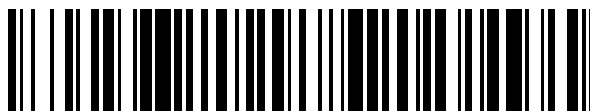


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 112**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2011 PCT/NL2011/050299**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12150857**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2011 E 11731142 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2717883**

54 Título: **Protección contra la disfunción de la barrera endotelial a través de la inhibición del gen relacionado con la tirosinaquinasa Abl (ARG)**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.07.2017

73 Titular/es:
**STICHTING VUMC (100.0%)
De Boelelaan 1117
1081 HV Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:
**VAN NIEUW AMERONGEN, GEERTEN P.;
VONK NOORDEGRAAF, ANTON;
AMAN, JURJAN y
VAN HINSBERGH, VICTOR W. M.**

74 Agente/Representante:
SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 622 112 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

Protección contra la disfunción de la barrera endotelial a través de la inhibición del gen relacionado con la tirosina quinasa *Abl* (ARG)

5

La invención se refiere al campo de la disfunción de la barrera endotelial. En particular, la invención se refiere a nuevos métodos para el tratamiento de síndromes/enfermedades caracterizados por una disfunción de la barrera endotelial, tal como el edema inflamatorio.

10

Las tirosina quinasa no receptoras proteína *Abl* están implicadas en la regulación de una serie de procesos celulares que incluyen proliferación, supervivencia y migración. Existen dos miembros de la familia *Abl* en mamíferos: *c-Abl* (*Abl* 1) y gen relacionado con *Abl* (ARG) conocido además como *Abl* 2 (Kruh, y otros. *Science* Dic 1986:1545-1548). Los dominios de tirosina quinasa de *c-Abl* y ARG son 94 % idénticos, sin embargo su similitud diverge en el extremo C-terminal. Aunque tanto *c-Abl* como ARG contienen un dominio de unión a actina F con homología a la calponina, *c-Abl* tiene un dominio de unión al ADN y un dominio de unión a la actina G y ARG contiene adicionalmente un dominio de unión a la actina F similar a la talina y un dominio de unión a microtúbulos.

15

ARG se ha implicado en procesos que afectan el citoesqueleto. Por ejemplo, la activación de ARG conduce a la polimerización de actina y la formación de filamentos de actina F a través del empaquetamiento de la actina F.^{32,33} Además, ARG regula la estructura de los filamentos de actina mediante la fosforilación dependiente de ARG de las proteínas que se adaptan a la actina cortactina³⁴ y N-WASp.³⁵ La participación de ARG en la regulación del citoesqueleto conlleva a un papel importante de la ARG en los movimientos celulares como la migración, la contracción celular, la formación de lamelipodios, etc. La función exacta de ARG en estos procesos puede depender de la distribución espacial y la regulación temporal de la actividad de ARG.

20

25

c-Abl se conoce mejor por su papel como un protooncogén. La fusión de los genes *Bcr* y *c-Abl* da como resultado una proteína *Bcr-Abl* quimérica que tiene actividad *Abl* tirosina quinasa activada de manera constitutiva. (Lugo y otros, *Science* 1990, 247: 1079-1082). *Bcr-Abl* es la causa subyacente de la leucemia mieloide crónica. Uno de los tratamientos para la leucemia positiva a *Bcr-Abl*,⁵⁻⁷ es el uso de imatinib. Imatinib es un inhibidor de molécula pequeña que bloquea la actividad ATPasa de *c-Abl*, así como ARG, PDGFR y *c-KIT*.⁴

30

Además *c-Abl* participa en la regulación de la función de barrera endotelial mediante la fosforilación de la quinasa de la cadena ligera de miosina no muscular. La disfunción de la barrera endotelial está implicada en la fisiopatología de una amplia variedad de enfermedades. Debido a que el endotelio controla estrechamente el flujo de fluido desde la circulación a los tejidos circundantes, la disfunción de esta barrera en un estado patológico (por ejemplo, inflamación) conduce a la extravasación descontrolada de líquido y edema.^{1,2} Si están implicados órganos vitales, el edema puede conducir a una insuficiencia orgánica con la consiguiente morbilidad y mortalidad.

35

Los mecanismos implicados en la disfunción de la barrera endotelial se han descrito anteriormente. Por ejemplo, Van Nieuw Amerongen y otros describen la implicación de Rho quinasa en el mantenimiento de la barrera endotelial (Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2007 27:2332-2339). Wang y otros describen la participación de RhoA y de la proteína quinasa II dependiente de calmodulina/calció delta 6 en la disfunción de la barrera endotelial inducida por trombina (J Bio Chem 2010 28:21303-21312). Birukova y otros describen el papel de PAK1 en la fuga vascular pulmonar inducida por LPS (AM J. PHYSIOL-LUNG C 2010 299:652-663). Armulik y otros investigan el papel de los pericitos en la barrera hematoencefálica mediante la generación de una mutación en un ratón que tiene un número reducido de pericitos en el SNC (Nature 2010 468:557-561) siRNA against *c-Abl* resulted in a decrease in endothelial cell barrier integrity after treatment with a barrier-enhancing agonist, i.e, sphingosine 1-phosphate (Dudek y otros. Mol Bio Cell 2010 21:4042-4056). El efecto de la inhibición de *c-Abl* sobre la alteración de la integridad de la barrera de células endoteliales se apoya además por uno de los efectos secundarios del tratamiento a largo plazo con imatinib, es decir el edema.⁷

40

45

50

Contrario a los estudios que informan edema subcutáneo como consecuencia del tratamiento crónico con imatinib, la presente descripción demuestra que el tratamiento a corto plazo con imatinib protege contra la disfunción de la barrera endotelial. La Figura 1A-D demuestra que el tratamiento a corto plazo de imatinib atenúa la hiperpermeabilidad endotelial inducida por la trombina. Imatinib ejerce estos efectos mediante la preservación de la integridad de las uniones de adherencia (AJ) y la adhesión célula a célula (Figura 1E-F). Teniendo en cuenta informes anteriores sobre el edema subcutáneo como un efecto secundario⁷ del tratamiento con imatinib, es importante tener en cuenta además que, en las concentraciones usadas en el estudio, imatinib no afectó la integridad de la barrera endotelial basal. Estos hallazgos sugieren que el edema subcutáneo como un efecto secundario del tratamiento con imatinib da como resultado más probable la inhibición crónica de PDGFR en los pericitos y la consiguiente perturbación del soporte vascular.

55

60

La disociación de las uniones de adherencia, inducida por la trombina, y la pérdida de la adhesión célula a célula implica la contracción actina-miosina mediada por Ca^{2+} y por RhoA/Rho quinasa.^{2,24} Dado que se ha informado que la mayoría de las quinasa sensibles a imatinib (*c-Abl*²⁵, PDGFR²⁶ y Arg^{27,28}) afectan la actividad de Rho quinasa, planteamos la hipótesis de que el imatinib atenúa los cambios inducidos por trombina en el citoesqueleto de actina mediante la

65

inhibición de la ruta de la RhoA/Rho quinasa. Sorprendentemente, el efecto protector de imatinib sobre la barrera de células endoteliales fue independiente de la ruta de la RhoA/Rho quinasa (Figura 2B-E).

5 Dado que el imatinib se desarrolló principalmente para dirigirse a c-Abl, planteamos la hipótesis de que la inhibición de c-Abl es la razón de los efectos protectores de imatinib. Sorprendentemente, ni la inhibición de c-Abl, PDGFR, o c-KIT es responsable de los efectos protectores de la barrera observados para imatinib (Figura 3). Sin embargo, un ARNip contra ARG, demostró que es, de hecho, la inhibición de la actividad de la ARG quinasa quien media los efectos de imatinib, protectores de la barrera (Figura 4). Nuestros datos sugieren que, mientras Arg media la disfunción de la barrera endotelial, c-Abl apoya la función de la barrera endotelial (Figura 3A y Figura 7A).

10 Estos hallazgos sugieren que el tratamiento a corto plazo con un inhibidor de ARG, por ejemplo, imatinib, sería beneficioso en los síndromes caracterizados por una disfunción de la barrera endotelial.

15 En consecuencia, en un aspecto, la descripción proporciona un método para el tratamiento de un individuo que padece o está en riesgo de padecer edema inflamatorio, el método comprende administrar un inhibidor de la función del gen relacionado con Abl (ARG) a dicho individuo para tratar de esta manera dicho edema en dicho individuo.

20 El edema puede definirse como una acumulación anormal de fluido en los intersticios de las células, en los espacios tisulares o en las cavidades corporales. Puede ser provocado por un movimiento excesivo de fluido desde el sistema vascular hacia los tejidos o un movimiento inadecuado de fluido de los tejidos de regreso al sistema vascular. El intercambio normal de fluido entre estos dos compartimentos depende del equilibrio de la presión osmótica y la presión hidrostática que actúan en direcciones opuestas a través de las paredes capilares semipermeables. El edema es el resultado de un desequilibrio en estas fuerzas, que tiende a provocar una acumulación anormal de fluido en los espacios intersticiales.

25 El edema puede caracterizarse como inflamatorio o no inflamatorio. La composición del fluido extravascular que se acumula en edema varía de acuerdo con su etiología. En el caso de un edema provocado por mecanismos no inflamatorios, el fluido (trasudado) comprende una concentración relativamente baja de proteínas y tiene una densidad específica menor, lo que indica que el endotelio del sitio afectado es normal. En tales casos, el trasudado es esencialmente un ultrafiltrado de plasma sanguíneo. Este tipo de edema no inflamatorio es provocado principalmente por alteraciones en las fuerzas hemodinámicas a través de la pared capilar y además se conoce como edema hemodinámico. Por otro lado, en el caso de un edema que es provocado por una respuesta inflamatoria, el fluido extravascular (exudado) comprende una alta concentración de proteínas, células y restos celulares y tiene una alta densidad específica. Esto indica una alteración significativa en la permeabilidad normal de los vasos sanguíneos pequeños en la zona afectada.

30 Un aumento en la permeabilidad vascular es una de las principales características de la respuesta inflamatoria del cuerpo contra los estímulos, especialmente en el caso de la inflamación aguda. De hecho, el edema es uno de los principales signos de inflamación aguda. Durante la inflamación, los factores químicos derivados del plasma y activados por estímulos inflamatorios median una serie de respuestas vasculares y celulares en el sitio afectado. Estos cambios estructurales en la microvasculatura dan como resultado un aumento de la permeabilidad de la membrana de los vasos sanguíneos, lo que provoca el movimiento de proteínas y células plasmáticas, por ejemplo, leucocitos de la circulación al intersticio, que finalmente da lugar a un edema específico del sitio. El edema inflamatorio puede atribuirse en gran medida a la acción directa de la histamina, la bradiquinina y otras sustancias liberadas. Los principales mecanismos de aumento de la permeabilidad vascular en la inflamación incluyen contracción de células endoteliales, retracción de las uniones, lesión directa, fugas dependientes de leucocitos, regeneración del endotelio, entre otros. El aumento de la filtración de fluido hacia el intersticio aumenta aún más por la acción vasodilatadora arteriolar de mediadores de la inflamación, lo que aumenta el flujo sanguíneo, el área de superficie perfundida, la presión hidrostática capilar, y facilita el edema también por otros mecanismos. Preferentemente, el edema inflamatorio afecta a un órgano distinto del pulmón y/o el cerebro.

35 Preferentemente, el edema inflamatorio que se trata es edema inducido por trombina, por ejemplo, la formación de edema después de una hemorragia intracerebral. Preferentemente, el edema inflamatorio es edema inducido por histamina. Preferentemente, el edema inflamatorio se debe a la disfunción de la barrera endotelial. La disfunción de la barrera endotelial puede definirse funcionalmente, por ejemplo, como un aumento del paso de macromoléculas a través de una monocapa endotelial cultivada o una disminución de la resistencia a través de una monocapa endotelial, o morfológicamente, por ejemplo, por la presencia de espacios intercelulares en una monocapa endotelial.

40 Preferentemente, un individuo que padece o que está en riesgo de padecer un edema inflamatorio está padeciendo de sepsis, síndrome de fuga capilar sistémica, lesión pulmonar aguda/síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (ALI/ARDS), preeclampsia, estenosis con no reflujo, edema pulmonar (preferentemente edema pulmonar después de radiación o edema pulmonar después de endarterectomía). La sepsis se define como la presencia y crecimiento de microorganismos en la circulación. Un medio para el diagnóstico incluye la presencia de dos o más de los siguientes criterios: temperatura corporal anormal (<36 °C o >38 °C), conteos anormales de glóbulos blancos (<4 o >12 x10⁹/L), un fuente clínica de la infección, microbiológicamente probada, taquicardia (>90/min) y taquipnea (>20/min o una presión parcial de dióxido de carbono arterial (P_aCO₂) <32 mmHg). ALI/ARDS pueden desarrollarse como consecuencia de

enfermedades pulmonares (por ejemplo, neumonía, contusión pulmonar o ahogamiento), o como consecuencia de una enfermedad sistémica (por ejemplo, sepsis).ALI y ARDS se diagnostican de acuerdo con los criterios de la Conferencia de Consenso de América y Europa. El edema pulmonar grave puede seguir a una radioterapia, en dependencia de la dosis y la duración de la irradiación. El edema pulmonar tras la irradiación se diagnostica por evidencia de edema pulmonar en una radiografía de tórax o TAC de tórax e hipoxemia. El edema pulmonar con reperfusión se produce por lo general dentro de las 72 horas después de una endarterectomía pulmonar (Levinson y otros. J Thorac Cardiovasc Surg. abril de 1990; 99 (4): 670-8; Levinson y otros. Am Rev Respir Dis. diciembre de 1986; 134(6):1241-5), y se diagnostica por la presencia de edema pulmonar en una radiografía de tórax o TAC (tórax), tensión de oxígeno arterial y saturación de la hemoglobina por oxígeno. La estenosis de no reflujo es un fenómeno que se observa comúnmente durante la cateterización cardíaca por la estenosis de las arterias coronarias, lo que es provocado probablemente por la formación de edema en la pared vascular que rodea la lesión. La preeclampsia se refiere a una afección en la que se produce hipertensión en asociación con cantidades significativas de proteína en la orina.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para inhibir la disfunción de la barrera endotelial en una colección de células endoteliales que comprenden una barrera endotelial que no funciona adecuadamente o está en riesgo de disfunción, dicho método comprende proporcionar una colección de células endoteliales in vitro con un inhibidor de la función del gen relacionado con *Abl* (ARG).

En un aspecto adicional, se proporciona una colección de células endoteliales que comprenden una barrera endotelial que no funciona adecuadamente o está en riesgo de disfunción, dichas células comprenden un inhibidor de la función del gen relacionado con *Abl* (ARG).

Un inhibidor de la función del gen relacionado con *Abl* (ARG) se refiere a la inhibición o alteración del gen ARG, ARNm de ARG o proteína de ARG. Una secuencia ilustrativa de la proteína ARG humana es

MGQQVGRVGEAPGLQPPQPRGIRGSSAARPSGRRRDPAGRTTETGFNIFTQ
 HDHFASCVEDGFEGDKTGGSSPEALHRPYGCDVEPQALNEAIRWSSKENL
 LGATESDPNLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNQNGEWSEVRSK
 NGQGWVPSNYITPVNSLEKHSWYHGPVSRSAEYLLSSLINGSFLVRESES
 SPGQLSISLRYEGRVYHYRINTTADGKVYVTAESRFSTLAELVHHHSTVAD
 GLVTTLHYPAPKCNKPTVYGVSPIDHKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVY
 VGVWKKYSLTVAVKTLKEDTMEVEEFLKEAAVMKEIKHPNLVQLLGVCTL
 EPPFYIVTEYMPYGNLLDYLRECNREEVTAVVLLYMATQISSAMEYLEKKN
 FIHRDLAARNCLVGENHVVKVADFGLSRLMTGDTYTAHAGAKFPIKWTAP
 ESLAYNTFSIKSDVWAFGVLLWEIATYGMSPYPGIDLSQVYDLLEKGYRME
 QPEGCPPKVYELMRACWKWSPADRPSFAETHQAFETMFHDSSISEEVAEE
 LGRAASSSSVVPYLPRLPILPSKTRTLKQVENKENIEGAQDATENSASSLA
 PGFIRGAQASSGSPALPRKQRDKSPSSLLEDAKETCFTRDRKGGFFSSFMK
 KRNAPTPPKRSSSFREMENQPHKKYELTGNFSSVASLQHADGFSFTPAQQ
 EANLVPPKCYGGSFAQRNLCNDDGGGGGGSGTAGGGWSGITGFFTPRLIK
 KTLGLRAGKPTASDDTTSKPFPRSNSTSSMSSGLPEQDRMAMTLPRNCQRS
 KLQLERTVSTSSQPEENVDRANDMLPKKSEESAAPSRRERPKAKLLPRGATA
 LPLRTPSGDLAITEKDPPGVGVAGVAAAPKGKEKNGGARLGMAGVPEDGE
 QPGWSPAKAAPVLPPTHNHKVPVLISPTLKHTPADVQLIGTDSQGNKFKL
 LSEHQVTSSGDKDRPRRVKPKCAPPVPMRLLQHPSICSDPTEEPTALTA
 GQSTSETQEGGKKAALGAVPISGKAGRPVMPVPPQVPLPTSSISPAMANGT
 AGTKVALRKTQAAEKISADKISKEALLECADLLSSALTEPVPNSQLVDTG
 HQLLDYCSGYVDCIPQTRNKFAFREAVSKLELSLQELQVSSAAAGVPGTNP
 VLNNLLSCVQEISDVVQR.

Se proporcionan inhibidores de la función de ARG para usar en el tratamiento de un individuo que padece o está en riesgo de padecer un edema inflamatorio tal como se describe en la presente.

5 En una modalidad preferida, el inhibidor de ARG inhibe preferentemente la isoforma Arg 1a sin el grupo miristoilo. En una modalidad preferida, el inhibidor de ARG inhibe preferentemente la isoforma Arg 1b sin el grupo miristoilo⁴⁰.

10 Un inhibidor de la función de ARG inhibe la actividad tirosina quinasa de la proteína codificada por ARG y se selecciona de nilotinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, dasatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, e imatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los ejemplos preferidos de tales inhibidores incluyen nilotinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (preferentemente clorhidrato de nilotinib monohidratado, es decir, Tasigna™); y dasatinib (Sprycel™) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El nilotinib se describe químicamente como 4-metil-N-[3-(4-metil-1H-imidazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil]-3-[[4-(3-piridinil)-2 pirimidinil]amino]-benzamida y su preparación se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 7,169,791. El dasatinib se describe químicamente como N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolcarboxamida y su preparación se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 6,596,746. En algunas modalidades, los efectos secundarios del dasatinib serán inaceptables y el inhibidor utilizado no será dasatinib. En algunas modalidades, el inhibidor no es nilotinib.

20 Los compuestos de mayor preferencia son imatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo mesilato (preferentemente mesilato de imatinib, referido además como STI-571, CGP 57148 y Gleevec™). El imatinib se describe químicamente como 4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenil]benzamida metano sulfonato y su preparación se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 5,521,184.

25 Los inhibidores de la función de ARG incluyen además anticuerpos que se unen a ARG e inhibición su función. El término "anticuerpo" incluye, por ejemplo, tanto los anticuerpos de origen natural como de origen no natural, anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos quiméricos y anticuerpos completamente sintéticos y fragmentos de los mismos, tales como, por ejemplo, los fragmentos Fab', F(ab')₂, Fv o Fab, u otros fragmentos de inmunoglobulinas de reconocimiento de antígenos. Los métodos de preparación de anticuerpos se conocen bien en la técnica. Preferentemente, un inhibidor de la función de ARG inhibe la actividad tirosina quinasa de la proteína ARG en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 80 %, 90 % o más en comparación con la actividad tirosina quinasa de la proteína ARG no tratada.

35 Preferentemente, un inhibidor de ARG muestra una concentración IC₅₀ para la actividad tirosina quinasa de ARG de menos de 1 micromolar, con mayor preferencia el inhibidor de ARG tiene una concentración IC₅₀ de 0,5 micromolar o menos. La IC₅₀ de imatinib para la actividad tirosina quinasa de ARG se ha informado como 0,5 micromolar (Okuda y otros. Blood, 2001).

40 Preferentemente, un inhibidor de la actividad tirosina quinasa de ARG inhibe específicamente la actividad tirosina quinasa de la proteína codificada por ARG. La inhibición específica se refiere a un inhibidor que inhibe la actividad tirosina quinasa de ARG al menos dos veces, preferentemente al menos cinco veces, o al menos 10 veces más de lo que inhibe la actividad tirosina quinasa de c-Abl.

45 Preferentemente, el inhibidor específico de la actividad tirosina quinasa no inhibe significativamente la actividad tirosina quinasa de C-kit, PDGFR-alfa y/o C-Abl.

50 En algunas modalidades, el inhibidor de ARG es una molécula de ácido nucleico cuya presencia en una célula provoca la degradación o inhibe la función, transcripción o traducción de su gen diana, es decir, ARG, de una manera específica de la secuencia. Las moléculas de ácido nucleico ilustrativas incluyen aptámeros, ARNip, microARN artificial, ARN de interferencia o ARNi, ARNbc, ribozimas, oligonucleótidos antisentido, y casetes de expresión de ADN que codifican dichas moléculas de ácido nucleico.

55 Preferentemente, la molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido. Los oligonucleótidos antisentido (ASO) generalmente inhiben su objetivo mediante la unión al ARNm diana y el bloqueo estérico de la expresión mediante la obstrucción del ribosoma. Los ASO además pueden inhibir su objetivo al unirse al ARNm diana y formar así un híbrido ADN-ARN que pueda ser una sustancia para la RNasa H. Los ASO además pueden producirse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos, miméticos de oligonucleótidos, o regiones o porciones de los mismos. Dichos compuestos además se han denominado en la técnica como híbridos o gámpmeros. Los métodos para diseñar y modificar dichos gámpmeros se describen, por ejemplo, en las publicaciones de patentes de los Estados Unidos núms. 20110092572 y 20100234451.

60 Recientemente se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido pueden utilizarse además para alterar el procesamiento del pre-ARNm, referido en la presente descripción como "AON de omisión de exón". Los oligonucleótidos antisentido de omisión de exones típicamente permiten saltar de un exón o la parte 5' o 3' del mismo. Los oligonucleótidos antisentido pueden dirigirse hacia el sitio de corte y empalme en 5', el sitio de corte y empalme en 3', a ambos sitios de corte y empalme, a uno o más sitios internos de exones y a secuencias de intrones, por ejemplo específico para el punto de ramificación. Este último permite la omisión del exón corriente arriba. Se dice que un

oligonucleótido se dirige hacia una secuencia interna de exón si la región de complementariedad que contiene la identidad de secuencia con el complemento inverso del pre-ARNm diana está dentro del límite del exón. Se han descrito métodos para diseñar oligonucleótidos de omisión de exones (ver, por ejemplo, Aartsma-Rus y otros, Mol Ther 17(3):548 (2009)).

5

Preferentemente, los AON útiles en los métodos descritos en la presente tienen al menos una modificación química que aumenta la resistencia del compuesto a la escisión de la RNasa H. Tales modificaciones incluyen, pero sin limitaciones, nucleótidos con modificaciones del azúcar. Como se usa en la presente descripción, un nucleótido con un azúcar modificado incluye, pero sin limitaciones uno o más restos de azúcar que son mono- o disustituidos en la posición 2', 3' y/o 5', tal como un -OH; -F; alquilo, alqueno, alquino, alcarilo, alilo, arilo, o aralquilo sustituidos o no sustituidos, lineales o ramificados inferiores (Cl-CIO) que pueden estar interrumpidos por uno o más heteroátomos; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; O-, S-, o N-alilo; O-alquil-O-alquilo, -metoxi, -aminopropoxi; -amino xi; metoxietoxi; -dimetilaminoxietoxi; y -dimetilaminoetoxietoxi. El resto de azúcar puede ser una piranosa o un derivado de la misma, o una desoxipiranosa o un derivado de la misma, preferentemente una ribosa o un derivado de la misma, o una desoxirribosa o un derivado de la misma. Tales restos de azúcares derivatizados preferidos comprenden un ácido nucleico bloqueado (LNA), en el cual el átomo de carbono 2' está unido al átomo de carbono 3' o 4' del anillo del azúcar lo que forma así un resto de azúcar bicíclico. Un LNA preferido comprende un ácido nucleico con puente de 2'-O,4'-C-etileno (Morita y otros 2001. Nucleic Acid Res Supplement núm. 1:241-242). Estas sustituciones hacen que el análogo de nucleótido o equivalente resistentes a las nucleasas y a la RNasa H y aumentan la afinidad por el ARN diana.

10

15

20

Los AON pueden comprender además cadenas principales modificadas, tales como cadenas principales de morfolino, cadenas principales de carbamato, cadenas principales de siloxano, cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona, cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo, cadenas principales de metileneformacetilo, cadenas principales de riboacetilo, cadenas principales que contienen alqueno, cadenas principales de sulfamato, sulfonato y sulfonamida, cadenas principales de metilenoimino y metilenohidrazino, y cadenas principales de amida. Preferentemente, el AON tiene una cadena principal de morfolino fosfordiamidato. Estos oligómeros tienen una cadena principal no cargada en la que el azúcar desoxirribosa del ADN se reemplaza por un anillo de seis miembros y el enlace fosfodiéster se reemplaza por un enlace fosfordiamidato. Un equivalente o análogo de nucleótido preferido comprende un ácido nucleico peptídico (PNA), que tiene una cadena principal de poliamida modificada (Nielsen, y otros (1991) Science 254, 1497-1500).

25

30

Otra cadena principal preferida comprende un análogo o equivalente de nucleótido de morfolino, en el que el azúcar ribosa o desoxirribosa se reemplaza por un anillo de morfolino de 6 miembros. Un análogo o equivalente de nucleótido de mayor preferencia comprende un oligómero de morfolino fosfordiamidato (PMO), en el que el azúcar ribosa o desoxirribosa se reemplaza por un anillo de morfolino de 6 miembros, y el enlace fosfodiéster aniónico entre los anillos de morfolino adyacentes se reemplaza por un enlace fosfordiamidato no iónico.

35

Aún en una modalidad adicional, un AON comprende una sustitución de uno de los átomos de oxígeno que no participa en el puente, en el enlace fosfodiéster. Esta modificación desestabiliza ligeramente el apareamiento de bases, pero añade una resistencia significativa a la degradación por nucleasas. Un análogo o equivalente de nucleótido preferido comprende fosfortioato, fosfortioato quiral, fosforditioato, fosfotriéster, aminoalquilfosfortriéster, H-fosfonato, fosfonato de metilo y otros grupos alquilo que incluyen 3'-alquileo fosfonato, 5'-alquileo fosfonato y fosfonato quiral, fosfinato, fosforamidato que incluye 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidato, tionofosforamidato, tionoalquilfosfonato, tionoalquilfosfortriéster, selenofosfato o boranofosfato.

40

45

Un experto en la técnica entiende que no es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido se modifiquen de manera uniforme. Además, más de uno de los análogos o equivalentes antes mencionados pueden incorporarse en un solo oligonucleótido o incluso en una sola posición dentro de un oligonucleótido. En determinadas modalidades, un oligonucleótido de la invención tiene al menos dos tipos diferentes de análogos o equivalentes.

50

Un AON preferido comprende un oligonucleótido antisentido de alquil fosfortioato, tal como ribosa modificada 2'-O-metilo (ARN), ribosa modificada 2'-O-etilo, ribosa modificada 2'-O-propilo, y/o derivados sustituidos de estas modificaciones tales como derivados halogenados. Un AON de mayor preferencia de acuerdo con la invención comprende ribosa 2'-O-metil fosfortioato.

55

Los AON comprenden típicamente entre 12 a 80, preferentemente entre 15 a 40, nucleobases. Preferentemente, los AON comprenden un tramo de al menos 8 nucleobases que tienen 100 % de complementariedad con el ARNm diana.

Preferentemente, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ARNi, es decir, una molécula de interferencia de ARN. Las moléculas de ARNi preferidos incluyen ARNip, shARN y microARN artificial.

60

Un ARNip comprende una estructura de doble cadena que contiene típicamente de 15 a 50 pares de bases y preferentemente de 19 a 25 pares de bases y que tiene una secuencia de nucleótidos idéntica o casi idéntica a un gen diana expresado o ARN dentro de la célula. Un ARNip puede estar compuesto de dos polinucleótidos hibridados o un solo polinucleótido que forma una estructura de horquilla. Como se usa en la presente descripción "shARN" o "ARN pequeño en horquilla" (denominado además bucle de tallo) es un tipo de ARNip. En una modalidad, estos shARN se componen de una cadena antisentido corta, por ejemplo aproximadamente 10 a aproximadamente 25 nucleótidos,

65

seguida por un bucle de nucleótidos de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 nucleótidos, y la cadena sentido análoga. Alternativamente, la cadena sentido puede preceder a la estructura del bucle de nucleótidos y puede seguir la cadena antisentido.

5 El diseño y la producción de moléculas de ARNip se conocen bien por un experto en la técnica (Hajeri PB, Singh SK. Drug Discov Today. 2009 14(17-18):851-8). Los métodos de administración de ARNip terapéutico también son bien conocidos para un experto en la técnica (Manjunath N, y Dykxhoorn DM. Discov Med. Mayo de 2010; 9(48):418-30; Guo J y otros, Mol Biosyst. 15 de julio de 2010; 6(7):1143-61). Una molécula de ARNip comprende una cadena antisentido que tiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos (por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 10 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30), en donde la cadena antisentido es complementaria a una secuencia de ARN o una porción de la misma que codifica. ARNip contra ARG también está disponible comercialmente (ver, por ejemplo, los números de catálogo de Invitrogen™ HSS100051, HSS100052, y HSS178493) y se describe en la publicación de patente de los Estados Unidos núm. 20050246794.

15 Las moléculas de microARN artificiales son pre-microARN o pri-microARN que comprenden una estructura(s) de tallo-bucle que se deriva de un microARN endógeno específico en el que el tallo(s) de la estructura(s) de tallo-bucle incorpora un híbrido de una cadena madura y una cadena pasajera donde la secuencia de la cadena madura es distinta de la secuencia de la cadena madura endógena del microARN endógeno referido específico. La secuencia de la cadena pasajera de un microARN de origen no natural de la descripción también es diferente de la secuencia de la cadena pasajera endógena del microARN endógeno referido específico. Pueden utilizarse muchos precursores de microARN, que incluyen sin limitación un microARN que comprende un diseño de cadena principal de miR-15a, -16, -19b, -20, -23a, 20 -27b, -29a, -30b, -30c, -104, -132s, -181, -191, - 223 (ver, por ejemplo, las publicaciones de patentes de los Estados Unidos núms. 20050075492 y 20100292310 para el diseño y la producción de moléculas de microARN artificiales).

25 La interferencia de ARN se refiere a una disminución en el nivel de ARNm en una célula para un gen diana heterólogo en al menos aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 %, aproximadamente 100 % del nivel de ARNm que se encuentra en la célula sin la presencia, por ejemplo, de la molécula de interferencia de microARN o 30 ARNip.

Las moléculas de ARNi pueden incluir además análogos químicos tales como, por ejemplo, análogos de 2'-O-metil ribosa de oligonucleótidos quiméricos de ARN, ADN, LNA y ARN, y otros análogos químicos de oligonucleótidos de 35 ácidos nucleicos.

Los inhibidores de moléculas de ácido nucleico pueden sintetizarse químicamente y proporcionarse directamente a las células de interés. El compuesto de ácido nucleico puede proporcionarse a una célula como parte de un vehículo de suministro génico. Un vehículo de este tipo es preferentemente un liposoma o un vehículo de suministro de genes 40 virales. Los liposomas se conocen en la técnica y muchas variantes están disponibles para propósitos de transferencia de genes. Actualmente se utilizan varios suministros de genes virales para transferir genes a las células diana. En la presente descripción se prefiere utilizar los vectores virales que no expresan sus propios genes, sino sólo los genes transferidos. El compuesto de ácido nucleico puede estar presente como tal en el vehículo de suministro de genes. En un vector viral, el compuesto de ácido nucleico se proporciona preferentemente como un casete de expresión en donde el casete de expresión codifica un transcrito que comprende dicho compuesto.

45 En consecuencia, los inhibidores de moléculas de ácido nucleico pueden proporcionarse en él. Un "vector" es un constructo de ácido nucleico recombinante, tal como un plásmido, genoma de fase, genoma de virus, cósmido, o cromosoma artificial, al que puede unirse otro segmento de ADN. El término "vector" incluye tanto medios virales como no virales para introducir el ácido nucleico en una célula in vitro, ex vivo o in vivo. Los vectores no virales incluyen plásmidos, liposomas, lípidos cargados eléctricamente (citofectinas), complejos de ADN y proteína, y biopolímeros. Los vectores virales incluyen retrovirus, virus adeno-asociados, viruela, baculovirus, vaccinia, herpes simple, virus de Epstein-Barr y vectores de adenovirus, como se expone en mayor detalle más abajo. Las secuencias de los vectores pueden contener además una o más regiones reguladoras y/o marcadores de selección útiles para seleccionar, medir y controlar los resultados de transferencia de ácidos nucleicos (transferencia a qué tejidos, duración de la expresión, etc.).

55 Preferentemente, las secuencias de los vectores proporcionan el suministro de las moléculas de ácido nucleico a las células apropiadas. Un vehículo de suministro preferido es un vector viral tal como un vector de virus adeno-asociado (AAV), o un vector retroviral tal como un vector lentivirus y similares (Goyenvalle A, y otros. Science 2004;306(5702):1796-9).

60 Además los plásmidos, cromosomas artificiales, plásmidos adecuados para la recombinación homóloga dirigida y la integración en el genoma humano de las células pueden aplicarse convenientemente para el suministro de un compuesto de ácido nucleico. Los preferidos son los vectores en donde la transcripción se conduce a partir de promotores de la Pol III, y/o en donde los transcritos están en la forma de fusiones con los transcritos de U1 o U7, que producen buenos resultados para el suministro de pequeños transcritos. Dentro de las habilidades del experto está el 65 diseño de transcritos adecuados. Los preferidos son los transcritos dirigidos por la Pol III.

En contraste con los estudios que informan edema subcutáneo como consecuencia del tratamiento con imatinib a largo plazo, la presente descripción demuestra que el tratamiento a corto plazo con imatinib protege contra la disfunción de la barrera endotelial. En consecuencia, se prefiere en los métodos descritos en la presente que el inhibidor de la función de ARG se proporcione a un individuo durante un periodo de tiempo de entre 1-20 semanas. Preferentemente, el inhibidor se proporciona durante un periodo de tiempo de entre 1-12 semanas, con mayor preferencia el inhibidor se proporciona durante hasta 3 semanas.

El inhibidor de la función de ARG puede formularse en cualquier preparación farmacéutica adecuada para su administración y comprende además, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, relleno, conservante, adyuvante, solubilizante, diluyente y/o excipiente. Tal vehículo, relleno, conservante, adyuvante, solubilizante, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables pueden encontrarse, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ma Edición. Baltimore, MD:Lippincott Williams & Wilkins, 2000.Si el inhibidor es un compuesto de ácido nucleico, los excipientes preferidos son capaces de formar complejos, vesículas y/o liposomas que lo suministren a través de una membrana celular. Los excipientes adecuados incluyen polietilenimina (PEI) o polímeros catiónicos similares, que incluyen copolímeros de polipropilenimina o polietilenimina (PEC) y derivados, ExGen 500, anfifílicos sintéticos (SAINT-18), lipofectina™, y DOTAP.

Un experto puede determinar la vía de administración para tales preparaciones farmacéuticas, tales como por administración oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intratecal y/o intraventricular. Preferentemente, el inhibidor se administra por vía oral o intravenosa.

Un experto puede determinar fácilmente una dosis y régimen de dosificación adecuados del inhibidor para la administración. Una dosis ilustrativa de imatinib, por ejemplo, es una dosis diaria de 400 mg que resulta en niveles plasmáticos de imatinib entre 1 y 10 micromolar (Singh y otros, Eur J Clin Pharmacol (2009) 65:545-549).Si no se observa respuesta clínica a los pocos días del inicio del tratamiento la dosificación se puede aumentar, por ejemplo a 400 mg dos veces al día.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 - Imatinib atenúa la disfunción de la barrera endotelial inducida por trombina a través de la estabilización de las uniones adherentes.Para probar los efectos de imatinib sobre la barrera endotelial, se sembraron HUVEC sobre filtros de policarbonato (paso de HRP) o electrodos de oro ECIS (mediciones de resistencia) y se cultivaron hasta la confluencia. Las células confluentes se trataron previamente con imatinib o DMSO (0,1 %), y se estimularon con trombina (IIa, 1 U/ml) o el vector. A) Curva de tiempo del paso de HRP en presencia o ausencia de imatinib. Media \pm SEM de N = 4 experimentos, cada uno representa mediciones triplicadas.** P <0,01, *** P <0,001 en comparación con DMSO + IIa. B) Efectos de imatinib sobre la resistencia endotelial normalizada durante la estimulación con trombina .La resistencia absoluta se normalizó hasta el momento justo antes de la adición de la trombina. Media \pm SEM de N = 5 experimentos, cada uno representa mediciones por duplicado. C) Cuantificación de la máxima disminución de la resistencia normalizada según se midió en B. Media \pm SEM de N = 4 experimentos, cada uno representa mediciones por duplicado.*** P <0,001.D) Pase de HRP sobre monocapas de células endoteliales microvasculares pulmonares humanas (HPMVEC) cultivadas en filtros de policarbonato (paso de HRP).Las células se trataron previamente con imatinib (10 μ M) o (DMSO 0,1 %), y posteriormente se estimularon con trombina (IIa, 1 U/ml) o el vector. Media \pm SEM de 5-6 mediciones en N = 2 experimentos. E) Las HUVEC se cultivaron hasta la confluencia en cubreobjetos de vidrio, tratadas previamente con DMSO (paneles superiores) o imatinib 10 μ M (paneles inferiores) y estimuladas con trombina durante 30 min. Las células fijadas se tiñeron para VE-cadherina (verde) y el núcleo (DAPI, azul).Imágenes representativas de N = 3 experimentos.F) Tinción de inmunofluorescencia de β -catenina después de 30 minutos de estimulación con trombina. Imágenes representativas de N = 2 experimentos. Las barras de escala representan 20 μ m. Todas las flechas indican pérdida de la tinción en la membrana, lo que sugiere espacios intercelulares. Las imágenes se tomaron con microscopio de fluorescencia invertido de campo amplio Axiovert 200 Marianas, mediante el uso de una lente de aire Zeiss 40x (NA 0,75).

Figura 2 - Imatinib inhibe la disfunción de la barrera endotelial sin afectar la señalización de RhoA/Rho quinasa (ROCK). Las HUVEC se sembraron en filtros de policarbonato, electrodos de oro ECIS, o cubreobjetos de vidrio y se cultivaron hasta la confluencia. Las células confluentes se trataron previamente con imatinib (10 μ M), el inhibidor de ROCK Y-27632 (10 μ M) o DMSO (0,1 %), y posteriormente se estimularon con trombina (IIa, 1 U/ml) o vector. A) Tinción de actina F (rodamina/faloidina) de las células confluentes tratadas previamente con imatinib o DMSO y estimuladas con trombina o vector. Las barras de escala representan 10 μ m. Las imágenes se realizaron con un microscopio invertido de fluorescencia de campo amplio Axiovert 200 Marianas, mediante el uso de una lente de aceite Zeiss 63x (NA 1,4).Imágenes representativas de N = 2 experimentos. B) Los efectos del tratamiento previo con imatinib y/o Y-27632 sobre el paso de HRP inducido por trombina sobre monocapas de HUVEC después de 30 min. Media \pm SEM de 6 mediciones en N = 2 experimentos. C) Resistencia eléctrica de monocapas de HUVEC durante la estimulación con trombina, después del tratamiento previo con imatinib, Y-27632 o DMSO. La resistencia se normalizó hasta el momento justo antes de la adición de la trombina. Media \pm SEM de N = 3 experimentos, cada uno representa mediciones por duplicado. D) La cuantificación de la máxima disminución de la resistencia relativa según se midió en C. Media \pm SEM

de N = 3 experimentos. E) Efectos del imatinib sobre la activación de RhoA inducida por trombina en HUVEC, expresado en unidades arbitrarias (U.A.).Media \pm SEM de 4 mediciones en N = 2 experimentos.* P <0,05, *** P <0,001.

5 Figura 3 - La inhibición de c-Abl, PDGFR o c-KIT no es la razón de los efectos protectores de imatinib. Las HUVEC se transfectaron con ARNip contra c-Abl, PDGFR- α y - β , c-KIT o ARN aleatorio (scARN), mediante el uso de Amaxa Technology. Después de la transfección, las células se sembraron en pocillos de 5 cm² para el análisis de transferencia Western o sobre electrodos de oro ECIS, y SE CULTIVARON hasta la confluencia durante 48 horas. Las células se trataron previamente con HSA al 1 %/M199, y posteriormente se estimularon con trombina (IIa, 1 U/ml).A) El tratamiento con ARNip resultó en una disminución del 80-90 % en la expresión de la proteína c-Abl, como se confirmó por análisis de transferencia Western para el total de c-Abl. La β -actina sirvió como control de carga (inserto).Resistencia absoluta en condiciones estimuladas con trombina o control. Media \pm SEM de 4 mediciones en N = 2 experimentos.B) Disminución inducida por trombina en la resistencia endotelial normalizada después de la transfección con ARNip o scARN para c-Abl. La resistencia se normalizó hasta el momento justo antes de la adición de la trombina. Media \pm SEM de N = 4 mediciones en 2 experimentos independientes.C) Disminución inducida por trombina en la resistencia endotelial normalizada después de la reducción de PDGFR- α , - β o la combinación. La resistencia se normalizó hasta el momento justo antes de la adición de la trombina. Media \pm SEM de 4 mediciones en N = 2 experimentos. D) El efecto de reducción de c-KIT sobre la caída inducida por trombina en la resistencia endotelial normalizada. La resistencia se normalizó hasta el momento justo antes de la adición de la trombina. Media \pm SEM de N = 3 experimentos, cada uno representa mediciones por duplicado.

20 Figura 4 - La inhibición de Arg imita los efectos de imatinib durante la estimulación con trombina. Las HUVEC se transfectaron con ARNip contra Arg, se sembraron en filtros de policarbonato, electrodos de oro ECIS o pocillos de 5 cm², y se cultivaron hasta la confluencia durante 48 horas (mediciones ECIS y transferencia Western) o 120 horas (paso de HRP y transferencia Western).Las células confluentes se trataron previamente con imatinib (10 μ M), DMSO (0,1 %) o HSA al 1 %/M199, y se estimularon con trombina (IIa, 1 U/ml) o vector. A) Curva de tiempo del paso de HRP en células transfectadas con scARN o ARNip para Arg después de la estimulación con trombina o vector.Media \pm SEM de N = 4 experimentos.** P <0,01 en comparación con scARN + IIa.B) Curva de tiempo del paso de HRP en células transfectadas con scARN o ARNip para Arg, tratadas previamente con imatinib o DMSO, y posteriormente estimuladas con trombina. Media \pm SEM de N = 4 experimentos. scARN + DMSO + IIa frente a siArg + DMSO + IIa, P <0,05; scARN + DMSO + IIa frente a scARN + Imatinib 10 μ M + IIa, P <0,001; scARN + DMSO + IIa frente a siArg + Imatinib 10 μ M + IIa, P <0,001; siArg + DMSO + IIa frente a scARN + Imatinib 10 μ M + IIa, P <0,05; siArg + DMSO + IIa frente a siArg + Imatinib 10 μ M + IIa, P <0,01 en ANOVA de mediciones repetidas. C) Resistencia endotelial normalizada durante la estimulación con trombina en HUVEC transfectadas con scARN o ARNip para Arg. La resistencia se normalizó hasta el momento justo antes de la estimulación con trombina. La respuesta a la trombina se cuantificó mediante el cálculo de la disminución máxima en la resistencia normalizada (inserto).Media \pm SEM de N = 4 experimentos.* P <0,05.D) Resistencia normalizada en células transfectadas con scARN o ARNip para Arg, tratadas previamente con imatinib o DMSO, y estimuladas con trombina. Media \pm SEM de N = 5 experimentos.E) La respuesta a la trombina se cuantificó mediante el cálculo de la disminución máxima en la resistencia normalizada. Media \pm SEM de N = 5 experimentos.* P <0,05, ** P <0,01.F) Expresión de la proteína Arg en células transfectadas con scARN o ARNip para Arg, lisadas 48 horas o 120 horas después de la transfección (inserto). La expresión de proteína se cuantificó con un método semicuantitativo, y se normalizó para la carga con β -actina. Media de N = 2 experimentos.

Figura 5

45 A) Las HUVEC se sembraron en filtros de policarbonato y se cultivaron hasta la confluencia durante 120 horas.Las células confluentes se trataron previamente con concentraciones crecientes de imatinib (1, 2, 5, 10 μ M) o DMSO (en concentraciones correspondientes), y se estimularon con trombina (IIa, 1 U/ml) o vector.Media de N = 2 experimentos, cada una representa mediciones por triplicado.B) Las HPMVEC se sembraron en electrodos de oro ECIS y se cultivaron hasta la confluencia.La resistencia endotelial absoluta de las monocapas de HPMVEC se trataron previamente con imatinib (10 μ M) o DMSO (0,1 %), y posteriormente se estimularon con trombina (IIa, 1 U/ml).Media \pm desviación estándar (SD) de 3 mediciones en 1 experimento.C) Las HFMVEC se sembraron en electrodos de oro ECIS y se cultivaron hasta la confluencia.La resistencia endotelial absoluta de las monocapas de células endoteliales microvasculares de piel humana (HSMVEC) se trataron previamente con imatinib (10 μ M) o DMSO (0,1 %) y posteriormente se estimularon con trombina (IIa, 1 U/ml).Media \pm SD de N = 3 experimentos, cada uno representa mediciones por duplicado.

Figura 6

60 Las HUVEC o HPMVEC se sembraron en electrodos de oro ECIS.A) Resistencia de la interacción célula a célula (Rb) en HUVEC durante la estimulación con trombina (IIa, 1 U/ml) después del tratamiento previo con DMSO (0,1 %) o imatinib (10 μ M).Media \pm SEM de N = 3 experimentos, cada uno representa mediciones por duplicado. B) Resistencia de la interacción célula-matriz (Alfa) en HUVEC durante la estimulación con trombina después del tratamiento previo con DMSO o imatinib. Media \pm SEM de N = 3 experimentos, cada uno representa mediciones por duplicado. C) Resistencia provocado por la interacción célula-célula (Rb) en HPMVEC tratadas previamente con DMSO (0,1 %) o imatinib (10 μ M), y estimuladas con trombina (IIa, 1 U/ml). D) Resistencia provocada por la interacción célula-matriz (Alfa) en HPMVEC tratadas previamente con DMSO o imatinib, y estimuladas con trombina.

Figura 7

5 A) Las HUVEC se transfectaron con scARN o ARNip para c-Abl y se sembraron en electrodos de oro ECIS. Las células se cultivaron hasta la confluencia durante 48 horas, se pretrataron con HSA al 1 % y se estimularon con trombina (IIa, 1 U/ml). A partir de mediciones de ECIS se calcularon la resistencia provocada por la interacción célula-célula (Rb) y la resistencia provocada por la interacción célula-matriz (alfa). Aquí se representa el efecto de la reducción de c-Abl sobre la disminución inducida por trombina en Rb normalizada. Media \pm SEM de 4 mediciones en N = 2 experimentos. B) Las células se transfectaron con scARN o ARNip para c-Abl y se cultivaron hasta la confluencia. Después de 48 horas las células se trataron previamente con imatinib (10 μ M) y posteriormente se estimularon con trombina (IIa, 1 U/ml). Media de N = 2 experimentos, cada uno representa mediciones por duplicado. C) Las HUVEC se transfectaron con scARN, ARNip para PDGFR- α o - β o la combinación de ARNip para PDGFR- α y - β , se sembraron en electrodos de oro ECIS, y se cultivaron hasta la confluencia. Después de 48 horas las células se trataron previamente con HSA al 1 %, y se estimularon con trombina (IIa, 1 U/ml). Los datos representan la resistencia endotelial absoluta. D) Curva de tiempo del paso de HRP en células transfectadas con scARN, ARNip para PDGFR- α o - β o una combinación de ARNip para PDGFR- α y - β después de la estimulación con trombina o vector. Media \pm SEM de 3-6 mediciones en N = 2 experimentos. E) Las HUVEC se sembraron en pocillos de cultivo de 5 cm² y se cultivaron hasta la confluencia. A las células confluentes se les substituyó el suero durante 24 horas con medio que contenía 1 % (1 % s) o 2 % (2 % s) de suero de ternero recién nacido, o se cultivaron en medio de crecimiento normal (cM199). Después de 24 horas las células se lisaron y los lisados celulares se analizaron para determinar la expresión de PDGFR- α o β por transferencia Western. Los lisados de fibroblastos de pulmón humano (FB) sirvieron como control positivo para la expresión de PDGFR. Imágenes representativas de N = 3 experimentos. F) Cuantificación de la disminución máxima en la resistencia normalizada en HUVEC tratadas previamente con concentraciones crecientes de Tirfostina AG1296 (2, 10, 50 μ M) o DMSO (0,1 %) y estimuladas con trombina (IIa, 1 U/ml) o vector. Media \pm SEM de N = 5 experimentos, *** P <0,001 en comparación con DMSO + IIa.

10

15

20

25

Lista de referencia

1. Lee WL, Slutsky AS. Sepsis and endothelial permeability. *N Engl J Med.* 2010;363(7):689-691.
2. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev.* 2006;86(1):279-367.
- 5 3. Overbeek MJ, van Nieuw Amerongen GP, Boonstra A, Smit EF, Vonk-Noordegraaf A. Possible role of imatinib in clinical pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J.* 2008;32(1):232-235.
4. Waller CF. Imatinib mesylate. *Recent Results Cancer Res.* 2010;184:3-20.
5. Schiffer CA. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors for chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med.* 2007;357(3):258-265.
- 10 6. Deininger MW, Goldman JM, Lydon N, Melo JV. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood.* 1997;90(9):3691-3698.
7. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ y otros. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2001;344(14):1031-1037.
8. van Oosterom AT, Judson I, Verweij J y otros. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet.* 2001;358(9291):1421-1423.
- 15 9. Daniels CE, Wilkes MC, Edens M y otros. Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. *J Clin Invest.* 2004;114(9):1308-1316.
10. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA y otros. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2811-2821.
- 20 11. Kerkela R, Grazette L, Yacobi R y otros. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med.* 2006;12(8):908-916.
12. Hellberg C, Ostman A, Heldin CH. PDGF and vessel maturation. *Recent Results Cancer Res.* 2010;180:103-114.
13. Su EJ, Fredriksson L, Geyer M y otros. Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat Med.* 2008;14(7):731-737.
- 25 14. Armulik A, Genove G, Mae M y otros. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature.* 2010;468(7323):557-561.
15. van Nieuw Amerongen GP, Draijer R, Vermeer MA, van Hinsbergh WMM. Transient and prolonged increase in endothelial permeability induced by histamine and thrombin: role of protein kinases, calcium, and RhoA. *Circ Res.* 1998;83(11):1115-1123.
16. Shelton JL, Wang L, Cepinkas G y otros. Albumin leak across human pulmonary microvascular vs. umbilical vein endothelial cells under septic conditions. *Microvasc Res.* 2006;71(1):40-47.
- 30 17. van Hinsbergh WMM, Spengers ED, Kooistra T. Effect of thrombin on the production of plasminogen activators and PA inhibitor-1 by human foreskin microvascular endothelial cells. *Thromb Haemost.* 1987;57(2):148-153.
18. Vogel SM, Gao X, Mehta D y otros. Abrogation of thrombin-induced increase in pulmonary microvascular permeability in PAR-1 knockout mice. *Physiol Genomics.* 2000;4(2):137-145.
- 35 19. Tauseef M, Kini V, Knezevic N y otros. Activation of sphingosine kinase-1 reverses the increase in lung vascular permeability through sphingosine-1-phosphate receptor signaling in endothelial cells. *Circ Res.* 2008;103(10):1164-1172.
20. Minami T, Sugiyama A, Wu SQ y otros. Thrombin and phenotypic modulation of the endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(1):41-53.
21. Giaever I, Keese CR. Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(17):7896-7900.
- 40 22. Lo CM, Keese CR, Giaever I. Cell-substrate contact: another factor may influence transepithelial electrical resistance of cell layers cultured on permeable filters. *Exp Cell Res.* 1999;250(2):576-580.
23. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 13):2115-2122.
- 45 24. van Nieuw Amerongen GP, van Delft S, Vermeer MA, Collard JG, van Hinsbergh WMM. Activation of RhoA by thrombin in endothelial hyperpermeability: role of Rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res.* 2000;87(4):335-340.
25. Huang X, Wu D, Jin H, Stupack D, Wang JYJ. Induction of cell retraction by the combined actions of Abl-CrkII and Rho-ROCK1 signaling. *J Cell Biol.* 2008;183(4):711-723.
- 50 26. Kim J, Wu Q, Zhang Y y otros. PDGF signaling is required for epicardial function and blood vessel formation in regenerating zebrafish hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(40):17206-17210.
27. Hernandez SE, Settleman J, Koleske AJ. Adhesion-dependent regulation of p190RhoGAP in the developing brain by the Abl-related gene tyrosine kinase. *Curr Biol.* 2004;14(8):691-696.
28. Bradley WD, Hernandez SE, Settleman J, Koleske AJ. Integrin signaling through Arg activates p190RhoGAP by promoting its binding to p120RasGAP and recruitment to the membrane. *Mol Biol Cell.* 2006;17(11):4827-4836.
- 55 29. Kurimoto N, Nan YS, Chen ZY y otros. Effects of specific signal transduction inhibitors on increased permeability across rat endothelial monolayers induced by neuropeptide Y or VEGF. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(1):H100-H106.
30. Singh N, Kumar L, Meena R, Velpandian T. Drug monitoring of imatinib levels in patients undergoing therapy for chronic myeloid leukaemia: comparing plasma levels of responders and non-responders. *Eur J Clin Pharmacol.* 2009;65(6):545-549.
31. Demetri GD, Wang Y, Wehrle E y otros. Imatinib plasma levels are correlated with clinical benefit in patients with unresectable/metastatic gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol.* 2009;27(19):3141-3147.
- 60 32. Wang Y, Miller AL, Mooseker MS, Koleske AJ. The Abl-related gene (Arg) nonreceptor tyrosine kinase uses two F-actin-binding domains to bundle F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(26):14865-14870.
- 65

33. Galkin VE, Orlova A, Koleske AJ, Egelman EH. The Arg non-receptor tyrosine kinase modifies F-actin structure. *J Mol Biol.* 2005;346(2):565-575.
34. Lapetina S, Mader CC, Machida K, Mayer BJ, Koleske AJ. Arg interacts with cortactin to promote adhesion-dependent cell edge protrusion. *J Cell Biol.* 2009;185(3):503-519.
- 5 35. Miller MM, Lapetina S, MacGrath SM y otros. Regulation of actin polymerization and adhesion-dependent cell edge protrusion by the Abl-related gene (Arg) tyrosine kinase and N-WASp. *Biochemistry.* 2010;49(10):2227-2234.
36. Boyle SN, Koleske AJ. Use of a chemical genetic technique to identify myosin IIb as a substrate of the Abl-related gene (Arg) tyrosine kinase. *Biochemistry.* 2007;46(41):11614-11620.
- 10 37. Kolega J. Asymmetric distribution of myosin IIB in migrating endothelial cells is regulated by a rho-dependent kinase and contributes to tail retraction. *Mol Biol Cell.* 2003;14(12):4745-4757.
38. Peacock JG, Couch BA, Koleske AJ. The Abl and Arg non-receptor tyrosine kinases regulate different zones of stress fiber, focal adhesion, and contractile network localization in spreading fibroblasts. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2010;67(10):666-675.
- 15 39. Shikata Y, Birukov KG, Garcia JGN. SIP induces FA remodeling in human pulmonary endothelial cells: role of Rac, GIT1, FAK, and paxillin. *J Appl Physiol.* 2003;94(3):1193-1203.
40. Bradley WD, Koleske AJ. Regulation of cell migration and morphogenesis by Abl-family kinases: emerging mechanisms and physiological contexts. *J Cell Sci.* 2009;122 (Pt 19):3441-3454.
41. Zandy NL, Playford M, Pendergast AM. Abl tyrosine kinases regulate cell-cell adhesion through Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104 (45):17686-17691.
- 20 42. Wang B, Kruh GD. Subcellular localization of the Arg protein tyrosine kinase. *Oncogene.* 1996;13(1):193-197.
43. Dudek SM, Chiang ET, Camp SM y otros. Abl tyrosine kinase phosphorylates nonmuscle Myosin light chain kinase to regulate endothelial barrier function. *Mol Biol Cell.* 2010;21(22):4042-4056.

La invención se explica adicionalmente en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que simplemente sirven para aclarar la invención.

Ejemplos

5 Ejemplo 1. Imatinib atenúa la hiperpermeabilidad endotelial inducida por trombina.

10 Para evaluar los efectos de imatinib sobre la función de la barrera endotelial, las HUVEC se trataron previamente con imatinib, y posteriormente se estimularon con trombina (1 U/ml). La trombina se utilizó para imitar las condiciones inflamatorias, ya que la trombina es un potente inductor de la permeabilidad endotelial,^{18,19} y se incrementa en la sepsis y en sitios de lesión vascular.²⁰ La función de barrera endotelial se evaluó mediante el paso de HRP a través de las monocapas endoteliales cultivadas en filtros porosos y mediante la resistencia eléctrica de las monocapas endoteliales cultivadas en electrodos de oro (Detección de la impedancia eléctrica de las células y el sustrato (ECIS)). Imatinib no afectó la función de la barrera endotelial basal en ambas mediciones (Figuras 1A y C). La trombina indujo un aumento de 5 a 10 veces en el paso de HRP a través de las monocapas endoteliales (Figura 1A), lo cual se atenuó por imatinib de manera dependiente de la dosis con un efecto máximo a 10 μ M (Figura 5A). Imatinib 10 μ M redujo el paso de HRP inducido por trombina de manera similar en todos los puntos de tiempo (inhibición de 35 - 44 %, $P < 0,001$; Figura 1A). En las mediciones de ECIS la trombina redujo fuertemente la resistencia eléctrica endotelial hasta alcanzar un máximo después de 30 minutos, seguido de una recuperación gradual de la resistencia EC (Figura 1B). Imatinib atenuó la disminución inducida por trombina en la resistencia endotelial, como se indica por una caída significativamente menor en la resistencia, y una recuperación más rápida hacia la línea de base (Figuras 1B y 1C, disminución máxima en la resistencia normalizada de $-0,54 \pm 0,02$ en células tratadas previamente con DMSO frente a $-0,41 \pm 0,03$ en células tratadas previamente con imatinib, $P < 0,001$).

25 Para evaluar si los efectos observados de imatinib se producen además en otros tipos de células endoteliales, los ensayos de permeabilidad se realizaron en células endoteliales microvasculares de pulmón humano (HPMVEC) y células endoteliales microvasculares de prepucio humano (HFMVEC). En las HPMVEC, el imatinib redujo el paso de la macromolécula inducido por trombina (Figura 1D) y atenuó la caída máxima de la resistencia endotelial (Figura 5B). De manera similar, el imatinib atenuó la caída máxima inducida por trombina en la resistencia endotelial en las HFMVEC (Figura 5C).

Ejemplo 2. Imatinib atenúa la desintegración, inducida por trombina, de las uniones endoteliales

35 La resistencia eléctrica a través de una monocapa endotelial es el resultado tanto de la interacción célula-célula (adhesión intercelular) como de la interacción célula-sustrato (adhesión celular a la matriz subcelular).^{21,22} El cálculo de la resistencia provocada por la interacción célula-célula (Rb) reveló que la trombina disminuye fuertemente la adhesión célula-célula, lo cual se atenuó por imatinib (Figura 6A, disminución máxima en Rb normalizada $-0,97 \pm 0,02$ en células tratadas previamente con DMSO frente a $-0,87 \pm 0,03$ en células tratadas previamente con imatinib, $p = 0,05$). Esto se acompañó por la atenuación de la caída inducida por trombina en la interacción célula-matriz (Figura 6B). Se observaron efectos comparables de imatinib sobre Rb y alfa en las HPMVEC (Figura 6C y D).

45 Para analizar adicionalmente el efecto de imatinib sobre la adhesión célula a célula, se realizó una tinción de inmunofluorescencia de las proteínas de AJ VE-cadherina y β -catenina, las cuales son necesarias para la integridad de AJ.^{2,23} A los 15 minutos (datos no mostrados) y 30 minutos, la pérdida, la trombina indujo pérdida de VE-cadherina (Figura 1E) y β -catenina (Figura 1F) de la membrana, como indica la reducción de la señal de fluorescencia en la periferia de las células, y la formación de espacios intercelulares (flechas, Figura 1E y F). La pérdida de VE-cadherina y β -catenina de la membrana podría revertirse parcialmente por el tratamiento previo con imatinib, indicado por la preservación de tinción de la membrana y reducción del número de espacios intercelulares.

50 En conjunto, estos datos demuestran que imatinib protege contra la disfunción de la barrera endotelial durante la estimulación con trombina. Imatinib ejerce estos efectos mediante la preservación de la integridad de AJ y la adhesión célula a célula.

Ejemplo 3. Los efectos de imatinib de protección de la barrera son independientes de la ruta de RhoA/Rho quinasa.

55 La disociación de las AJ inducida por la trombina y la pérdida de la adhesión de célula a célula implica Ca^{2+} y la contracción por actina y miosina mediada por RhoA/Rho quinasa.²⁴ Para evaluar la contracción por actina y miosina, las HUVEC se tiñeron para la actina F. La trombina (15 min) alteró el citoesqueleto de actina F de una banda de actina F periférica predominante (Figura 2A, panel superior izquierdo) a un nuevo patrón con robustas fibras de estrés de actina F (flechas, Figura 2A, panel superior derecho). En las células tratadas previamente con imatinib la actina F no se organizó en fibras de estrés de actina F, sino en una red bien estructurada de pequeños filamentos de actina F en la periferia de la célula. La ausencia de fibras de estrés en las células tratadas previamente con imatinib se asoció con la pérdida de la morfología celular contráctil y menos espacios intercelulares (Figura 2A, panel inferior derecho).

65 Dado que se ha informado que la mayoría de las quinasas sensibles a imatinib (c-Abi²⁵, PDGFR²⁶ y Arg^{27,28}) afectan la actividad de Rho quinasa, planteamos la hipótesis de que el imatinib atenúa los cambios inducidos por trombina en el

citoesqueleto de actina mediante la inhibición de la ruta de la RhoA/Rho quinasa. Las HUVEC se trataron previamente con imatinib y/o el inhibidor de Rho quinasa Y-27632, y se estimularon con trombina. Tanto imatinib como Y-27632 redujeron la permeabilidad endotelial inducida por trombina según se determinó mediante el paso de HRP y la resistencia eléctrica transendotelial. Los efectos inhibidores de imatinib y Y-27632 sobre el paso de HRP fueron independientes y aditivos (Figura 2B, $P < 0,05$). Similarmente, las mediciones de ECIS apuntaron a un efecto aditivo de imatinib y Y-27632 (Figuras 2C y D, caída máxima de la resistencia eléctrica de $-0,44 \pm 0,02$ en las células tratadas previamente con imatinib solo frente a $-0,18 \pm 0,04$ en las células tratadas previamente con una combinación de imatinib y Y-27632, $P < 0,05$).

Para analizar el efecto de imatinib sobre la activación de RhoA, se analizaron los lisados celulares para determinar la actividad de RhoA con un ensayo de la actividad de RhoA G-LISA. La actividad de RhoA tuvo un gran aumento tras la estimulación con trombina, pero no se afectó por el tratamiento previo con imatinib (Figura 2E). Dado que imatinib no afecta la activación de RhoA y tiene un efecto aditivo a la inhibición de ROCK, imatinib atenúa la permeabilidad endotelial independiente de la ruta de la RhoA/Rho quinasa. Mediante el uso de BAPTA-AM como un quelante de calcio intracelular, se excluyó además un efecto del imatinib sobre el Ca^{2+} citoplasmático (datos no mostrados).

Estos datos indican que imatinib reduce la formación de fibras de estrés de actina F y la contracción celular sin afectar la ruta de la RhoA/Rho quinasa. Esto implica que, durante la disfunción de la barrera endotelial, existe una regulación de la estructura de la actina F independiente de la ruta de la RhoA/Rho quinasa.

Ejemplo 4. La inhibición de c-Abl, PDGFR o c-KIT no es la razón de los efectos protectores de la barrera del imatinib.

Para determinar cuál de las quinasas sensibles a imatinib (c-Abl, PDGFR, Arg y c-KIT) está implicada en la hiperpermeabilidad endotelial inducida por trombina, se obtuvo una disminución por ARNip sistemático de las quinasas sensibles a imatinib. Dado que imatinib se desarrolló principalmente para dirigirse a c-Abl, planteamos la hipótesis de que la inhibición de c-Abl es la razón de los efectos protectores de imatinib. Las HUVEC se transfectaron con ARNip para c-Abl para disminuir a c-Abl, lo que resultó en una reducción del 85 % en la expresión de la proteína c-Abl en comparación a la transfección con ARN aleatorio (scARN, Figura 3A inserto). Las mediciones de ECIS demostraron que la disminución de c-Abl deterioró en algo la integridad de la barrera endotelial basal (reducción de 100Ω en comparación con las células control, Figura 3A). La trombina indujo una disminución idéntica en la resistencia eléctrica en las células control y las células deficientes en c-Abl (Figura 3A y 3B). Sin embargo, el cálculo de Rb reveló que la respuesta a la trombina fue más prominente en las células endoteliales deficientes de c-Abl (Figura 7A). En las células deficientes de c-Abl, imatinib todavía atenuó la respuesta a la trombina (Figura 7B). Por lo tanto, la inhibición de c-Abl no es la razón de los efectos protectores de imatinib sobre la función de barrera endotelial.

Posteriormente, probamos si la inhibición de PDGFR era la responsable de los efectos de imatinib sobre la permeabilidad endotelial. Las HUVEC se transfectaron con ARNip contra PDGFR- α o - β , o la combinación. Aunque la disminución combinada de PDGFR- α y β aumentó la resistencia endotelial basal (Figura 7C), no se observó efecto protector sobre la respuesta a la trombina (Figura 3C). Similarmente, no se detectaron diferencias en el paso de HRP entre las células transfectadas con scARN y ARNip para PDGFR (Figura 7D). La expresión de proteínas de PDGFR- α y - β estaba por debajo del límite de detección (Figura 7E), lo que respalda aún más el hallazgo de que PDGFR no está involucrado en la respuesta a la trombina.

Similarmente, la disminución de c-KIT con ARNip no afectó la respuesta a la trombina (Figura 3D). Para confirmar los resultados de la disminución de PDGFR y c-KIT, las HUVEC se trataron previamente con Tirofostina AG1296, un inhibidor farmacológico de ambos PDGFR y c-KIT. Similar a la disminución combinada de PDGFR- α y - β , AG1296 mejoró la función de barrera basal, pero no inhibió la respuesta a la trombina (Figura 7F). En conjunto, estos datos indican que ni la inhibición de c-Abl, ni la inhibición de PDGFR o c-KIT son la razón de los efectos protectores de la barrera del imatinib.

Ejemplo 5. La tirosina quinasa Arg es un mediador de la hiperpermeabilidad inducida por trombina.

Finalmente, se investigó si Arg está implicada en la disfunción de la barrera endotelial inducida por trombina. La disminución de Arg redujo significativamente el paso de HRP inducido por la trombina. El paso de HRP fue menor en las células transfectadas con ARNip para Arg en comparación con las células transfectadas con scARN (Figura 4A; $15,5 \pm 1,1$ % frente a $20,1 \pm 1,5$ %, respectivamente, $P < 0,01$ después de 1 hora y $21,3 \pm 1,5$ % frente a $27,3 \pm 1,8$ %, respectivamente, $P < 0,01$ después de 2 horas). El tratamiento previo con imatinib tuvo un efecto aditivo a la disminución de Arg sobre la respuesta a la trombina, ya que el paso de HRP fue significativamente menor en las células deficientes de Arg tratadas previamente con imatinib, en comparación con las células deficientes de Arg tratadas previamente con DMSO (Figura 4B, $P < 0,01$). En las mediciones de ECIS la disminución de Arg atenuó la respuesta a la trombina como se indica por una caída menor en la resistencia endotelial y una recuperación más rápida hacia los valores basales (Figura 4C). La disminución de Arg imitó el tratamiento previo con imatinib, ya que ese observó una disminución similar en la resistencia normalizada en las células deficientes de Arg y las células tratadas previamente con imatinib, mientras que el tratamiento previo con imatinib no tuvo ningún efecto aditivo (Figura 4D y E). La eficacia de la disminución de Arg fue mayor después de 48 horas que después de 120 horas (Figura 4F). Como el intervalo entre la transfección y la medición difiere para las mediciones de ECIS (48 horas) y los experimentos del paso de HRP (120 horas), la diferencia

en la disminución de Arg probablemente explica la observación de que la disminución de Arg imitó exactamente al imatinib en las mediciones de ECIS, pero no en los experimentos del paso de HRP.

Estos datos indican que imatinib atenúa la hiperpermeabilidad inducida por trombina a través de la inhibición de Arg. Además, estos datos identifican a Arg como un nuevo mediador de la respuesta a la trombina. Arg contribuye de manera importante a la disfunción de la barrera endotelial inducida por la trombina, ya que la inhibición de Arg reduce el paso de macromoléculas inducido por la trombina hasta un 40 %.

Ejemplo 6. Tratamiento de la sepsis con un inhibidor de ARG

La sepsis se diagnostica si dos o más de los siguientes criterios están presentes: temperatura corporal anormal ($< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$), conteos anormales de leucocitos (< 4 o $> 12 \times 10^9/\text{L}$), una fuente de infección clínica o microbiológicamente probada, taquicardia ($> 90/\text{min}$) y taquipnea ($> 20/\text{min}$ o una presión parcial de dióxido de carbono arterial (P_aCO_2) < 32 mmHg). Tras el diagnóstico de la sepsis, el tratamiento con imatinib se iniciará a una dosis de 400 mg al día, administrada por vía oral o intravenosa. Los indicadores de respuesta clínica son: presencia de edema pulmonar en la radiografía o TAC de tórax, saturación de la hemoglobina por oxígeno, presión parcial de oxígeno arterial (relación P_aO_2)/fracción de oxígeno inspirado (FiO_2), dependencia de ventilador, dependencia de vasopresores y presión arterial sistémica. Si no hay respuesta clínica durante 2 días, la dosis de imatinib se puede aumentar a 400 mg dos veces al día. La duración máxima del tratamiento es de 3 semanas.

Ejemplo 7. Tratamiento de edema pulmonar después de la radiación con inhibidor de ARG

El edema pulmonar grave puede seguir a una radioterapia, en dependencia de la dosis y la duración de la irradiación. El edema pulmonar tras la irradiación se diagnostica por evidencia de edema pulmonar en una radiografía de tórax o TAC de tórax e hipoxemia. Tras el diagnóstico de un edema pulmonar después de la radiación el tratamiento con imatinib se iniciará con una dosis inicial de 400 mg al día administrada por vía oral o intravenosa. Los parámetros para el seguimiento del edema pulmonar incluyen: presencia de edema pulmonar en la radiografía de tórax o CT (tórax), tensión de oxígeno arterial y saturación de la hemoglobina por oxígeno. Si no hay respuesta clínica durante 2 días, la dosis de imatinib se puede aumentar a 400 mg dos veces al día. La duración máxima del tratamiento es superior a las 3 semanas.

Ejemplo 8. Tratamiento del edema pulmonar con reperfusión después de una endarterectomía pulmonar con inhibidor de ARG

El edema pulmonar de reperfusión se produce por lo general dentro de las 72 horas después de una endarterectomía pulmonar (Levinson y otros. J Thorac Cardiovasc Surg. Abr de 1990; 99 (4): 670-8; Levinson y otros. Am Rev Respir Dis. Dic de 1986; 134(6):1241-5), y se diagnostica por la presencia de edema pulmonar en una radiografía de tórax o TAC (tórax), tensión de oxígeno arterial y saturación de la hemoglobina por oxígeno. Después de realizar una endarterectomía pulmonar, el tratamiento con imatinib se iniciará con una dosis inicial de 400 mg administrados diariamente por vía oral o intravenosa para prevenir el desarrollo de edema pulmonar. Los parámetros para el seguimiento del edema pulmonar incluyen: presencia de edema pulmonar en la radiografía de tórax o CT (tórax), tensión de oxígeno arterial, saturación de la hemoglobina por oxígeno y dependencia de ventilador. Si no hay respuesta clínica durante 2 días, la dosis de imatinib se puede aumentar a 400 mg dos veces al día. La duración máxima del tratamiento es de 3 semanas.

Ejemplo 9. Tratamiento de la estenosis de no reflujo con inhibidor de ARG

La estenosis de no reflujo es un fenómeno que se observa comúnmente durante la cateterización cardíaca por la estenosis de las arterias coronarias, lo que es provocado probablemente por la formación de edema en la pared vascular que rodea la lesión. El tratamiento con imatinib se iniciará 12 horas (dosis única de 400 mg administrada por vía oral o intravenosa) antes del comienzo de la cateterización cardíaca para prevenir el desarrollo de edema en la pared vascular durante el procedimiento y continúa después del procedimiento (400 mg al día) para evitar la formación de edema en la fase postoperatoria. La duración máxima del tratamiento es de 1 semana.

Ejemplo 10. Tratamiento de la lesión pulmonar aguda/síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (ALI/ARDS)

ALI/ARDS pueden desarrollarse como consecuencia de enfermedades pulmonares (por ejemplo, neumonía, contusión pulmonar o ahogamiento), o como consecuencia de una enfermedad sistémica (por ejemplo, sepsis). ALI y ARDS se diagnostican de acuerdo con los criterios de la Conferencia de Consenso de América y Europa. Tras el diagnóstico de ALI/ARDS, el tratamiento con imatinib se iniciará además del tratamiento regular como se indica en las directrices sobre el tratamiento para ALI/ARDS. La dosis inicial de imatinib será de 400 mg al día, administrados por vía oral o intravenosa. Los indicadores de respuesta clínica son: presencia de edema pulmonar en la radiografía o TAC de tórax, saturación de la hemoglobina por oxígeno, presión parcial de oxígeno arterial relación (P_aO_2)/fracción de oxígeno inspirado (FiO_2), dependencia de ventilador y agua pulmonar extravascular, según se mide por la técnica de termodilución de indicador individual. Si no hay respuesta clínica durante 2 días, la dosis de imatinib se puede aumentar a 400 mg dos veces al día. La duración máxima del tratamiento es de 3 semanas.

Materiales y Métodos

Reactivos

5 El mesilato de imatinib se adquirió de ChemieTek (Indianapolis, IN, Estados Unidos) y se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración madre de 10 mM. Tirfostina AG1296 se adquirió de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania) y se disolvió en DMSO a una concentración madre de 5 mM. La trombina se adquirió de Sigma Aldrich (Zwijndrecht, Países Bajos). Y-27632 se adquirió de Tocris Cookson Ltd (Londres, Reino Unido). Los ARN pequeños de interferencia (ARNip) contra c-Abl, PDGFR- α y - β , Arg, c-KIT y ARN aleatorios (scARN) eran de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, Estados Unidos). Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti c-Abl (núm. 2862), anti PDGFR- α (núm. 3174) y - β (núm. 3169), todos de Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, Estados Unidos), anti β -actina (Sigma Aldrich), anti VE-cadherina (SC-6458, Santa Cruz) y Arg (SC-6356, Santa Cruz) y β -catenina (clon 8E7, Upstate/Millipore, Temecula, CA, Estados Unidos).

15 Cultivo celular

20 Para las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), los cordones umbilicales se obtuvieron de Amstelland Ziekenhuis, Amstelveen. Las células se aislaron de donantes sanos, y se caracterizaron extensamente como se describió anteriormente.¹⁵ Después del aislamiento, las células se resuspendieron en medio M199 (BioWhittaker/Lonza, Verviers, Bélgica), suplementado con penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 mg/ml (BioWhittaker/Lonza, Verviers, Bélgica), suero humano inactivado por calor al 10 % (Sanquin CLB, Amsterdam, Países Bajos), suero de ternero recién nacido al 10 % inactivado por calor (Gibco, Grand Island, Nueva York), factor de crecimiento de células endoteliales crudo 150 μ g/ml (preparado a partir de cerebros bovinos), L-glutamina 2 mmol/l (BioWhittaker/Lonza), y heparina 5 U/ml (Leo Pharmaceutical Products, Weesp, Países Bajos). Las células se cultivaron a 37 °C y 5 % de CO₂, con un cambio del medio de cultivo cada dos días. Las células se cultivaron hasta el pase 2, para los experimentos se utilizaron células de 1-2 pases.

30 Las células microvasculares pulmonares humanas se aislaron a partir de tejido pulmonar humano como se describió previamente.¹⁶ Las células se cultivaron en medio de cultivo EGM2-MV (medio EBM2 suplementado con 5 % de suero fetal bovino, factor de crecimiento epidérmico humano, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento similar a la insulina, hidrocortisona, ácido ascórbico, gentamicina y anfotericina de acuerdo con el protocolo de los fabricantes [BioWhittaker/Lonza], y con penicilina [100 U/ml] y estreptomina [100 mg/ml]) y se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm² revestidos con gelatina. Las células se cultivaron hasta la confluencia a 37 °C y 5 % de CO₂, con un cambio del medio de cultivo cada dos días. Se caracterizaron ampliamente como células endoteliales por la presencia de marcadores endoteliales y la ausencia de marcadores de células epiteliales, linfáticas y de músculo liso. Las células se cultivaron hasta el pase 7, para los experimentos se utilizaron células de 4-7 pases. Las células microvasculares de prepucio humano se aislaron a partir de prepucio humano¹⁷, y se cultivaron con medio de cultivo EGM2-MV. Las células se cultivaron hasta confluencia a 37 °C y 5 % de CO₂, con un cambio del medio de cultivo cada dos días, y se caracterizaron de manera similar a las células endoteliales.¹⁷

45 Aislamiento de células endoteliales microvasculares pulmonares humanas (HPMVEC) El tejido pulmonar se obtuvo a partir de pacientes sometidos a lobectomía por cáncer de pulmón primario o metástasis (Departamento de Cirugía Torácica, Centro Médico Universitario VU, Amsterdam). Después de enjuagar el tejido pulmonar en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se eliminó el tejido pleural y el tejido restante se cortó en piezas durante 5 minutos. El tejido cortado se incubó en 20 ml de solución de colagenasa tipo II al 0,3% (Sigma, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) en PBS durante 60 minutos bajo agitación suave. La digestión se detuvo mediante la adición de medio de cultivo EGM2-MV (medio EBM2 suplementado con 5 % de suero fetal bovino, factor de crecimiento epidérmico humano, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento similar a la insulina, hidrocortisona, ácido ascórbico de acuerdo con el protocolo de los fabricantes [Lonza, Basel, Suiza], y con penicilina [100 U/ml] y estreptomina [100 mg/ml, Lonza, BioWhittaker, Verviers, Bélgica]). Después de la digestión, la suspensión se lavó abundantemente a través de un filtro de células de 100 μ m y 70 μ m (BD Biosciences, Bedford, Estados Unidos). La suspensión filtrada se centrifugó durante 5 min a 230 x G/21 °C, y el sedimento se resuspendió en 120 μ l de EGM2-MV, 40 μ l de reactivo de bloqueo de FcR y 40 μ l de perlas magnéticas recubiertas con CD31 (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania) y se incubaron durante 15 min a 4 °C. Las células endoteliales CD31+ se separaron de otras células al pasar la suspensión celular a través de un campo magnético. Las células endoteliales recién aisladas se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm² recubiertos de gelatina y fibronectina. Después de 7-10 días de cultivo, las células se purificaron adicionalmente mediante la repetición del procedimiento de las perlas magnéticas hasta alcanzar un cultivo 95-100 % puro. Las células se caracterizaron ampliamente como células endoteliales por la presencia de marcadores endoteliales (CD31, VE-cadherina, vWF, Tie2 y unión de lectina de Ulex), y la ausencia de marcadores de células epiteliales (pancitoqueratina), de células de músculo liso vascular (α -actina de músculo liso) o marcadores linfáticos (LYVE-1). Las células se caracterizaron además como células endoteliales microvasculares (lectina de Ulex).

65 Función de barrera endotelial

La función de barrera endotelial se evaluó con el paso de la peroxidasa de rábano picante (HRP) y detección de la impedancia eléctrica de las células y el sustrato (IEM). Para la medición del paso de HRP, las células confluentes se sembraron en densidad de 1:1 en filtros de policarbonato Costar de 0,33 cm², tamaño de poro de 3,0 μm (Corning, Lowell, MA, Estados Unidos) y se cultivaron hasta la confluencia en 4 o 5 días, con cambio de medio de cultivo cada dos días. Para el pretratamiento, los inhibidores farmacológicos o vector se disolvieron en M199 suplementado con 1 % de albúmina de suero humano (HSA, Sanquin CLB), y después de la eliminación del medio de cultivo, se añadieron las soluciones al compartimiento superior de los filtros durante 60 min. Para la estimulación, el medio de pretratamiento se cambió por HSA al 1 %/M199 que contenía los inhibidores designados, HRP 5 μg/ml (Sigma Aldrich) y trombina 1 U/ml. Se añadió HSA al 1 %/M199 al compartimiento inferior. En los puntos de tiempo indicados se tomaron muestras del compartimiento inferior; la concentración de HRP se detectó en las muestras mediante la medición de quimioluminiscencia después de la adición de TMB/E (Upstate/Millipore).

Para las mediciones de ECIS, las células se tripsinizaron y se sembraron en densidad de 1:1 en arreglos de ECIS recubiertos con gelatina, cada uno contenía 8 pocillos con 10 electrodos de oro/pocillo (8W10E, Applied Biophysics, Troy, Nueva York, Estados Unidos). El medio de cultivo se renovó 24 horas después de la siembra, mientras que los experimentos se llevaron a cabo 48 horas después de la siembra. Para el pretratamiento, el vector o los inhibidores farmacológicos designados se disolvieron en M199 suplementado con HSA al 1 %. Después de 90 minutos de pretratamiento, se añadió la trombina directamente a las células para una concentración final de 1 U/ml. Durante la estimulación se midió la impedancia a múltiples frecuencias para permitir el cálculo de la resistencia atribuible a la adhesión célula a célula (Rb) y la resistencia atribuible a la interacción célula-matriz (alfa). Se midió la resistencia absoluta, mientras que la resistencia relativa se calculó mediante normalización al punto de tiempo justo antes de la adición de la trombina, para corregir las diferencias de la línea de base.

25 Tinción de inmunofluorescencia

Las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio recubiertos con gelatina al 1 % y tratados previamente con glutaraldehído al 0,5 % (Fluka, St. Gallen, Suiza). Las células se sembraron en densidad de 1:1 y se cultivaron hasta la confluencia en 48-72 horas. Para el pretratamiento, el medio de cultivo se cambió a HSA al 1 %/M199, que contenía los inhibidores farmacológicos o el vector. Después de 60 minutos de pretratamiento, se añadió la trombina directamente a los pocillos para una concentración final de 1 U/ml. En los puntos de tiempo indicados, se retiró el medio y se añadió paraformaldehído al 2 % caliente (Sigma Aldrich) a las células, mientras se mantenían en hielo durante 15 min. Las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,05 % (Sigma Aldrich) en solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se incubaron durante la noche con anticuerpos primarios para β-catenina (1:100), VE-cadherina (1:400) o Arg (1:150) en HSA al 0,1 %/PBS. Posteriormente, las células se lavaron y se incubaron con anticuerpos secundarios marcados con FITC (Invitrogen, Paisly, Reino Unido) y rodamina/faloidina (Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron y se sellaron en medio de montaje Vectashield que contenía DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingham, CA, Estados Unidos) para la tinción nuclear. La toma de imágenes de inmunofluorescencia se realizó con un microscopio invertido de fluorescencia de campo amplio Axiovert 200 Marianas™, mediante el uso de una lente de aire Zeiss de 40x 0,75) y una lente de aceite Zeiss 63x (NA 1,4). Todas las imágenes se trabajaron con el programa informático Slidebook (Intelligent Imaging Innovation, Denver, CO, Estados Unidos).

Ensayo de actividad de RhoA

Para el análisis de la actividad de RhoA, 10 cm² de células confluentes/condición se pretrataron con imatinib (10 μM) o vector (DMSO 0,1 %) y se estimularon con trombina (1 U/ml) durante los intervalos indicados. Después de la estimulación, las células se lavaron con PBS frío y se lisaron con tampón de lisis que contenía 0,02 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,15 M NaCl, 0,09 M KCl, 2 mM de EDTA/NaOH pH 8,0, 5 % de Igepal, y 0,5 % de Triton X-100, suplementado adicionalmente con el inhibidor de proteasa PhosStop (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), y el inhibidor de fosfatasa libre de EDTA completo (Roche Diagnostics). Después de la centrifugación de los lisados celulares, el sobrenadante se congeló de manera instantánea y se almacenó a -80 °C. La actividad de RhoA relativa se determinó con un Ensayo de la actividad de RhoA G-LISA (Cytoskeleton Inc, Denver, CO, Estados Unidos), de acuerdo con el protocolo de los fabricantes.

55 Transfecciones

Las células se transfectaron con Amaxa Technology (Amaxa Biosystems, Lonza), de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. El 80-90 % de las células confluentes (pase 1) se tripsinizaron y se transfectaron con los ARNip indicados (0,05 nmol para 10 cm² de células) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Después de la transfección, las células se sembraron en matrices ECIS recubiertas de gelatina o pocillos de cultivo de 5 cm². Para el control de la expresión de proteínas en células transfectadas, 5 cm² de células confluentes/condición se lisaron 48 horas o 120 horas después de la transfección. 20 μg de proteína total/condición se sometieron a electroforesis, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se sometieron a inmunotransferencia para c-Abl (1:1000, durante la noche a 4 °C), PDGFR-α y -β (ambos 1:200, durante la noche a 4 °C), y Arg (1:150, durante la noche a 4 °C). La β-actina (1:100 000) sirvió como control de carga.

Análisis estadístico

5 Todos los datos se presentan como Media \pm Error estándar de la media (SEM). N se refiere al número de experimentos independientes. Para la comparación de 2 grupos se utilizó una prueba t de Student, para la comparación de más de 2 grupos se utilizó un ANOVA de una vía con la prueba post-hoc de Tukey. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

Reivindicaciones

1. Un inhibidor de la función del gen relacionado con Abl (ARG) para usar en el tratamiento de un individuo que padece o está en riesgo de padecer edema inflamatorio, en donde dicho inhibidor se selecciona de:
 - a) un inhibidor de la actividad tirosina quinasa de la proteína codificada por dicho gen relacionado con Abl (ARG), seleccionado entre nilotinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, dasatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; e imatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
 - b) un anticuerpo anti-ARG que se une a ARG e inhibe su función; y
 - c) una molécula de ácido nucleico que provoca la degradación de ARG o inhibe la función, la transcripción o traducción de ARG.
2. Un inhibidor para usar de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicho edema inflamatorio es edema inducido por trombina.
3. Un inhibidor para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho individuo que padece o está en riesgo de padecer edema inflamatorio, padece de sepsis, ALI/ARDS, preeclampsia, estenosis de no reflujo, edema pulmonar y preferentemente edema pulmonar después de la radiación o edema pulmonar después de una endarterectomía.
4. Un inhibidor para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho inhibidor de la actividad tirosina quinasa no inhibe significativamente la actividad tirosina quinasa de C-kit, PDGFR-alfa y/o C-Abl.
5. Un inhibidor para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho inhibidor de la función del gen relacionado con Abl (ARG) es imatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
6. Un inhibidor para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho inhibidor de la función del gen relacionado con Abl (ARG) comprende un oligonucleótido antisentido específico para un pre-ARNm codificado por dicho gen relacionado con Abl (ARG).
7. Un inhibidor para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho inhibidor de la función del gen relacionado con Abl (ARG) comprende un ARNip específico para un ARNm codificado por dicho gen relacionado con Abl (ARG).
8. Un inhibidor para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho inhibidor de la función del gen relacionado con Abl (ARG) se proporciona durante un período de tiempo de entre 1-20 semanas.
9. Un método para inhibir la disfunción de la barrera endotelial en una colección in vitro de células endoteliales que comprende una barrera endotelial que no funciona adecuadamente o está en riesgo de disfunción, dicho método comprende proporcionar dicha colección de células endoteliales con un inhibidor de la función del gen relacionado con Abl (ARG), en donde dicho inhibidor se selecciona de:
 - a) un inhibidor de la actividad tirosina quinasa de la proteína codificada por dicho gen relacionado con Abl (ARG), seleccionado entre nilotinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, dasatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; e imatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
 - b) un anticuerpo anti-ARG que se une a ARG e inhibe su función; y
 - c) una molécula de ácido nucleico que provoca la degradación de ARG o inhibe la función, la transcripción o traducción de ARG.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho inhibidor de la función del gen relacionado con Abl (ARG) es imatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho inhibidor de la función del gen relacionado con Abl (ARG) es una molécula de ácido nucleico que provoca la degradación de ARG o inhibe la función, la transcripción o la traducción de ARG.
12. Una colección de células endoteliales que comprenden una barrera endotelial que no funciona adecuadamente o está en riesgo de disfunción, dichas células comprenden un inhibidor de la función del gen relacionado con Abl (ARG), en donde dicho inhibidor se selecciona de:
 - a) un inhibidor de la actividad tirosina quinasa de la proteína codificada por dicho gen relacionado con Abl (ARG), seleccionado entre nilotinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, dasatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; e imatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
 - b) un anticuerpo anti-ARG que se une a ARG e inhibe su función; y
 - c) una molécula de ácido nucleico que provoca la degradación de ARG o inhibe la función, la transcripción o traducción de ARG.

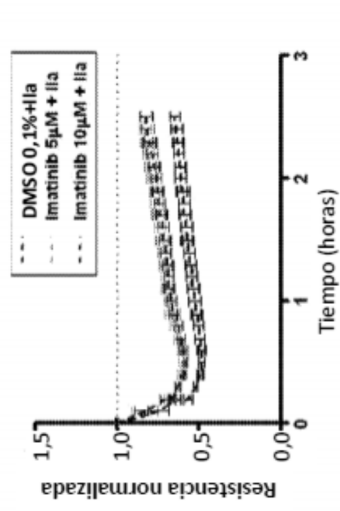


Figura 1B

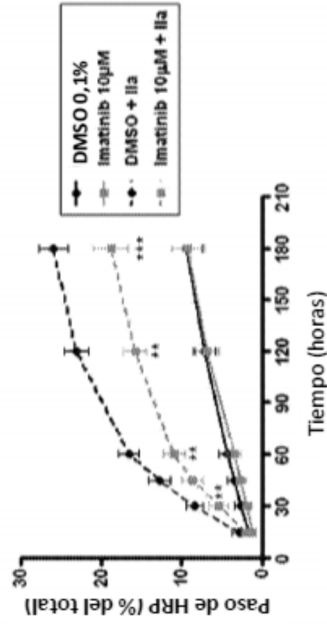


Figura 1A

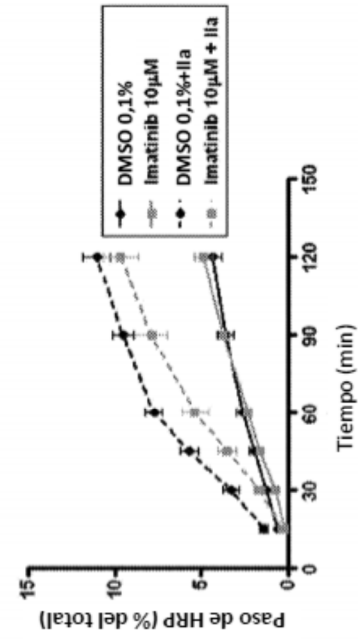


Figura 1D

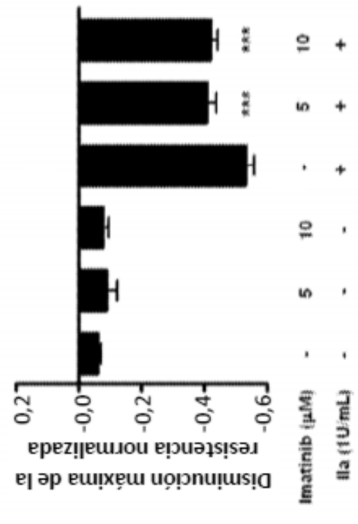


Figura 1C

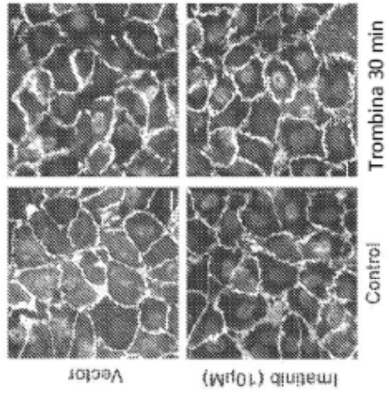


Figura 1F

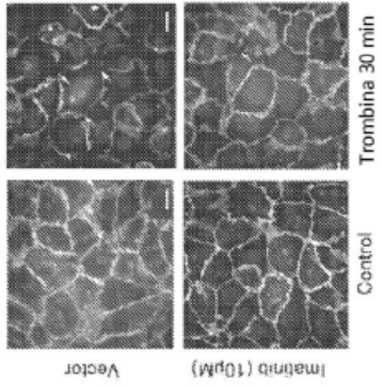


Figura 1E

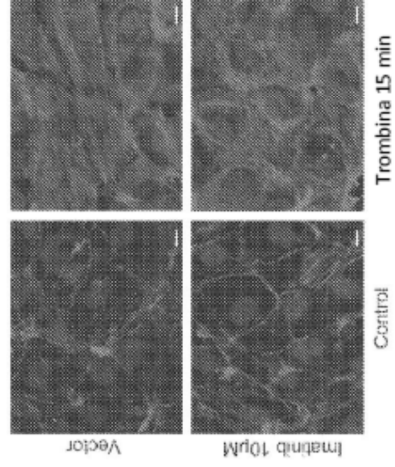


Figura 2A

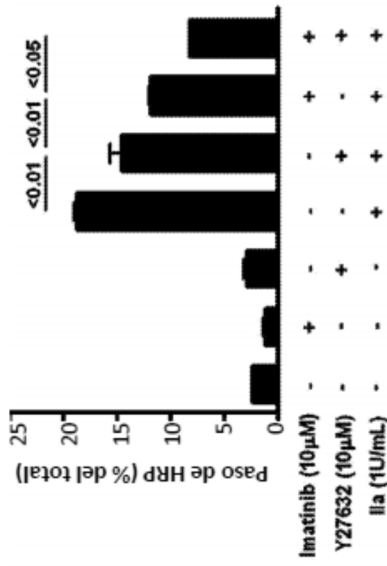


Figura 2B

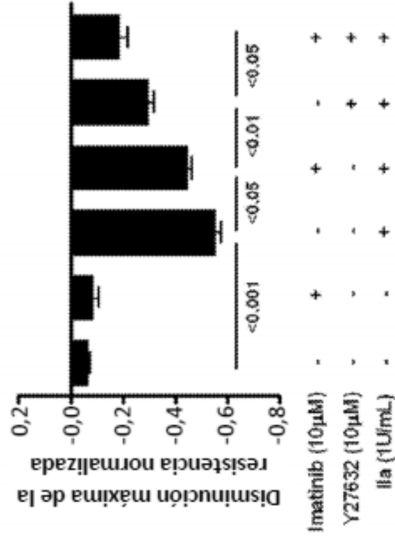


Figura 2D

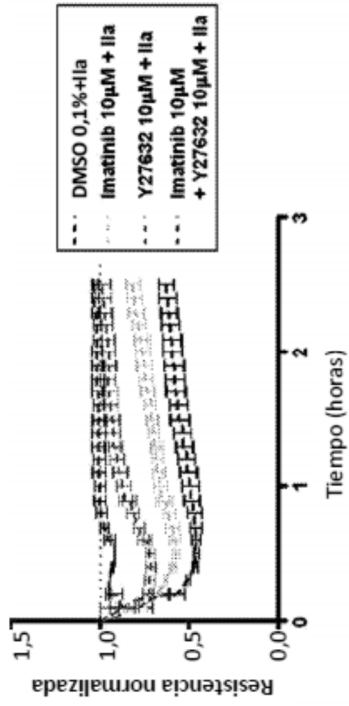


Figura 2C

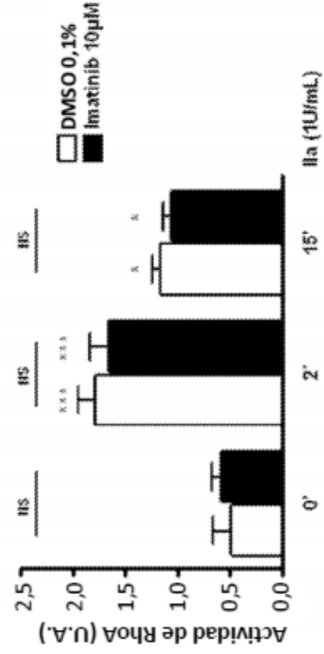


Figura 2E

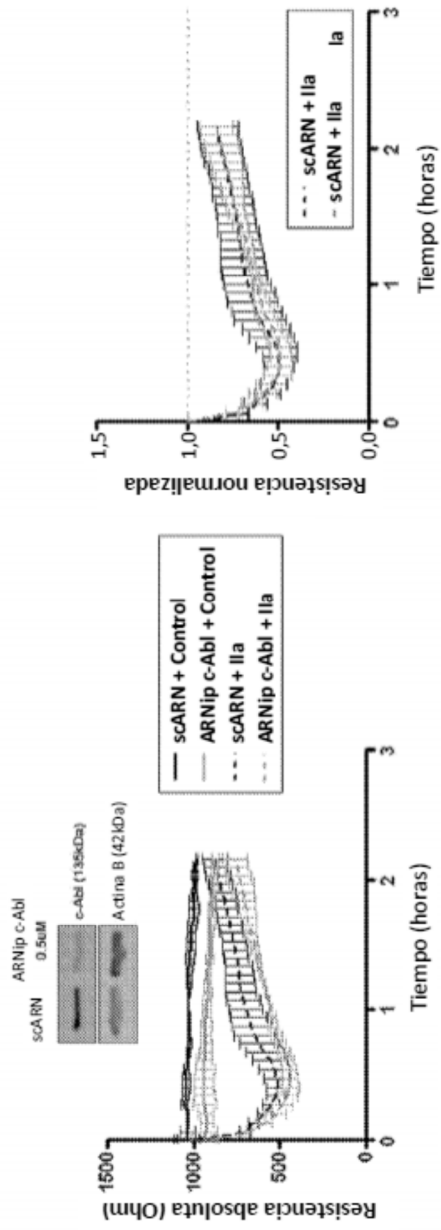


Figura 3A

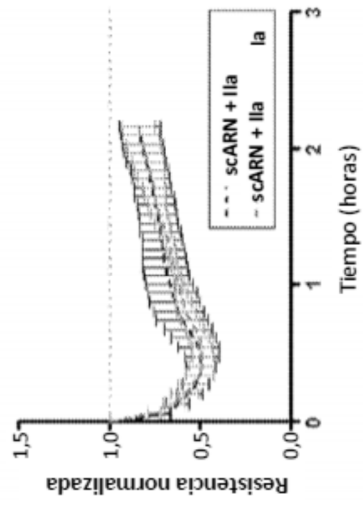


Figura 3B

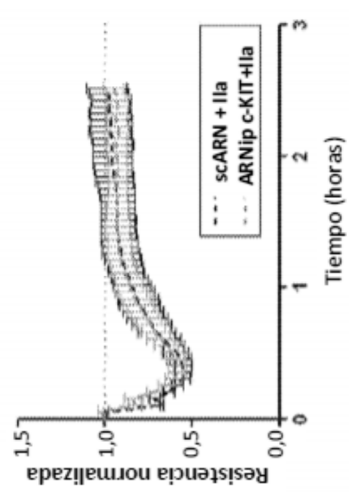


Figura 3D

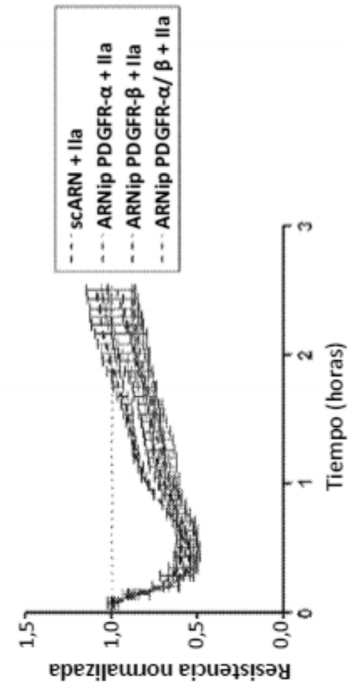


Figura 3C

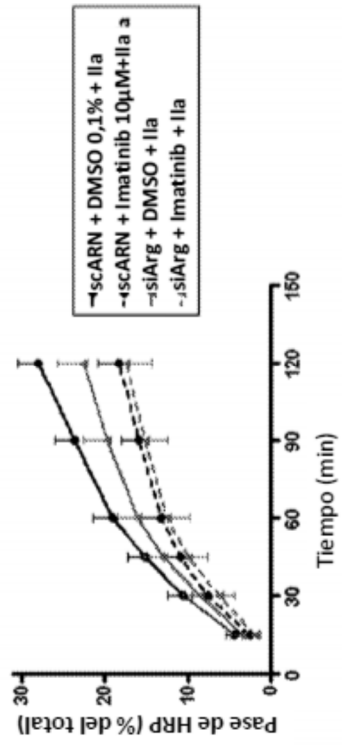


Figura 4B

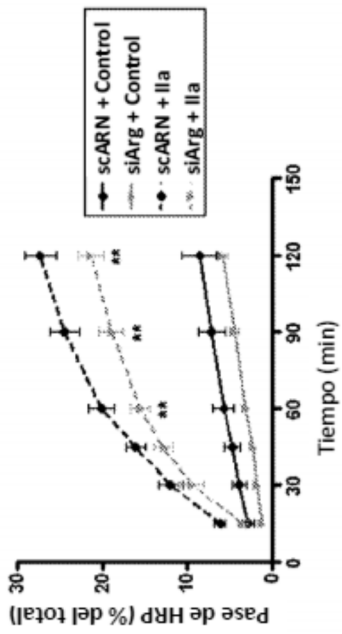


Figura 4A

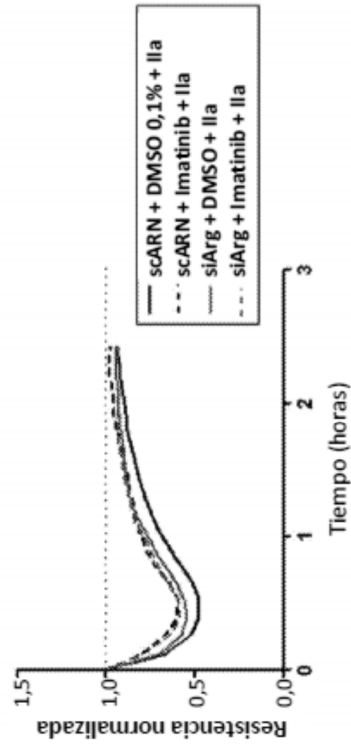


Figura 4D

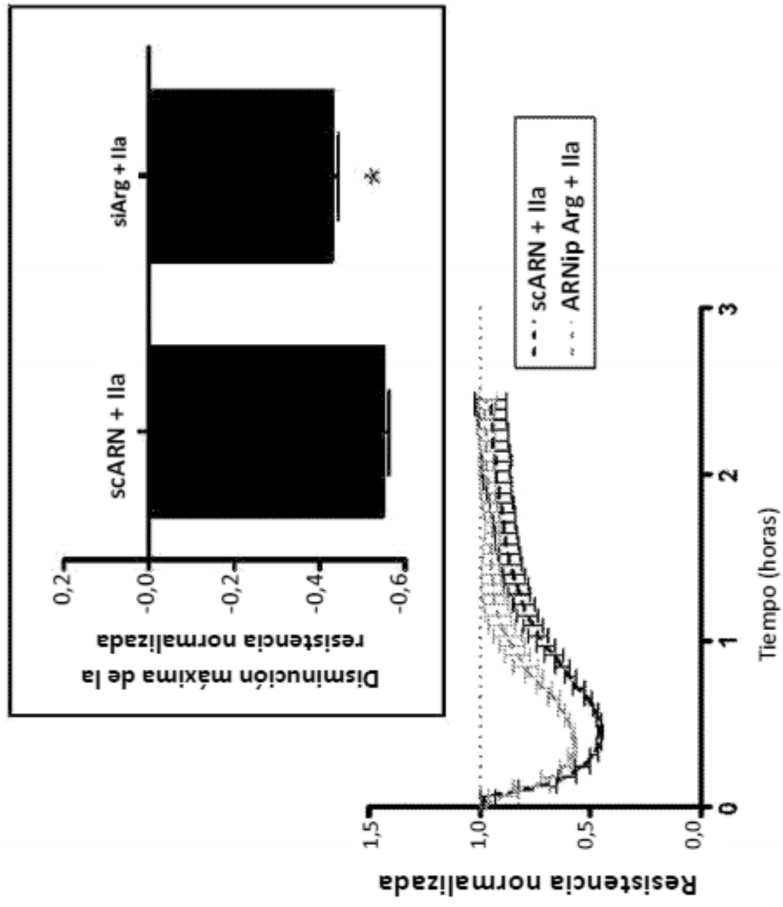


Figura 4C

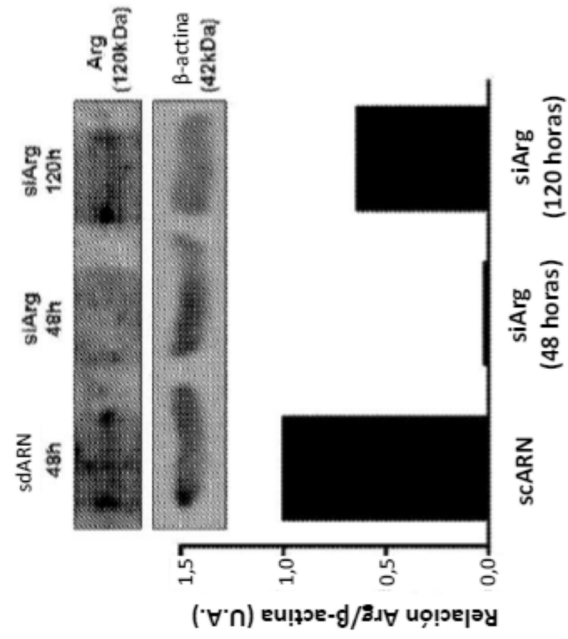


Figura 4F

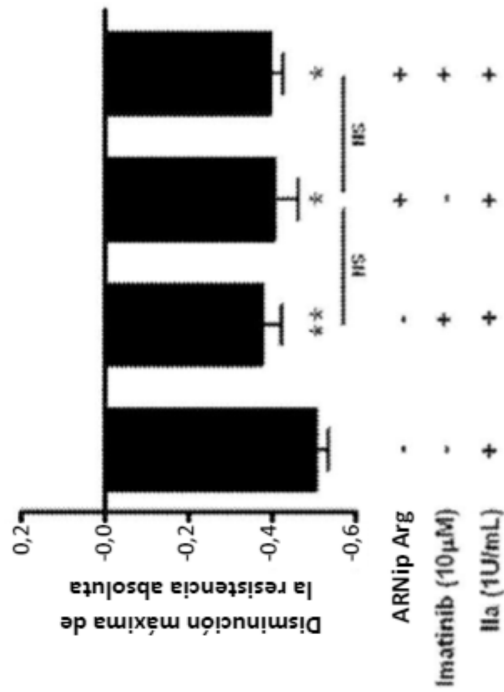


Figura 4E

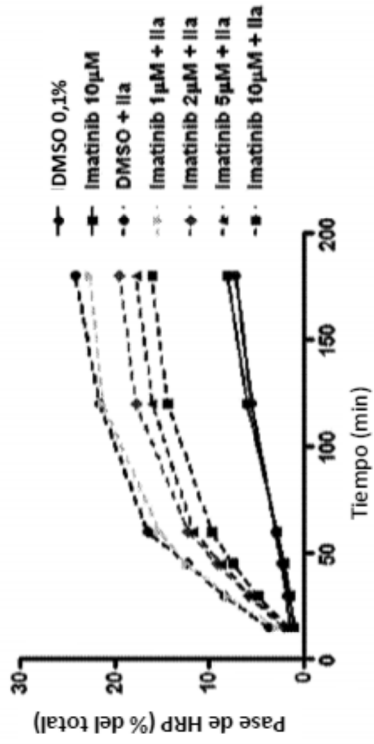


Figura 5A

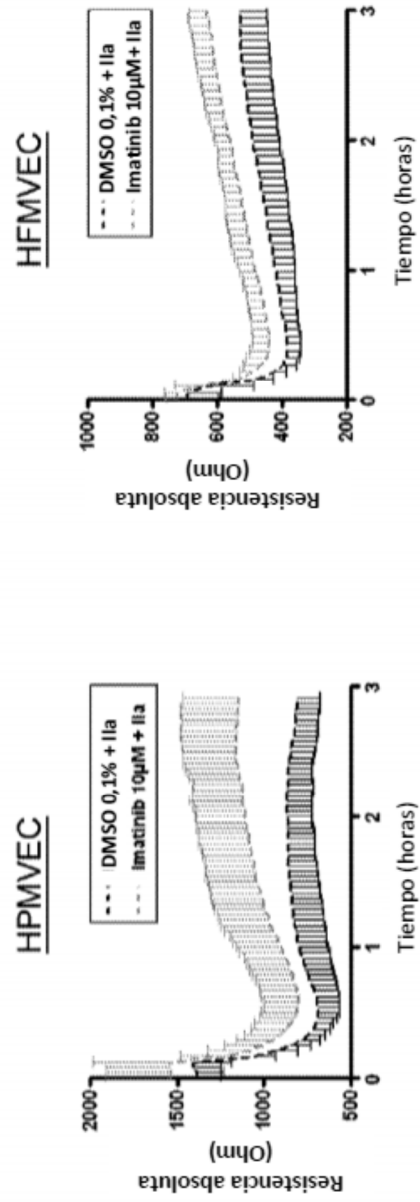
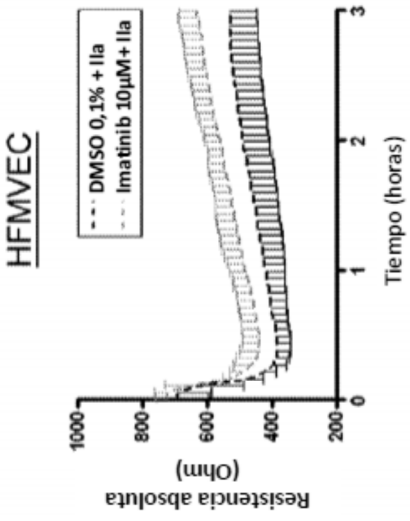


Figura 5B

Figura 5C



HPMVEC

HFMVEC

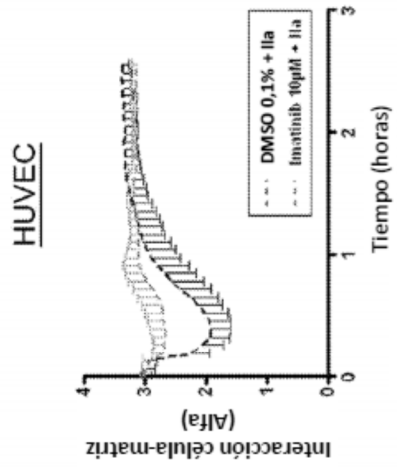


Figura 6B

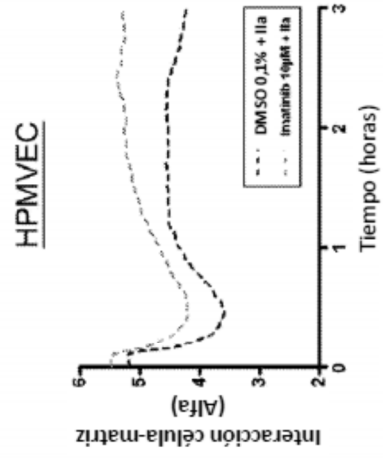


Figura 6D

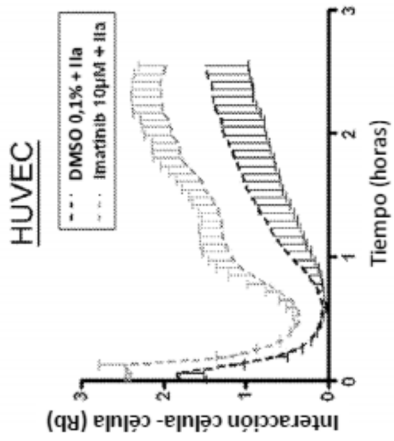


Figura 6A

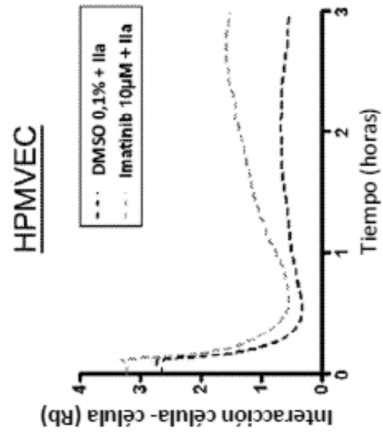


Figura 6C

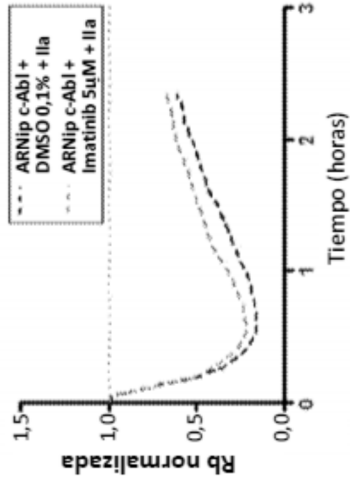


Figura 7B

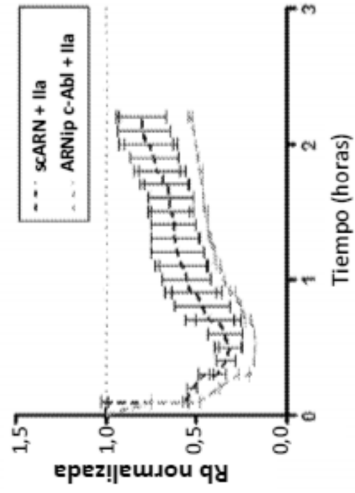


Figura 7A

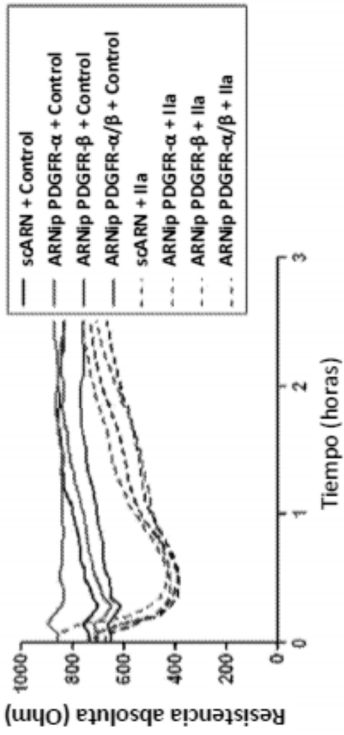


Figura 7C

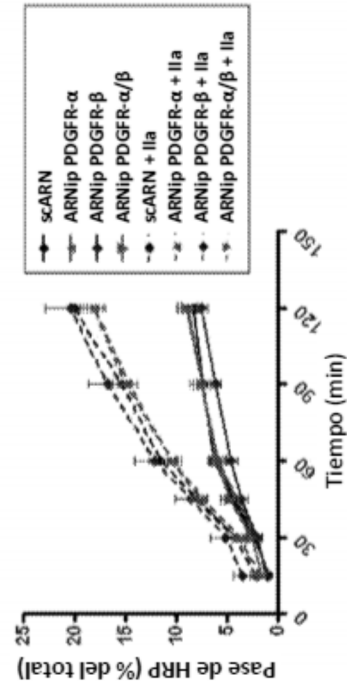


Figura 7D

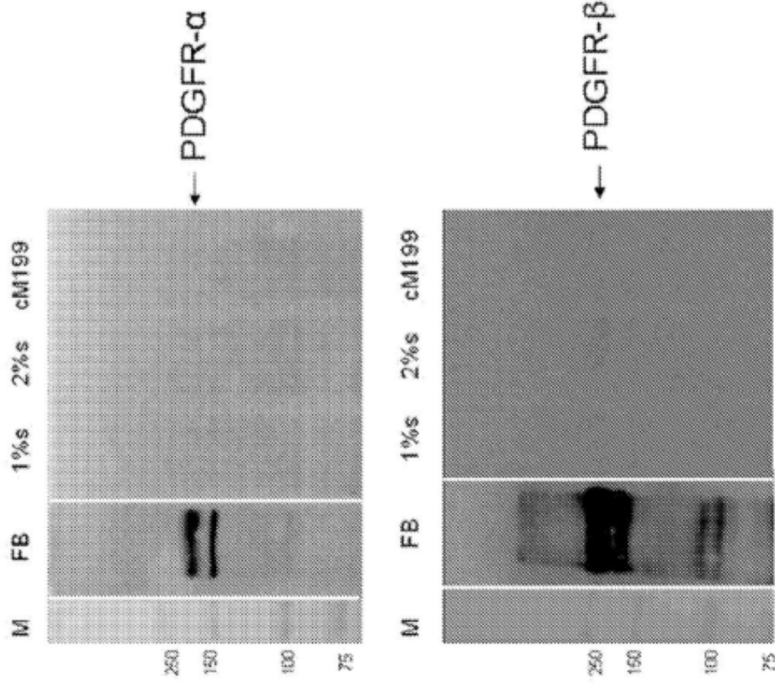


Figura 7E

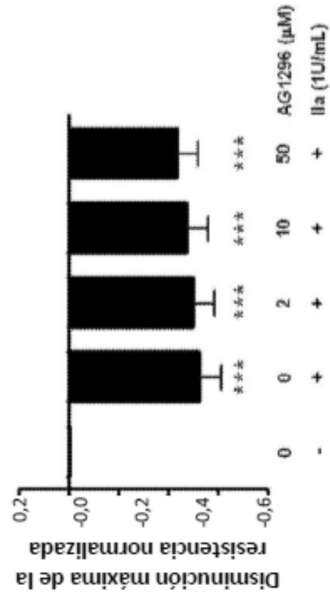


Figura 7F