 Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro Gly Trp Asp Ser Ala Pro Gly Ala Pro
 145 150 155 160
 Ser Pro Ala Asp Ile Thr His Pro Thr Pro Ala Pro Gly Pro Ser Ala
 165 170 175
 His Ala Ala Pro Ser Thr Thr Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala Ala
 180 185 190
 Ala Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser Ser Val Ala Lys Gly Gly Ala
 195 200 205

<210> 3
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

5

ES 2 497 641 T3

Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
 20 25 30
 Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
 35 40 45
 Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
 50 55 60
 Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
 65 70 75 80
 Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
 85 90 95
 Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
 100 105 110
 Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
 115 120 125
 Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Ser Pro Arg Pro Leu Cys Pro Arg
 130 135 140
 Cys Thr Gln His His Gln Arg Pro Asp Pro Arg Thr Cys Arg Arg Arg
 145 150 155 160
 Cys Arg Arg Arg Ser Phe Leu Arg Cys Gln Gly Arg Gly Leu Glu Leu
 165 170 175
 Asn Pro Asp Thr Cys Arg Cys Arg Lys Leu Arg Arg
 180 185

<210> 4
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 4

ES 2 497 641 T3

Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
 20 25 30
 Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
 35 40 45
 Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
 50 55 60
 Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
 65 70 75 80
 Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
 85 90 95
 Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
 100 105 110
 Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
 115 120 125
 Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Arg Ala Ala Thr Pro His His Arg
 130 135 140
 Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro Gly Trp Asp Ser Ala Pro Gly Ala Pro
 145 150 155 160
 Ser Pro Ala Asp Ile Thr His Pro Thr Pro Ala Pro Gly Pro Ser Ala
 165 170 175
 His Ala Ala Pro Ser Thr Thr Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala Ala
 180 185 190
 Ala Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser Ser Val Ala Lys Gly Gly Ala
 195 200 205

<210> 5
 <211> 1236
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 5

5

10

```

etcagggcgt cgctgcgggc ctgcegttgc ctgcctgocg ccagggctcg ggagggggcc 60
gcgaggagag cggcccctgc gcccggcccc gggccccggg gcccgcgcga tggggctctg 120
gctgcccggc cccccacgc cgccgggcta gggccatgcg ggcgctcccg gcgctcgccc 180
cccggggca ccatgagccc cctgctcctg cgcctgctgc ttgttgcact gctgcagctg 240
gctcgacccc agggccctgt gtcccagttt gatggcccca gccaccagaa gaaagtgggt 300
ccatggatag acgtttatgc acgtgccaca tgccagccca gggaggtggt ggtgcctctg 360
agcatggaac tcatgggcaa tgtggtcaaa caactagtgc ccagctgtgt gactgtgcag 420
cgctgtgggt gctgctgccc tgacgatggc ctggaatgtg tgcccactgg gcaacaccaa 480
gtccgaatgc agatcctcat gatccagtac ccgagcagtc agctggggga gatgtccctg 540
gaagaacaca gccaatgtga atgcagacca aaaaaaagg agagtgtgtt gaagccagac 600
agggttgcca taccocacca ccgtccccag ccccgctctg ttccgggctg ggactctacc 660
ccgggagcat cctcccagc tgacatcate catcccactc cagccccagg atcctctgcc 720
cgccttgcac ccagcgcctg caacgcctg acccccggac ctgcccgtgc cgctgcagac 780
gcccgcctt cctccattgc caagggcggg gcttagagct caaccagac acctgtaggt 840
gcccgaagcc cccgaaagtga caagctgctt tccagactcc acgggcccgg ctgcttttat 900
ggccctgctt cacagggaga agagtggagc acagcgaac ctcctcagtc tgggaggtca 960
ctgccccagg acctggacct tttagagagc tetctcgcca tcttttatct cccagagctg 1020
ccatctaaca attgtcaagg aacctcatgt ctacactcag gggccagggt actctctcac 1080
ttaaccaccc tggccaagtg agcatcttct ggctggctgt ctcccctcac tatgaaaacc 1140
ccaaacttct accaataacg ggatttgggt tctgtatga taactgtgac acacacacac 1200
actcacactc tgataaaaga gatggaagac actaac 1236

```

<210> 6
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 6

```

Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Val Ala Leu Leu Gln Leu
 1          5          10

Ala Arg Thr Gln Ala Pro Val Ser Gln Phe Asp Gly Pro Ser His Gln
 20          25          30

Lys Lys Val Val Pro Trp Ile Asp Val Tyr Ala Arg Ala Thr Cys Gln
 35          40          45

Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Ser Met Glu Leu Met Gly Asn Val
 50          55          60

Val Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
 65          70          75

Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
 85          90

Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Gln Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
100          105          110

Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
115          120          125

Lys Glu Ser Ala Val Lys Pro Asp Arg Val Ala Ile Pro His His Arg
130          135          140

Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro Gly Trp Asp Ser Thr Pro Gly Ala Ser
145          150          155

Ser Pro Ala Asp Ile Ile His Pro Thr Pro Ala Pro Gly Ser Ser Ala
165          170          175

Arg Leu Ala Pro Ser Ala Val Asn Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala Ala
180          185          190

Ala Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser Ser Ile Ala Lys Gly Gly Ala
195          200          205

```

10

ES 2 497 641 T3

5
 <210> 7
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 7

```

Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Val Ala Leu Leu Gln Leu
 1          5          10
Ala Arg Thr Gln Ala Pro Val Ser Gln Phe Asp Gly Pro Ser His Gln
 20          25          30
Lys Lys Val Val Pro Trp Ile Asp Val Tyr Ala Arg Ala Thr Cys Gln
 35          40          45
Pro Arg Gln Val Val Val Pro Leu Ser Met Glu Leu Met Gly Asn Val
 50          55          60
Val Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
 65          70          75
Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
 85          90          95
Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Gln Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
 100         105         110
Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
 115         120         125
Lys Glu Ser Ala Val Lys Pro Asp Ser Pro Arg Ile Leu Cys Pro Pro
 130         135         140
Cys Thr Gln Arg Arg Gln Arg Pro Asp Pro Arg Thr Cys Arg Cys Arg
 145         150         155
Cys Arg Arg Arg Arg Phe Leu His Cys Gln Gly Arg Gly Leu Glu Leu
 165         170         175
Asn Pro Asp Thr Cys Arg Cys Arg Lys Pro Arg Lys
 180         185
    
```

10
 <210> 8
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 8

ES 2 497 641 T3

Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Val Ala Leu Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Ala Arg Thr Gln Ala Pro Val Ser Gln Phe Asp Gly Pro Ser His Gln
 20 25 30
 Lys Lys Val Val Pro Trp Ile Asp Val Tyr Ala Arg Ala Thr Cys Gln
 35 40 45
 Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Ser Met Glu Leu Met Gly Asn Val
 50 55 60
 Val Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
 65 70 75 80
 Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
 85 90 95
 Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Gln Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
 100 105 110
 Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
 115 120 125
 Lys Glu Ser Ala Val Lys Pro Asp Arg Val Ala Ile Pro His His Arg
 130 135 140
 Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro Gly Trp Asp Ser Thr Pro Gly Ala Ser
 145 150 155 160
 Ser Pro Ala Asp Ile Ile His Pro Thr Pro Ala Pro Gly Ser Ser Ala
 165 170 175
 Arg Leu Ala Pro Ser Ala Val Asn Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala Ala
 180 185 190
 Ala Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser Ser Ile Ala Lys Gly Gly Ala
 195 200 205

- 5 <210> 9
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
- 15 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (2)
- <223> aminoácido variable
- 20 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (5) .. (7)
- <223> aminoácido variable
- 25 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (10)
- <223> aminoácido variable
- <400> 9

Pro Xaa Cys Val Xaa Xaa Xaa Arg Cys Xaa Gly Cys Cys
 1 5 10

ES 2 497 641 T3

5 <210> 10
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10 <400> 10
tcaatgtacc aggaattaca gaagg 25

15 <210> 11
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

20 <400> 11
tctccaggct cagagtcaga ag 22

25 <210> 12
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 12
ttcctgagga tacaagatac cattg 25

35 <210> 13
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

45 <400> 13
ttcttctgg aaatgcatg age 23
<210> 14
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

55 <400> 14
ctctgaacct ggtgcagctc ta 22

60 <210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

65 <400> 15
tcgaaggctc ccagacagga g 21

ES 2 497 641 T3

5
<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10
<400> 16
gcaagtccca tcagcaactg 20

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
15
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

20
<400> 17
gggggaaatc acagttctc 20

<210> 18
<211> 21
25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30
<400> 18
gctataaccag catgtccgct c 21

<210> 19
<211> 22
35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

40
<400> 19
gtggtcagag attccagtt cc 22

45
<210> 20
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

55
<400> 20
tacaaccaag tggtgacatc tctg 24

<210> 21
<211> 21
<212> ADN
60
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

65
<400> 21
aatctcttcg gtcaatggga c 21

ES 2 497 641 T3

5
<210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10
<400> 22
gcgagaacat tcccttcacc 20

15
<210> 23
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

20
<400> 23
aacactgctg agtcctttcc c 21

25
<210> 24
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 24
gatgagcata ggacatactt agatgtg 27

35
<210> 25
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 25
caccactcca atccaagta ag 22

45
<210> 26
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

55
<400> 26
actctccag ccttccttc 19

60
<210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

65
<400> 27
atctccttct gcatcctgtc 20

ES 2 497 641 T3

5
<210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
<400> 28
10 ttgaggagct tcaccgaac 20
<210> 29
<211> 20
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
20 <400> 29
ggaggagtac aacaccacgg 20
<210> 30
<211> 22
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
30 <400> 30
agtaaaagca gggagtctgt gg 22
<210> 31
<211> 21
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
40 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
<400> 31
agcacctctc tcgtgattc c 21
45 <210> 32
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
50 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
<400> 32
55 tggccgtgt caacgagg 18
<210> 33
<211> 18
<212> ADN
60 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
<400> 33
65 ggtggacacg ttctgcc 18

ES 2 497 641 T3

5
<210> 34
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10
<400> 34
atggaatcct gcggcatc 18

<210> 35
<211> 20
<212> ADN
15
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

20
<400> 35
gcttgctgst ccacatctgc 20

<210> 36
<211> 18
25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
30

<400> 36
catcccttc accctgcc 18

<210> 37
<211> 20
35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
40

<400> 37
tgtcgtggca ttcacaaac 20

45
<210> 38
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

55
<400> 38
agcaccactt ctgaactcca ac 22

<210> 39
<211> 20
<212> ADN
60
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

65
<400> 39
ctgctctgcg gtcctaagtc 20

ES 2 497 641 T3

5 <210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

10 <400> 40
ctgtcgctgg ttctccaac 20

15 <210> 41
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

20 <400> 41
aaggaaggt gtccgtcg 18

25 <210> 42
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Marcador His 6x sintético

<400> 42

His His His His His His
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un inhibidor de VEGF-B para su uso en el tratamiento de una dislipidemia en un sujeto humano, en donde dicho agente se selecciona de entre:
- (a) un anticuerpo anti VEGF-B o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y
 - (b) un oligonucleótido antisentido que inhibe la transcripción o la traducción de VEGF-B, expresado opcionalmente a partir de un vector de expresión.
- 10 2. Un inhibidor de VEGF-B de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho inhibidor es un anticuerpo el cual se une a VEGF-B₁₆₇ y/o VEGF-B₁₈₆ o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 15 3. Un inhibidor de VEGF-B de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicha dislipidemia es hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia.
- 20 4. Un inhibidor de VEGF-B de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en donde la dislipidemia es una dislipidemia genética tal como hipercolesterolemia familiar, Apo 100 defectuosa familiar, hipertrigliceridemia familiar, deficiencia en apoproteína CII familiar, deficiencia de lipasa hepática, hiperlipidemia familiar combinada, disbetalipoproteinemia y deficiencia de lipoproteína lipasa familiar.
- 25 5. Un inhibidor de VEGF-B de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, en donde el inhibidor de VEGF-B se administra en combinación con una o más sustancias farmacológicamente activas adicionales por separado o en forma de un producto combinado.