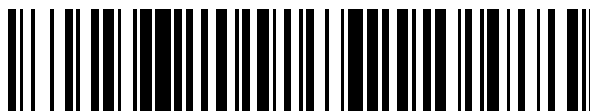


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 366**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2009 E 09798982 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2373328**

54 Título: **Potenciadores de la angiogénesis generada por accidente cerebrovascular y usos de los mismos**

30 Prioridad:

31.12.2008 US 204064 P

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

05.12.2014

73 Titular/es:

**THE TEXAS A & M UNIVERSITY SYSTEM
(100.0%)
3369 Tamu
College Station, TX 77843-3369 , US**

72 Inventor/es:

BIX, GREGORY, J.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 524 366 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

Potenciadores de la angiogénesis generada por accidente cerebrovascular y usos de los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, al campo del accidente cerebrovascular (ACV) y la angiogénesis. Más específicamente, la presente invención se refiere a potenciadores de la angiogénesis generada por accidente cerebrovascular y a usos de los mismos.

Descripción de la técnica relacionada

10 La recuperación cerebral de un accidente cerebrovascular es un sistema complejo que implica el restablecimiento de suministro sanguíneo (angiogénesis) y de neuronas (neurogénesis) en la zona afectada. En cuanto a la angiogénesis, la proliferación de células endoteliales puede tener lugar en un periodo tan corto como de 12 a 24 horas. Estas células recién generadas migran luego hacia regiones cerebrales isquémicas en respuesta a un número de mitógenos de células endoteliales, tales como el factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF; del inglés, vascular endothelial cell growth factor) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF; del inglés, platelet derived growth factor), y forman nuevos vasos sanguíneos en la corteza periinfartada después de 15 3-7 días. Luego continúa la angiogénesis durante al menos 21 días. Es importante que el niaspan, un fármaco que aumenta la angiogénesis en roedores después de un accidente cerebrovascular, mejora la recuperación funcional del accidente cerebrovascular, lo que sugiere que potenciar la angiogénesis cerebral después de un accidente cerebrovascular podría dar lugar a resultados mejorados tras el accidente cerebrovascular. Además, la angiogénesis cerebral es diferente de la angiogénesis no cerebral a causa de propiedades únicas de la vasculatura del cerebro, incluyendo la formación de la barrera hematoencefálica, la inclusión en un entorno neuronal-glial, la diferente expresión de receptores matriciales, y la insensibilidad relativa a la angiogénesis después del desarrollo.

20 Ohab et al. (1) han demostrado en roedores que, después de un accidente cerebrovascular, neuronas inmaduras en migración (neuroblastos) se asocian con vasos sanguíneos de remodelación en un "nicho neurovascular" que vincula causalmente la angiogénesis y la neurogénesis reparadoras. La vasculatura recién producida promueve la neurogénesis mediante la producción de diversos factores de crecimiento y parece que sirve como un andamio para neuronas recién generadas que las permite migrar hacia el tejido infartado. Además de las células endoteliales y las neuronas en maduración, el nicho neurovascular contiene una matriz extracelular (ECM; del inglés, extracelular matrix) que es secretada y activamente remodelada durante la angiogénesis para permitir la migración celular y la morfogénesis de vasos sanguíneos. Uno de dichos componentes de la matriz extracelular, el perlecano, es esencial para el nicho neurovascular. Su ausencia en ratones da lugar a una neurogénesis gravemente deteriorada a causa de la pérdida de la captura de factores neurogénicos que el perlecano proporciona para sustentar la neurogénesis.

25 La remodelación matricial durante y después de un accidente cerebrovascular es una parte importante de la reparación cerebral después de una lesión, reparación que apunta además a la importancia del perlecano. En un accidente cerebrovascular, las células inflamatorias agonizantes e infiltrantes liberan metaloproteinasas matriciales (MMPs; del inglés, matrix metalloproteinases) que alteran la barrera hematoencefálica y procesan proteolíticamente la matriz extracelular. Aunque el procesamiento y la degradación iniciales de la matriz extracelular se consideran en gran medida una consecuencia negativa del accidente cerebrovascular, una consecuencia de la proteólisis matricial es la generación de fragmentos matriciales bioactivos. En realidad, se sabe que muchos componentes matriciales albergan fragmentos matriciales bioactivos en sus regiones C-terminales que pueden inhibir la angiogénesis fuera del sistema nervioso central (2-3). El perlecano posee la distinción de ser el componente matricial más sensible y más rápidamente procesado después de un accidente cerebrovascular. La proteólisis del perlecano tiene lugar en menos de 2 horas tras la oclusión de la arteria cerebral media en primates no humanos y persiste durante al menos 7 días.

35 El perlecano está compuesto por cinco dominios, cada uno con homología secuencial en relación con otras proteínas. El fragmento C-terminal del perlecano, conocido como dominio V (DV o endorrepelina), consiste en tres dominios globulares de laminina (LG; del inglés, laminin globular), cada uno separado por dos dominios de tipo factor de crecimiento epidérmico (EG; del inglés, epidermal growth). El dominio V y su fragmento LG3 se encuentran normalmente en los proteomas de orina, sangre y fluido cerebroespinal humanos. El dominio V, al unirse a la subunidad $\alpha 2$ de la integrina $\alpha 2\beta 1$, inhibe diversas funciones angiogénicas de células endoteliales no cerebrales, incluyendo la migración y la morfogénesis capilar. Parece que la interacción del dominio V con $\alpha 2\beta 1$ es diferente de la interacción del colágeno proangiogénico con $\alpha 2\beta 1$, dando lugar a resultados opuestos. El dominio V ha sido caracterizado como antiangiogénico en diversos tipos de células endoteliales de origen no cerebral (4-5).

40 Clarke et al. ("Endorepellin and endostatin affect the neurovascular unit in vitro", J. Neurochem. 104, Supl. 1, 77, 2008) describen el efecto potenciador de la angiogénesis de la endorrepelina en el contexto de tejido cerebral en un sistema de modelo in vitro basado en roedores.

A pesar de esto, la técnica previa es deficiente en cuanto a potenciadores de la angiogénesis. La descripción actual satisface esta antigua necesidad de la técnica.

Sumario de la invención

5 La presente descripción muestra que el Dominio V potencia la angiogénesis cerebral y la interacción entre células endoteliales y neuronas en el nicho neurovascular. El Dominio V interacciona con, afecta a la distribución celular de, y ejerce su efecto proangiogénico a través de, la integrina $\alpha 5\beta 1$. Estas observaciones son consistentes con la falta de expresión del Dominio V integrina $\alpha 2\beta 1$ antiangiogénica en células endoteliales cerebrales y con el concepto de que la angiogénesis cerebral podría ser diferentemente regulada que la angiogénesis fuera del cerebro. Por lo tanto, la presente descripción muestra que el Dominio V, generado después de un accidente cerebrovascular por una

10 proteólisis aumentada e ininterrumpida de perlecano, estimula la angiogénesis tras el accidente cerebrovascular, promueve la formación del nicho neurovascular necesario para la neurogénesis y la migración dirigida de neuroblastos tras el accidente cerebrovascular, y es por ello un componente del mecanismo de autorreparación del cerebro que puede ser terapéuticamente explotado para mejorar la recuperación de un accidente cerebrovascular.

15 El alcance de la presente invención viene definido por las reivindicaciones, y toda información que no esté incluida en las reivindicaciones sólo se proporciona para información.

En un aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para estimular o potenciar la angiogénesis en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína endorrepelina, en donde dicha proteína endorrepelina tiene una secuencia de aminoácidos del dominio V del perlecano; y estimular o potenciar la generación de vasos sanguíneos.

20 En otro aspecto relacionado de la presente descripción, se proporciona un método para estimular o potenciar la angiogénesis en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína endostatina, o fragmentos o derivados o análogos de la misma; y estimular o potenciar la generación de vasos sanguíneos (no reivindicado).

25 En otro aspecto de la presente descripción, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un dominio V de perlecano, una estatina y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto de la presente descripción, se proporciona una composición farmacéutica que comprende endostatina o fragmentos o derivados o análogos de la misma, una estatina y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable (no reivindicado).

Breve descripción de los dibujos

30 Los dibujos adjuntos se han incluido en esta memoria para que las características, ventajas y objetos anteriormente citados de la descripción resulten claros y puedan ser entendidos con detalle. Estos dibujos forman una parte de la memoria descriptiva. Sin embargo, se ha de advertir que los dibujos adjuntos ilustran aspectos preferidos de la descripción.

35 Las Figuras 1A-1B muestran que un accidente cerebrovascular causa un aumento de los niveles de Dominio V en el cerebro. Se sometió una rata Harlan Sprague Dawley a una inyección estereotáctica de endotelina-1 para ocluir la arteria cerebral media (MCAo; del inglés, middle cerebral artery oclusion). Se anestesió la rata con ketamina y xilazina y, una vez que se hubo expuesto el cráneo y se hubo hecho un pequeño agujero a la izquierda, en las coordenadas estereotácticas +0,9 mm anterior y +3,4 mm lateral con respecto al bregma y con una profundidad de 8,5 mm desde la superficie dural, se inyectaron 3 ml de endotelina-1 (1 mg/ml, American Peptide Company, California, EE.UU.). Figura 1A: Transferencia Western representativa para Dominio V y GAPDH (testigo de carga) de los hemisferios cerebrales con accidente cerebrovascular (2) y sin accidente cerebrovascular (1) de la misma única

40 rata, 7 días después del accidente cerebrovascular. El hemisferio cerebral con accidente cerebrovascular contenía más ($p < 0,0001$) Dominio V (banda de 85 kDa) y su componente LG3 (banda de 26 kDa) ($p < 0,001$) que el hemisferio sin accidente cerebrovascular, según se normalizó en relación con GAPDH y se analizó por medio de densitometría óptica en la Figura 1B (mostrado DV).

45

Las Figuras 2A-2B muestran que el Dominio V potencia la formación de tubos capilares de células endoteliales cerebrales. Figura 2A: Se añadieron células endoteliales de cerebro de rata (8), rutinariamente cultivadas y subcultivadas en una incubadora de células (NuAire, Plymouth, Minnesota, EE.UU.) en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; del inglés, Dulbecco's Modified Eagle Medium) que contenía suero bovino fetal al 10%, 10 mg/ml de heparina y 50 ng/ml de FGF ácido, a pocillos revestidos con Matrigel \pm preincubación con Dominio V \pm anticuerpo $\alpha 5\beta 1$ (10 mg/ml) bloqueador de la función durante 30 minutos. Figura 2B: Después de 9 horas, las células tratadas con Dominio V habían formado más tubos (** $p < 0,0001$) que los testigos, lo que a su vez fue significativamente

50 bloqueado por el anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ (* $p < 0,001$, en comparación con el tratamiento con DV). Barras de error = desviación estándar, $n = 3$ experimentos, HPF (del inglés, high power field) = campo de alto aumento.

La Figura 3 muestra que el Dominio V estimula la formación de capilares de células endoteliales de cerebro y la interacción con neuronas. Se añadieron células endoteliales de cerebro de rata (rojas, teñidas con anticuerpo anti-factor de von Willebrand, Dako) a una capa de neuronas granulosas de cerebelo (verdes, teñidas con un anticuerpo anti-TUJ1, Dako) y luego se trataron con Dominio V (300 nM) o testigo vehicular. En el testigo, las células endoteliales se segregaban de las neuronas formando islas nítidas, mientras que el tratamiento con Dominio V daba lugar a la formación de tubos capilares alrededor de las neuronas.

La Figura 4 muestra que el Dominio V causa la redistribución de la integrina $\alpha 5\beta 1$. Células endoteliales de cerebro sobre laminina fueron tratadas con Dominio V (300 nM) o testigo vehicular durante 2 horas. Las células fueron luego fijadas, inmunoteñidas para integrina $\alpha 5\beta 1$ (verde) y contrateñidas con tinte nuclear DAPI (azul), y visualizadas mediante microscopía confocal. El tratamiento con Dominio V dio lugar a la redistribución de $\alpha 5\beta 1$ a proyecciones en la superficie celular comúnmente vistas en células endoteliales angiogénicas.

La Figura 5 muestra que el Dominio V soporta la adhesión de células endoteliales de cerebro. Se añadieron células endoteliales de cerebro \pm preincubación con anticuerpo bloqueante de la función de $\alpha 5\beta 1$ a pocillos revestidos con BSA al 1% o Dominio V, lo que fue seguido de fijación, tinción y espectrofotometría (OD560). Se adhirieron significativamente más (#, $p < 0,001$) células endoteliales de cerebro al Dominio V que a la BSA, lo que a su vez fue significativamente inhibido (*, $p < 0,001$) mediante la adición de anticuerpo bloqueante de la función de $\alpha 5\beta 1$. $n = 3$. Barras de error = desviación estándar.

Las Figuras 6A-6B muestran que el tratamiento con Dominio V después de un accidente cerebrovascular isquémico arterial perinatal (PAS; del inglés, perinatal arterial stroke) aumenta la superficie cerebral y la vasculatura en la penumbra del accidente cerebrovascular. Se indujo una oclusión transitoria de la arteria cerebral media en ratas de 7 días de edad por medio de una inyección estereotáctica de endotelina-1. Los animales recibieron luego una inyección intraperitoneal de 0,5 mg/kg de Dominio V esterilizado por filtración o testigo vehicular de PBS 24 y 72 horas después del accidente cerebrovascular. 5 días después del accidente cerebrovascular, se extirparon los cerebros de los animales y se obtuvieron imágenes de la vasculatura de la superficie cerebral con accidente cerebrovascular, lo que fue seguido de una inmunohistoquímica von Willebrand de cortes tisulares congelados para analizar la vasculatura en la penumbra. El tratamiento con Dominio V dio lugar a una hipervascularidad de la superficie cerebral y a un significativo aumento ($p < 0,001$) de la vasculatura en la penumbra del accidente cerebrovascular.

La Figura 7 muestra que el Dominio V administrado se localiza mediante inmunohistoquímica en tejido con accidente cerebrovascular y de periinfarto. Cortes tisulares congelados de animales con accidente cerebrovascular tratados con Dominio V o testigo vehicular de PBS fueron procesados por medio de inmunohistoquímica con anticuerpos dirigidos contra el factor de von Willebrand y el epítipo HIS para visualizar los vasos sanguíneos y el Dominio V administrado, respectivamente. Hubo una abundancia de Dominio V en el tejido con accidente cerebrovascular y el tejido cerebral de periinfarto de accidente cerebrovascular. Aquí el Dominio V se depositaba según una distribución perivasculatura. Por contraste, no se detectó Dominio V en el correspondiente tejido cerebral contralateral sin accidente cerebrovascular del mismo animal tratado con Dominio V, lo que sugiere que el Dominio V se dirige específicamente a tejido cerebral con accidente cerebrovascular y de periinfarto.

La Figura 8 muestra que el Dominio V administrado se localiza mediante inmunotransferencia Western en tejido cerebral con accidente cerebrovascular. Un lisado del tejido cerebral ipsilateral (I) con accidente cerebrovascular o del correspondiente tejido contralateral (C) sin accidente cerebrovascular de un animal tratado con PBS o Dominio V fue analizado mediante inmunotransferencia Western con anticuerpos hacia Dominio V (detecta los DV tanto endógeno como administrado), HIS (sólo detecta el Dominio V administrado) y testigo de carga de proteína GAPDH. Se muestra la banda de 85 kDa para anti-Dominio V y anti-HIS. Se detectó significativamente más Dominio V en el tejido con accidente cerebrovascular que en el tejido contralateral, cuando se normalizaron con respecto al testigo de carga de GAPDH, en los animales tanto tratados con PBS ($p < 0,001$) como con Dominio V ($p < 0,00001$), en el segundo caso aún más a causa del Dominio V extra administrado. Sólo se pudo detectar Dominio V administrado, según se detectó mediante el anticuerpo anti-HIS, en el lisado de la corteza con accidente cerebrovascular del animal tratado con Dominio V.

Las Figuras 9A-9B muestran que el tratamiento con Dominio V aumenta el número de neuronas recién generadas en tejido cerebral de periinfarto. Figura 9A: Se inmunotiñeron cortes tisulares congelados para el marcador neuronal doblecortina de recién nacido y se cuantificó con Adobe Photoshop el porcentaje medio de píxeles positivos para doblecortina por campo de alto aumento (HPF, 20 imágenes por animal) en tejido cerebral de periinfarto de un animal tratado con PBS y con Dominio V. Se detectaron significativamente más píxeles de doblecortina en el animal tratado con Dominio V (* = $p < 0,0001$). Figura 9B: Inmunohistoquímica del animal tratado con Dominio V que muestra varias diferentes neuronas positivas para doblecortina (verdes) íntimamente asociadas con vasos sanguíneos de periinfarto con Dominio V administrado íntimamente asociado, según se detectó con anticuerpo anti-HIS (rojo). Los núcleos celulares fueron contrateñidos con DAPI (azul).

La Figura 10 muestra que el Dominio V potencia la migración de neuronas corticales. Se añadieron neuronas corticales de ratones C57B16 embrionarios de 15 días +/- preincubación durante 30 minutos con Dominio V 100 nM o 200 nM al pocillo superior de una cámara Boyden modificada (3x103/pocillo) y se dejó que migraran durante 8 horas (a 37 °C), a través de una membrana de policarbonato revestida con colágeno de tipo I, hacia un pocillo del fondo que no contenía nada (testigo de migración) o que contenía factor de crecimiento nervioso (NGF; del inglés, nerve growth factor; 4 nM por pocillo). N = 3 para cada condición. La preincubación con Dominio V potenció significativamente, y de un modo dependiente de la dosis, la migración neuronal cortical, lo que sugiere que podría producir efectos directos y potencialmente terapéuticos sobre neuronas. * = p < 0,001, ** = p < 0,0001. Las barras indican el error estándar.

La Figura 11 muestra que el Dominio V mejora el resultado funcional/motor en el modelo animal de accidente cerebrovascular por endotelina-1. Se pusieron animales con accidente cerebrovascular o testigos quirúrgicos simulados en un cilindro transparente de 20 cm de diámetro x 35 cm de altura durante 3 minutos para examinar la preferencia de las extremidades y su capacidad para soportar peso en cada extremidad anterior (6). Cuando el animal se levanta para explorar el entorno se cuenta el número de colocaciones bilaterales de las patas, colocaciones de la pata ipsilateral con respecto a la lesión (derecha) y colocaciones de la pata contralateral con respecto a la lesión (izquierda). Los contactos de las patas se graban en vídeo y se analizan más tarde. El porcentaje de uso de la extremidad ipsilateral se calculó utilizando la ecuación: contactos ipsilaterales/(contactos ipsilaterales + contralaterales) x 100. N = 5 por grupo de tratamiento, *p < 0,05, **p < 0,001, comparando animales con accidente cerebrovascular tratados con Dominio V y animales con accidente cerebrovascular tratados con PBS. A partir del día 3 después del accidente cerebrovascular en adelante, no hubo diferencia estadística alguna entre los testigos simulados y los animales con accidente cerebrovascular tratados con Dominio V. Los animales tratados con Dominio V se trataron con 0,5 mg/kg los días 1, 3, 5 y 7 después del accidente cerebrovascular.

Las Figuras 12A-12B muestran los efectos del Dominio V sobre BDNF. Figura 12A: ELISA para BDNF de medios acondicionados de células endoteliales de cerebro ± Dominio V ± anticuerpo α5β1 (dirigido contra el dominio de unión al ligando α5) ± SNAKA51 (anticuerpo activador de α5β1) a lo largo del curso de 24 horas. Esto demuestra que el Dominio V (**p = 0,0025), el anticuerpo α5β1 (*p = 0,0001) y SNAKA51 (#p = 0,0007) aumentan significativamente los niveles de BDNF. La adición simultánea de anticuerpo α5β1 y Dominio V da lugar a niveles de liberación de BDNF de línea base, mientras que SNAKA51 y Dominio V aumentaban más los niveles de BDNF, aunque este aumento no era estadísticamente significativo (p = 0,06). Figura 12B: Transferencia Western representativa para BDNF de tejido cerebral ipsilateral con accidente cerebrovascular en animales tratados con testigo vehicular de PBS o Dominio V los días 3 y 7 después del accidente cerebrovascular. Figura 12C: Cuantificación de transferencias Western para BDNF que demuestran un aumento significativo en los niveles de BDNF después del accidente cerebrovascular los días 3 y 7 después del accidente cerebrovascular (*p = 0,006, **p = 0,0001) con tratamiento con Dominio V en comparación con los correspondientes días en los animales tratados con PBS. Se muestran los valores medios +/- el error estándar de 3 transferencias Western independientes.

Las Figuras 13A-13H muestran que el Dominio V interacciona con, y ejerce sus efectos proangiogénicos a través de, la integrina α5β1. Figura 13A: Cuantificación del ensayo representativo de adhesión de células endoteliales cerebrales a BSA inmovilizada (testigo negativo) o Dominio V +/- anticuerpo bloqueante de la función de α5β1 (10 mg/ml), que demuestra que el Dominio V soporta significativamente más adhesión celular en comparación con la BSA (** p = 0,00005), que podía ser significativamente inhibida por anticuerpo bloqueante de la función de α5β1 (* p = 0,0007). Figura 13B: Un ELISA para α5β1-DV demuestra que el Dominio V se une a la integrina α5β1 inmovilizada de un modo dependiente de la dosis con un valor de Kd de aproximadamente 30 nM. También se muestra el testigo negativo Tween 20. Figura 13C: Cuantificación de células que migran hacia suero bovino fetal al 3% (testigo) o DV ± α5β1-GST o fibronectina-GST [según se normaliza con respecto a un testigo negativo (no quimioatrayente)], que demuestra que el Dominio V era tan potente como quimioatrayente como el suero al 3%, lo que podía ser significativamente inhibido por α5β1-GST (* p = 0,02) o fibronectina-GST (** p = 0,01). Las barras de error representan la desviación estándar. Figura 13D: Imágenes representativas de células endoteliales de cerebro sobre Matrigel después de 12 horas, ± Dominio V ± el péptido CRRETAWAC (ID. SEC. n° 3) ligante específico de α5β1, que demuestran que CRRETAWAC inhibe la potenciación de la formación de estructuras de tipo tubular por el DV. Figura 13E: Los resultados de la cuantificación de los experimentos tubulares en Matrigel (Figura 13D) que demuestran que el Dominio V potenciaba significativamente la formación de estructuras de tipo tubular (* p = 0,0003) eran significativamente inhibidos (** p = 0,001) por CRRETAWAC. Figura 13F: Transferencia Western representativa para α5β1 de células endoteliales cerebrales confluentes, desprovistas de suero, con testigo de carga de GAPDH a lo largo de 8 horas ± Dominio V, que demuestra que los niveles de α5β1 de células completas disminuyen a lo largo de 8 horas en los testigos mientras que el Dominio V mantiene los niveles de α5β1. Figura 13G: Inmunocitoquímica de células endoteliales de cerebro para α5β1 que demuestra que la exposición al Dominio V desplaza la localización de α5β1, de una distribución celular uniforme a la superficie/lamelipodios. Figura 13H: Transferencia Western representativa de tejido cerebral con accidente cerebrovascular (I) y contralateral (C), el día 3 después del accidente cerebrovascular, de animales tratados con PBS y Dominio V con el correspondiente testigo de carga de GAPDH, que demuestra un aumento significativo en los niveles totales de α5β1 en cerebro con

accidente cerebrovascular mediante el tratamiento con Dominio V.

Las Figuras 14A-14B muestran los efectos de $\alpha 2\beta 1$ sobre la actividad proliferativa celular de DV en células C57. Figura 14A: El DV aumenta la proliferación de células endoteliales de cerebro de ratón, en comparación con medios celulares testigo, que puede ser bloqueada mediante la adición de un anticuerpo neutralizante de VEGF o un anticuerpo bloqueante de la función de la integrina $\alpha 5\beta 1$. Figura 14B: La adición de integrina $\alpha 2\beta 1$ a las células más bien suprime que aumenta el crecimiento de las células. Las barras representan los valores medios +/- la desviación estándar (Figura 14B). **p < 0,01, ###p < 0,01.

Las Figuras 15A-15B muestran los efectos de DV sobre el espacio intervascular en razas Balb/c (Figura 15A) y C57B16 (Figura 15B) de ratones. Figura 15A: En la raza BALB/c, valores de R_{tisular} de [^3H]manitol y [^{14}C]sacarosa medidos en ausencia (testigo de 0 horas) y presencia de DV (8 y 24 horas). La diferencia entre los tres grupos experimentales tanto para [^3H]manitol como para [^{14}C]sacarosa no es mayor que la que se esperaría por casualidad después de tener en cuenta los efectos de diferencias en cuanto a la región (*P > 0,05; ANOVA de dos vías). En cada grupo n = 4. Los valores representan la media \pm el error estándar de la media. Figura 15B: En la raza C57B16, valores de R_{tisular} de [^3H]manitol y [^{14}C]sacarosa medidos en ausencia (testigo de 0 horas) y presencia de DV (2 horas). La diferencia entre los grupos experimentales tanto para [^3H]manitol como para [^{14}C]sacarosa no es mayor que la que se esperaría por casualidad después de tener en cuenta los efectos de diferencias en cuanto a la región (*P > 0,05; ANOVA de dos vías). En cada grupo n = 5. Los valores representan la media \pm el error estándar de la media.

Descripción detallada de la invención

El uso de la palabra "un" o "una", cuando se usa junto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva, puede significar "uno" pero es también consistente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno". Ciertos aspectos de la descripción pueden consistir o consisten esencialmente en uno o más elementos, operaciones de método, y/o métodos de la descripción. Se considera que cualquier método o composición descritos en esta memoria descriptiva puede ser implementado con respecto a cualquier otro método o composición descritos en esta memoria descriptiva.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se emplea para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere sólo a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la descripción soporta una definición que se refiere a sólo alternativas e "y/o".

La presente descripción proporciona un método para estimular o potenciar la angiogénesis en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína endorrepelina, en donde dicha proteína endorrepelina tiene una secuencia de aminoácidos del dominio V del perlecano; y estimular o potenciar la generación de vasos sanguíneos. El dominio V del perlecano puede ser administrado mediante cualquier método útil que pueda ser fácilmente determinado por una persona que tiene una experiencia ordinaria en esta técnica. Además, el dominio V del perlecano puede ser administrado en una cantidad de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del paciente. Típicamente, la administración da lugar a la formación de tubos capilares de células endoteliales de cerebro dentro de las neuronas y/o a la expresión aumentada de la integrina $\alpha 5\beta 1$ proangiogénica en células endoteliales de cerebro.

La presente descripción también proporciona un método para estimular o potenciar la angiogénesis en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína endostatina, o fragmentos o derivados o análogos de la misma; y estimular o potenciar la generación de vasos sanguíneos. Preferiblemente, los fragmentos de endostatina tienen una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% con respecto a la endostatina. En general, una persona que tuviera una experiencia ordinaria en esta técnica sería capaz de obtener fácilmente fragmentos o derivados útiles. La endostatina o los fragmentos o derivados o análogos de la misma se pueden administrar mediante cualquier método útil que pueda ser fácilmente determinado por una persona que tenga una experiencia ordinaria en esta técnica. En general, la endostatina o los fragmentos o derivados o análogos de la misma se pueden administrar en una cantidad de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del paciente. La administración da lugar a la formación de tubos capilares de células endoteliales de cerebro dentro de las neuronas.

La presente descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende un dominio V de perlecano, un compuesto de estatina y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende endostatina o fragmentos o derivados o análogos de la misma, un compuesto de estatina y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende endostatina o fragmentos o derivados o análogos de la misma, una estatina y un vehículo excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición descrita en esta memoria puede ser administrada sola o en combinación con otro fármaco o un compuesto. Dicho fármaco o compuesto se puede administrar concurrente o secuencialmente con la composición descrita en esta memoria. El efecto de la administración conjunta con la composición es reducir la dosificación del fármaco o compuesto normalmente requerido, del que se sabe que ejerce al menos un efecto farmacológico o terapéutico mínimo contra la enfermedad que está siendo tratada.

La composición descrita en esta memoria y el fármaco o el compuesto se pueden administrar independientemente, sea sistémica o sea localmente, mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, subcutánea, intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, tópica, entérica, rectal, nasal, bucal o vaginalmente, por inhalación de una composición pulverizada, mediante una bomba de fármaco, o contenida dentro de un parche transdérmico o un implante. Las formulaciones de dosificación de la composición descrita en esta memoria pueden comprender vehículos atóxicos convencionales, fisiológica o farmacéuticamente aceptables, adecuados para el método de administración.

La composición descrita en esta memoria y el fármaco o el compuesto se pueden administrar independientemente una o más veces para alcanzar, mantener o mejorar un efecto terapéutico. Está dentro de la experiencia de un técnico el determinar la dosificación o si una dosificación adecuada de la composición o el fármaco o compuesto, o de ambos, comprende una sola dosis administrada o múltiples dosis administradas.

Como es bien sabido en la técnica, un nivel de dosis específico de dicha composición generada para cualquier paciente concreto depende de una diversidad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad concreta para la que se aplica la terapia. La persona responsable de la administración determinará la dosis apropiada para el sujeto individual. Más aún, para la administración a seres humanos, las preparaciones deberían satisfacer normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza como las requeridas por la FDA Office of Biologics.

La administración de la composición de la presente descripción a un paciente o sujeto seguirá los protocolos generales para la administración de terapias empleadas en el tratamiento de enfermedades o trastornos vasculares cerebrales teniendo en cuenta la toxicidad, si la hubiera, de los componentes en la composición y/o en realizaciones de terapia de combinación. Se espera que se repitan los ciclos de tratamiento conforme sea necesario. También se contempla que se puedan aplicar diversas terapias estándares, así como una intervención quirúrgica, en combinación con la terapia descrita.

Como es conocido por quien tiene experiencia en la técnica, la composición descrita en esta memoria puede ser administrada junto con cualquiera de los conocidos vehículos farmacológicamente aceptables. Además, la composición puede ser administrada a través de cualquiera de las vías de administración conocidas, tal como la vía subcutánea, intranasal o mucosa. Además, la dosificación de la composición que se va a administrar puede ser determinada llevando a cabo experimentos, como es conocido por quien tiene experiencia en la técnica.

Los ejemplos siguientes se proporcionan con la finalidad de ilustrar diversos aspectos de la descripción.

Ejemplo 1

Células endoteliales

Se adquirieron células endoteliales microvasculares humanas de vena umbilical (HUVEC; del inglés, human umbilical vein endothelial cells) y de cerebro a Lonza (Basel, Suiza) y Cell Systems (Kirkland, Washington, EE.UU.), respectivamente, y se subcultivaron siguiendo las instrucciones de los proveedores. Se obtuvieron células endoteliales microvasculares de cerebros de ratón y rata a través de Jane Welsh, Texas A&M University, y se subcultivaron del modo descrito (5).

Ejemplo 2

Dominio V y endostatina

Se adquirió endostatina humana a Cell Sciences, Inc. (Canton, Massachusetts, EE.UU.) y Sigma Chemical (St. Louis, Missouri, EE.UU.). El Dominio V (DV) fue clonado en el vector pSecTag2A (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) y fue purificado de células 293FT transfectadas (ATCC, Manassas, Virginia, EE.UU.) a través de su etiqueta 6XHis C-terminal y cromatografía en columna de glóbulos de agarosa Ni-ATA (Qiagen, Valencia, California, EE.UU.). La pureza del DV dializado (frente a PBS) se confirmó a través de SDS-PAGE y transferencia Western con anticuerpos anti-DV (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EE.UU.) y anti-his (EMD Chemicals, Gibbstown, New Jersey, EE.UU.). En todos los experimentos se emplearon pretratamientos de treinta minutos con concentraciones antiangiogénicas previamente demostradas de DV (250 nM) y endostatina (600 ng/ml) y testigos térmicamente inactivados (100 °C durante 30 minutos). Para todos los experimentos descritos, N = 15 (5 experimentos

independientes; cada condición llevada a cabo por triplicado). Se determinó la significación estadística ($p < 0,05$) en todos los experimentos mediante la prueba t desapareada de Student con el conjunto informático Sigmastat.

Ejemplo 3

Modelo de accidente cerebrovascular in vivo de la arteria cerebral media con endotelina-1

- 5 Se sometieron ratas Harlan Sprague Dawley ($n = 10$) a cirugía estereotáctica para oclusión de la arteria cerebral media con inyección de endotelina-1 (American Peptide Company, Sunnyvale, California, EE.UU.) o PBS. Se sacrificaron las ratas 3 o 7 días después de la cirugía y se procesó tejido cerebral para el análisis de Dominio V y GAPDH por inmunotransferencia Western.

Ejemplo 4

10 Ensayos de angiogénesis in vitro

- Se llevaron a cabo experimentos con Matrigel del modo descrito (7). Después de 12-18 horas, se obtuvieron imágenes de las células y se cuantificó la formación de tubos (píxeles de tubo/campo de alto aumento, 10 zonas por condición) con Adobe Photoshop CS. Se evaluó la migración celular con una cámara Boyden modificada (NeuroProbe, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 6-8 horas se evaluó la migración a través de una membrana de policarbonato revestida con colágeno de tipo I hacia medios exentos de suero +/- suero bovino fetal al 3%. Después de 48 horas se evaluó la proliferación en medios exentos de suero que contenían 20 ng/ml de VEGF con disolución de MTS (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 5

20 Ensayo de tubulogénesis en cultivo conjunto de neuronas y células endoteliales de cerebro

- Se añadieron neuronas granulosas de cerebelo, aisladas de ratas posnatales de 8 días, a un portaobjetos de cámara previamente revestido con laminina (Invitrogen) y se cultivaron durante la noche. Luego se añadieron células endoteliales de cerebro durante la noche, lo que fue seguido de tratamientos experimentales durante 2-6 horas en medios exentos de suero. Las células fijadas fueron inmunoteñidas con anticuerpos anti-factor de von Willebrand (Dako, Dinamarca) o anti-TUJ1 (Neuromics, Edina, Minnesota, EE.UU.) y los apropiados anticuerpos secundarios etiquetados con fluorocromos (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, EE.UU.) para microscopía confocal (Zeiss, New York, EE.UU.).

Ejemplo 6

Resultados

- 30 Puesto que la angiogénesis máxima del periinfarto se inicia después de 3-7 días, se examinaron los hemisferios cerebrales con accidente cerebrovascular y sin accidente cerebrovascular testigo del mismo animal en cuanto a los niveles de Dominio V por inmunotransferencia Western 3 y 7 días después del accidente cerebrovascular ($n = 5$ para cada punto temporal). Tres días después de la inducción del accidente cerebrovascular se demostró un aumento del 530% \pm 20% (desviación estándar) en el Dominio V del hemisferio cerebral con accidente cerebrovascular, según se normalizó con respecto al testigo de carga de GAPDH y se cuantificó por densitometría óptica (ImageJ, software del NIH) ($p < 0,001$ mediante la prueba t desapareada de Student) (Figuras 1A-1B).

- Se examinaron la capacidad de DV para afectar a la angiogénesis cerebral y la implicación de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en este proceso usando un ensayo de tubo capilar in vitro. Se añadieron células endoteliales microvasculares de cerebro de rata (50.000 células/pocillo, proporcionadas por Jane Welsh, Texas A&M) (8) a pocillos revestidos con Matrigel [una sustancia similar a la membrana basal vascular, que estimula la tubulogénesis capilar (9), 25 ml/pocillo, BD Biosciences] de una placa de 24 pocillos \pm una preincubación con DV (200 nM) \pm anticuerpo $\alpha 5\beta 1$ bloqueante de la función (10 mg/ml, Figura 2A). Después de 9 horas, las células endoteliales de cerebro tratadas con DV formaron significativamente más tubos capilares que los testigos no tratados ($p < 0,0001$). Este efecto fue a su vez significativamente bloqueado por el anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ ($p < 0,001$, en comparación con el tratamiento con DV solo, Figura 2B). Un pretratamiento con anticuerpo bloqueante anti- $\alpha 5\beta 1$ solo no afectó significativamente a la formación de tubos ($p = 0,3$).

- A continuación, para determinar si el DV podría afectar a la interacción entre células endoteliales de cerebro y neuronas, es decir, al nicho neurovascular, se desarrolló un ensayo de cultivo conjunto de células endoteliales de cerebro y neuronas granulosas en el que se añaden células endoteliales de cerebro a una capa de neuronas primarias obtenidas del cerebelo de una rata posnatal de 8 días, lo que produjo un cultivo de neuronas granulosas recién generadas con pureza $> 95\%$ (10). Se añadieron las neuronas (5×10^4 células/pocillo) a un portaobjetos de cámara de 8 pocillos previamente revestido con laminina y se dejaron en cultivo durante la noche a 37 °C. Al día

siguiente, se añadieron células endoteliales de cerebro (3×10^4 células/pocillo) y se dejaron en cultivo durante la noche, lo que fue seguido de un tratamiento con DV durante 6 horas en medios exentos de suero. En este ensayo, las células endoteliales de cerebro se segregan rápidamente (en 2-3 horas) de las neuronas formando islas nítidas de células endoteliales. El tratamiento con DV dio lugar a una drástica formación de tubos capilares de células endoteliales de cerebro dentro de las neuronas (Figura 3).

Para demostrar si el Dominio V afecta a la expresión de la integrina proangiogénica $\alpha 5\beta 1$ en células endoteliales de cerebro, se analizó por medio de inmunocitoquímica y microscopía confocal la localización subcelular de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en células endoteliales de cerebro de rata cultivadas, no tratadas y expuestas al Dominio V. En la Figura 4 se muestra que el tratamiento con DV daba lugar a una redistribución de la integrina $\alpha 5\beta 1$, de proyecciones difusamente citoplasmáticas a proyecciones en la superficie celular comúnmente vistas en células endoteliales angiogénicas.

Para determinar si el Dominio V podía sustentar la adhesión de células endoteliales de cerebro a través de la integrina $\alpha 5\beta 1$, se llevó a cabo un ensayo de adhesión celular con pocillos revestidos con BSA al 1% (testigo de adhesión) o Dominio V (40 $\mu\text{g/ml}$) y células añadidas \pm preincubación con anticuerpo bloqueante de la función de $\alpha 5\beta 1$ (10 $\mu\text{g/ml}$). La Figura 5 demuestra que el Dominio V sustentaba significativamente más adhesión de células endoteliales de cerebro que la BSA ($p < 0,001$) y que el anticuerpo bloqueante de la función de $\alpha 5\beta 1$ inhibía significativamente ($p < 0,001$) la adhesión de células endoteliales de cerebro a DV, lo que sugiere la posibilidad de que DV pueda sustentar la adhesión de células endoteliales de cerebro mediada por la integrina $\alpha 5\beta 1$.

Estos resultados demuestran que el Dominio V de cerebro está aumentado después de un accidente cerebrovascular y potencia tanto la angiogénesis en un entorno neuronal como la interacción entre células endoteliales de cerebro y neuronas. Además, estos efectos requieren interacciones con la integrina $\alpha 5\beta 1$. Resulta importante que estos resultados respaldan la postura de que el cerebro se autorrepara después de un accidente cerebrovascular al generar un fragmento bioactivo (DV) de perlecano y que se puede explotar terapéuticamente este mecanismo de reparación del cerebro.

Ejemplo 7

Efectos de DV sobre la angiogénesis cerebral y la formación del nicho neurovascular

Para demostrar el papel del Dominio V en la angiogénesis cerebral *in vitro*, se llevan a cabo ensayos de angiogénesis que incluyen ensayos de tubos capilares en Matrigel, ensayos de migración celular y ensayos de proliferación celular con células endoteliales cerebrales microvasculares y Dominio V recombinante humano. Se utiliza un ensayo de tubos capilares en cultivo conjunto de neuronas y células endoteliales de cerebro para estudiar los efectos del Dominio V sobre la formación de tubos capilares en un entorno más parecido al cerebral así como para estudiar la formación del nicho neurovascular. Los estudios anteriores se llevan a cabo en un entorno desprovisto de oxígeno y glucosa (OGD; del inglés, oxygen and glucose-deprived) para modelar una isquemia focal *in vitro*. El DV potenciará significativamente, y de una manera dependiente de la dosis, la angiogénesis cerebral así como la interacción entre neuronas y células endoteliales tanto en condiciones normales como en condiciones de OGD.

Ejemplo 8

Clonación y purificación de DV

Se clonó el Dominio V en el vector pSecTag2A (Invitrogen), que añadía una etiqueta 6XHis al extremo C del DV. Se transfectaron células 293FT (ATCC, Manassas, Virginia, EE.UU.) con plásmidos por medio de Lipofectamine (Invitrogen). Después de la transfección, se recogieron los medios acondicionados exentos de suero (que contenían DV secretado por las células) y se purificó el DV por medio de cromatografía en columna de glóbulos de agarosa Ni-ATA a 4 °C. El DV eluido fue dializado frente a PBS 1X y fue evaluado en cuanto a pureza por medio de SDS-PAGE con tinción con Brilliant Blue G coloidal (DV_C) y mediante análisis por transferencia Western (DV_{WB}) con anticuerpo anti-DV (mostrado) y anticuerpo anti-His. El DV fue cuantificado con el reactivo colorante Quick Start Bradford.

Ejemplo 9

Efectos de DV sobre la proliferación de células endoteliales

La proliferación de células endoteliales es una fase inicial importante en la angiogénesis. Para evaluar los efectos proliferativos del Dominio V sobre células endoteliales, se emplean células endoteliales cerebrales microvasculares tanto de ratones como de ratas para descartar diferencias específicas de la especie y lograr la correspondencia con el uso de ratas en un modelo de accidente cerebrovascular *in vivo*. Se utilizan células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, Lonza, Basel, Suiza) como un testigo y se utilizan células endoteliales microvasculares de cerebro humano (Cell Systems, Kirkland, Washington, EE.UU.) para determinar si los efectos del Dominio V pudieran ser

también aplicables a seres humanos. Para los ensayos de proliferación, las células son recogidas con tripsina al 0,25% (Invitrogen), pretratadas con testigo vehicular o DV en suspensión en diferentes concentraciones (se utilizan concentraciones 1-450 nM en todos los experimentos de angiogénesis in vitro) durante 30 minutos en medios exentos de suero que contienen 20 ng/ml de VEGF, y luego añadidas a placas de 96 pocillos con una densidad de 5×10^3 células/pocillo. Luego se incuban las células durante 48 horas bajo condiciones de crecimiento normales. Luego se añade una disolución de MTS (20 ml/pocillo) durante 1 hora, lo que va seguido de una lectura de la absorbancia a 490 nm con el lector de placas.

Ejemplo 10

Determinación de los efectos de DV sobre la migración de células endoteliales

10 Cuando las células endoteliales angiogénicas están proliferando, comienzan a migrar hacia una región tisular que requiere un nuevo suministro de sangre en respuesta a un agente quimioatrayente liberado por el tejido que requiere vasos sanguíneos. Para evaluar si el DV pudiera afectar a la migración de células endoteliales, las células son recogidas, cargadas en la cámara superior de una cámara Boyden modificada (NeuroProbe, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.) ± preincubación durante 30 minutos en los apropiados medios exentos de suero con diferentes concentraciones de DV en suspensión a 37 °C, y dejadas migrar a través de una membrana de policarbonato revestida con colágeno de tipo I, laminina o fibronectina hacia medios exentos de suero ± FBS al 3% en la cámara inferior durante 6-8 horas a 37 °C. Resulta importante que estas matrices extracelulares representan un sustrato neutro, antiangiogénico y proangiogénico, respectivamente, para células endoteliales de cerebro (11) y que su uso debería permitir la determinación de si los efectos de DV son específicos de la ECM. La membrana (que contiene células que migran) es luego fijada con acetona, y las células son teñidas con violeta cristal (Sigma) y contadas bajo el microscopio. Además, se determina si el DV afecta diferencialmente a la migración hacia diferentes agentes quimioatrayentes, incluyendo el VEGF, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; del inglés, brain derived neurotrophic factor), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el FGF básico (bFGF).

Ejemplo 11

25 Determinación de los efectos de DV sobre la tubulogénesis de células endoteliales inducida por Matrigel

Una vez que las células endoteliales llegan a la prevista diana tisular que requiere un nuevo suministro de sangre, las células experimentan una morfogénesis capilar para crear el nuevo vaso sanguíneo. Los ensayos de tubulogénesis en Matrigel son una técnica bien establecida para estudiar la morfogénesis de capilares de células endoteliales in vitro (12). Para este fin, estos ensayos se llevan a cabo del modo anteriormente descrito ± preincubación de células endoteliales con DV en diferentes concentraciones. Las células son observadas en diferentes puntos temporales y son luego fijadas en paraformaldehído al 4% después de 12-18 horas. Se adquieren imágenes con una cámara de CCD fijada a un microscopio invertido, usando un software estándar para captura de imágenes. La formación de los tubos se cuantifica (píxeles de tubo/campo microscópico, 10 campos por condición) con Adobe Photoshop CS.

35 **Ejemplo 12**

Determinación de los efectos de DV sobre la tubulogénesis de células endoteliales y las interacciones neuronales en cultivo conjunto

Para investigar la capacidad del Dominio V para modular la formación de tubos capilares de células endoteliales de cerebro en un entorno más similar al cerebral que Matrigel, se desarrolló un sistema de ensayo en cultivo conjunto compuesto de neuronas granulosas de cerebelo y células endoteliales de cerebro. Se seleccionó el cerebelo de una rata posnatal de 8 días como fuente neuronal ya que es fácilmente accesible y una fuente abundante de neuronas recién generadas (13), que interaccionan con células endoteliales de cerebro. Además de laminina, las neuronas son añadidas a pocillos previamente revestidos con colágeno I o fibronectina para determinar la importancia relativa de cada sustrato subyacente en cuanto a la formación de tubos de células endoteliales. Se determinan los efectos de diferentes concentraciones de Dominio V sobre el grado de formación de tubos de células endoteliales durante diferentes periodos de incubación (1, 3, 6 y 9 horas). Se demuestran los efectos potenciadores del Dominio V, dependientes de la dosis, sobre la formación de tubos.

Los datos presentes sugieren que las células endoteliales de cerebro se segregan de las neuronas en ausencia de Dominio V, mientras que el Dominio V promueve la formación de tubos capilares entre las neuronas. Por lo tanto, además de permitir el estudio de la formación de capilares, este sistema de cultivo conjunto permite examinar los efectos de DV sobre las interacciones dinámicas entre células endoteliales, neuronas y la ECM. En primer lugar se utiliza el microscopio confocal para examinar los efectos del Dominio V en diferentes puntos temporales sobre la interacción tridimensional entre las células endoteliales de cerebro, las neuronas y la ECM circundante recogiendo imágenes por apilamiento focal (z-stack) de células fijadas e inmunoteñidas para anti-factor de von Willebrand, anti-TUJ1, anti- $\alpha 5 \beta 1$, la proteína claudina-5 de juntas ceñidas y anti-componentes de la ECM, incluyendo fibronectina,

laminina y colágeno de tipo IV. En estos estudios, se muestra si DV afecta a la distribución de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en células endoteliales en relación con la ECM circundante así como la determinación de cambios en las interacciones homotípicas de células endoteliales, según se miden por cambios en la expresión de claudina-5 y en la distribución celular, y en las interacciones neuronales heterotípicas, según se miden por cambios en la proximidad de células endoteliales-neuronas.

Se utiliza un microscopio para células vivas (microscopio Nikon con platina motorizada y platina con CO_2 controlado y calentada, conectada a una cámara de CCD y a un PC con el software Metamorph para obtención de imágenes) para obtener imágenes de la interacción entre neuronas y células endoteliales fluorescentemente marcadas con dil y diO (14), respectivamente, \pm terapia con DV a lo largo de un periodo prolongado. El tratamiento con Dominio V aumenta los contactos físicos visibles entre las células endoteliales de cerebro y las neuronas, promoviendo y potenciando por ello la formación del nicho neurovascular durante la recuperación de un accidente cerebrovascular. El contacto entre células endoteliales y neuronas se cuantifica como el número de contactos visibles entre células endoteliales y neuronas por campo microscópico/por hora. También se cuantifica el grado en que células endoteliales individuales entran en contacto con neuronas por hora.

Finalmente, para determinar si la presencia de neuronas o sus ECM/factores de crecimiento secretados es necesaria para los efectos de DV en cuanto a promover la formación de tubos capilares, en ciertos experimentos se separan las neuronas con Cellstripper, una disolución de disociación no enzimática que dejará la matriz secretada por las neuronas en el fondo del pocillo, según se verifica por anticuerpos para ECM, antes de la adición de las células endoteliales de cerebro \pm tratamiento con DV. En otros experimentos se añaden medios acondicionados neuronales a las células endoteliales cultivadas sobre laminina. Los datos muestran la necesidad de las interacciones entre neuronas y células endoteliales para la formación de tubos de células endoteliales.

Ejemplo 13

Efectos de la privación de oxígeno-glucosa (OGD) en ensayos in vitro sobre DV

Se muestran los efectos del Dominio V en un modelo in vitro de isquemia (15) usando los ensayos de angiogénesis anteriormente descritos en medios con niveles de glucosa reducidos (1 g/l) en una cámara hipóxica. Para cada ensayo, se colocan los cultivos, en medios con niveles de glucosa reducidos \pm DV, en una cámara hipóxica que es purgada con N_2 al 95%/ CO_2 al 5% durante 1 hora, lo que va seguido del sellado de la cámara durante el experimento, como se describió anteriormente para cada ensayo de angiogénesis. La OGD sola aumenta la angiogénesis de células endoteliales de cerebro y ésta es adicionalmente potenciada por el DV.

Ejemplo 14

Efectos proangiogénicos de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y el DV en células endoteliales de cerebro

La necesidad de $\alpha 5\beta 1$ para los efectos proangiogénicos de DV significa que el bloqueo de $\alpha 5\beta 1$ y/o la reducción de los niveles de $\alpha 5\beta 1$ mitigan o inhiben los efectos proangiogénicos del Dominio V. Por lo tanto, se muestran los efectos de una inhibición funcional de la integrina $\alpha 5\beta 1$ con un anticuerpo bloqueante de la función y una IgG testigo (Millipore, 10-20 mg/ml, preincubados con las células) y de una reducción de los niveles de $\alpha 5\beta 1$ con siRNA (siRNA Accell previamente diseñado, Dharmacon, Chicago, Illinois, EE.UU.), respectivamente, sobre células endoteliales de cerebro tratadas con DV y no tratadas en ensayos de migración, proliferación y tubulogénesis. La rebaja de $\alpha 5\beta 1$ se confirma por medio de una transferencia Western.

Ejemplo 15

Determinación de los efectos de DV sobre la localización superficial de $\alpha 5\beta 1$ en células endoteliales

Para medir directamente la localización superficial de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en células endoteliales de cerebro en respuesta a una exposición a DV, se usan los métodos de Milner et al. (15) para preparar células cultivadas sobre plástico o diversos sustratos (laminina, colágeno, fibronectina o DV inmovilizado, en concentración de 40 mg/ml, añadidos a los pocillos durante la noche a 4 °C) \pm exposición a DV para citometría de flujo usando el aparato Becton-Dickinson FACSCalibur con los programas informáticos CellQuest (Becton-Dickinson) y ModFit LT (Verify).

Ejemplo 16

Determinación de la interacción de DV con la integrina $\alpha 5\beta 1$ y la activación de ésta

El DV debería unirse a la integrina $\alpha 5\beta 1$ y activarla para dar lugar a una afinidad aumentada de las células endoteliales de cerebro por la fibronectina a través del motivo ligante RGD de fibronectina/ $\alpha 5\beta 1$. Se muestra que el DV efectúa un aumento de la adhesión de células endoteliales de cerebro a fibronectina inmovilizada y la secuencia RGD GRGDS (ID. SEC. n° 1) frente a un péptido testigo SDGRG (ID. SEC. n° 2).

Se llevaron a cabo ensayos de adhesión celular del modo anteriormente descrito en pocillos revestidos con DV (40 µg/ml), fibronectina (10 µg/ml), péptidos GRGDS o SDGRG (0,1 µg/ml) o BSA al 1%. Para mostrar que la adhesión celular a DV depende de $\alpha 5\beta 1$, se llevan a cabo estudios de adhesión en que se inhibe la función o expresión de $\alpha 5\beta 1$. Se tratan las células con siRNA de $\alpha 5\beta 1$ siguiendo las instrucciones del fabricante y se confirma la eficacia de la rebaja de $\alpha 5\beta 1$ por medio de una inmunotransferencia Western. Alternativamente, las células son previamente incubadas con el anticuerpo bloqueante anti- $\alpha 5\beta 1$ antes del ensayo de adhesión. Se muestra que la inhibición de la función o expresión de $\alpha 5\beta 1$ disminuye o inhibe la adhesión de células endoteliales de cerebro al DV. Se muestra que el DV potencia la adhesión de células endoteliales de cerebro a fibronectina y el péptido GRGDS y que el tratamiento con siRNA de $\alpha 5\beta 1$ inhibe la adhesión de células endoteliales de cerebro al Dominio V inmovilizado y que el DV añadido potencia la adhesión de células endoteliales de cerebro a fibronectina y GRGDS.

Ejemplo 17

DV generado por accidente cerebrovascular

Se administra DV después de un accidente cerebrovascular y se muestran sus efectos sobre la patología y la recuperación funcional del accidente cerebrovascular. La angiogénesis después del accidente cerebrovascular se ve aumentada tras la administración de DV en un accidente cerebrovascular *in vivo*, al igual que la formación del nicho neurovascular, y los resultados patológicos y funcionales del accidente cerebrovascular en ratas resultan mejorados. La terapia con DV es bien tolerada por los animales.

Ejemplo 18

Modelo de accidente cerebrovascular *in vivo* por endotelina-1 y terapia con DV

Se someten ratas Harlan Sprague Dawley a endotelina-1 (o un testigo simulado de PBS) para inducir la oclusión de la arteria cerebral media (MCAo), del modo anteriormente descrito. Se confirma la interrupción del flujo sanguíneo usando un caudalímetro Doppler por láser (modelo BPM2, Vasamedics Inc., St. Paul, Minnesota, EE.UU.) (16) (49). 24 horas después de la MCAo, los animales son aleatoriamente distribuidos en dos grupos: 1 que recibe 2-6 mg/kg de DV filtrado [una cantidad suficiente para inhibir la angiogénesis tumoral, como se ha publicado (7)] por inyección intraperitoneal (I.P.) (grupo tratado) y 1 que recibe testigo vehicular cada 2 días durante 2 semanas. También comenzando a las 24 horas después de la MCAo, las ratas reciben diariamente (durante 14 días) inyecciones I.P. de bromodesoxiuridina (BrdU; 100 mg/kg; Sigma) para marcar el DNA recién sintetizado con objeto de identificar neuronas recién nacidas en los cerebros de rata en recuperación.

Ejemplo 19

Inmunohistoquímica y transferencia Western de tejido de accidente cerebrovascular

Para evaluar la angiogénesis y la formación del nicho neurovascular después de un accidente cerebrovascular \pm terapia con DV en ratas, se congelan tejidos cerebrales frescos de animales con accidente cerebrovascular y con simulación de accidente cerebrovascular en nitrógeno líquido. Para la inmunohistoquímica de la angiogénesis, se sondan cortes criostáticos de los hemisferios cerebrales con accidente cerebrovascular, obtenidos con un criostato Microm HM 550 (Walldorf, Alemania), con anticuerpos dirigidos contra antígenos de vasos sanguíneos, es decir, CD31 y factor de von Willebrand (Dako). El grado de las interacciones de los vasos sanguíneos con neuronas BrdU+ es evaluado y cuantificado con Adobe Photoshop CS. Además, la incorporación y distribución del DV inyectado en el tejido con accidente cerebrovascular se muestran con un anticuerpo dirigido hacia la etiqueta 6xHIS de DV (EMD). En comparación con los animales con accidente cerebrovascular no tratados, la terapia con DV dará lugar a un aumento de vasos sanguíneos, es decir, un aumento de células positivas para CD31 y/o factor de von Willebrand, alrededor del tejido cerebral con accidente cerebrovascular, que puede también tener una expresión aumentada de integrina $\alpha 5\beta 1$ y una interacción aumentada entre estos vasos sanguíneos y neuronas BrdU+. El DV administrado se localizará en el sitio del accidente cerebrovascular y dará lugar a un tamaño de infarto reducido.

Ejemplo 20

Terapia con el Dominio V de perlecano para la parálisis cerebral inducida por accidente cerebrovascular

El accidente cerebrovascular isquémico arterial perinatal (PAS), un suceso cerebrovascular que tiene lugar durante la vida fetal o neonatal, es una causa principal de parálisis cerebral infantil. Desafortunadamente, el PAS se diagnostica típicamente de forma retrospectiva, es decir, una vez que se ha producido el daño y es demasiado tarde para las terapias tradicionales del accidente cerebrovascular, tal como el activador tisular de plasminógeno. Por lo tanto, las terapias exitosas para la parálisis cerebral deberían explotar los mecanismos cerebrales de autorreparación. Desafortunadamente, la autorreparación cerebral está poco entendida, aunque parece que tiene lugar en un nicho neurovascular de revascularización (angiogénesis) y repoblación neuronal (neurogénesis). Estos dos procesos implican una remodelación de la matriz extracelular (ECM) conducida por proteasas, con

consecuencias desconocidas. La angiogénesis y la formación del nicho neurovascular cerebrales después de un accidente cerebrovascular se estimulan en parte al generarse un fragmento bioactivo de la ECM, el perlecano, y este mecanismo de autorreparación es explotado para la terapia de la parálisis cerebral inducida por un PAS. El accidente cerebrovascular genera rápidamente fragmentos bioactivos de perlecano, que es el componente de la ECM más sensible a proteasas estudiado, y el perlecano es necesario tanto para la angiogénesis como para la neurogénesis. Además, un fragmento del perlecano, el dominio V (DV, también conocido como endorreplina), puede inhibir la angiogénesis en sistemas no cerebrales a través de la integrina $\alpha 2\beta 1$.

La presente descripción muestra que el DV está suprarregulado en el cerebro después de un accidente cerebrovascular y potencia inesperadamente la angiogénesis cerebral *in vitro* e *in vivo* después del accidente cerebrovascular, posiblemente a causa de la ausencia de la integrina $\alpha 2\beta 1$ en células endoteliales de cerebro. El DV ejerce sus efectos en células endoteliales de cerebro a través de la integrina proangiogénica $\alpha 5\beta 1$ y potencia la interacción entre neuronas y células endoteliales. Colectivamente, estos resultados sugieren que el cerebro podría autorrepararse a través de la producción de DV y que esto puede ser explotado terapéuticamente.

Para demostrar la utilidad de una terapia con DV para el PAS, se utilizó endotelina-1 para inducir accidentes cerebrovasculares transitorios por oclusión de la arteria cerebral media (MCAo) en ratas de 7 días de edad. Los animales recibieron luego una inyección intraperitoneal de 0,5 mg/kg de DV o testigo vehicular de PBS estériles 24 y 72 horas después del accidente cerebrovascular. Puesto que la angiogénesis máxima en la penumbra (la zona que rodea inmediatamente el tejido con accidente cerebrovascular) se inicia después de 3-7 días, se examinó la vasculatura de los cerebros con accidente cerebrovascular 5 días después del accidente cerebrovascular. Hubo hipervascularidad en la superficie de la corteza con accidente cerebrovascular en los animales tratados con DV, que no resultó evidente en la corteza contralateral ni en los animales con accidente cerebrovascular tratados con PBS (Figuras 6A-6B). Además, una inmunotinción de cortes tisulares congelados de estos cerebros con el marcador de vasos sanguíneos factor de von Willebrand reveló una vasculatura en la penumbra del accidente cerebrovascular significativamente aumentada en los animales tratados con DV en comparación con el testigo tratado con PBS (Figuras 6A-6B). Colectivamente, estos resultados sugieren que el DV podría aumentar la angiogénesis después de un PAS.

Ejemplo 21

El DV administrado se localiza en tejido de accidente cerebrovascular y periinfarto

Se analizó tejido cerebral mediante inmunohistoquímica para detectar el DV administrado (etiqueta epitópica HIS en el extremo C de DV recombinante) así como vasos sanguíneos (factor de von Willebrand) para determinar si el DV administrado podía ser detectado en tejido cerebral con accidente cerebrovascular y donde podía ser localizado. En la Figura 7 se demuestra que el DV administrado podía hallarse en abundancia en tejido cerebral con accidente cerebrovascular y en menor medida en la corteza del periinfarto, pero no en la corteza contralateral sin accidente cerebrovascular del mismo animal. Además, casi todo el DV administrado se depositaba según una distribución perivascular en la corteza del periinfarto y en el tejido con accidente cerebrovascular en menor grado, lo que es consistente con sus efectos promotores de vasos sanguíneos cerebrales y su capacidad para dirigirse a la perivascularidad activada de tumor sólido *in vivo*. Esto sugiere de forma significativa que el DV es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, al menos hasta regiones perivasculares no adyacentes a la luz tubular, a través de un mecanismo aún desconocido, donde podría exponerse a, y ejercer efectos sobre, otros tipos celulares tales como astrocitos y neuronas. En la Figura 8 se demuestra un resultado similar mediante análisis por transferencia Western de lisados obtenidos de las cortezas con accidente cerebrovascular y contralateral de un animal con accidente cerebrovascular tratado con PBS y DV, respectivamente.

Ejemplo 22

El DV administrado se localiza en tejido de accidente cerebrovascular y periinfarto

Para determinar si la terapia con DV podía afectar al número de neuroblastos que migran en el tejido cerebral de periinfarto, que se define como una zona cerebral inmediatamente adyacente al tejido cerebral infartado, e influir por ello en la repoblación del tejido cerebral con accidente cerebrovascular con nuevas neuronas, se utilizó la inmunohistoquímica con doblecortina (Figura 9A) de cortes cerebrales de un animal con accidente cerebrovascular tratado con PBS y DV y se cuantificó el número medio de píxeles de doblecortina por campo de alto aumento (HPF, $n = 20$ imágenes por animal) en los respectivos tejidos de periinfarto de accidente cerebrovascular. Se advirtió un aumento significativo de píxeles positivos para doblecortina en el animal tratado con DV. Además, al parecer haber concordancia con la hipótesis de que *DV promueve la formación del nicho neurovascular*, se advirtió un porcentaje significativamente mayor ($p < 0,001$) de células positivas para doblecortina identificadas en la proximidad inmediata a vasos sanguíneos, según se identificó mediante anticuerpos dirigidos a anticuerpo von Willebrand o anticuerpo HIS (Figura 9B) en el animal tratado con DV ($90\% \pm 5\%$, $n = 20$ imágenes por animal) en comparación con el testigo tratado con PBS ($60\% \pm 3\%$) en el tejido cerebral de periinfarto.

Ejemplo 23El DV potencia la migración neuronal cortical in vitro

Al promover la formación del nicho neurovascular a través de efectos sobre células endoteliales de cerebro, como sugieren los resultados anteriores, el DV podría ser neuroprotector y potenciar la neurogénesis y la migración neuronal. Además, si el DV atraviesa la barrera hematoencefálica, podría ejercer también efectos directos sobre neuronas. Se determinó si DV podía ejercer efectos neuronales directos que pudieran ser coherentes con su potencial terapéutico para el accidente cerebrovascular. Con esta finalidad, se aislaron neuronas corticales primarias de ratones C57B16 embrionarios de 15 días utilizando una técnica rutinaria de disección en ambiente estéril para el aislamiento de células primarias, poniendo particular atención en separar las meninges, y se llevó a cabo con estas células un ensayo de migración in vitro.

Antes de su uso, se confirmó la identidad neuronal mediante inmunocitoquímica con TUJ-1. Se cargaron las neuronas (3×10^3 /pocillo) en la cámara superior de una cámara Boyden modificada (NeuroProbe, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.) \pm preincubación durante 30 minutos en los apropiados medios exentos de suero con DV 100 nM o 200 nM en suspensión a 37 °C y luego se dejó que migraran a través de una membrana de policarbonato revestida con colágeno de tipo I hacia el quimioatrayente factor de crecimiento nervioso (NGF, 4 nM por pocillo inferior) durante 8 horas a 37 °C. La membrana (que contenía células en migración) fue luego fijada con acetona, y las células fueron teñidas con violeta cristal (Sigma) y contadas bajo el microscopio. En la Figura 10 se muestra que el DV potencia la migración de neuronas corticales al demostrarse que el tratamiento con DV potenciaba significativamente, y de un modo dependiente de la dosis, la migración neuronal cortical hacia NGF ($p < 0,0001$ para ambas concentraciones de DV), lo que sugiere que el DV podría ejercer efectos terapéuticos directos sobre neuronas.

La terapia con DV mejora el resultado funcional del accidente cerebrovascular

En la Figura 11 se muestra que desde el día 3 después del accidente cerebrovascular en adelante no hubo diferencia estadística alguna entre los testigos simulados y los animales con accidente cerebrovascular tratados con Dominio V. Los animales tratados con Dominio V se trataron con 0,5 mg/kg los días 1, 3, 5 y 7 después del accidente cerebrovascular.

Ejemplo 24El Dominio V induce la liberación de BDNF

Los presentes resultados *in vivo* sugieren que el tratamiento con DV favorecía la reparación neurovascular del cerebro, lo que podía ser debido en parte a la liberación, inducida por DV, de factores promotores neurovasculares tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). En la Figura 12A se demuestra que, después de 24 horas, el DV potencia significativamente (** $p = 0,0025$) la liberación de BDNF por células endoteliales microvasculares de cerebro. Similarmente, después de un accidente cerebrovascular, el tratamiento con DV daba lugar a un aumento significativo de los niveles de BDNF en el cerebro con accidente cerebrovascular (Figuras 12B-12C) los días 3 y 7 después del accidente cerebrovascular en comparación con los testigos tratados con PBS. Además, no se vio efecto alguno sobre los niveles de BDNF con la adición de DV a astrocitos primarios aislados de rata o neuronas corticales, lo que sugiere que los efectos de DV sobre los niveles cerebrales de BDNF *in vivo* pueden ser fundamentalmente mediados por células endoteliales de cerebro.

Ejemplo 25El Dominio V interacciona con, y ejerce sus efectos proangiogénicos a través de, la integrina $\alpha 5\beta 1$

Puesto que las células endoteliales microvasculares de cerebro no expresan el receptor de DV previamente identificado, la integrina $\alpha 2\beta 1$, el efecto proangiogénico de DV sobre las células endoteliales de cerebro podría ser debido tanto a la ausencia de $\alpha 2\beta 1$ como a la presencia de un receptor proangiogénico de DV distinto. La $\alpha 5\beta 1$ es crítica para el desarrollo vascular y promueve la angiogénesis cerebral después de un accidente cerebrovascular, pero, por otro lado, está infrarregulada en el cerebro maduro hasta que se vuelve a expresar en células endoteliales de cerebro después de una hipoxia. Una variante monómera de la angiopoyetina 1, un factor de crecimiento que promueve la angiogénesis, se une a, y promueve la estabilización vascular a través de, la integrina $\alpha 5\beta 1$, lo que enfatiza más la importancia de este receptor en la angiogénesis y la remodelación vascular.

Se determinó primero si la activación específica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ podría afectar a los niveles de BDNF. En la Figura 12A se demuestra que el tratamiento celular con un anticuerpo $\alpha 5\beta 1$ que reconoce específicamente el dominio $\alpha 5$ de unión al ligando era en sí mismo capaz de aumentar la liberación de BDNF. Además, SNAKA51, un anticuerpo que activa la integrina $\alpha 5\beta 1$ al unirse a una región fuera del dominio de unión al ligando y prepara por ello a $\alpha 5\beta 1$ para unirse al ligando, aumentó significativamente los niveles de BDNF ($p = 0,0007$). Resulta interesante que

la adición simultánea de anticuerpo $\alpha 5\beta 1$ y DV inhibía la liberación de BDNF, mientras que la adición simultánea de DV y SNAKA51 aumentaba más los niveles de BDNF ($p = 0,06$). Esto es coherente con la hipótesis de que DV aumenta la liberación de BDNF al unirse al dominio $\alpha 5$ de unión al ligando.

5 Se examinó si la adhesión de células endoteliales microvasculares de cerebro a DV podía depender de $\alpha 5\beta 1$ demostrando que el anticuerpo $\alpha 5\beta 1$ dirigido contra el dominio $\alpha 5$ de unión al ligando podía prevenir su adhesión a DV inmovilizado (figura 12A). Mediante un ELISA con integrina $\alpha 5\beta 1$ recombinante se demostró que DV se une a $\alpha 5\beta 1$ de un modo dependiente de la dosis con un valor de K_d de aproximadamente 30 nM (Figura 13B). Para vincular más los efectos proangiogénicos de DV con $\alpha 5\beta 1$, se demostró que la migración de células endoteliales de cerebro hacia DV podía ser inhibida tanto mediante fibronectina-GST como mediante $\alpha 5\beta 1$ soluble-GST (Figura 13C). Además, el péptido ligante CRRETAWAC (ID. SEC. n° 3) específico de $\alpha 5\beta 1$ podía inhibir significativamente ($p = 0,001$) los efectos de DV sobre la formación de tubos por células endoteliales de cerebro *in vitro* (Figuras 13D-13E).

15 Para abordar si DV aumenta la angiogénesis cerebral en parte al aumentar la expresión de $\alpha 5\beta 1$ por células endoteliales de cerebro, un tratamiento de monocapas de células endoteliales confluentes de cerebro con DV a lo largo de 8 horas mantuvo los niveles totales de proteína $\alpha 5\beta 1$ que, por otro lado, disminuían significativamente en condiciones testigo exentas de suero (Figura 13F). Además, el tratamiento con DV de células endoteliales de cerebro cultivadas sobre plástico redistribuía significativamente la integrina $\alpha 5\beta 1$ a la superficie/lamelipodios (Figura 13G) pero no ejercía efecto alguno sobre la expresión superficial de $\alpha 5\beta 1$ en astrocitos ni en neuronas corticales primarias. Finalmente, para determinar si DV podía también afectar a los niveles de integrina $\alpha 5\beta 1$ *in vivo*, se llevó a cabo un análisis por transferencia Western de un lisado cerebral de los hemisferios con accidente cerebrovascular y contralateral de animales el día 3 después del accidente cerebrovascular \pm tratamiento con DV (Figura 13H) y se observó significativamente más integrina $\alpha 5\beta 1$ en el tejido cerebral con accidente cerebrovascular de los animales tratados con DV ($p = 0,00004$, cuantificación no mostrada). Colectivamente, estos resultados sugieren que DV se une a, afecta a la expresión de, y ejerce su efecto proangiogénico a través de, la integrina $\alpha 5\beta 1$.

25 La integrina $\alpha 2\beta 1$ invierte la actividad de proliferación celular de DV

La adición de integrina $\alpha 2\beta 1$ a células endoteliales C57 de cerebro de ratón invierte la actividad proliferativa celular del Dominio V. Puesto que DV es antiangiogénico en la mayoría de las células endoteliales que expresan tanto integrina $\alpha 2\beta 1$ (receptor antiangiogénico) como integrina $\alpha 5\beta 1$ (receptor proangiogénico), se contempló que DV es antiangiogénico en estas células a causa de su afinidad aumentada por la integrina $\alpha 2\beta 1$ (K_d de aproximadamente 30 nM) con respecto a la integrina $\alpha 5\beta 1$ (K_d de 160 nM). Se transfectaron con integrina $\alpha 2\beta 1$ células endoteliales microvasculares de cerebro de ratón que no expresan normalmente este receptor. Esto fue llevado a cabo por transfección con un vector plasmídico (pEGFP-N2, Clontech) que contiene una secuencia que codifica la subunidad integrínica $\alpha 2$ con una proteína de fusión RFP C-terminal (Texas A&M University Biomedical Engineering); se empleó un vector vacío como testigo. Se dejó que las células se recuperaran durante 24 horas en un medio que no contenía antibióticos. La eficacia de la transfección se apreció después de 24 horas usando un microscopio de fluorescencia invertido. Se evaluó la proliferación celular después de 48 horas en medios exentos de suero con disolución de MTS (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DV aumenta la proliferación de células endoteliales de cerebro de ratón en comparación con los medios celulares testigo, lo que puede ser bloqueado mediante la adición de un anticuerpo neutralizante de VEGF o un anticuerpo bloqueante de la función de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Figura 14A). La adición de integrina $\alpha 2\beta 1$ a las células más bien suprime que aumenta el crecimiento de las células, lo que demuestra que la adición de integrina $\alpha 2\beta 1$ a células endoteliales de cerebro de ratón convierte a DV de proliferativo en antiproliferativo. Las barras son los valores medios \pm la desviación estándar (Figura 14B). ** $p < 0,01$. ## $p < 0,01$.

45 Cinética de la unión de DV a A5

Se llevaron a cabo ensayos de unión usando un biosensor óptico (IAsys; Affinity Sensors, Reino Unido) del modo descrito (17). En resumen, para unir covalentemente el dominio A5, denominado "un aceptor", a las superficies de un sensor, se activaron grupos carboxilato presentes en la superficie mediante la inyección de una mezcla 1:1 de N-hidroxisuccinimida 0,1 M y N-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida 0,4 M (Pierce). Luego se dejó que el aceptor, disuelto en disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline), se uniera a la superficie activada hasta que se alcanzó una respuesta en meseta. Los grupos activos residuales fueron bloqueados mediante una inyección de 100 μ l de Tris-HCl 1 M (pH de 8,5).

Una cubeta con A5 inmovilizado fue preparada con el tampón de unión (NaCl 150 mM, Tris-HCl 25 mM, pH = 7,4, y $MnCl_2$ 1 mM) a 25 °C durante 10 minutos. Se añadió a la cubeta una muestra de 100 μ l que contenía reactivo DV libre disuelto en el tampón de unión y luego se registró la fase de asociación. Posteriormente, se retiró la muestra, se añadió tampón exento de analito a la cubeta y se registró la fase de disociación. Después de cada ensayo la superficie de la cubeta fue regenerada mediante un breve lavado con glicocola 100 mM, pH = 4, lo que fue seguido de la obtención del equilibrio con el tampón de unión. Durante los ciclos de regeneración se puso atención en

completar la separación del analito unido a la superficie, y se continuó el lavado hasta que se alcanzó una respuesta igual a un valor de línea de base.

Para los ensayos de unión, se añadió DV libre en concentraciones que variaban de $8,0 \times 10^{-8}$ M a $4,0 \times 10^{-7}$ M. Se analizaron los datos del biosensor mediante el método del ajuste global, del modo descrito (18). Para cada ensayo, se obtuvieron las constantes de velocidad de asociación (k_{on}) y las constantes de velocidad de disociación (k_{off}) y se calcularon los valores de constantes de disociación en equilibrio (K_d) a partir de la relación k_{off}/k_{on} . Además, también se llevó a cabo la unión testigo de albúmina sérica bovina (BSA; del inglés, bovine serum albumin) en una concentración molar de $8,0 \times 10^{-7}$ (el doble de la mayor concentración de DV). Como se muestra en la Tabla 1, el DV se une a la integrina $\alpha 5\beta 1$.

k_{on} [$M^{-1}s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_d ($K_d = k_{off}/k_{on}$) [M]
$3,8 \times 10^6 \pm 2,7 \times 10^5$	$7,2 \times 10^{-1} \pm 1,1 \times 10^{-1}$	$1,6 \times 10^{-7} \pm 7,2 \times 10^{-8}$

Tabla 1

Estos estudios demuestran que el inhibidor de la angiogénesis derivado de la matriz extracelular, el DV de perlecano, es estable y crónicamente generado en el cerebro dañado por un accidente cerebrovascular. Bastante inesperadamente, el DV administrado más bien potencia que inhibe la angiogénesis cerebral *in vitro* e *in vivo*. El DV se dirige a tejido cerebral de accidente cerebrovascular y periinfarto, potencia la formación del nicho neurovascular, debido al menos en parte a una liberación potenciada de BDNF, y finalmente mejora el resultado motor funcional hasta los niveles de línea de base previos al accidente cerebrovascular en la endotelina-1 y los modelos de accidente cerebrovascular CCA y MCA ipsilaterales en tándem en ratas y ratones, respectivamente. Finalmente, el DV potencia la angiogénesis de células endoteliales de cerebro, en ausencia de la integrina $\alpha 2\beta 1$, a través de la integrina $\alpha 5\beta 1$.

El perlecano, sintetizado y secretado por neuronas, astrocitos y células endoteliales, inducido en el último caso por VEGF₁₆₅, presenta la distinción de ser el componente matricial más sensible y rápidamente procesado después de un accidente cerebrovascular. La proteólisis del perlecano por la catepsina L se produce en un plazo de 2 horas tras la oclusión de la arteria cerebral media en primates no humanos y persiste durante varios días. El procesamiento ininterrumpido del perlecano durante días después de un accidente cerebrovascular es consistente con los estudios que demuestran un aumento de la producción de perlecano en neuronas y astrocitos después de una lesión cerebral. En el presente estudio, hubo un rápido aumento de los niveles de DV de perlecano que se estabiliza gradualmente en un nivel elevado a lo largo del curso de siete días, un patrón temporal que se correlaciona bien con el perfil de proteólisis de perlecano después de un accidente cerebrovascular en primates no humanos.

La capacidad de un fragmento antiangiogénico de la matriz extracelular para promover la angiogénesis cerebral se puede deber al concepto de la heterogeneidad endotelial, por el que células endoteliales de diferentes lechos vasculares, en este caso cerebro frente a no cerebro, responden diferentemente a factores angiomoduladores. Esta respuesta diferencial puede ser debida a diferencias en los respectivos microentornos, a diferencias en receptores expresados, tal como la presencia o ausencia de la integrina $\alpha 2\beta 1$, o a diferencias en componentes de la transducción de señales. Además, la endostatina, el inhibidor de la angiogénesis derivado de colágeno de tipo XVIII, promueve la angiogénesis en células endoteliales inmaduras derivadas de células madre embrionarias diferenciadas, lo que hace surgir la posibilidad de que endotelios cerebrales angiogénicos actúen o se comporten como endotelios inmaduros. En realidad los endotelios cerebrales recién angiogénicos experimentan un cambio de receptores integrínicos después de una hipoxia cerebral, de receptores integrínicos maduros de vuelta a una expresión de integrinas en desarrollo, particularmente, la integrina $\alpha 5\beta 1$.

La expresión potenciada de la integrina $\alpha 5\beta 1$ después de un accidente cerebrovascular podría también explicar la capacidad de DV para dirigirse a la vasculatura de la corteza del accidente cerebrovascular y el periinfarto justo como la vasculatura tumoral que expresa $\alpha 2\beta 1$ sustentaba el direccionamiento de DV *in vivo*. Además, la proteólisis del perlecano y la generación de DV casi inmediatas después de un accidente cerebrovascular podrían servir como parte del desencadenamiento del cambio de receptores integrínicos. Esto viene sustentado por la observación de que DV aumentaba la expresión total de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en células endoteliales de cerebro *in vitro* y los niveles de integrina $\alpha 5\beta 1$ en tejido cerebral después del accidente cerebrovascular.

La presente descripción también muestra que DV estimula la liberación de BDNF. El BDNF es tanto proangiogénico como neuroprotector y estimula la migración neuronal y la renovación de células madre neurales. El BDNF es crítico para la recuperación inducida por rehabilitación en ratas después de un accidente cerebrovascular.

La isquemia cerebral focal causa la alteración de la barrera hematoencefálica, que se manifiesta como una pérdida de integridad microvascular y una fuga de componentes plasmáticos al espacio extravascular. Además, la prevención de aumentos precoces de permeabilidad puede ser beneficiosa para las consecuencias de una lesión. El

nDV puede llevar a cabo esta función e incluso quizás mejorar la función de barrera dentro de este marco temporal, reduciendo así el grado de la lesión. Resulta intrigante que el mismo proceso proteolítico que descompone la matriz extracelular vascular y contribuye directamente a una fuga vascular aguda en el accidente cerebrovascular también genere DV, lo que sugiere que la proteólisis de la matriz vascular inducida por un accidente cerebrovascular no es completamente deletérea. La subsiguiente permeabilidad inducida por DV después de 8 horas puede indicar un papel en la remodelación vascular precoz que contribuya a un rápido restablecimiento de un estado estable en cuanto al suministro de oxígeno. Resulta notable que el aumento de permeabilidad microvascular inducido por DV precede a la segunda fase de 24-48 horas de fuga en la barrera que se ve en modelos de accidente cerebrovascular, lo que concede más peso a esta posibilidad.

10 **Ejemplo 26**

El DV no afecta significativamente a la permeabilidad de la barrera hematoencefálica *in vivo*

Puesto que se demostró que DV podía disminuir la TEER en células endoteliales de cerebro *in vitro*, un efecto potencialmente inquietante después de un accidente cerebrovascular donde la permeabilidad de la barrera hematoencefálica está ya negativamente afectada, se determinó si DV ejercía algún efecto sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica *in vivo*.

Material y métodos

Se adquirieron [³H]manitol (5,254·10¹¹ Bq/milimol) y [¹⁴C]sacarosa (1,524·10¹⁰ Bq/milimol) a Moravek Biochemicals (EE.UU.). Los productos químicos restantes se adquirieron a Sigma Chemical Company (Reino Unido). Los ratones se adquirieron a Harlan, Reino Unido.

Todos los experimentos se llevaron a cabo siguiendo las directrices de la Animals Scientific Procedures Act (1986, Reino Unido). Se anestesiaron [hidrocloruro de medetomidina (2 mg/kg) y ketamina (150 mg/kg) i.p.] y heparinizaron (100 U, i.p.) machos adultos de ratones BALB/c (27,3 ± 0,3 g) y C57B16 (27,9 ± 0,6 g) y se llevó a cabo la técnica de perfusión cerebral *in situ* mediante la inserción de una cánula en el ventrículo izquierdo del corazón y el seccionamiento de la aurícula derecha, del modo descrito por Sanderson et al., 2007. El plasma artificial contenía [³H]manitol (35,2 nM; 182 Da; radio = 0,36 nm) y [¹⁴C]sacarosa (1,1 M; 342 Da; radio = 0,46 nm) y la perfusión duró 10 minutos. Una vez terminado este periodo se decapitó el animal y se tomaron regiones del cerebro [corteza frontal, corteza occipital, núcleo caudado, hipocampo, hipotálamo, tálamo, cerebelo, puente troncoencefálico] para recuento de centelleo en estado líquido. La cantidad de radiactividad tisular se expresó como un porcentaje de aquella en el plasma artificial y fue denominada % de R_{tisular} (ml·100 g⁻¹). Se administró DV (1 mg/kg) disuelto en vehículo de PBS a grupos separados de ratones y se llevó a cabo el procedimiento de perfusión cerebral *in situ* 2, 8 y 24 horas después de la inyección. Se compararon estos grupos experimentales con animales que sólo habían recibido vehículo. También se examinó el efecto de DV sobre el contenido de agua en el cerebro (circunvolución central anterior) en los puntos temporales estudiados. Se aplicó ANOVA de dos vías o ANOVA de una vía a los datos usando el conjunto informático GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.).

Efectos de DV sobre el espacio vascular en ratones

En la raza BALB/c, el espacio vascular en todas las regiones cerebrales, según se mide mediante [¹⁴C]sacarosa y [³H]manitol, no resultó significativamente afectado 8 ni 24 horas después de una inyección intraperitoneal de DV (1 mg/kg, Figura 15A). Además, el contenido de agua en el cerebro fue 73,3 ± 1,3% a las 0 horas y no resultó significativamente afectado a las 8 (64,6 ± 3,4%) ni las 24 (72,8 ± 2,9%) horas por la inyección intraperitoneal de DV (1 mg/kg) (ANOVA de una vía). En la raza C57B16, el espacio vascular en todas las regiones cerebrales, según se mide mediante [¹⁴C]sacarosa y [³H]manitol, no resultó significativamente afectado 2 horas después de una inyección intraperitoneal de DV (1 mg/kg, Figura 15B).

En esta memoria se citan las referencias siguientes.

1. Ohab *et al.*, J. Neurosci., 26: 13.007-16 (13 de diciembre de 2006).
2. Mundel *et al.*, Microvascular Research, 74: 85-9 (2007).
3. Bix *et al.*, Trends Cell Biol., 15: 52-60 (2005).
4. Bix *et al.*, J. Natl. Cancer Inst., 98: 1634-46 (2006).
5. Bix *et al.*, J. Cell Biol., 166: 97-109 (2004).
6. Schallert *et al.*, Adv. Neurol. 73: 229-238 (1997).
7. O'Reilly *et al.*, Cell, 88: 277 (1997).

8. Sapatino *et al.*, *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 29A: 923-8 (1993).
9. Bix *et al.*, *Blood*, 109: 3745-8 (2007).
10. Asou *et al.*, *Neuroscience Letters*, 144: 221-4 (1992).
11. Fukuda *et al.*, *Stroke*, 35: 1364-70 (1 de abril de 2004).
- 5 12. Auerbach *et al.*, *Clin. Chem.*, 49: 32-40 (1 de enero de 2003).
13. Bix *et al.*, *J. Neurosci.*, 18: 307-18 (1 de enero de 1998).
14. Hirotsune *et al.*, *Nature Genetics*, 19: 333 (agosto de 1998).
15. Milner *et al.*, *Stroke*, 39: 191-7 (1 de enero de 2008).
16. Aronowski *et al.*, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 19: 652-60 (19 de junio de 1999).
- 10 17. Brittinlews *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280: 191-198 (2005).
18. Myszk *y* Morton, *Trends Biochem. Sci.*, 22: 149-150 (1998).

REIVINDICACIONES

1. Una proteína endorrepelina que tiene la secuencia de aminoácidos del dominio V del perlecano para uso en el tratamiento de un paciente al estimular o potenciar la angiogénesis cerebral, en donde dicha proteína endorrepelina se administra oral, subcutánea, intravenosa o intraperitonealmente.
- 5 2. La proteína endorrepelina para uso según la Reivindicación 1, en donde dicha proteína endorrepelina se administra oralmente.
3. La proteína endorrepelina para uso según la Reivindicación 1, en donde dicha proteína endorrepelina se administra en una cantidad de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal del paciente.
- 10 4. La proteína endorrepelina para uso según la Reivindicación 1, en donde dicha proteína endorrepelina se administra intraperitonealmente.
5. La proteína endorrepelina para uso según la Reivindicación 1, en donde dicha proteína endorrepelina se administra intravenosamente.
6. La proteína endorrepelina para uso según la Reivindicación 1, en donde dicha proteína endorrepelina se administra subcutáneamente.
- 15 7. La proteína endorrepelina para uso según la Reivindicación 1, para uso para mejorar la recuperación de un accidente cerebrovascular.
8. La proteína endorrepelina para uso según la Reivindicación 1, para uso para estimular la angiogénesis después de un accidente cerebrovascular y promover la formación del nicho neurovascular necesario para la neurogénesis y la migración dirigida de neuroblastos después de un accidente cerebrovascular.

20

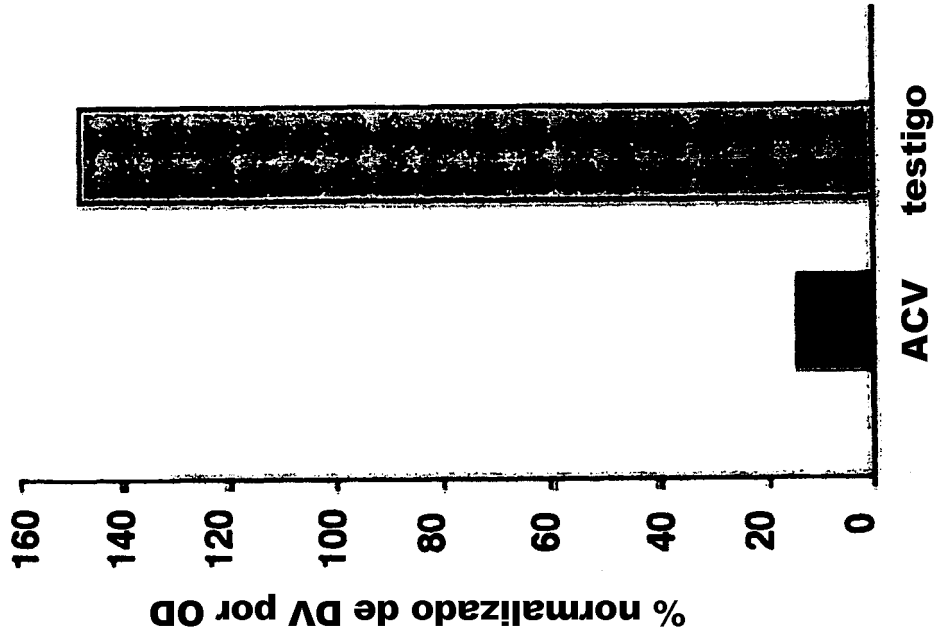


Fig. 1B

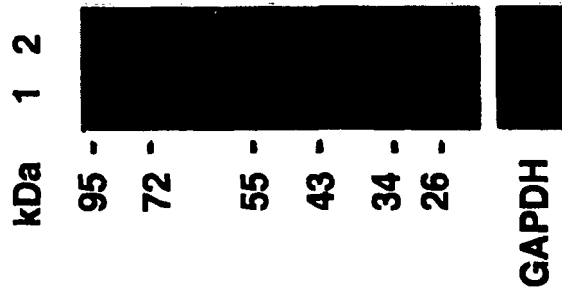


Fig. 1A

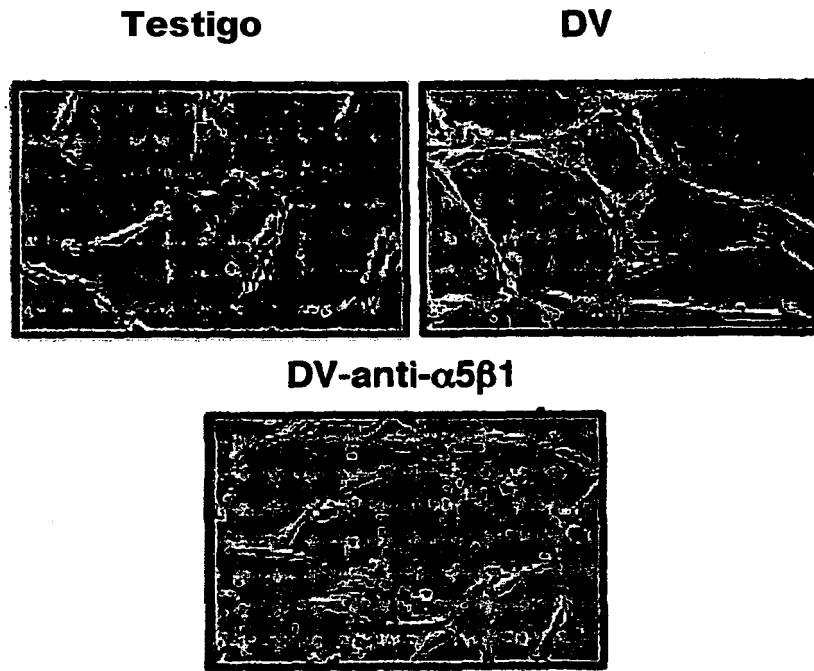


Fig. 2A

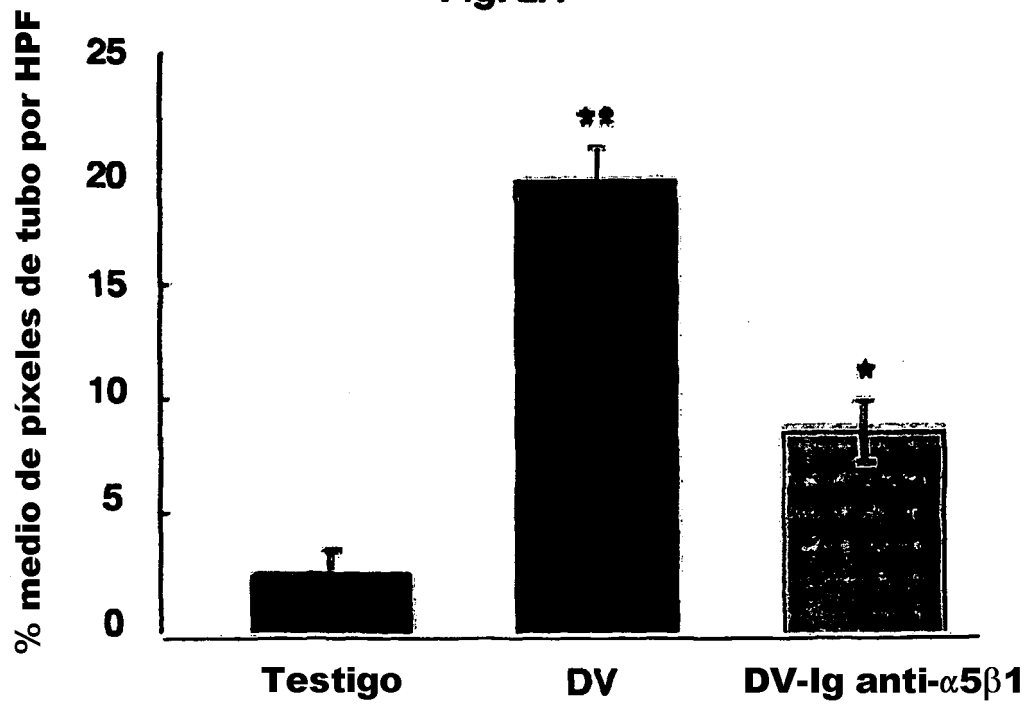


Fig. 2B

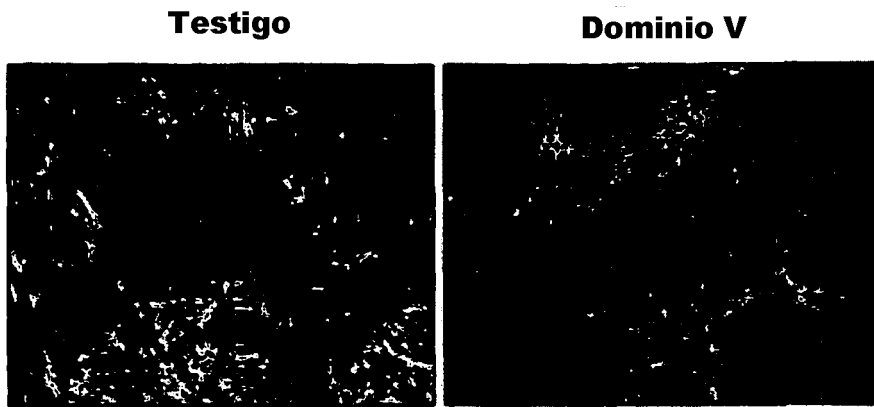


Fig. 3

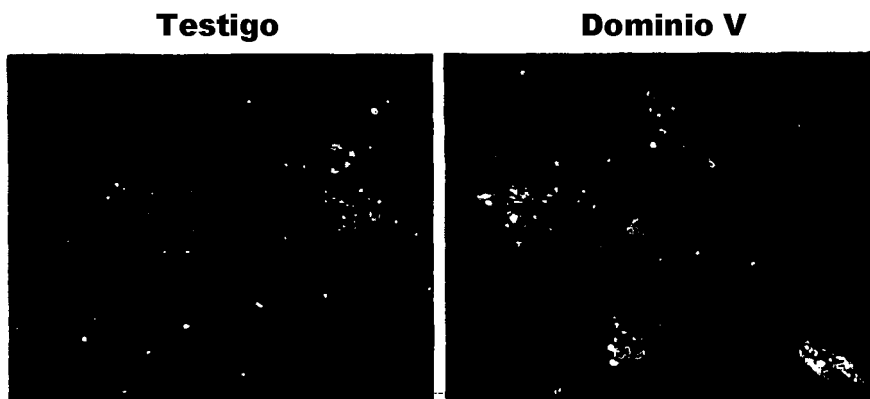


Fig. 4

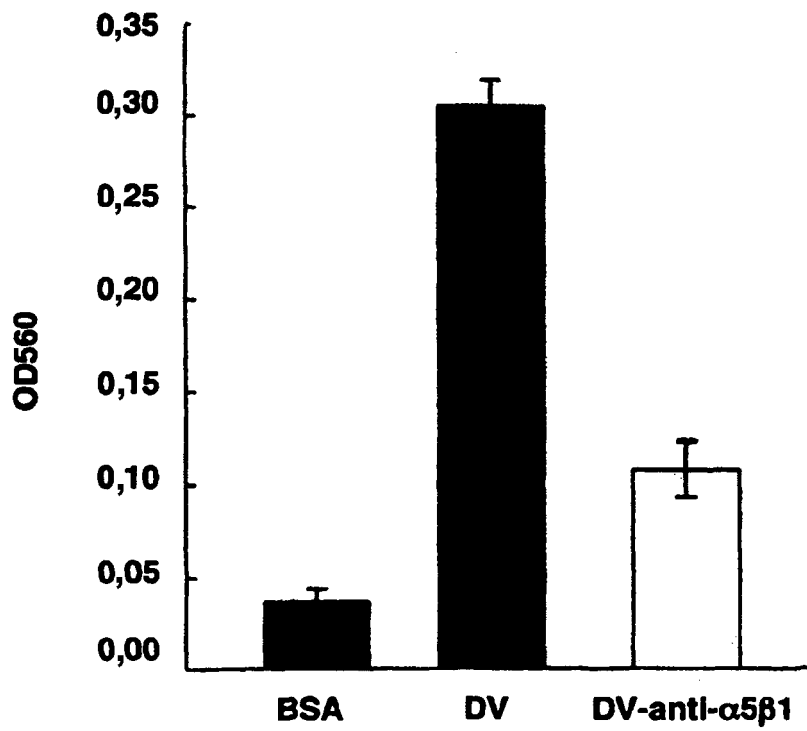


Fig. 5

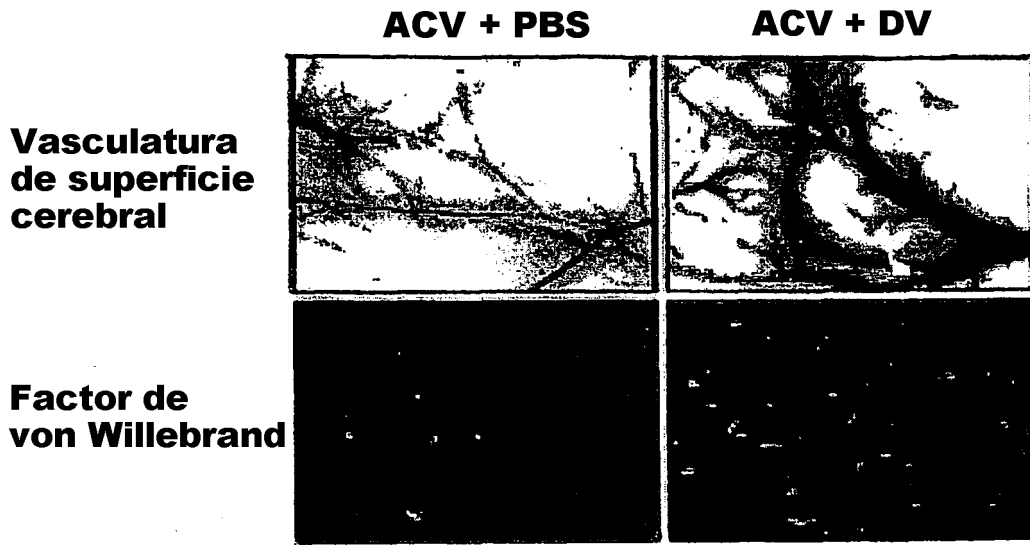


Fig. 6A

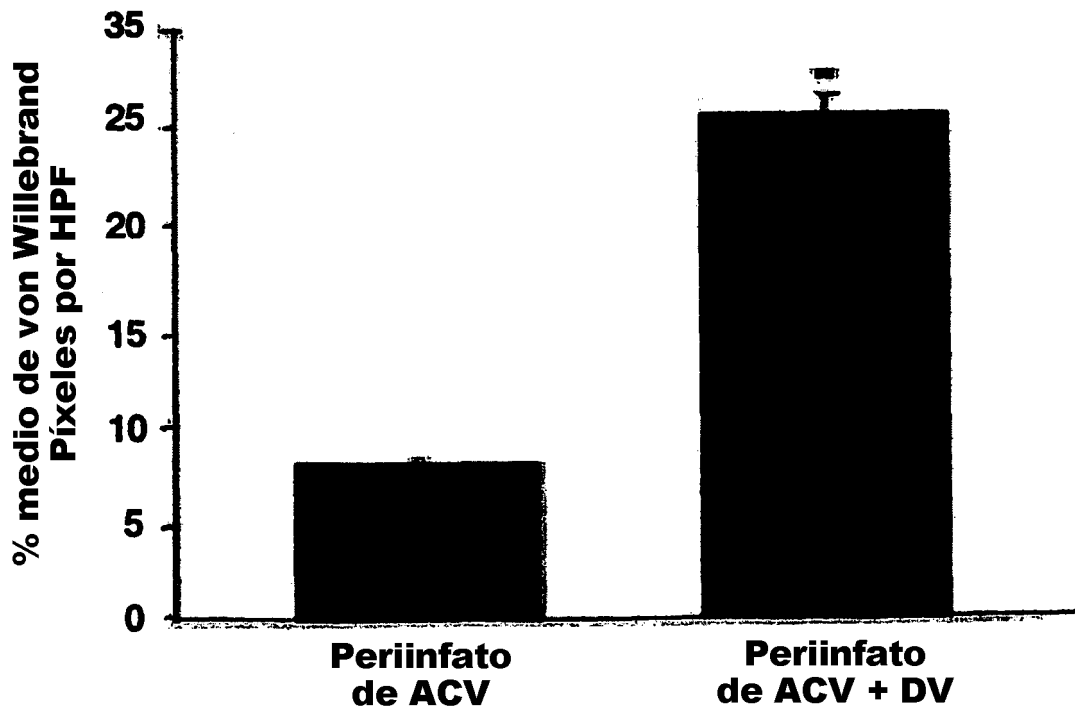


Fig. 6B

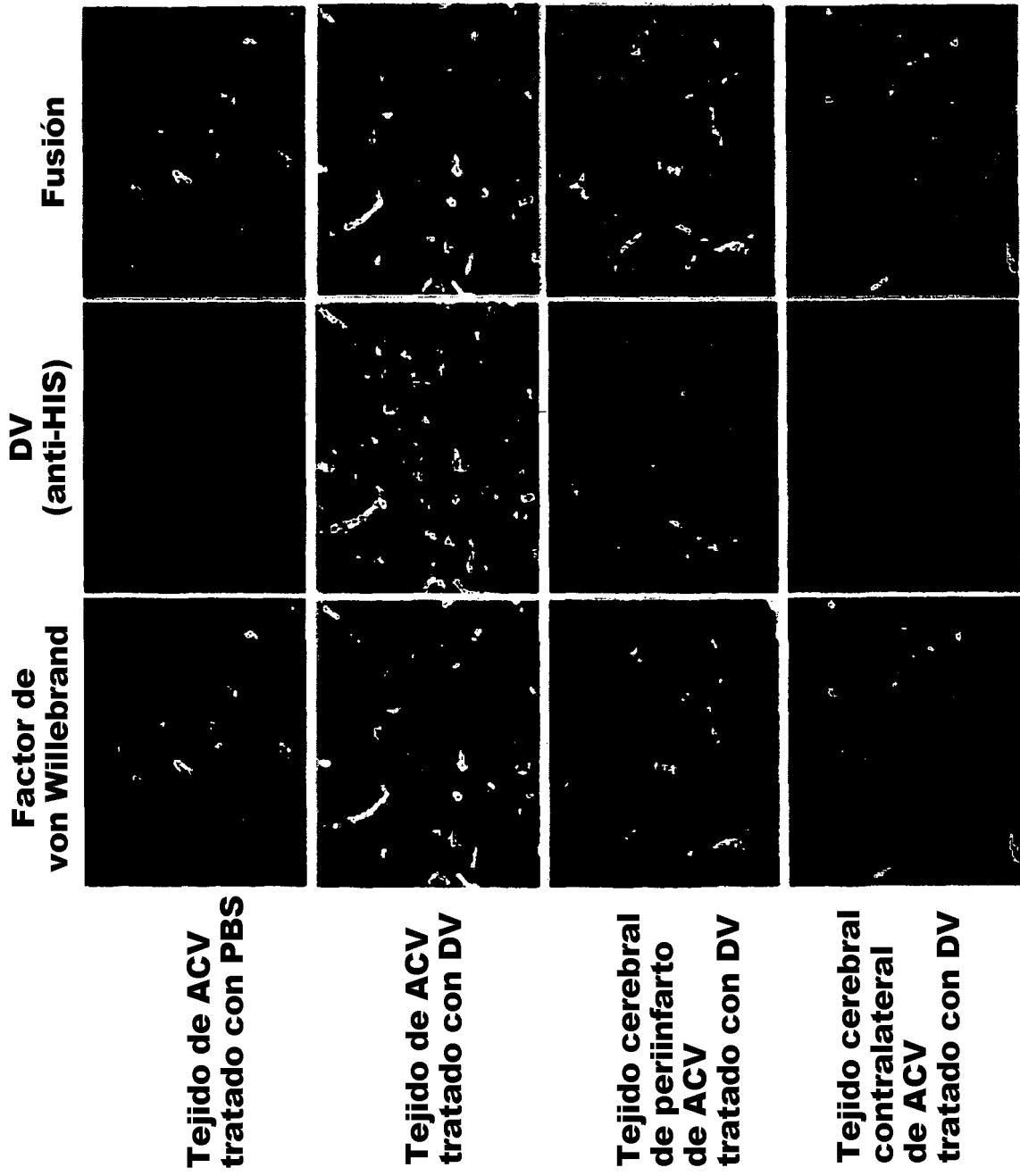


Fig. 7

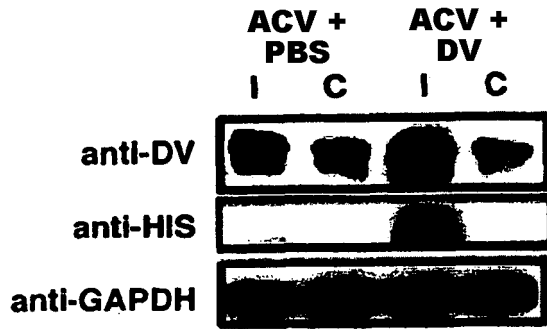


Fig. 8

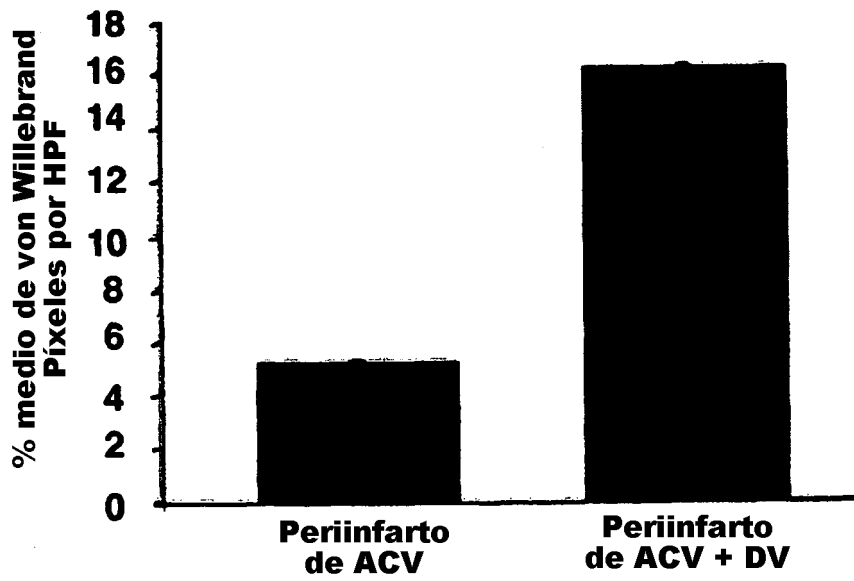


Fig. 9A

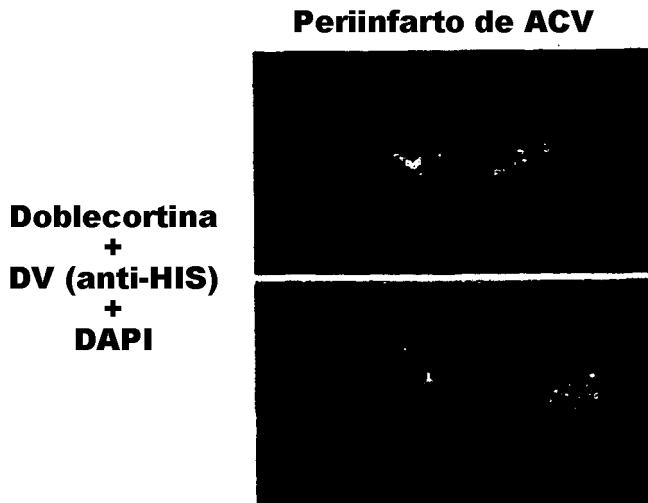


Fig. 9B

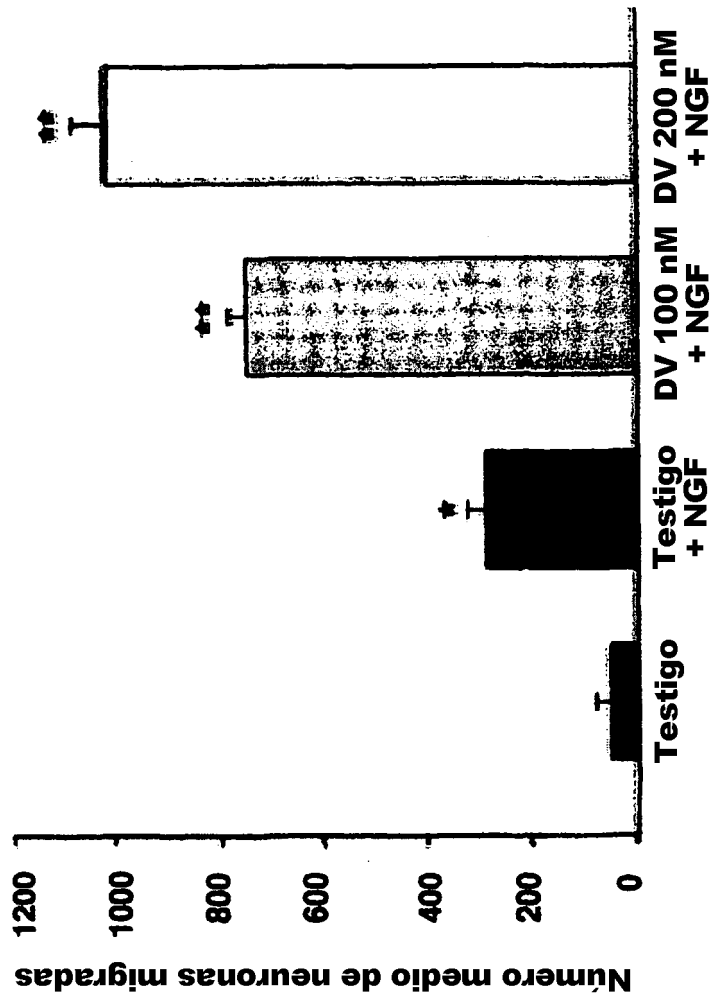


Fig. 10

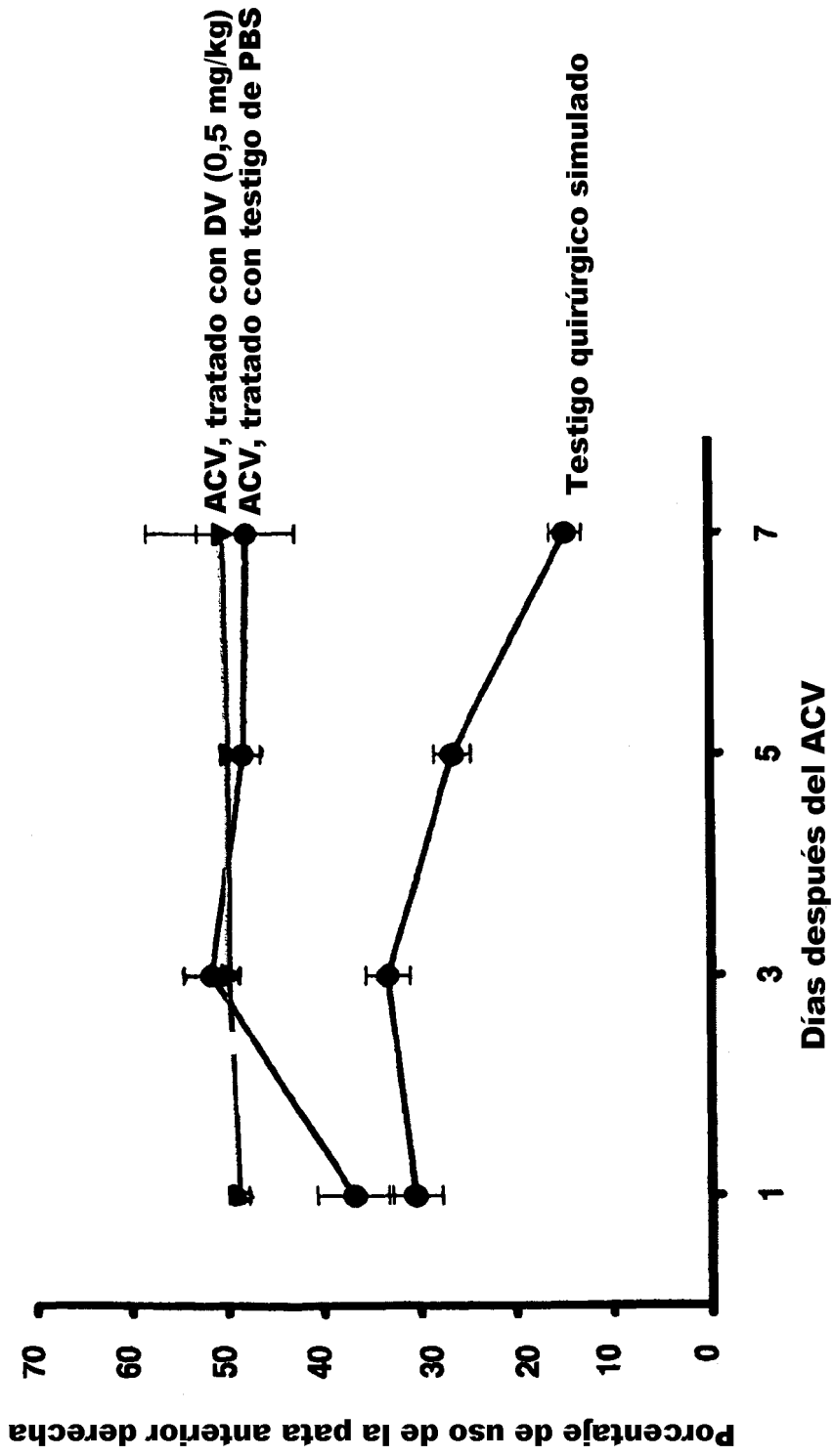


Fig. 11

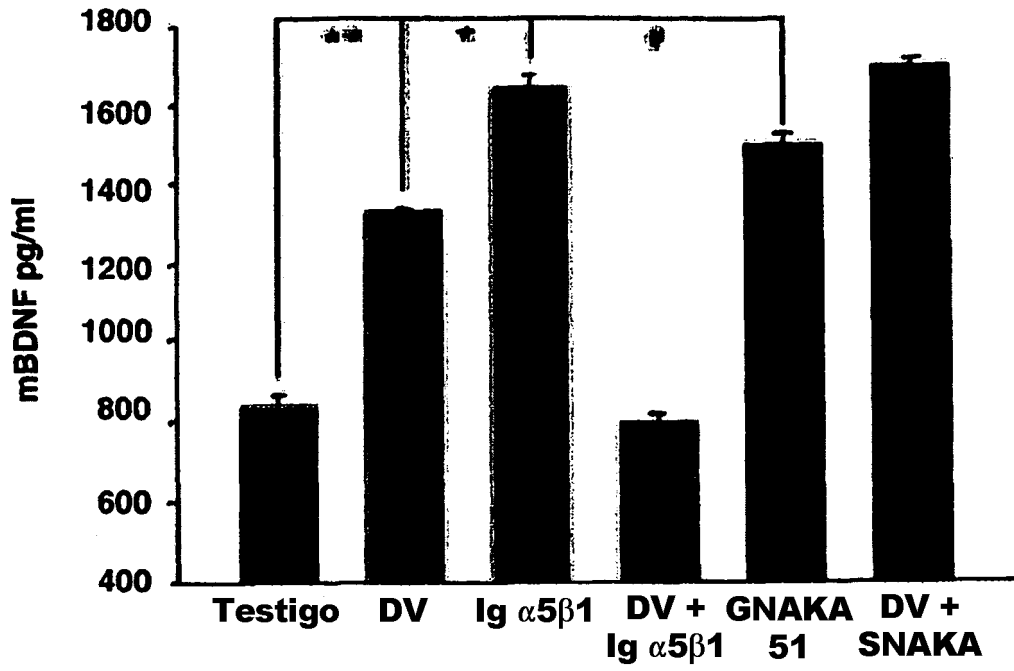


Fig. 12A

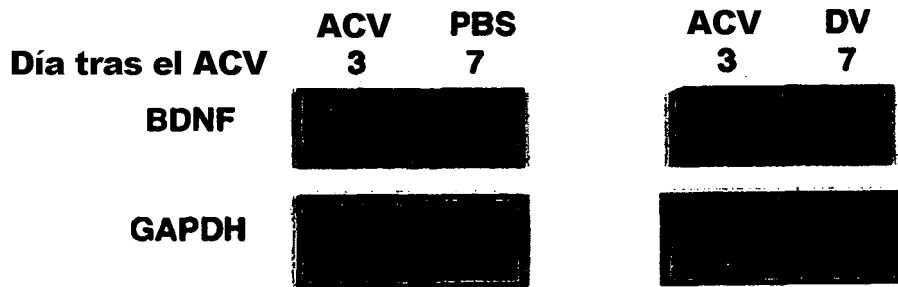


Fig. 12B

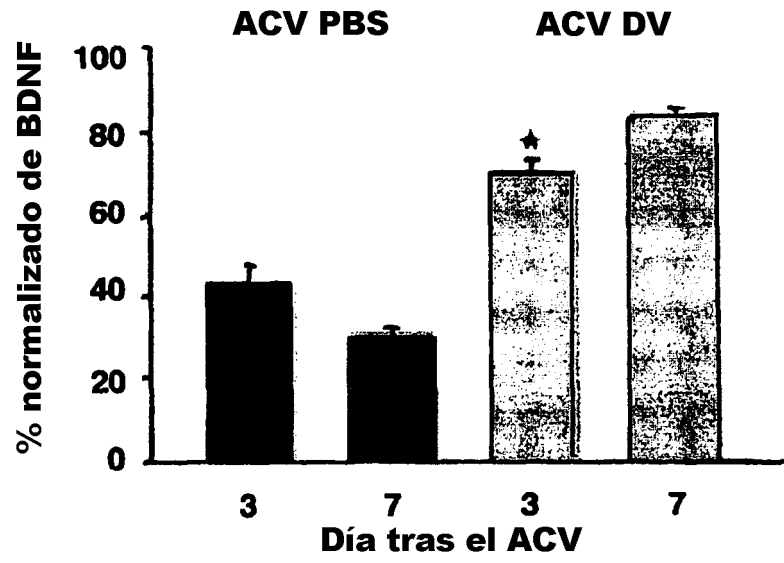


Fig. 12C

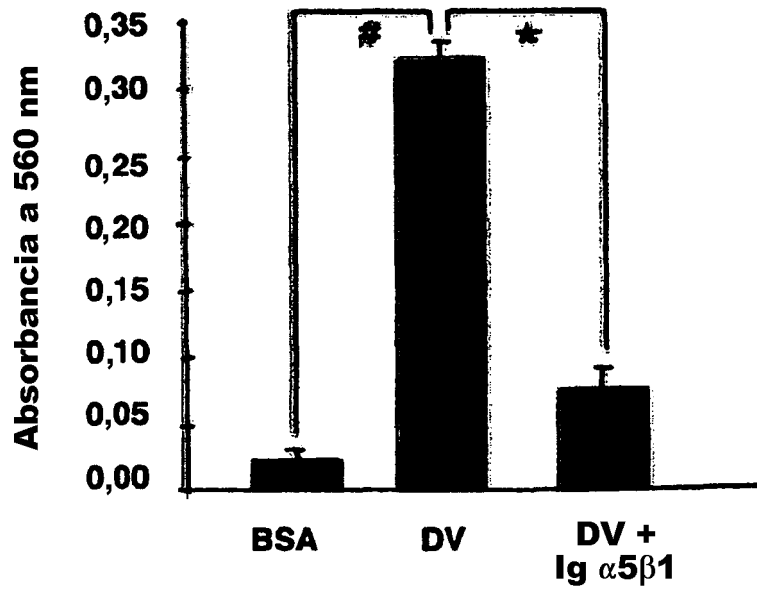


Fig. 13A

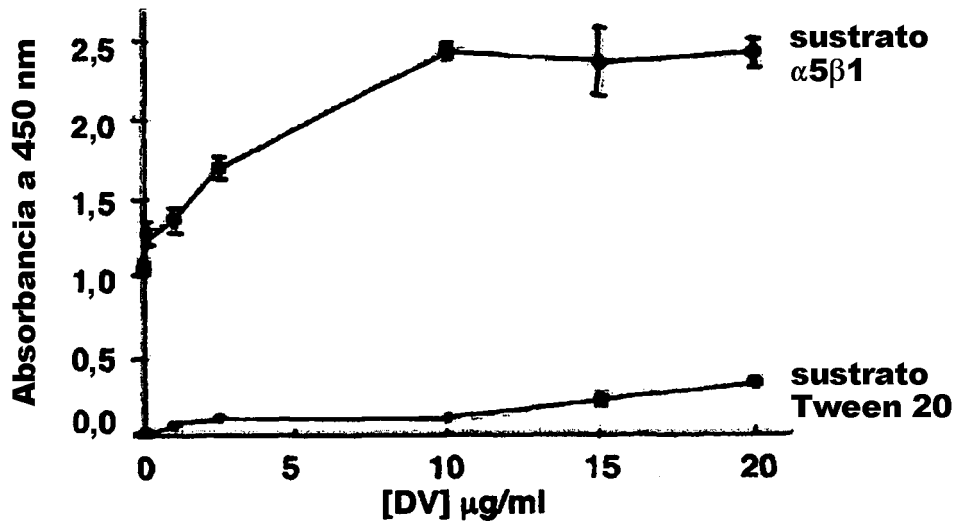


Fig. 13B

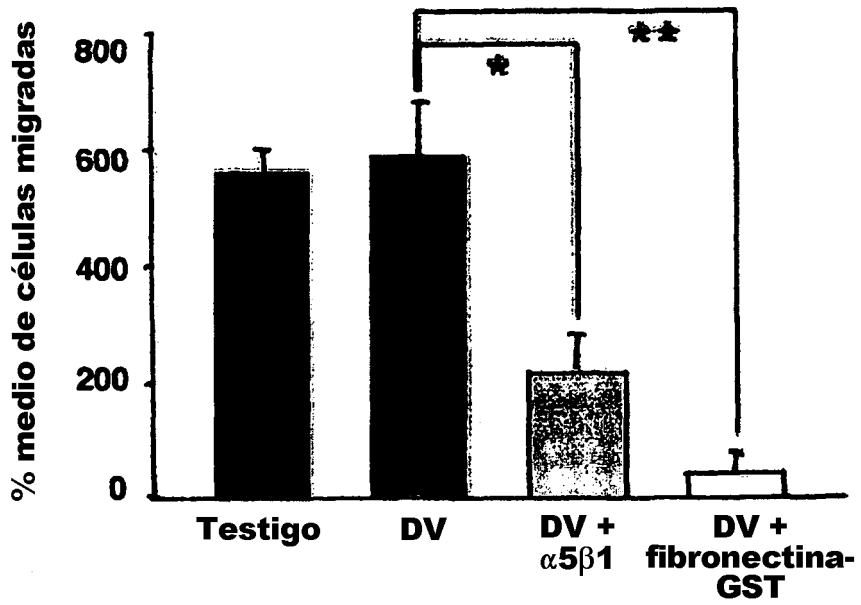


Fig. 13C

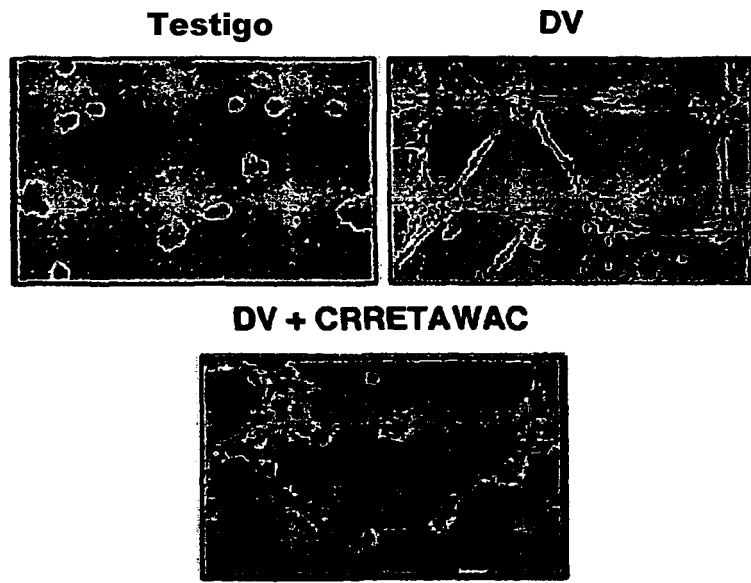


Fig. 13D

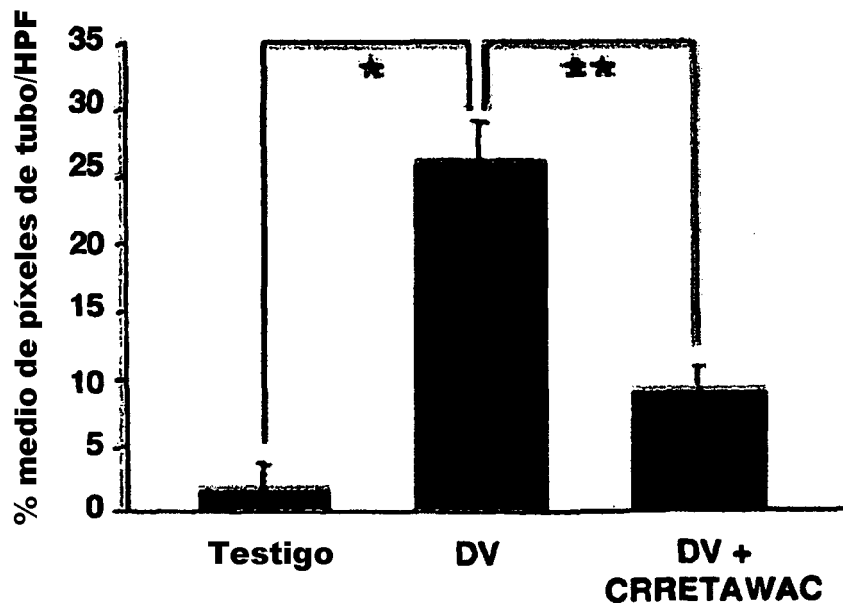


Fig. 13E

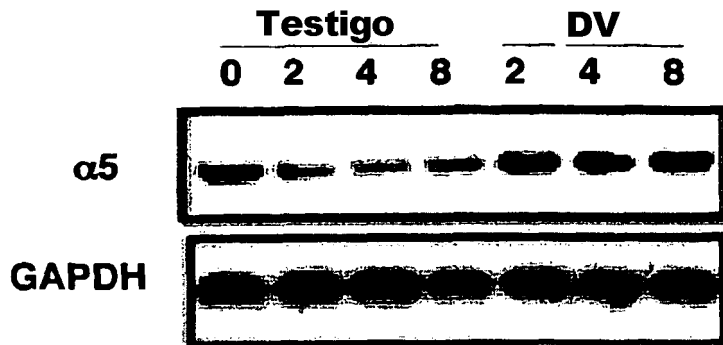


Fig. 13F

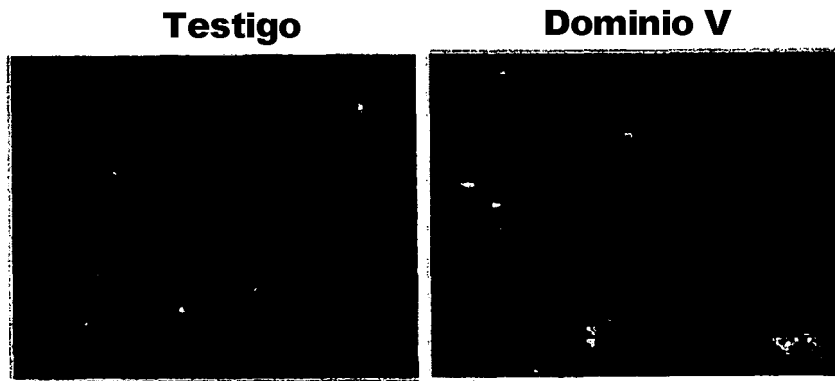


Fig. 13G

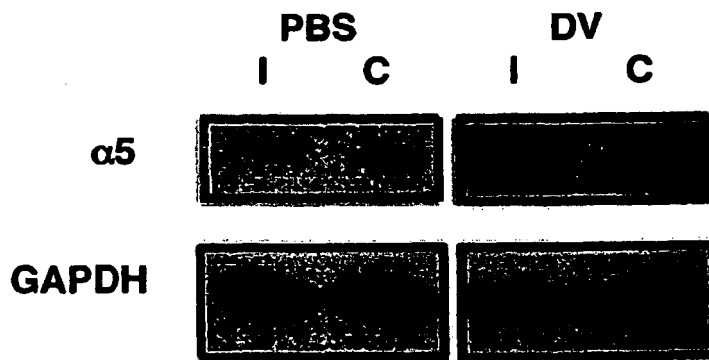


Fig. 13H

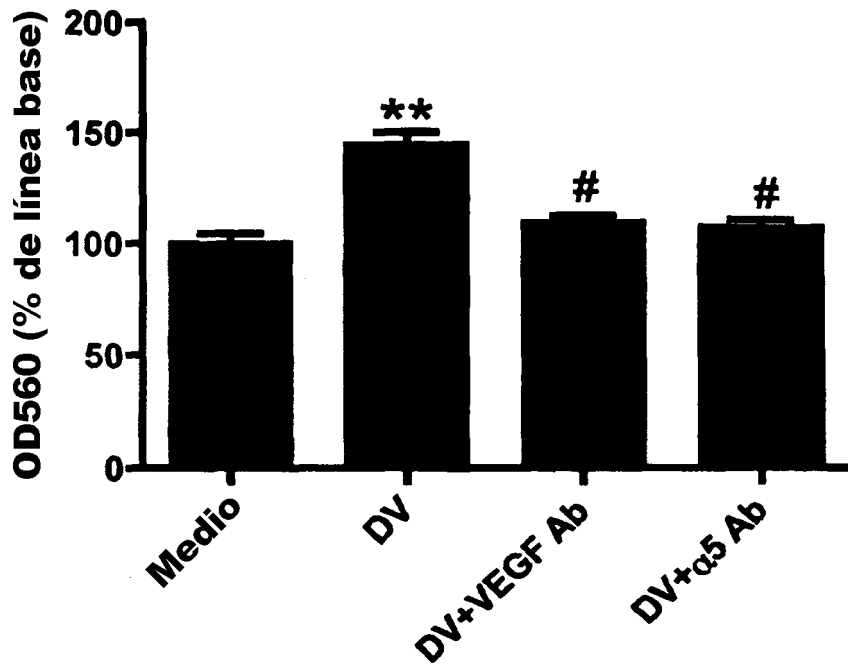


Fig. 14A

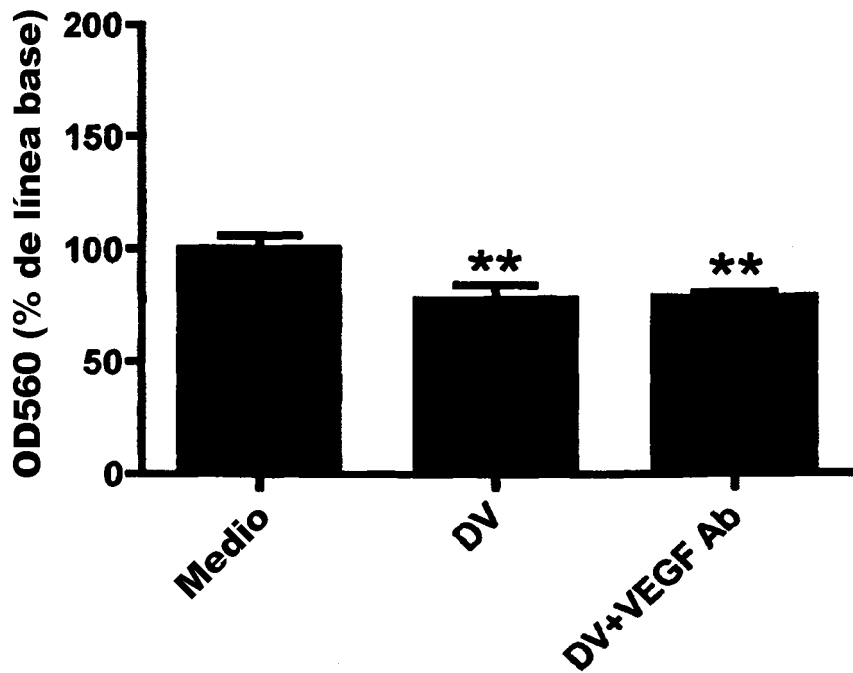


Fig. 14B

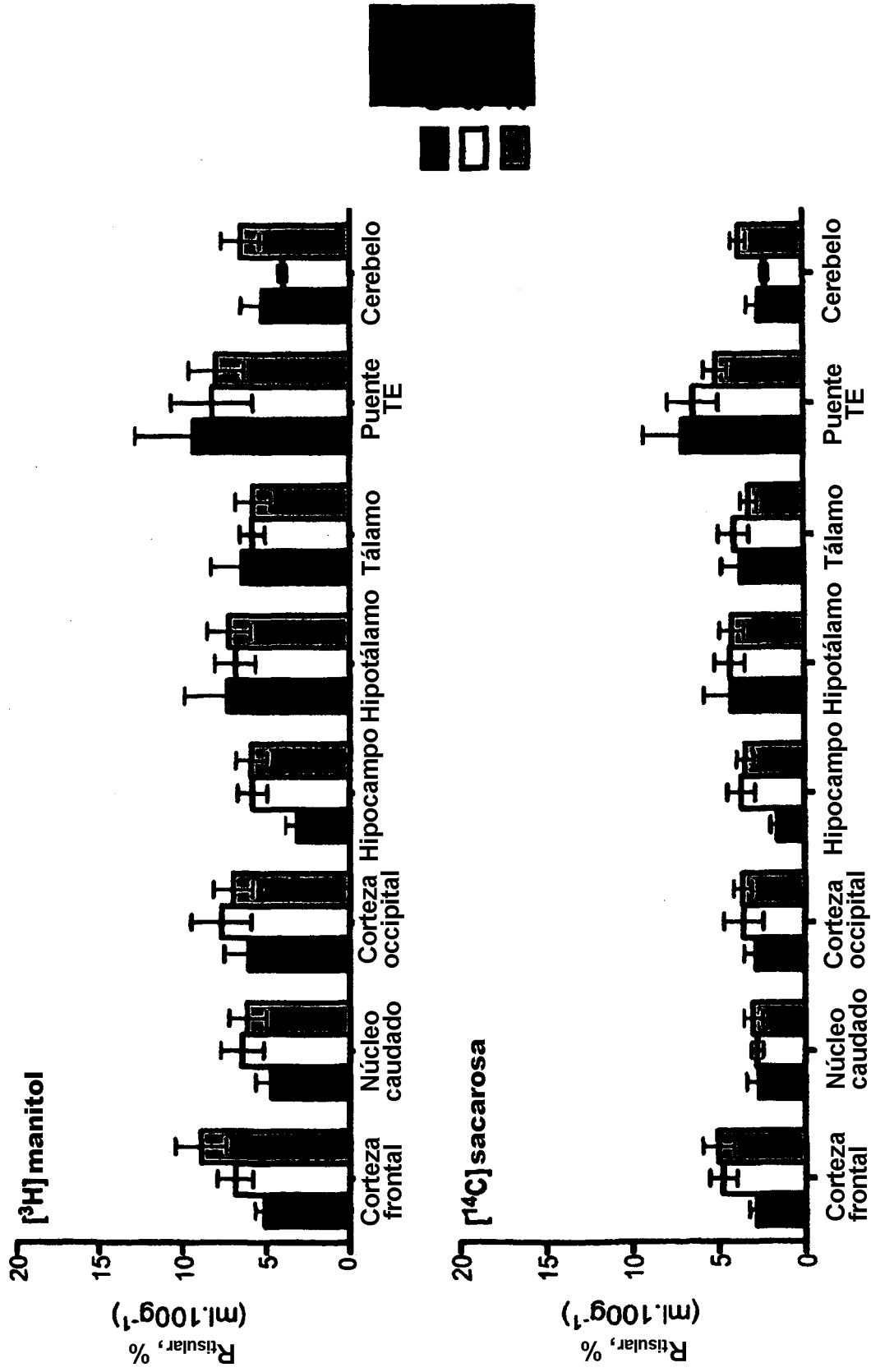


Fig. 15A

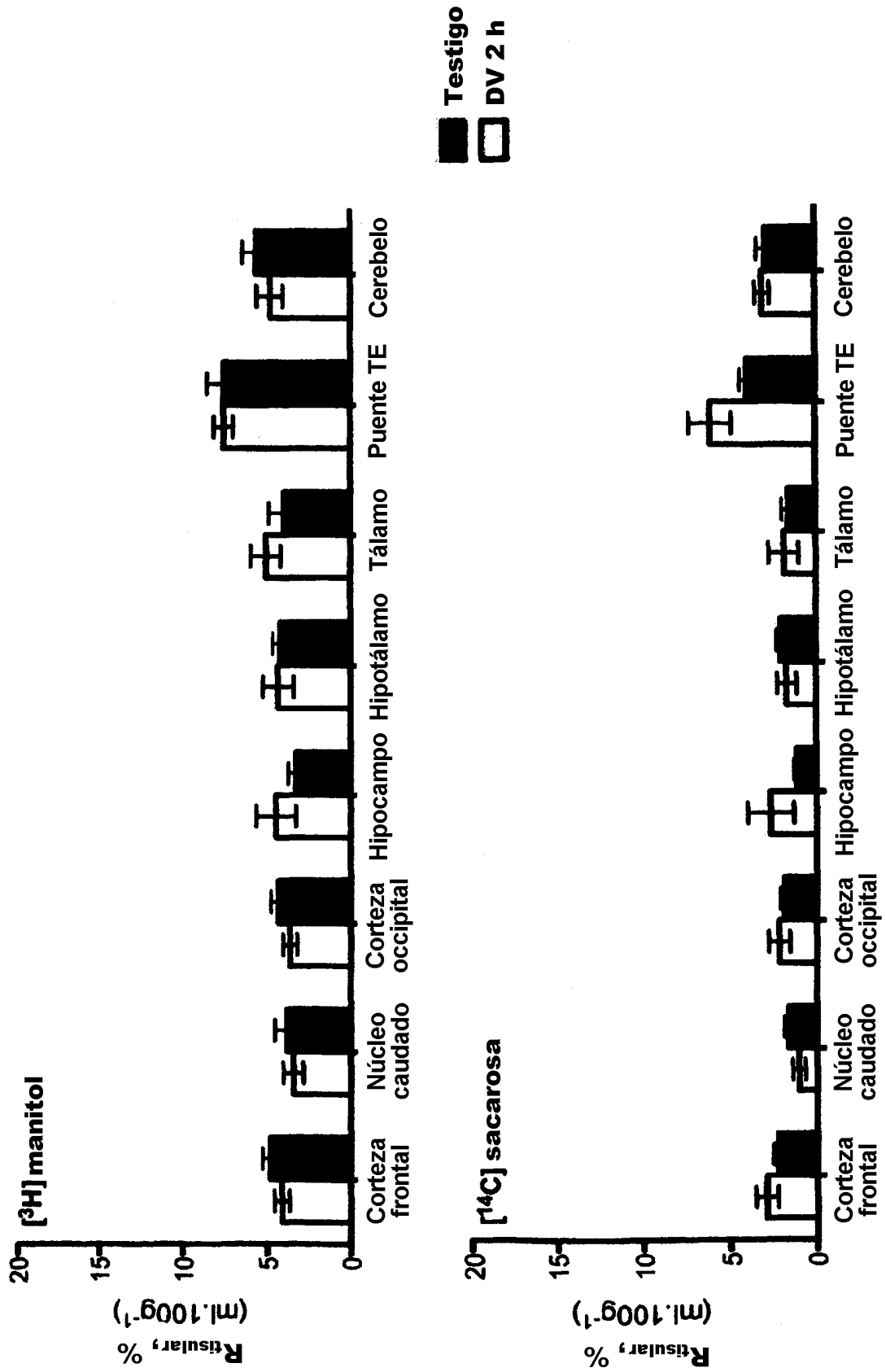


Fig. 15B