



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 096**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01918834 .1**

96 Fecha de presentación : **19.03.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1268760**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2003**

54

Título: **Proteínas recombinantes que contienen toxina de tipo Shiga y fragmentos de factor de crecimiento vascular endotelial.**

30

Prioridad: **22.03.2000 US 190973 P**
01.03.2001 US 796861

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.05.2011

73

Titular/es: **SIBTECH, Inc.**
115A Commerce Drive
Brookfield, Connecticut 06804, US

72

Inventor/es: **Backer, Marina, V. y**
Backer, Joseph, M.

74

Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

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

Proteínas recombinantes que contienen toxina de tipo Shiga y fragmentos de factor de crecimiento vascular endotelial.

5

1. Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a moléculas recombinantes de ácidos nucleicos y a proteínas de fusión recombinantes, y más particularmente a proteínas de fusión de toxina de tipo Shiga-factor de crecimiento vascular endotelial y a moléculas recombinantes de ADN codificante de dichas proteínas de fusión. Asimismo, la presente invención se refiere a vectores de expresión que contienen las moléculas recombinantes de ácidos nucleicos anteriormente indicadas, a métodos para producir las proteínas de fusión anteriormente indicadas, y a su utilización en tratamientos terapéuticos.

10

2. Descripción de la técnica relacionada

[0002] La angiogénesis es un procedimiento estrechamente controlado de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (ver Folkman y Shing, 1992; Hanahan, 1997, para revisiones). Bajo circunstancias normales, la angiogénesis se produce únicamente durante el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas y el desarrollo del cuerpo lúteo. Sin embargo, la angiogénesis se produce en un gran número de patologías, tales como el crecimiento de tumores sólidos y la metástasis, en diversas enfermedades de los ojos, en estados inflamatorios crónicos y en daños isquémicos (ver Folkman, 1995, para una revisión). De esta manera, las células endoteliales en crecimiento presentan dianas únicas para el tratamiento de varias patologías mayores.

15

20

[0003] El regulador positivo crucial de la angiogénesis es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), también conocido como factor de permeabilidad vascular (ver Neufeld, 1999, para revisiones). El VEGF es una glucoproteína dimérica secretada que, como resultado del procesamiento alternativo, podría consistir de polipéptidos con 121, 145, 165, 189 y 206 residuos aminoácidos. El VEGF es expresado por células normales y tumorales y el control de la expresión de VEGF aparentemente se encuentra regulado en varios niveles (ver Claffey y Robinson, 1996; Veikkola y Alitalo, 2000, para revisiones). La expresión de VEGF resulta regulada positivamente en respuesta a la hipoxia y la privación nutricional, sugiriendo la existencia de un bucle de retroalimentación entre el crecimiento tumoral y de metástasis y la capacidad de las células tumorales de inducir respuestas angiogénicas del huésped.

25

[0004] La acción de VEGF sobre las células endoteliales se encuentra mediada por la tirosina quinasa flt-1 y los receptores KDR/flk-1, también denominados VEGFR-1 y VEGFR-2 (ver Terman y Dougher-Vermazen, 1996; Veikkola *et al.*, 2000, para una revisión). Estos receptores se expresan preferentemente en células endoteliales. Se ha publicado que las células endoteliales en los sitios de angiogénesis expresan un número significativamente más alto de receptores KDR/Flk1 que las células endoteliales quiescentes (Brown *et al.*, 1993, 1995; Plate *et al.*, 1993; Detmar *et al.*, 1994; Couffinhal *et al.*, 1997). Los receptores son proteínas tirosina quinasa transmembranales unipaso que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y que contienen siete bucles de tipo Ig en el dominio extracelular y comparten homología con el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas. La unión de VEGF a estos receptores induce la dimerización de los receptores, seguido de la fosforilación de las tirosinas de los dominios SH2 y SH3 en el dímero (ver Neufeld *et al.*, 1994, para una revisión). El complejo KDR/Flk1-VEGF resulta internalizado mediante endocitosis mediada por receptores (Bikfalvi *et al.*, 1991).

30

35

[0005] Varios grupos han informado de que el tratamiento dirigido del VEGF o de KDR/flk-1 inhibe la angiogénesis y los procesos dependientes de la angiogénesis (Kim *et al.*, 1993; Millauer *et al.*, 1994; Saleh *et al.*, 1996; Aiello *et al.*, 1995). Por otra parte, la inyección directa de VEGF o de un plásmido codificante de VEGF en tejidos isquémicos en un sistema modelo estimula el desarrollo de la microvasculatura y mejora la recuperación tras el daño isquémico o la angioplastia con balón (Asahara *et al.*, 1996). Conjuntamente, estos resultados dejan pocas dudas de que VEGF y KDR/Flt1 desempeñan funciones cruciales en la angiogénesis. Aunque estos experimentos proporcionan una "prueba de principio" de que los conjugados de VEGF-toxina o las proteínas de fusión podrían funcionar *in vivo*, el desarrollo posterior de los constructos DT-VEGF se pone en duda debido a la toxicidad renal y hepática de las proteínas de fusión que contienen DT (ver, por ejemplo, Vallera *et al.*, 1997).

40

45

[0006] Debido a que VEGF se une específicamente a las células endoteliales, este factor de crecimiento proporciona una oportunidad única para la administración dirigida de fármacos en los sitios de la angiogénesis. Se ha demostrado que las formas catalíticamente activas de la toxina diftérica unidas covalentemente o fusionadas mediante tecnología de ADN recombinante a VEGF165 y/o VEGF121 recombinantes resultan selectivamente tóxicas para las células que expresan receptores KDR/flk-1 y también suprimen la angiogénesis *in vivo* (Ramakrishnan *et al.*, 1996; Olson *et al.*, 1997; Arora *et al.*, 1999).

50

[0007] Resulta ventajoso utilizar VEGF para direccionar toxinas que son "asesinas naturales" de las células endoteliales. La toxina 1 de tipo Shiga producida por *E. coli* O157:H7 es una de los "asesinos naturales" de las células

55

endoteliales. El daño a las células endoteliales causado por las toxinas 1 de tipo Shiga desempeña un papel causativo en la patogénesis de la colitis hemorrágica (HC) y en el síndrome urémico hemolítico (HUS) inducido por *E. coli* O157:H7 (Obrig *et al.*, 1987, 1993; Richardson *et al.*, 1988; Kaplan *et al.*, 1990).

[0008] La toxina 1 de tipo Shiga (SLT-1) está compuesta de una única copia de una subunidad A de 32 kDa asociada a un pentámero en forma de anillo de subunidades B de 7 kDa ligantes de receptores. Las subunidades B unen las SLTs al receptor celular globotriaosilceramida, conocido como Gb₃ (Obrig *et al.*, 1993). Este receptor se encuentra en muchos tipos celulares, incluyendo las células endoteliales (Obrig *et al.*, 1993). Tras la unión al receptor de superficie celular, la SLT resulta endocitada y la subunidad A se corta en las formas A1 (27,5 kDa) y A2 (4,5 kDa) que se encuentran unidas mediante un enlace disulfuro (Olsness *et al.*, 1981). La subunidad A procesada es una N-glucosidasa específica que inactiva los ribosomas al escindir un único residuo de adenina en la posición 4.324 desde el extremo 5'-terminal del ARNr 28S de la subunidad ribosómica 60S (Saxena *et al.*, 1989). El corte de A4324 del ARNr 28S inactiva los ribosomas mediante la inhibición de la unión del factor de elongación complejo (EF-1)/aminoacil-ARNt a los ribosomas, resultando en la inhibición de la síntesis de las proteínas. Al igual que con otros agentes inactivadores de los ribosomas, los efectos citostáticos y citotóxicos posteriores pueden surgir como respuesta celular a la inactivación de una proporción relativamente reducida de ribosomas a través de la respuesta de estrés ribotóxico (Iordanov *et al.*, 1997). Alternativamente, podrían surgir efectos citostáticos y citotóxicos como respuesta celular a un colapso masivo de la síntesis de proteínas debido a la inactivación de un gran número de ribosomas. Resulta importante que la subunidad A de longitud completa no procesada, así como diversas subunidades A truncadas conserven una actividad significativa de N-glucosidasa (Haddad *et al.*, 1993; Al-Jaufy *et al.*, 1994, 1995). Además, las proteínas de fusión que contienen subunidad A de longitud completa no procesada, así como diversas subunidades A truncadas fusionadas al extremo N-terminal de CD4 conservan actividad de N-glucosidasa y son citotóxicas para las células que expresan el complejo gp120-gp41 del VIH (Al-Jaufy *et al.*, 1994, 1995).

[0009] Debido a que la toxina de tipo Shiga es una asesina "natural" de las células endoteliales, resulta ventajoso administrar subunidad A enzimática activa de longitud completa, truncada o mutada en células endoteliales con el fin de inhibir su crecimiento y/o eliminarlas. Para evitar daños a otros tipos celulares, la subunidad A enzimáticamente activa de longitud completa, truncada o mutada debe ser transportada a las células diana por un factor de crecimiento específico de las células endoteliales tal como VEGF. Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos eficaces de ADN recombinante para la producción de proteínas de fusión que contengan subunidad A enzimáticamente activa de longitud completa, truncada o mutada fusionada con VEGF de longitud completa, truncada o mutado que conserve la capacidad de unirse a receptores de VEGF.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0010] En un aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado codificante de una proteína de fusión que comprende:

- (1) la subunidad A de la toxina bacteriana de tipo Shiga, y
- (2) el factor de crecimiento vascular endotelial humano,

en el que la proteína de fusión presenta actividad inactivadora de los ribosomas.

[0011] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que comprende:

- (1) la subunidad A de la toxina bacteriana de tipo Shiga, y
- (2) el factor de crecimiento vascular endotelial humano,

en el que el polipéptido aislado presenta actividad inactivadora de los ribosomas.

[0012] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión, que comprende: (1) un ácido nucleico codificante de una proteína de fusión que comprende la subunidad A de la toxina bacteriana de tipo Shiga, y factor de crecimiento vascular endotelial humano, y (2) una secuencia promotora operablemente ligada al ácido nucleico para permitir la expresión del mismo.

[0013] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula bacteriana transformada con el vector de expresión anteriormente indicado.

[0014] En todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* de inactivación de los ribosomas en una célula, que expresa el receptor de factor de crecimiento vascular endotelial humano, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una célula con un polipéptido que comprende: (1) la subunidad A de la toxina bacteriana de tipo Shiga, y (2) el factor de crecimiento endotelial vascular humano, bajo condiciones que permitan que el polipéptido sea internalizado en la célula e inactiva los ribosomas en la célula.

[0015] En todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición para inhibir el crecimiento de las células endoteliales en un paciente, que comprende: (A) una proteína de fusión que comprende la subunidad A de la toxina bacteriana de tipo Shiga, y el factor de crecimiento endotelial vascular humano, presentando la proteína de

fusión actividad inactivadora, y (B) un portador farmacéuticamente aceptable.

[0016] En todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende una proteína de fusión que comprende la subunidad A de la toxina bacteriana de tipo Shiga y el factor de crecimiento vascular endotelial humano, presentando la proteína de fusión actividad inactivadora de los ribosomas, y un portador farmacéuticamente aceptable para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que sufre una afección fisiopatológica dependiente de la angiogénesis.

[0017] Además, las proteínas y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse solas, o en combinación con otros tratamientos para enfermedades relacionadas con la angiogénesis, particularmente tratamientos cuya eficacia se incrementa al reducirse el suministro de oxígeno o de nutrientes que aparecerían en respuesta al endotelio causado por dicha proteína y dichas composiciones farmacéuticas.

[0018] Este aspecto y otros se describen en mayor detalle en la descripción detallada siguiente de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0019] La invención se entenderá más completamente a partir de la descripción detallada siguiente considerada conjuntamente con las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 es una representación esquemática de las proteínas SLT-VEGF/L, SLT-VEGF/Lci catalíticamente inactiva y SLT-VEGF/S. La SLT-VEGF/Lci catalíticamente inactiva se construyó con el fin de separar los efectos de inactivación ribosómica de otros efectos que podrían ser inducidos por proteínas SLT-VEGF recombinantes. Esta proteína contiene una subunidad A doble mutante con sustituciones de aminoácidos Y114S y R170L que reducen significativamente de manera independiente la actividad enzimática de la subunidad A SLT-1, sin afectar a su plegamiento a juzgar por la no modificación de las propiedades antigénicas (Deresiewicz *et al.*, 1993; Cao *et al.*, 1994). Las etiquetas His y S se utilizan para la purificación y cuantificación. Se indica el sitio de corte para la proteasa intracelular furina, que corta las subunidades A en dímeros A1-A2 unidos por enlaces disulfuro. La proteína VEGF-121 recombinante utilizada en experimentos de control también contiene etiquetas His y S.

La figura 2 ilustra la expresión de las proteínas SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S en cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS y Origami(DE3)pLysS (denominadas BL21 y Origami, respectivamente) y su acumulación en cuerpos de inclusión aislados de los huéspedes respectivos (fig. 2, paneles A y B). La fig. 2 también ilustra la calidad de las preparaciones finales de proteínas VEGF121 (carril V), SLT-VEGF/L, SLT-VEGF/Lci y SLT-VEGF/S obtenidas tras la purificación a partir de la cepa Origami(DE3)pLysS de *E. coli* (fig. 2, panel C). Se indujo la expresión de las proteínas de fusión SLT-VEGF mediante la adición de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Se recolectaron las células BL21 (DE3)pLysS 3,5 horas después de la inducción con IPTG en el caso de SLT-VEGF/L, y 2 horas después de la inducción con IPTG en el caso de SLT-VEGF/S, a 37°C. Se recolectaron las células Origami(DE3)pLysS 4 horas después de la inducción con IPTG para ambas proteínas a 30°C. Las fracciones solubles (S), cuerpos de inclusión (I) y proteínas nuevamente plegadas purificadas a partir de cuerpos de inclusión se analizaron mediante SDS-PAGE en geles al 15%. Los pesos moleculares de los marcadores en el carril M se indican en kDa.

La figura 3 ilustra que las proteínas SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S, pero no la SLT-VEGF/Lci catalíticamente inactiva, inhibe la síntesis de proteínas en sistemas de traducción sin células. Las proteínas de fusión SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S inhiben la traducción del ARNm de la luciferasa de luciérnaga en 99,99% y 99%, respectivamente, a una concentración de 100 nM (fig. 3, panel A). La proteína VEGF121 recombinante aislada mediante el mismo procedimiento que las proteínas de fusión SLT-VEGF inhibe la traducción únicamente en ~50% a una concentración tan elevada como 1.000 nM (fig. 3, panel A). Los complejos SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S inhibieron la síntesis de proteínas de un modo dependiente de la dosis, con una inhibición de 90% a concentraciones de 0,4 nM y 2 nM, respectivamente, mientras que SLT-VEGF/Lci no inhibió la síntesis de proteínas (fig. 3, panel B). Se indican las actividades de luciferasa detectadas en porcentaje de la del control de VEGF121.

La figura 4 ilustra que las proteínas SLT-VEGF/L, SLT-VEGF/Lci y SLT-VEGF/S inducen la fosforilación de las tirosinas de los receptores KDR/flk-1 de VEGF en células que sobreexpresan los receptores KDR/flk-1 (células 293/KDR). Se detectó la fosforilación de tirosinas de los receptores KDR/flk-1 mediante análisis de transferencia western de los lisados de células 293/KDR tratadas con SLT-VEGF/L, SLT-VEGF/Lci, SLT-VEGF/S y VEGF121, utilizando anticuerpo anti-fosfotirosina.

La figura 5 ilustra que las proteínas SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S presentan como diana células PAE/KDR que sobreexpresan receptores KDR/flk-1 (círculos blancos) pero no afectan a las células PAE/V de control que no sobreexpresan los receptores KDR/flk-1 (círculos negros). Las células PAE/KDR y las células PAE/V de control que no presentaban receptores KDR/flk-1 se sembraron en placa a razón de 5.000 células/pocillo y se trataron durante 72 horas con SLT-VEGF/L (fig. 5, panel A) o SLT-VEGF/S (fig. 5, panel B) aislado de un huésped Origami(DE3)LysS. Tal como se muestra en la fig. 5, las proteínas SLT-VEGF inhiben fuertemente el crecimiento de las células PAE/KDR que sobreexpresan los receptores KDR/flk-1. Se cree que este efecto se debe a la actividad de inactivación de los ribosomas del grupo SLT, debido a que la proteína SLT-VEGF/Lci catalíticamente inactiva no afecta al crecimiento de las células PAE/KDR o PAE/V (fig. 5, panel C).

La figura 6 ilustra que la proteína de fusión SLT-VEGF/L activa rápidamente la apoptosis en las células PAE/KDR, a juzgar por la degradación del ADN (fig. 6, panel A) y el corte de la α -fodrina (fig. 6, panel B).

La figura 7 ilustra que las proteínas SLT-VEGF/L no presentan como diana las células endoteliales con un número bajo de receptores KDR/flk-1 (fig. 7, panel A) y las células PAE/KDR quiescentes (fig. 7, panel B). Según estimaciones mediante análisis de transferencia western, las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVE) expresan 30.000 a 50.000 receptores KDR/flk-1 en cada célula y las células PAE/KDR_{low} expresan ~5.000 receptores KDR/flk-1 en cada célula. Las células MS1 expresaban ~20.000 VEGFR-2/célula. Se sembraron las células HUVE, PAE/KDR_{low} y MS1 en placas de 24 pocillos a densidades de 5-10x10³ células/pocillo y se expusieron a SLT-VEGF/L 2,5 nM 20 horas después y se realizó un recuento durante 72 horas. Se mantuvieron células PAE/KDR confluentes a confluencia durante 3 días y después se trataron con SLT-VEGF/L 20 nM durante 72 horas. Las células PAE/KDR en crecimiento se expusieron a SLT-VEGF/L 20 nM durante 5 minutos y después se transfirieron a medio de cultivo fresco y se realizó un recuento tras 72 horas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0020] Un objetivo de la presente invención es proporcionar secuencias de ácidos nucleicos, tales como secuencias de ADN o ARN, que codifiquen proteínas de fusión denominadas en la presente memoria SLT-VEGF. Entre las proteínas de fusión SLT-VEGF se incluyen una subunidad A de la toxina bacteriana de tipo Shiga que proporciona actividad inactivadora de los ribosomas, y un factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que se une a los receptores de VEGF. Las tres secuencias de ácidos nucleicos y las secuencias de proteína resultantes preferentemente se separaron con una secuencia espaciadora.

[0021] Las secuencias de ácidos nucleicos para la toxina de tipo Shiga y el VEGF son individualmente conocidas de la técnica. Sin embargo, los inventores inesperadamente han encontrado que una combinación de dichas dos secuencias permite la producción de una proteína de fusión con una combinación única de características. La proteína de fusión es capaz de unirse a un receptor celular de VEGF específico en virtud del dominio VEGF. La proteína de fusión también es capaz de inactivar los ribosomas y de inducir la apoptosis en células endoteliales que sobreexpresan receptores KDR/flk-1 en virtud del dominio de la toxina de tipo Shiga. En combinación, estos dos dominios de proteína proporcionan un tratamiento eficaz y altamente focalizado de enfermedades relacionadas con la angiogénesis.

[0022] Todavía otro objetivo de la invención es proporcionar una composición farmacéutica para la utilización en la inhibición del crecimiento de las células endoteliales, y que contiene las proteínas de fusión SLT-VEGF y un portador farmacéuticamente aceptable. Entre los portadores útiles se incluyen agua, solución salina tamponada u otro portador farmacéuticamente aceptable conocido de la técnica. Las proteínas de fusión SLT-VEGF de la composición farmacéutica son potentes agentes citotóxicos o citostático y resultan útiles en el tratamiento de una diversidad de afecciones fisiopatológicas que dependen de la angiogénesis, tales como el crecimiento de tumores sólidos y la metástasis, diversas enfermedades de los ojos, estados inflamatorios crónicos y lesiones isquémicas. Además, las proteínas y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse solas o en combinación con otros tratamientos conocidos de enfermedades relacionadas con la angiogénesis, particularmente tratamientos cuya eficacia se incrementa al reducirse el suministro de oxígeno o de nutrientes que aparecerían en respuesta al endotelio causado por dicha proteína y dichas composiciones farmacéuticas.

[0023] Todavía otro objetivo de la invención es proporcionar vectores de expresión recombinante que incluyen las nuevas secuencias de ADN, y células bacterianas transformadas que contienen dichos vectores de expresión recombinantes. Las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de la proteína de fusión SLT-VEGF pueden insertarse en vectores conocidos, tales como un plásmido bacteriano o un vector vírico, utilizando materiales y métodos bien conocidos de la técnica. El constructo de ácidos nucleicos codificante de las proteínas de fusión SLT-VEGF se inserta en un plásmido de manera que el constructo de ácidos nucleicos se liga operablemente a una secuencia promotora inducible, una secuencia que codifica etiquetas que simplifican la purificación y cuantificación de la proteína de fusión, y una funcionalidad terminadora en el huésped seleccionado. El plásmido también se introduce preferentemente en una célula huésped, tal como una célula bacteriana, en la que el promotor se regula induciblemente.

[0024] En la proteína de fusión expresada por la secuencia recombinante de ácidos nucleicos según la presente invención, el VEGF de la misma se selecciona convenientemente de entre formas de longitud completa o mutantes de VEGF121, VEGF165, VEGF189 y VEGF209 capaces de unirse a receptores de alta afinidad de VEGF. Según una realización particularmente preferente de la invención, el VEGF está constituido por VEGF121 o VEGF mutantes truncados del mismo.

[0025] Tal como se utiliza en la presente memoria, la subunidad A de la toxina de tipo Shiga (abreviada en la presente memoria SLT) se refiere a un polipéptido que presenta las secuencias de aminoácidos presentes en *E. coli* O157:H7, así como secuencias modificadas, que presentan sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de aminoácidos, que todavía expresan una actividad inactivadora de ribosomas sustancial. Para algunas aplicaciones, tales como diversos experimentos de control, podría resultar beneficioso producir SLT que no presente actividad inactivadora de ribosomas. En particular, dichas SLTs modificadas pueden producirse mediante modificación del

ADN dado a conocer en la presente memoria, mediante la alteración de uno o más aminoácidos o la delección o inserción de uno o más aminoácidos que podrían convertirlo en más adecuado para conseguir las propiedades deseadas de las proteínas de fusión SLT-VEGF. Entre dichas propiedades se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, rendimiento de proteína recombinante en el huésped bacteriano, capacidad de unirse al receptor celular de VEGF, la capacidad de ser internalizado mediante la incorporación mediada por receptor, la actividad inhibidora intracelular de la síntesis de proteínas, los efectos citotóxicos o citostáticos globales, la farmacocinética y la farmacodinámica, y la estabilidad bajo diversas condiciones de almacenamiento y de utilización. Cualquier proteína de este tipo, o versión de la misma, fusionada con VEGF tal como se describe en la presente memoria, que muestre actividad inactivadora de ribosomas y la capacidad de unirse a receptores celulares de VEGF en ensayos *in vitro* o *in vivo* estándares se encuentra contemplada para la utilización en la presente memoria.

[0026] Tal como se utiliza en la presente memoria, las proteínas SLT-VEGF son proteínas de fusión que contienen un polipéptido SLT y factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que es reactivo con el receptor de superficie celular del VEGF.

[0027] Las proteínas de fusión SLT-VEGF resultantes resultan útiles como agentes citotóxicos o citostáticos inhibidores del crecimiento y con diana en las células endoteliales, y de esta manera resultan útiles como tratamiento de enfermedades dependientes de la angiogénesis, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, el crecimiento de tumores sólidos y la metástasis, diversas enfermedades de los ojos, estados inflamatorios crónicos y lesiones isquémicas.

[0028] Tal como se utiliza en la presente memoria, el tratamiento dirigido con proteína SLT-VEGF se refiere a dirigirlo a una célula que expresa receptores de VEGF. Tras la unión al receptor, la proteína SLT-VEGF resulta internalizada por la célula y resulta citotóxica o citostática para la misma.

[0029] Tal como se utiliza en la presente memoria, el término activo, o la referencia a la actividad de las proteínas SLT-VEGF o a los efectos citotóxicos o citostáticos de las proteínas SLT-VEGF, se refiere a la capacidad de dichas proteínas de inactivar los ribosomas *in vivo* o *in vitro*, o respectivamente, de eliminar células o de inhibir el crecimiento celular tras la internalización mediada por receptores de VEGF de proteínas SLT-VEGF por parte de las células. Dicha actividad puede someterse a ensayo mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, los ensayos que miden la síntesis de proteínas, la unión de receptores, la autofosforilación y la internalización, y los ensayos que evalúan los efectos citotóxicos y citostáticos mediante la medición del efecto de un compuesto de ensayo sobre la proliferación celular, la apoptosis y la síntesis de proteínas.

[0030] Tal como se utiliza en la presente memoria, VEGF se refiere a polipéptidos que presentan secuencias de aminoácidos de proteínas VEGF nativas, así como a secuencias modificadas, que presentan sustituciones, delecciones, inserciones o adiciones de aminoácidos de la proteína nativa pero que conservan la capacidad de unirse a receptores de VEGF y de ser internalizadas. Entre dichos polipéptidos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, VEGF121, VEGF165, VEGF189 y VEGF209.

[0031] Se entiende que pueden producirse diferencias entre las secuencias de aminoácidos de los VEGFs de diferentes especies, así como entre los VEGFs de organismos individuales o especies. La referencia a los VEGFs también pretende comprender proteínas aisladas procedentes de fuentes naturales, así como aquellas preparadas sintéticamente, así como por medios recombinantes o posiblemente mediante síntesis química. VEGF también comprende mutantes de VEGF que presentan la capacidad de dirigir SLT a células que expresan receptores de VEGF y creadas con el fin de, por ejemplo, conservar o incrementar la actividad o estabilidad del factor de crecimiento, para reducir o eliminar la reorganización de disulfuros, o para alterar la reactividad con diversos grupos modificadores (por ejemplo polietilenglicol).

[0032] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "receptor de VEGF" se utiliza para referirse a receptores que interactúan específicamente con VEGF y lo transportan al interior de la célula. Se encuentran incluidos, aunque sin limitarse a ellos, KDR/flk-1 (VEGF-R1) y flt-1 (VEGF-R2).

[0033] Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "polipéptido reactivo con el receptor de VEGF" se refiere a cualquier polipéptido que interactúe específicamente con receptores de VEGF, preferentemente el receptor de alta afinidad de VEGF, y resulte transportado al interior de la célula en virtud de su interacción con el receptor de VEGF.

[0034] A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos adicionales utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado que el entendido comúnmente por el experto en la materia a la que pertenece el objeto de la presente invención.

[0035] Aunque la invención no se encuentra limitada en modo alguno, se ejemplificará a continuación principalmente haciendo referencia a la subunidad A de longitud completa de la toxina bacteriana de tipo Shiga (SLT/L), la versión truncada de la misma (SLT/S) o una versión doble mutante catalíticamente inactiva de la misma (SLT/Lci). De acuerdo con lo anterior, la invención se describe en relación a la construcción de proteínas de fusión genética entre SLT/L o SLT/S o SLT/Lci y la molécula de VEGF que dirigirá la proteína de fusión a receptores de VEGF específicos, y se demuestra en la presente memoria que únicamente las proteínas de fusión que contiene SLT/L o SLT/S, pero

no SLT/Lci muestran efectos citotóxicos y/o citostáticos sobre las células endoteliales.

[0036] Las proteínas de fusión denominadas SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S que consisten de SLT/L o SLT/S ligado VEGF121 inhiben el crecimiento de las células endoteliales porcinas PAE/KDR que sobreexpresan el receptor KDR/flk-1 de VEGF de una manera dependiente de la dosis con IC50 de ~0,15 nM. En el intervalo de concentraciones nanomolares bajas, las proteínas SLT-VEGF/L son citotóxicas, eliminando virtualmente todas las células PAE/KDR tras la exposición a una concentración de tan solo 2,5 nM. En contraste, las proteínas SLT-VEGF/S a las concentraciones nanomolares bajas son mayoritariamente citostáticas. Estos efectos dependen de la actividad catalítica del grupo SLT en la proteína de fusión que inactiva los ribosomas, debido a que la VEGF-SLT/Lci catalíticamente inactiva no afecta al crecimiento de las células PAE/KDR. Estos efectos dependen de la expresión de los receptores KDR/flk-1 debido a que SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S no afectan al crecimiento de las células endoteliales porcinas PAE/V que no expresan los receptores KDR/flt-1 pero que han sido transfectadas con vector de control. Resulta importante que las proteínas SLT-VEGF/L no afectan a las células endoteliales que expresan un número bajo de receptores KDR/flk-1 o a las células PAE/KDR quiescentes incluso a una concentración tan alta como 20 nM. Los resultados demuestran que las moléculas SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S pueden entrar en las células mediante los receptores KDR/flk-1 y que los grupos SLT/L o SLT/S de dichas moléculas pueden provocar eficazmente efectos citotóxicos y/o citostáticos en las células endoteliales en crecimiento que sobreexpresan receptores KDR/flk-1, pero no en células endoteliales que expresan un número bajo de receptores KDR/flk-1 o en células endoteliales quiescentes.

[0037] Estos resultados demuestran la posibilidad de utilizar las proteínas SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S para el tratamiento dirigido selectivamente a endotelio en crecimiento en los sitios de la angiogénesis que es conocido que sobreexpresan receptores KDR/flk-1, sin afectar a las células endoteliales normales o a otros tipos de células que expresan un número bajo o nulo de receptores de las proteínas VEGF, minimizando de esta manera los efectos secundarios no deseados que pueden aparecer debido a la interacción con células no diana. Por lo tanto, las proteínas SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S reciben un espectro reducido de interacciones celulares mediante unión específica a receptores de superficie de VEGF en células que sobreexpresan dichos receptores, dirigiendo de esta manera SLT/L y SLT/S principalmente a células endoteliales en crecimiento en los sitios de la angiogénesis.

[0038] Además, mediante la utilización de los constructos SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S los presentes inventores han demostrado que:

(i) las proteínas SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S, pero no SLT-VEGF/Lci, conservan la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas,
 (ii) las proteínas SLT-VEGF/L, SLT-VEGF/S y SLT-VEGF/Lci se unen a receptores celulares KDR/flk-1 e inducen la autofosforilación de tirosinas de dichos receptores,
 (iii) la proteína SLT-VEGF/L es una proteína citotóxica que induce la muerte de las células endoteliales en crecimiento que sobreexpresan receptores KDR/flk-1, pero no las células endoteliales que expresan un número bajo de receptores KDR/flk-1, o células endoteliales quiescentes, mientras que SLT-VEGF/S es principalmente una proteína citostática que causa la inhibición del crecimiento.

[0039] Las composiciones para la utilización en la inhibición del crecimiento de las células endoteliales con el fin de inhibir la angiogénesis comprenden una proteína de fusión, en combinación con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones según la invención en la práctica se administran normalmente mediante inyección intravenosa, infusión continua, aunque también pueden utilizarse otros métodos, tales como la inyección parenteral o la inyección intramuscular.

[0040] Las composiciones para inyección pueden proporcionarse en forma de dosis unitaria y pueden adoptar una forma como la solución y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes estabilizadores, tampones y similares.

[0041] La invención se describe adicionalmente mediante los Ejemplos siguientes, pero no pretende encontrarse limitada a los mismos. Todas las partes y porcentajes son en peso y todas las temperaturas son en grados centígrados, a menos que se indique explícitamente lo contrario.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1 - CONSTRUCCIÓN DE SECUENCIAS DE ADN CODIFICANTES DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S

DESCRIPCIONES GENERALES

Cepas bacterianas, plásmidos y células de mamífero

[0042] La cepa DH5α de *E. coli* se encuentra disponible comercialmente de Life Technologies, Inc. (USA). Las cepas BL21(DE3)pLysS y Origami(DE3)pLysS de *E. coli* se encuentran disponibles comercialmente de Novagen. El vector

pET32(a) para la expresión bacteriana de proteínas recombinantes con una extensión terminal que contiene la etiqueta His, la etiqueta S y la tiorredoxina se encuentra disponible comercialmente de Novagen (USA). El plásmido pLen-121 que contiene la secuencia de ADN codificante de la forma de 121 residuos del VEGF humano ha sido descrita en la patente US No. 5.219.739, incorporada en la presente memoria como referencia en su totalidad, y fue obtenida del Dr. J. Abraham (Scios Nova, Inc., USA). El plásmido pJB144, que contiene una secuencia de la holo-toxina VT1/SLT se obtuvo del Dr. J. Brunton (Samuel Lunenfeld Research Institute, Toronto, Canadá). Los plásmidos pBalPst (vector vacío) y pBalPst/KDR codificante del receptor KDR/flk-1 se obtuvieron del Dr. B. Terman (Albert Einstein School of Medicine, New York City, USA). Las células endoteliales aórticas porcinas (PAE) y las células renales embrionarias primarias humanas 293 (293) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (USA). Las células PAE expresaban $2-3 \times 10^5$ KDR/flk-1 por célula (PAE/KDR), las células PAE transfectadas con plásmido pBalPst (PAE/V), las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVE) y las células endoteliales de ratón MS1 se obtuvieron del Dr. B. Terman (Albert Einstein School of Medicine, New York City, USA). Las células 293 que sobreexpresaban VEGFR-2 (293/KDR) y las células PAE que expresaban un número reducido de KDR/flk-1 (PAE/KDR_{low}) se construyeron mediante transfección de las células parentales correspondientes con el plásmido pBalPst/KDR utilizando reactivo Trans/T-LT1 (PanVera Corporation, USA), seguido de la selección en presencia de 0,375 g/m de puomicina. Un clon de células 293/KDR seleccionado para este estudio expresaba $2,5 \times 10^6$ VEGFR-2 por célula según el análisis de Scatchard de la unión de 125 I-VEGF165. Los niveles de expresión de VEGFR-2 en PAE/KDR y PAE/KDR_{low} se estimaron mediante análisis de transferencia western con células 293/KDR a modo de estándar. Los filtros inmunológicos se sondaron con suero anti-VEGFR-2 policlonal de conejo obtenido del Dr. B. Terman (Albert Einstein School of Medicine, New York, USA). Las células PAE, 293 y sus derivados se mantuvieron en DMEM suplementado con suero de feto bovino al 10% (Gemini, Inc., USA), L-glutamina 2 mM y antibióticos. Se cultivaron células HUVE de bajo número de pase (3° a 7° pase) en matraces recubiertos con gelatina en DMEM con FBS al 20%, 50 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico, 100 g/ml de heparina, L-glutamina 2 mM y antibióticos. Se cultivaron las células MS1 en DMEM con FBS al 5%, L-glutamina 4 mM y antibióticos. Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C, 5% de CO₂.

Manipulaciones del ADN

[0043] Los enzimas de restricción y modificación utilizados en la presente memoria se encuentran disponibles comercialmente de las fuentes habituales y se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación de los diferentes constructos de ADN se realizó en Macromolecular Resources (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Ft. Collins, CO, USA). Las células competentes, la transformación y los medios bacterianos fueron preparados según Sambrook *et al.* (J. Sambrook, E.F. Fritsch y T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) o siguiendo las instrucciones del fabricante. La purificación de los plásmidos se realizó utilizando sistemas de purificación de ADN Wizard Plus SV Minipreps o Maxipreps (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La purificación adicional del ADN, así como las purificaciones del ADN a partir de los geles de agarosa se realizó utilizando el kit GeneClean Spin (Bio 101, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

SUBCLONACIÓN DE LA ISOFORMA DE 121 RESIDUOS DEL VEGF HUMANO EN UN VECTOR DE EXPRESIÓN PET32(A)

Cebadores para la amplificación del ADN codificante de la isoforma de 121 residuos del VEGF humano

[0044] Los cebadores para las amplificaciones del ADN del VEGF humano se sintetizaron mediante GeneLink (USA). El cebador correspondiente a la cadena "sentido" (SEC ID n° 1) incluía un sitio de restricción Stul inmediatamente cadena arriba del codón de ADN para el aminoácido 1 de la isoforma de 121 residuos madura del VEGF. El cebador correspondiente a la cadena "antisentido" (SEC ID n° 2) complementaba la secuencia codificante del ADN codificante del extremo carboxilo del péptido maduro, incluyendo un codón de parada de traducción después de la secuencia codificante del VEGF maduro, e introdujo un sitio de restricción XhoI cadena abajo del ADN codificante del VEGF y del codón de parada.

5'-TAAGGCCTATGGCAGAAGGAGGAGGG-3' (SEC ID n° 1)
5'-ACTCGAGTCACCGCCTCGGCTTGTCAC-3' (SEC ID n° 2)

PCR para amplificar el ADN codificante de la isoforma de 121 residuos del VEGF humano

[0045] Se amplificó el ADNc del VEGF humano mediante PCR a partir del plásmido pLen-121 que contenía la secuencia para la isoforma de 121 residuos del VEGF humano. Se mezclaron diez nanogramos de ADN molde en 0,1 ml de mezcla de reacción, que contenía 1 pmoles de cada oligonucleótido, 0,2 mM de cada dNTP y 2 U de polimerasa Pfu (Stratagene, USA) en tampón Pfu (Stratagene, USA). Las incubaciones se realizaron en un sistema DNA GenAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Cetus, USA). Un ciclo incluía una etapa de desnaturalización (94°C durante 1 minuto), una etapa de hibridación (65°C durante 1 minuto) y una etapa de elongación (72°C durante 1 minuto). El ADN amplificado se digirió con Stul y XhoI y se purificó con el kit GeneClean Spin (BIO 101, USA).

Construcción del plásmido pET32-VEGF121

[0046] Las formas de ADN amplificado indicadas anteriormente se ligaron en un vector pET32(a) utilizando el sitio XhoI del sitio de clonación múltiple del vector y el sitio StuI, que se construyó mediante el siguiente tratamiento del vector: se linealizó el ADN de pET32(a) con restrictasa NcoI, y uno de los extremos cohesivos producido se rellenó parcialmente con citidina utilizando el fragmento grande (Klenow) de la ADN polimerasa I. El constructo se purificó con el kit GeneClean Spin (BIO 101, USA) y los extremos protuberantes monocatenarios se eliminaron con nucleasa Mung bean. El constructo resultante se digirió con restrictasa XhoI y se purificó con el kit GeneClean Spin (BIO 101, USA). La ligación se llevó a cabo de manera que el primer aminoácido de la isoforma de 121 residuos madura del VEGF se convirtiese en el primer aminoácido tras un sitio de corte de enteroquinasa proporcionado por el vector. El plásmido resultante se denominó pET32-txVEGF121 y se transformó en células competentes DH5 α (Life Technologies, USA) siguiendo las instrucciones el fabricante. El cultivo bacteriano que contenía el plásmido deseado se cultivó adicionalmente con el fin de obtener preparaciones grandes de plásmido aislado utilizando los métodos indicados anteriormente.

[0047] El gen tiorredoxina (tx) se eliminó de pET32-txVEGF121 mediante digestión del ADN purificado de plásmido con restrictasa NdeI, seguido de la ligación intramolecular de los ADNs de plásmido linearizados con ligasa de T4. El plásmido resultante se denominó pET32-VEGF121 y se transformó en células competentes DH5 α (Life Technologies, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cultivo bacteriano que contenía el plásmido deseado se cultivó adicionalmente con el fin de obtener preparaciones grandes de plásmido aislado utilizando los métodos indicados anteriormente. El ADN del plásmido pET-VEGF121 codifica un extremo N-terminal de longitud completa de 36 aminoácidos que contiene etiqueta His (6 aminoácidos), un sitio de corte de trombina (6 aminoácidos), una etiqueta S (15 aminoácidos), un péptido conector de longitud completa de 6 aminoácidos que contiene el sitio de corte de enteroquinasa, y 1 a 121 aminoácidos de la proteína VEGF121 madura (fig. 1).

Subclonación de las formas de longitud completa, truncadas y mutantes de la subunidad A de SLT en el vector pET32-VEGF121**1. Cebadores para la amplificación del ADN codificante de las formas de longitud completa (L) y truncada (S) de la subunidad A de SLT**

[0048] Los cebadores para las amplificaciones de ADN del ADN codificante de las formas L y S de la subunidad A de SLT fueron sintetizados por GeneLink (USA). Los cebadores correspondientes a las cadenas "sentido" de la forma SLT de longitud completa (293 residuos) (SEC ID nº 3) y la forma SLT truncada (202 residuos) (SEC ID nº 4) incluía sitios de restricción BglII cadena arriba del codón de ADN para el aminoácido 1 y el aminoácido 62, respectivamente, de la subunidad A de la SLT madura. Con el fin de clonar las moléculas de SLT en el mismo marco de lectura con la primera Met de VEGF121 se insertó una G adicional entre los sitios BglII y los ORFs de SLT.

5'-CCGAGATCTGAAGGAATTTACCTTAGAC-3' (SEC ID nº 3)
5'-CCCAGATCTGCTACGGCTTATTGTTGAACG-3' (SEC ID nº 4)

[0049] El cebador correspondiente a la cadena "antisentido" de la forma SLT de longitud completa complementó la secuencia codificante del ADN de SLT codificante del extremo carboxilo de la subunidad A de la SLT madura inmediatamente cadena arriba del codón de parada (SEC ID nº 5). El cebador correspondiente a la cadena "antisentido" de la forma SLT truncada complementaba la secuencia codificante del ADN codificante de los codones de ADN para los aminoácidos 258 a 264 de la subunidad A de la SLT (SEC ID nº 6). Ambos cebadores introdujeron sitios de restricción KpnI cadena abajo del ADN codificante de SLT:

5'-ATAGGTACCACTGCTAATAGTTCTGCG-3' (SEC ID nº 5)
5'-ATAGGTACCATCTGCCGGACACATAGAAG-3' (SEC ID nº 6)

PCR para amplificar las formas de longitud completa y truncada de la subunidad A de la SLT

[0050] Se amplificó el ADN codificante de las formas de longitud completa y truncada de la subunidad A de SLT mediante PCR a partir del plásmido pJB144 que contenía la holotoxina VT1/SLT. Se mezclaron diez nanogramos de ADN molde en 0,1 ml de mezcla de reacción, que contenía 10 pmoles de cada oligonucleótido, dNTPs 0,2 mM y 2 U de ADN polimerasa Vent (New England Biolabs, USA) en tampón Vent. Las incubaciones se realizaron en un sistema DNA GenAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Cetus, USA). Un ciclo incluía una etapa de desnaturalización (94°C durante 30 segundos), una etapa de hibridación (58°C durante 1 minuto) y una etapa de elongación (72°C durante 1 minuto 20 segundos). Tras 25 ciclos, se corrió una alícuota de 10 μ l de cada reacción en un gel de agarosa al 1% para verificar el tamaño correcto del producto amplificado. Las formas de ADN amplificado se digirieron con las restrictasas BglII y KpnI y se purificaron con el kit GeneClean Spin (BIO 101, USA).

Construcción de los plásmidos pET32-VEGF121-STL/L y pET32-VEGF121-STL/S

[0051] Los ADNs de las formas de amplificados que se han indicado anteriormente se ligaron en el vector pET32-VEGF121 que había sido tratado con las restrictasas BglII y KpnI, y se purificaron tal como se ha indicado anteriormente. Los plásmidos resultantes que contenían ADN codificante de las formas de SLT de longitud completa y truncada se denominaron pET32-VEGF121-SLT/L y pET32-VEGF121-SLT/S, respectivamente, y se transformaron en células competentes DH5 α (Gibco, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los clones se cribaron, se purificaron, se caracterizaron y se propagaron tal como se ha indicado anteriormente. Los fragmentos de ADN en los plásmidos pET32-VEGF121-SLT/L y pET32-VEGF121-SLT/S se secuenciaron entre el promotor de T7 y el nucleótido 203 en las secuencias codificantes de SLT con el fin de confirmar que contenían las secuencias de ADN de la SLT esperadas.

[0052] El ADN del plásmido pET-VEGF121-SLT/L codifica un extremo N-terminal de longitud completa de 36 aminoácidos que contiene una etiqueta His (6 aminoácidos), un sitio de corte de trombina (6 aminoácidos), una etiqueta S (15 aminoácidos), la subunidad A de SLT completa (293 aminoácidos), un péptido conector de longitud completa de 6 aminoácidos que contiene el sitio de corte de enteroquinasa, y 1 a 121 aminoácidos de la proteína VEGF121 madura (fig. 1). El plásmido pET-VEGF121-SLT/S era idéntico al plásmido pET-VEGF121-SLT/L, aunque en lugar de ADN codificante de la subunidad A de SLT completa contenía el ADN codificante de un fragmento de 202 aminoácidos de dicha subunidad entre el aminoácido 62 y el aminoácido 264 (fig. 1).

Construcción de plásmido para la expresión de proteína SLT-VEGF/Lci catalíticamente inactiva

[0053] Se realizó la mutagénesis específica de sitio de la subunidad A de la SLT-1 codificada por pET32/SLT-VEGF/L utilizando el sistema de mutagénesis sitio-dirigida *in vitro* GeneEditor™ (Promega). Se diseñaron dos cebadores mutagénicos para introducir tres mutaciones puntuales (subrayadas): Y114S (SEC ID nº 7) y E167Q y R170L (SEC ID nº 8):

5'-ACGTGGTAGAGCTACTGTCACC-3' (SEC ID nº 7)
5'-TTGCCGAAAAAGTAAAGCTTGAGCTGTACAG-3' (SEC ID nº 8)

[0054] Las mutaciones Y114S y R170L se confirmaron mediante secuenciación de ADN mutado que se había aislado a partir de dos clones. No se detectó la mutación E167Q en ninguno de los clones. El plásmido resultante, denominado pET32-VEGF121-SLT/Lci era idéntico al plásmido pET-VEGF121-SLT/L, aunque en lugar de ADN codificante de subunidad A de SLT de tipo salvaje contenía ADN codificante de un doble mutante (Y114S y R170L) de esta subunidad (fig. 1).

EJEMPLO 2: EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN SLT-VEGF/L, SLT-VEGF/Lci y SLT-VEGF/S RECOMBINANTES

A. Expresión de las proteínas SLT-VEGF/L, SLT-VEGF/Lci y SLT-VEGF/S

1. Expresión de las proteínas SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S en *E. coli* BL21(DE3)pLysS

[0055] Las células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen, UA) transformadas con pET-VEGF121-SLT/L y pET-VEGF121-SLT/S se cultivaron bajo condiciones en las que la expresión de las proteínas de fusión se encontraba reprimida por el represor lac hasta una D.O. comprendida en la etapa exponencial de crecimiento o en el punto central de la misma, después de lo cual se añadió IPTG (isopropil-D-tiogalactósido, Life Technologies, USA) para inducir la expresión del ADN codificante de la proteína de fusión.

[0056] Para generar un cultivo por lotes grande de células de *E. coli* transformadas con pET-VEGF121-SLT/L y pET-VEGF121-SLT/S, los cultivos de durante la noche (de aproximadamente 16 horas) de células *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas con los plásmidos pET-VEGF121-SLT/L y pET-VEGF121-SLT/S, respectivamente, en caldo LB que contenía ampicilina 50 mg/l y cloranfenicol 34 mg/l se diluyeron 1:100 en un matraz que contenía 100 ml de caldo LB con ampicilina 50 mg/l y cloranfenicol 34 mg/l. Las células se cultivaron bajo agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,5 según medición en el espectrofotómetro (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech, USA).

[0057] En la segunda etapa, se indujo la expresión de proteína de fusión mediante la adición de IPTG (Life Technologies, USA) hasta una concentración final de 1 mM. Los cultivos inducidos se cultivaron durante 3,5 horas adicionales para SLT-VEGF/L y 2 horas adicionales para SLT-VEGF/S; después se recolectaron mediante centrifugación (25 minutos, 5000xg). Los pellets celulares se resuspendieron en tampón A helado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 0,1 M, Nonidet P40 al 1%, DTT 0,1 M, PMSF 200 mg/l, antitripsina 25 mg/l, leupeptina 50 mg/l, aprotinina 25 mg/l). Tras cinco ciclos de congelación y descongelación, se añadió ADNasa a cada una de las suspensiones celulares hasta 50 U por ml. Las suspensiones se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente, después se centrifugaron a 5.000xg durante 30 minutos a 4°C. El análisis de la distribución de las proteínas de fusión denominadas SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S entre fracciones solubles y cuerpos de inclusión de bacterias inducidas con IPTG indicaron que las proteínas de fusión SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S se encontraban presentes en los cuerpos de inclusión (fig. 2, panel A).

[0058] Los pellets de cuerpos de inclusión se lavaron con el tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 0,5 M, imidazol 5 mM, y se solubilizaron en urea 8 M, seguido de sonicación de las soluciones durante 5 a 10 minutos en un sonicador de agua helada (FC 14, Fisher Sci., USA). Las soluciones de proteína se clarificaron mediante centrifugación a 14xg durante 10 minutos a 4°C y se recogieron los sobrenadantes y se dializaron frente a un volumen de 1.000 veces de tampón que contenía Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Nonidet P40 al 0,05%, durante 16 horas a 4°C. Las soluciones de proteínas de fusión SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S se suplementaron con glicerol al 10% y se almacenaron en alícuotas a -20°C. Las concentraciones de proteínas recombinantes se determinaron con el kit de ensayo de etiqueta S (Novagen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2. Expresión de las proteínas SLT-VEGF/L, SLT-VEGF/Lci y SLT-VEGF/S en *E. coli* Origami(DE3)pLysS

[0059] Las células de *E. coli* Origami(DE3)pLysS (Novagen, USA) transformadas con pET-VEGF121-SLT/L, pSLT-VEGF/Lci y pET-VEGF121-SLT/S, se cultivaron bajo condiciones en las que se encontraba reprimida la expresión de las proteínas de fusión por el represor *lac* a una D.O. comprendida en la etapa exponencial de crecimiento o en el centro de la misma, después de lo cual se añadió IPTG (Life Technologies, USA) para inducir la expresión del ADN codificante de la proteína de fusión.

[0060] Para generar un cultivo por lotes grande de células *E. coli* transformadas con pET-VEGF121-SLT/L, pET-VEGF121-SLT/Lci y pET-VEGF121-SLT/S, un cultivo de durante la noche (aproximadamente 16 horas) de células *E. coli* Origami(DE3)pLysS transformadas con los plásmidos pET-VEGF121-SLT/L o pET-VEGF121-SLT/Lci o pET-VEGF121-SLT/S, respectivamente, en caldo LB que contenía ampicilina 50 mg/l, cloranfenicol 34 mg/l, tetraciclina 12,5 mg/l y canamicina 15 mg/l, se diluyó 1:100 en un matraz que contenía 100 ml de caldo LB con ampicilina 50 mg/l, cloranfenicol 34 mg/l, tetraciclina 12,5 mg/l y canamicina 15 mg/l. Las células se cultivaron bajo agitación a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,4 según la medición en un espectrofotómetro (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech, USA).

[0061] En la segunda etapa, la expresión de la proteína de fusión se indujo mediante la adición de IPTG (Life Technologies, USA) hasta una concentración final de 1 mM. Los cultivos inducidos se cultivaron durante 4 horas adicionales a 30°C; después se recolectaron mediante centrifugación (25 minutos, 5000xg). Los pellets celulares se resuspendieron en tampón A helado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 0,1 M, Nonidet P40 al 1%, DTT 0,1 M, PMSF 200 mg/l, antitripsina 25 mg/l, leupeptina 50 mg/l, aprotinina 25 mg/l). Tras cinco ciclos de congelación y descongelación, se añadió ADNasa a cada una de las suspensiones celulares hasta 50 U por ml. Las suspensiones se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente; después se centrifugaron a 5.000xg durante 30 minutos a 4°C. El análisis de la distribución de las proteínas de fusión denominadas SLT-VEGF/L, SLT-VEGF/Lci y SLT-VEGF/S entre fracciones solubles y cuerpos de inclusión de bacterias inducidas con IPTG indicó que las proteínas SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S se encontraban presentes en los cuerpos de inclusión (fig. 2, panel B para SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S).

[0062] Los pellets de cuerpos de inclusión se lavaron con tampón que contenía Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 0,5 M, imidazol 5 mM y se solubilizaron en urea 8 M, seguido de sonicación de las soluciones heladas durante 20 a 30 segundos en un sonicador VirSonic 475 (VirTis, USA) operado a 40-50% de la potencia de salida. Las soluciones de proteína se clarificaron mediante centrifugación a 14.000xg durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes se recolectaron y se dializaron frente a un volumen 1.000 veces superior del tampón que contenía Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Brij-35 al 0,01% durante 2 horas a 4°C y después durante 16 horas a 4°C frente a un volumen fresco 1000 veces mayor del mismo tampón. Las proteínas de fusión SLT-VEGF/L, SLT-VEGF/Lci y SLT-VEGF/S obtenidas mediante este procedimiento se caracterizaron mediante SDS-PAGE (fig. 2, panel C). Las soluciones de proteínas de fusión SLT-VEGF/L, SLT-VEGF/Lci y SLT-VEGF/S se suplementaron con glicerol al 5% y se almacenaron en alícuotas a -70°C. Las concentraciones de las proteínas recombinantes se determinaron con el kit de ensayo de etiqueta S (Novagen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

B. Expresión de VEGF121 en *E. coli* BL21(DE3)pLysS

[0063] Se cultivaron células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas con pET32-VEGF121 y se indujo la expresión del VEGF recombinante denominado VEGF121 bajo las condiciones indicadas anteriormente. Se recuperó VEGF121 recombinante de los cuerpos de inclusión tal como se ha indicado anteriormente y se dializó el sobrenadante frente a un volumen 1.000 veces mayor de tampón que contenía Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, durante 16 horas a 4°C. Las soluciones de proteína VEGF121 se suplementaron con glicerol al 10% y se almacenaron en alícuotas a -20°C. Se determinaron las concentraciones de las proteínas VEGF121 recombinantes con el kit de ensayo de etiqueta S (Novagen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

EJEMPLO 3 - ACTIVIDADES BIOQUÍMICAS DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN SLT-VEGF/L Y SLT-VEGF/S

A. Efecto inhibidor de proteínas de fusión SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S sobre la síntesis de proteínas sin células

[0064] Las capacidades de las proteínas de fusión recombinantes SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S, obtenidas anteriormente, de inhibir la síntesis de proteínas se sometieron a ensayo en un ensayo *in vitro* que medía la síntesis de

proteínas sin células en un lisado de reticulocitos de conejo tratado con nucleasa (Promega, USA). Se añadieron sobre hielo 5 µl de las soluciones de SLT-VEGF/L, SLT-VEGF/S y VEGF121 o tampón de almacenamiento que contenía Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, urea 8 mM, glicerol al 8%, a mezclas de reacción de 20 µl que incluían 18 µl del lisado de reticulocitos de conejo, mezcla completa de aminoácidos 1 mM, KCl 90 mM y ARNm de luciferasa de luciérnaga, 0,5 µg en cada ensayo. Las concentraciones finales de SLT-VEGF/L, SLT-VEGF/Lci eran de 100 nM, y la concentración final de VEGF121 era de 1.000 nM. Las concentraciones finales de SLT-VEGF/L, SLT-VEGF/Lci, SLT-VEGF/S en experimentos de dependencia de dosis eran las indicadas en la figura 3, panel B. Tras una incubación de 90 minutos a 30°C, las mezclas de reacción se diluyeron 20 veces con agua que contenía BSA 1 mg/ml y 2 µl de cada mezcla se sometieron a ensayo para actividad de luciferasa de luciérnaga en tampón de reacción de luciferasa (Promega, USA) utilizando un luminómetro LumiOne (Bioscan, Inc., USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se fijó como 100% la actividad de luciferasa de la reacción de control que contenía VEGF121 100 nM.

[0065] Las proteínas de fusión SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S a una concentración de 100 nM inhibieron la síntesis de las proteínas a niveles de 0,01% y 1,2% del control (fig. 3, panel A). A título comparativo, la proteína VEGF121 recombinante a concentraciones de hasta 1.000 nM inhibió la síntesis de proteínas hasta un nivel de 48% del control (fig. 3, panel A). Los experimentos de dependencia de la dosis revelaron que SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S inhibían la síntesis de proteína en el 90% a concentraciones de 0,04 nM y 2 nM, respectivamente, mientras que SLT-VEGF/Lci no inhibió la síntesis de proteínas (fig. 3, panel C).

B. Inducción de la fosforilación de tirosinas de los receptores KDR/flk-1 celulares por parte de las proteínas de fusión SLT-VEGF/L, SLT-VEGF/Lci y SLT-VEGF/S

[0066] Se sometieron a ensayo las capacidades de las proteínas de fusión recombinantes SLT-VEGF/L, SLT-VEGF/Lci y SLT-VEGF/S obtenidas anteriormente de inducir la fosforilación de tirosinas de los receptores KDR/flk-1 celulares utilizando células 293 establemente transfectadas con KDR/flk-1 denominadas células 293/KDR. Se sembraron aproximadamente 50.000 células 293/KDR en cada pocillo de placas de 24 pocillos en 1 ml de DMEM (Life Technologies, USA) suplementado con suero de feto bovino al 10% (Gemini, USA) y se incubaron durante la noche a 37°C, con 5% de CO₂. Al día siguiente, las células se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato y se transfirieron a DMEM sin suero durante 4 horas a 37°C. A continuación, se cambió el medio por DMEM sin suero suplementado con ortovanadato sódico 0,1 mM, albúmina de suero bovino 100 ng/ml, HEPES 25 mM, pH 7,2, y las células se incubaron durante 20 minutos a 37°C seguido de una incubación de 20 minutos a 4°C. Seguidamente, las células se incubaron con SLT-VEGF/L o SLT-VEGF/Lci o SLT-VEGF/S o VEGF121 durante 1 hora a 4°C, seguido de 8 minutos a 37°C. A continuación, las células se enjuagaron una vez con solución salina tamponada con fosfato helado que contenía ortovanadato sódico 0,1 mM, solubilizado en tampón para muestras que contenía Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8, SDS al 2,5%, glicerol al 7,5%, EDTA 5 mM, DTT 50 mM, azul bromofenol al 0,025% y se analizaron mediante transferencia western. Las proteínas celulares se fraccionaron mediante SDS-PAGE en geles al 7,5% y se transfirieron a nitrocelulosa (BioRad, USA) utilizando un sistema 2117 Multiphor II semiseco (LKB, Suecia), tal como indica el fabricante. Los filtros western se procesaron y se sondearon con conjugado RC20:HRP anti-fosfotirosina (Transduction Lab, USA) a una dilución de 1:2.000 siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó un sistema basado en la quimioluminiscencia (ECL, Amersham, USA) para la detección de las bandas. Las proteínas SLT-VEGF/L, SLT-VEGF/Lci y SLT-VEGF/S indujeron la fosforilación de tirosinas de KDR/flk-1 de un modo dependiente de la dosis en el mismo intervalo de concentraciones que VEGF121 (fig. 4).

EJEMPLO 4. EFECTOS CITOTÓXICOS Y CITOSTÁTICOS DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN SLT-VEGF/L Y SLT-VEGF/S

A. Efectos de las proteínas de fusión VEGF-SLT/L y VEGF-SLT/S sobre células endoteliales en crecimiento que sobreexpresaban receptores KDR/flk-1 y sobre células endoteliales en crecimiento que no expresaban receptores KDR/flk-1

[0067] Las capacidades de las proteínas de fusión VEGF-SLT/L y VEGF-SLT/S obtenidas anteriormente de afectar a las células endoteliales en crecimiento utilizando células endoteliales aórticas porcinas establemente transfectadas con el vector vacío (denominadas células PAE/V). Se sembraron aproximadamente 5.000 células en cada pocillo de placas de 24 pocillos en 1 ml de DMEM (Life Technologies, USA) suplementado con suero de feto bovino al 10% (Gemini, USA) y se incubaron durante la noche a 37°C, con 5% de CO₂. Al día siguiente, se cambió el medio por medio DMEM fresco suplementado con suero de feto bovino al 10% y SLT-VEGF/L o SLT-VEGF/S a concentraciones finales de entre 0,078 nM y 2,5 nM. Las placas se incubaron durante 72 horas a 37°C, con 5% de CO₂. Tras el periodo de incubación, los pocillos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato, se desengancharon las células con solución de tripsina (Life Technologies, USA) y se realizó un recuento en un contador Coulter (Coulter Corporation, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas de fusión SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S inhibieron el crecimiento de las células PAE/KDR de un modo dependiente de la dosis, con IC₅₀~0,15 nM, mientras que el crecimiento de PAE/V, que no expresaban receptores KDR/flk-1, no resultó afectado (fig. 5). En el intervalo nanomolar bajo de concentraciones, las proteínas SLT-VEGF/L eran citotóxicas, eliminando virtualmente la totalidad de las células PAE/KDR tras la exposición durante la noche a una concentración de tan sólo 2,5 nM. En contraste, las proteínas SLT-VEGF/S a las concentraciones nanomolares bajas siguieron siendo mayoritariamente citostáticas, observándose pocas células muertas a la concentración de 2,5 nM.

[0068] La proteína de fusión SLT-VEGF/Lci catalíticamente inactiva no afectó al crecimiento de las células PAE/KDR y PAE/V (fig. 5, panel C), indicando que los efectos citotóxicos y citostáticos de las proteínas de fusión SLT-VEGF/L y SLT-VEGF/S se debían a la actividad inactivadora de ribosomas del grupo SLT.

[0069] La actividad citotóxica de SLT-VEGF/L se manifestaba en la inducción rápida de apoptosis de las células PAE/KDR, según las características típicas de la apoptosis, tales como la fragmentación del ADN y la escisión de la fodrina (fig. 6). Para detectar la fragmentación apoptótica del ADN, se sembraron células PAE/KDR en placas de 6 pocillos a una densidad de 2×10^5 células/pocillo y se expusieron a SLT-VEGF/L 5 nM tras 24 horas. Tras los periodos de tiempo indicados, se aisló el ADN de los lisados celulares y se fraccionó en un gel de agarosa al 1,5%. Para detectar la escisión de la fodrina en fragmentos de 150 kDa y 120 kDa, se sembraron las células PAE/KDR en placas de 24 pocillos a una densidad de 4×10^4 células/pocillo y se expusieron a SLT-VEGF/L 2,5 nM veinte horas después durante los periodos de tiempo indicados. Se detectaron fodrina y sus fragmentos mediante análisis de transferencia western de los lisados de las células tratadas utilizando anticuerpo anti-fodrina (Chemicon, USA).

B. Efectos de la proteína de fusión VEGF-SLT/L sobre células endoteliales que expresan un número reducido de receptores KDR/flk-1 y sobre células endoteliales quiescentes

[0070] Las células endoteliales en la vasculatura normal expresan un número reducido de receptores KDR/flk-1. Para minimizar los potenciales efectos secundarios negativos, una proteína de fusión toxina-VEGF útil no debería ser tóxica para las células endoteliales con un número reducido de receptores KDR/flk-1 o para células endoteliales quiescentes que constituyen la vasculatura normal. La capacidad de la proteína de fusión VEGF-SLT/L obtenida anteriormente de afectar a las células endoteliales que expresan un número reducido de receptores KDR/flk-1 se sometió a ensayo con células endoteliales de vena umbilical humana (HUVE) que expresaban 30.000 a 50.000 receptores KDR/flk-1 en cada célula, en células endoteliales aórticas porcinas PAE/KDR_{low} que expresaban ~5.000 KDR/flk-1 receptores en cada célula, y en células endoteliales de ratón MS1 que expresaban ~20.000 VEGF-2/célula. Las células HUVE, PAE/KDR_{low} y MS1 se sembraron en placas de 24 pocillos a densidades de entre 5 y 10×10^3 células/pocillo y se expusieron a SLT-VEGF/L 2,5 nM veinte horas después. Las placas se incubaron durante 72 horas a 37°C con 5% de CO₂.

Tras el periodo de incubación, los pocillos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se desengancharon las células con solución de tripsina (Life Technologies, USA) y se realizó un recuento en un contador Coulter (Coulter Corporation, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La proteína de fusión SLT-VEGF/L no afectó a las células endoteliales HUVE humanas, MS1 de ratón y PAE/KDR_{low} porcinas en crecimiento, indicando que sólo un nivel elevado de expresión de receptores KDR/flk-1 podría dar lugar a sensibilidad a la proteína de fusión SLT-VEGF/L a las células endoteliales (fig. 7, panel A).

[0071] La capacidad de la proteína de fusión VEGF-SLT/L obtenida anteriormente de afectar a las células endoteliales quiescentes se sometió a ensayo con células PAE/KDR quiescentes. Se sembraron aproximadamente 5.000 células PAE/KDR en placas de 24 pocillos en 1 ml de DMEM (Life Technologies, USA) suplementado con suero de feto bovino al 10% (Gemini, USA) y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. Las células alcanzaron la confluencia tras aproximadamente una semana y se mantuvieron en forma quiescente durante tres días adicionales. A continuación, se cambió el medio por DMEM fresco suplementado con suero de feto bovino al 10% y SLT-VEGF/L a una concentración final de 20 nM. Las placas se incubaron durante 72 horas a 37°C con 5% de CO₂. A título comparativo, se expusieron PAE/KDR en crecimiento a SLT-VEGF/L 20 nM durante 5 minutos; después se transfirieron a medio de cultivo fresco y se realizó un recuento tras 72 horas. Las proteínas SLT-VEGF/L no afectaron a las células endoteliales PAE/KDR quiescentes incluso tras una exposición de 72 horas, mientras que afectaron drásticamente a las PAE/KDR en crecimiento incluso tras una exposición de 5 minutos.

REFERENCIAS

[0072]

- Aiello, L. P., Northrup, J. M., Keyt, B. A., Takagi, H., and Iwamoto, M. A. (1995) Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch. Ophthalmol.*, 113, 1538-1544.
- Al-Jaufy, A. Y., Haddad, J. E., King, S. R., McPhee, R. A., and Jackson, M. P. (1994) Cytotoxicity of a Shiga toxin A subunit-CD4 fusion protein to human immunodeficiency virus-infected cells. *Infect. & Immun.*, 62, 956-960.
- Al-Jaufy, A. Y., King, S. R., and Jackson, M. P. (1995) Purification and characterization of a Shiga toxin A subunit-CD4 fusion protein cytotoxic to human immunodeficiency virus-infected cells. *Infect. & Immun.*, 63, 3073-3078.
- Arora, N., Maood, R., Zheng, T., Cai, J., Smith, L., and Gill, P. S. (1999) Vascular endothelial growth factor chimeric toxin is highly active against endothelial cells. *Cancer Res.*, 59, 183-188.
- Asahara, T., Chen, D., Tsurumi, Y., Kearney, M., Rossow, S., Passeri, J., Symes, J. F., and Isner, J. M. (1996) Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer. *Circulation*, 94, 3291-3302.
- Bikfalvi, A., Sauzeau, C., Moukadiri, H., Maclouf, J., Busso, N., Bryckaert, M., Plouet, J., and Tobelem, G. (1991) Interaction of vasculotropin/vascular endothelial cell growth factor with human umbilical vein endothelial cells: bind-

- ing, internalization, degradation, and biological effects. *J. Cell Physiol.* 149, 50-59.
- Brown, L. F., Berse, B., Jackman, R. W., Tognazzi, K., Guidi, A. J., Dvorak, H. F., Senger, D. R., Connolly, J. L., and Schnitt, S. J. (1995) Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum. Pathol.*, 26, 86- 91.
- Brown, L. F., Berse, B., Jackman, R. W., Tognazzi, K., Manseau, E. J., Dvorak, H. F., and Senger, D. R. (1993) Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am. J. Pathol.*, 143, 1255-1262.
- Cao, C., Kurazono, H., Yamasaki, S., Kashiwagi, K., Igarashi, K., and Takeda, Y. (1994) Construction of mutant genes for a non-toxic verotoxin 2 variant (VT2vp1) of *Escherichia coli* and characterization of purified mutant toxins. *Microbiol. Immunol.*, 38, 441-447.
- Claffey, K. P., and Robinson, G. S. (1996) Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor and metastasis growth and metastasis. *Cancer Metast. Rev.*, 15, 165-176.
- Couffignal, T., Kearney, M., Witzensbichler, B., Chen, D., Murohara, T., Losordo, D. W., Symes, J., and Isner, J. M. (1997) Vascular endothelial growth factor/Vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Amer. J. Pathol.* 150, 1673-1685.
- Deresiewicz, R. L., Austin, P. R., and Hovde, C. J. (1993) The role of tyrosine-114 in the enzymatic activity of the Shiga-like toxin I A-chain. *Mol. Gen. Genet.* 241, 467-473.
- Detmar, M., Brown, L. F., Claffey, K. P., Yeo, K. T., Kocher, O., Jackman, R. W., Berse, B., and Dvorak, H. F. (1994) Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J. Exp. Med.*, 180, 1141-1146.
- Folkman, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature, Med.*, 1, 27-31.
- Folkman, J., and Shing, Y. (1992) Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 267, 10931-10934.
- Haddad, J. E., Al-Jaufy, A. Y., and Jackson, M. P. (1993) Minimum domain of the Shiga toxin A subunit required for enzymatic activity. *J. Bacteriol.*, 175, 4970-4978.
- Hanahan, D. (1997) Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*, 277, 48-60.
- Iordanov, M. S., Pribnow, D., Magun, J. L., Dinh, T. H., Pearson, J. A., Chen, S. L., and Magun, B. E. (1997) Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 3373-3381.
- Kaplan, B. S., Cleary, T. G., and Obrig, T. G. (1990) Recent advances in understanding the pathogenesis of the hemolytic uremic syndromes. *Pediatr. Nephrol.* 4, 276-283.
- Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S., and Ferrara, N. (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature (Lond.)*, 362, 841-844.
- Millauer, B., Shawver, L. K., Plate, K. H., Risau, W., and Ulrich, A. (1994) Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature (Lond.)*, 367, 576-579.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z. (1999) *FASEB J.*, 13, 9-22.
- Neufeld, G., Tessler, S., Gitay-Goren, H. Cohen, T., and Levi, B. Z. (1994) Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog. Growth Factor Res.*, 5, 89-97.
- Obrig, T. G., Del Vecchio, P. J., Karmali, M. A., Petric, M., Moran, T. P., and Judge, T. K. (1987) Pathogenesis of haemolytic uraemic syndrome *Lancet* 2, 687.
- Obrig, T., Louise, C., Lingwood, C., Boyd, B., Barley-Maloney, L., and Daniel, T., (1993) Endothelial heterogeneity in Shiga toxin receptors and responses. *J. Biol. Chem.*, 268, 15484-15488.
- Olsnes S., Reisbig R., and Eiklid K. (1981) Subunit structure of Shigella cytotoxin. *J. Biol. Chem.* 256, 48732-8738.
- Olson T. A., Mohanraj, D., Roy, S., and Ramakrishnan, S. (1997) Targeting the tumor vasculature : inhibition of tumor and metastasis growth by a vascular endothelial growth factor-toxin conjugate. *Int. J. Cancer* 73, 865-870.
- Plate, K. H., Breier, G., Millauer, B., Ullrich, A., and Risau, W. (1993) Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 53, 5822-5827.
- Ramakrishnan, S., Olson, T. A., Bauch, V. L., and Mohanraj, D. (1996) Vascular endothelial growth factor-toxin conjugate specifically inhibits KDR/flk-1 positive endothelial cell proliferation in vitro and angiogenesis in vivo. *Cancer Res.* 56, 1324-1330.
- Richardson, S. E., Karmali, M. A., Becker, L. E., and Smith, C. R. (1988) The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Hum. Pathol.* 19, 1102-1108.
- Saleh, M., Stacker, S. A., and Wilks, A. F. (1996) Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence. *Cancer Res.*, 56, 393-401.
- Saxena, S. K., O'Brien, A. D., and Ackerman, E. J. (1989) Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N- glycosidases of 28 S RNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 264, 596-601.
- Terman, B. I., and Dougher- Vermazen, M. (1996) Biological properties of VEGF/VPF receptors. *Cancer Metast. Rev.* 15, 159-163.
- Vallera, D. A., Panoskaltsis-Mortari, A., and Blazar, B. R. (1997) Renal dysfunction accounts for the dose limiting toxicity of DT390anti-CD3sFv, a potential new recombinant anti-GVHD immunotoxin. *Protein Eng.* 10, 1071-1076.
- Veikkola, T., and Alitalo, K. (1999) VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 9,211-220.

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico aislado codificante de una proteína de fusión, que comprende:
 - (1) la subunidad A de la toxina bacteriana de tipo Shiga,
 - y
 - (2) factor de crecimiento vascular endotelial humano,en el que dicha proteína de fusión presenta actividad inactivadora de los ribosomas.
2. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 1, en el que dicha proteína de fusión se une específicamente a receptores del factor de crecimiento vascular endotelial.
3. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 2, en el que dicha proteína de fusión resulta internalizada por una célula que expresa dichos receptores.
4. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 3, en el que dicha internalización se produce mediante endocitosis.
5. Polipéptido aislado que comprende:
 - (1) la subunidad A de la toxina bacteriana de tipo Shiga
 - y
 - (2) el factor de crecimiento vascular endotelial humano,en el que dicho polipéptido aislado presenta actividad inactivadora de los ribosomas.
6. Polipéptido aislado según la reivindicación 5, en el que dicho polipéptido aislado se une específicamente a los receptores del factor de crecimiento vascular endotelial.
7. Polipéptido aislado según la reivindicación 6, en el que dicho polipéptido aislado resulta internalizado por una célula que expresa dichos receptores.
8. Polipéptido aislado según la reivindicación 5, en el que dicha internalización se produce mediante endocitosis.
9. Vector de expresión, que comprende:
 - (1) un ácido nucleico codificante de una proteína de fusión que comprende la subunidad A de la toxina bacteriana de tipo Shiga y factor de crecimiento vascular endotelial humano, presentando dicha proteína de fusión actividad inactivadora de los ribosomas,
 - (2) una secuencia promotora operativamente ligada a dicho ácido nucleico para permitir la expresión de dicho ácido nucleico.
10. Vector de expresión según la reivindicación 9, en el que dicha proteína de fusión se une específicamente a receptores del factor de crecimiento vascular endotelial.
11. Vector de expresión según la reivindicación 10, en el que dicha proteína de fusión resulta internalizada por una célula que expresa dichos receptores.
12. Célula bacteriana transformada con el vector de expresión según la reivindicación 10.
13. Método *in vitro* de inactivación de ribosomas en una célula que expresa receptores del factor de crecimiento vascular endotelial humano, que comprende las etapas de:
 - (a) poner en contacto la célula *in vitro* con una proteína de fusión que comprende:
 - (1) la subunidad A de la toxina bacteriana de tipo Shiga
 - y
 - (2) el factor de crecimiento vascular endotelial humano, bajo condicionesque permiten que dicha proteína de fusión resulte internalizada en dicha célula, e inactivar los ribosomas en dicha célula, presentando dicha proteína de fusión actividad inactivadora de los ribosomas.
14. Método según la reivindicación 13, en el que dicha proteína de fusión se une específicamente a receptores del factor de crecimiento vascular endotelial.
15. Método según la reivindicación 14, en el que dicha proteína de fusión resulta internalizada por una célula que expresa dichos receptores.

16. Composición para inhibir el crecimiento de las células endoteliales en un paciente, que comprende:

(A) una proteína de fusión que comprende la subunidad A de la toxina bacteriana de tipo Shiga, y factor de crecimiento vascular endotelial humano, presentando dicha proteína de fusión actividad inactivadora de los ribosomas, y
(B) un portador farmacéuticamente aceptable.

- 5 17. Composición que comprende una proteína de fusión que comprende la subunidad A de la toxina bacteriana de tipo Shiga y el factor de crecimiento vascular endotelial humano, presentando dicha proteína de fusión actividad inactivadora de los ribosomas; y un portador farmacéuticamente aceptable para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un paciente que sufre una afección fisiopatológica que depende de la angiogénesis.

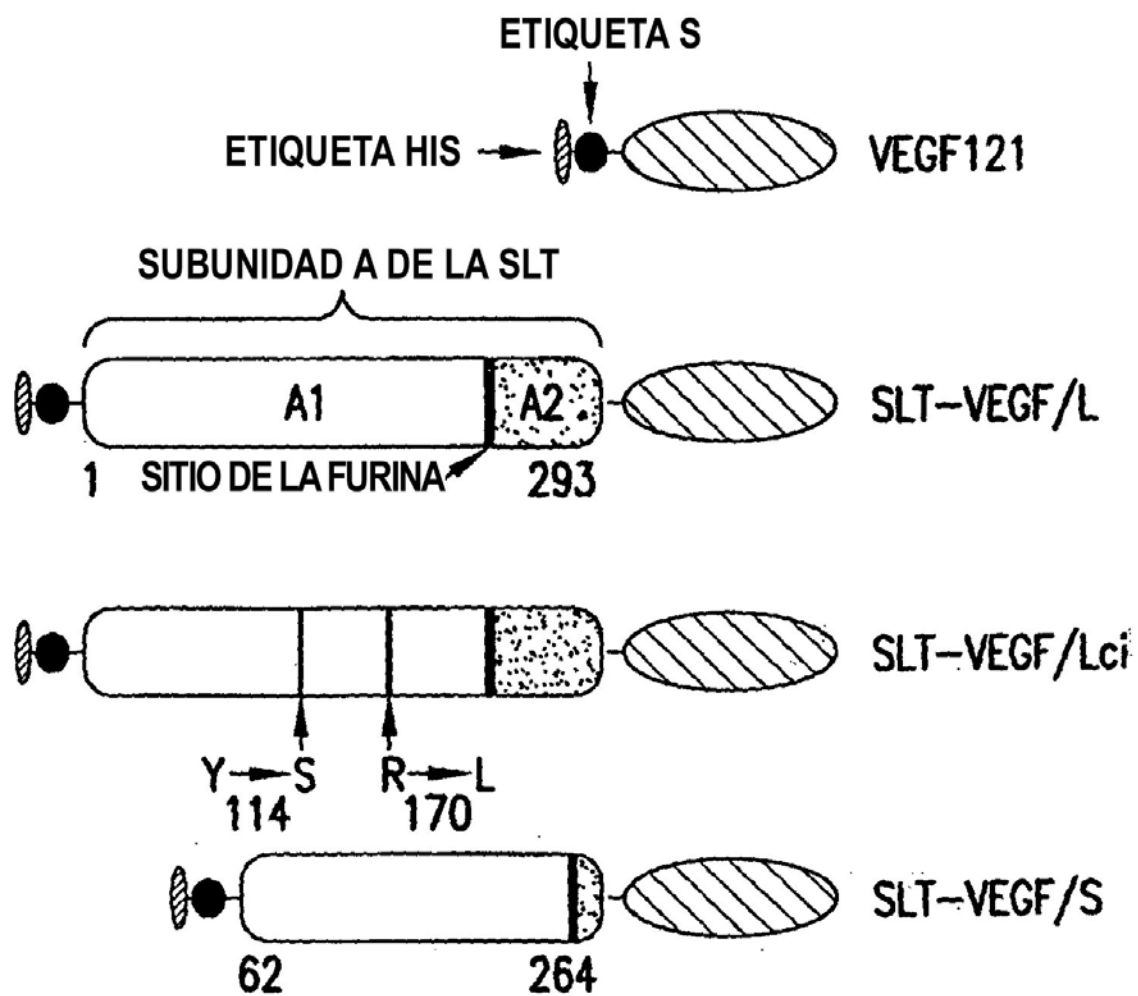


FIG.1

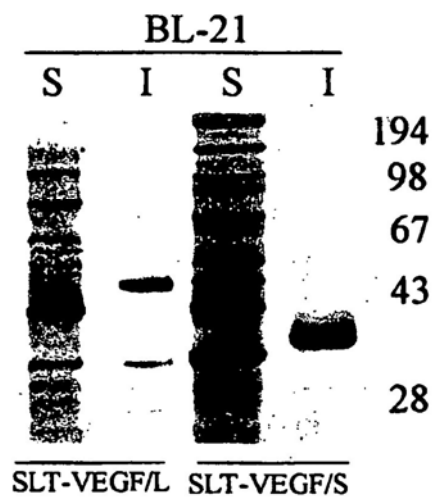


FIG.2A

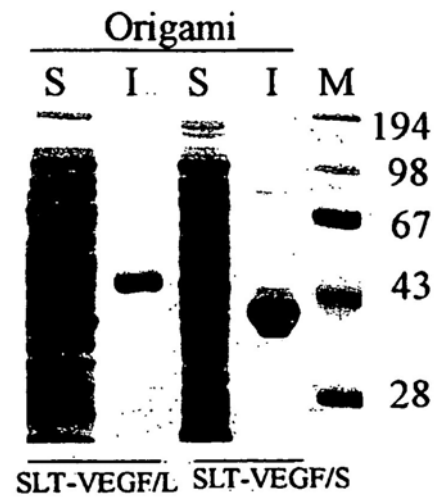


FIG.2B

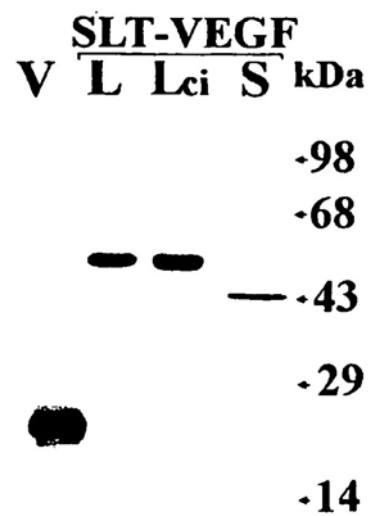


FIG.2C

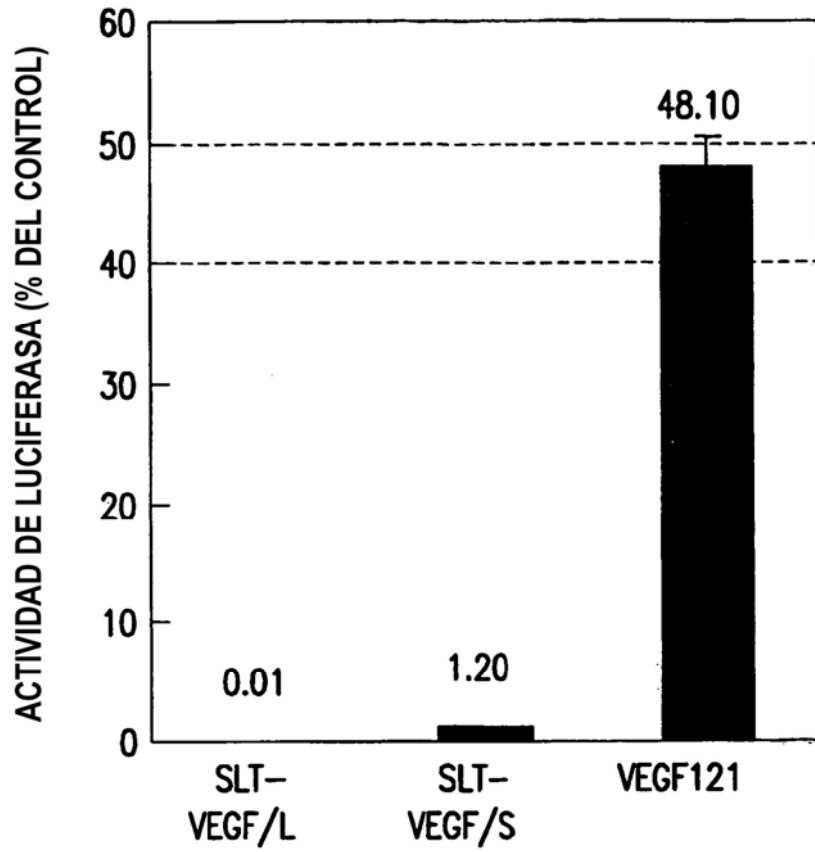


FIG.3A

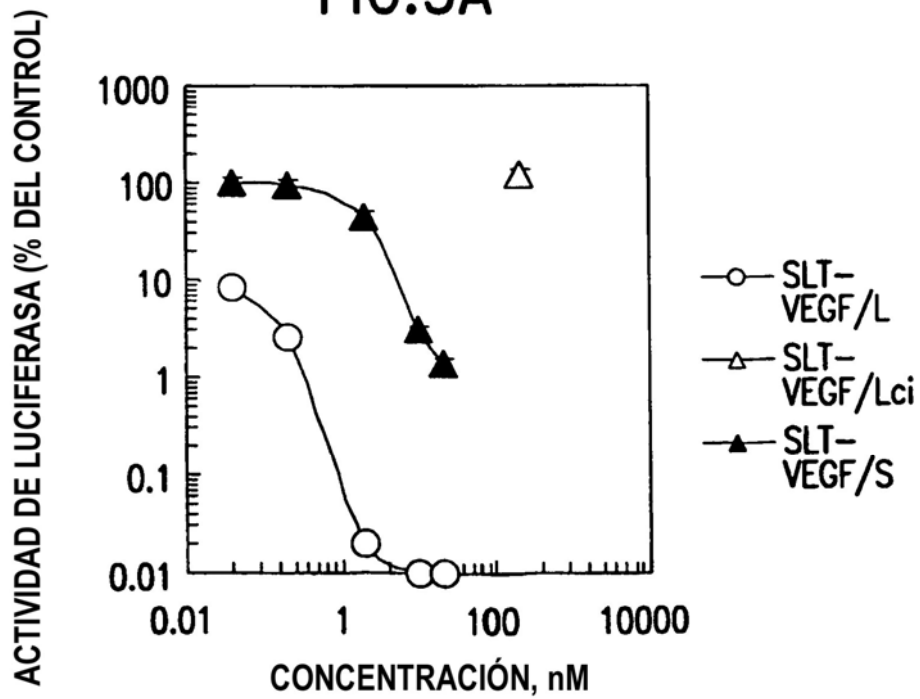


FIG.3B

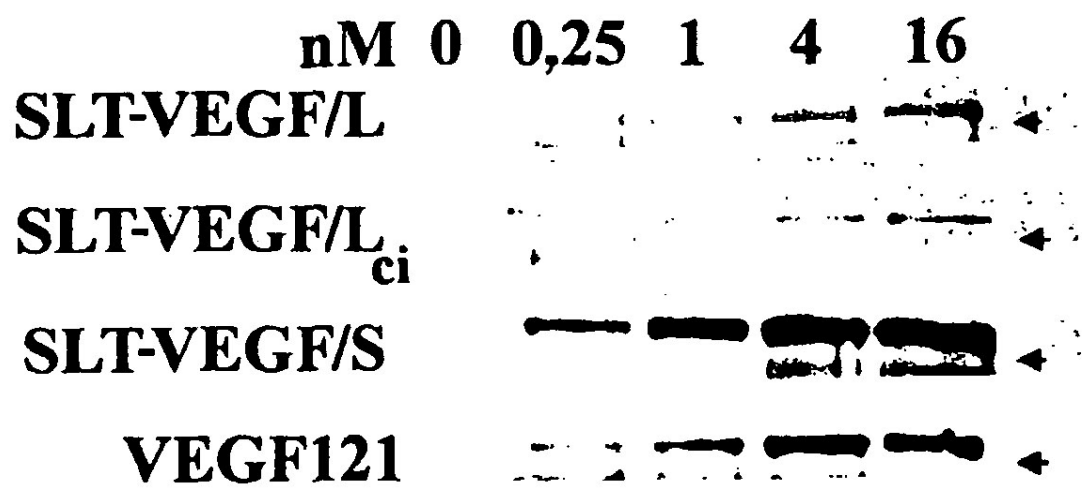


FIG.4

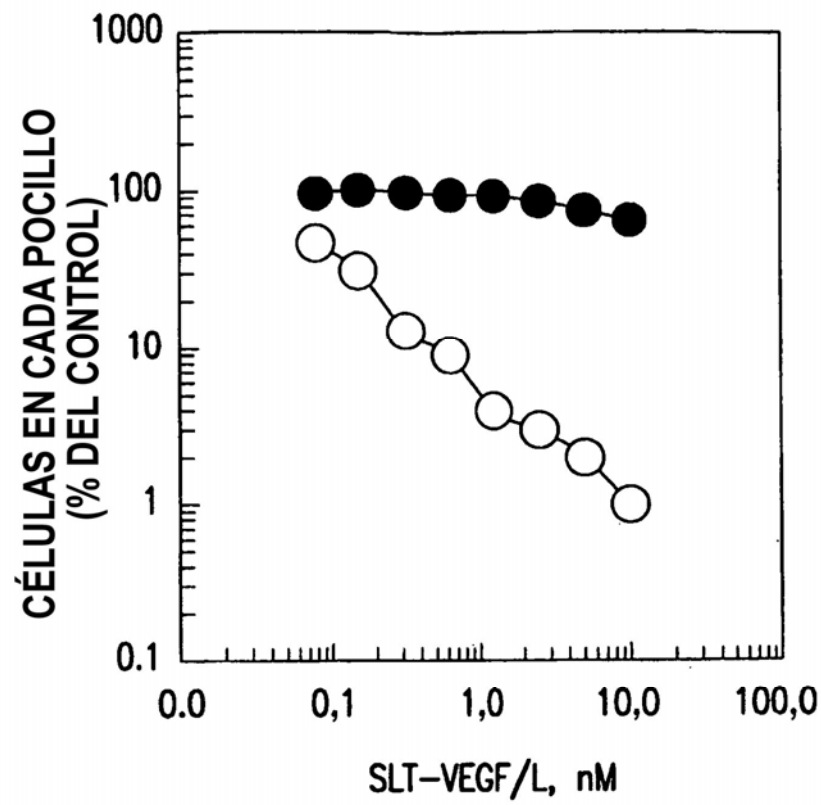


FIG.5A

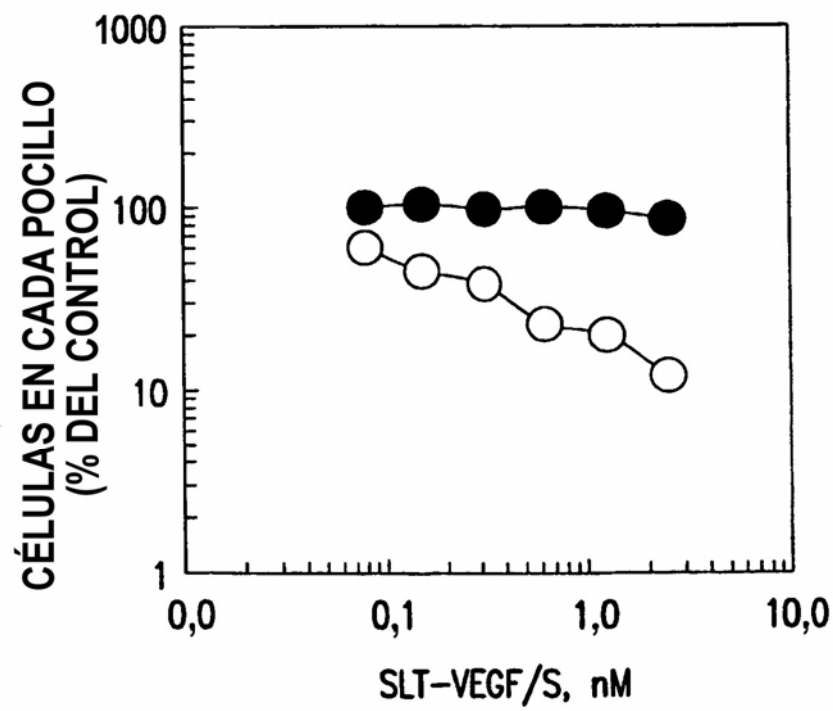


FIG.5B

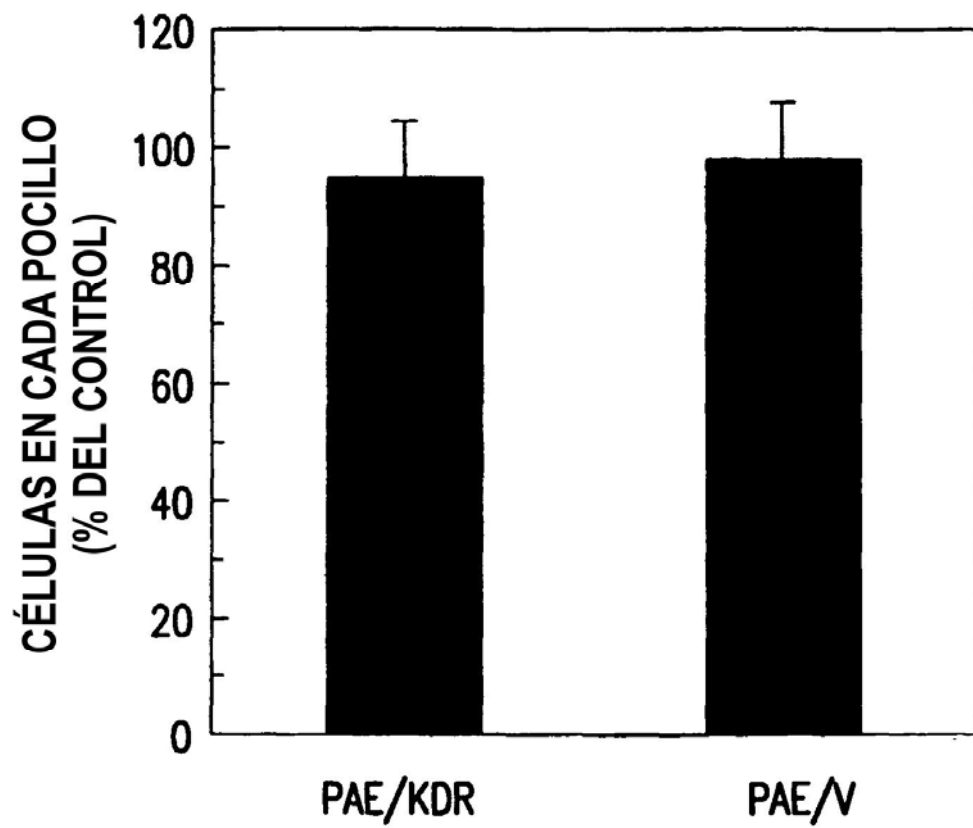


FIG.5C

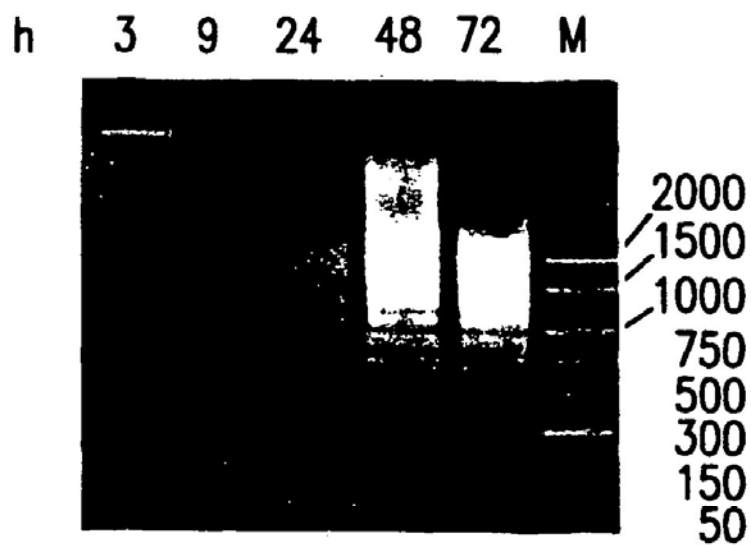


FIG.6A

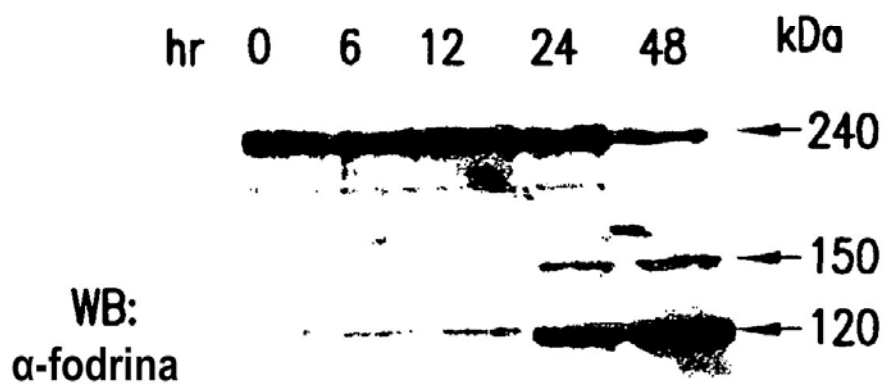


FIG.6B

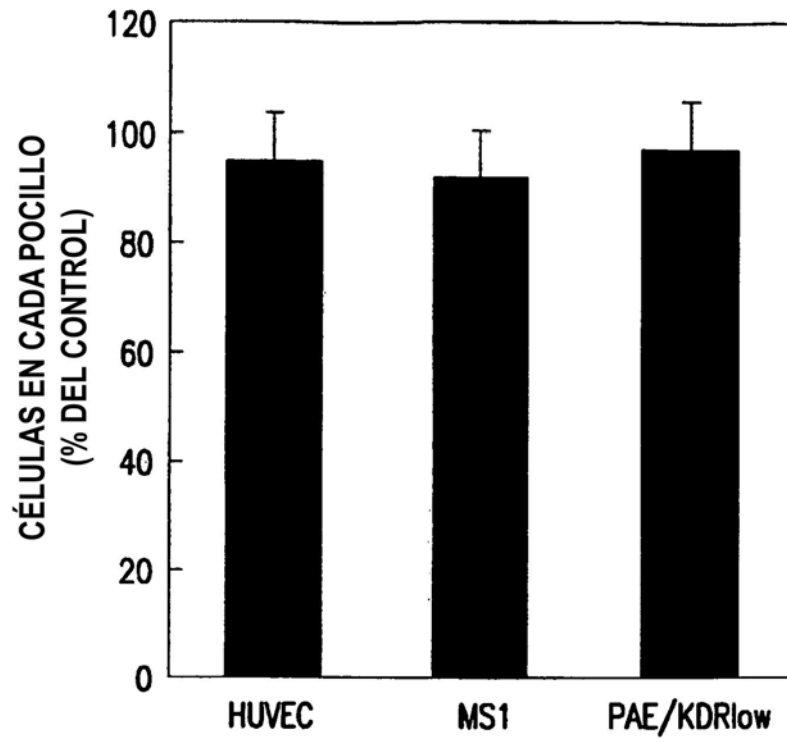


FIG.7A

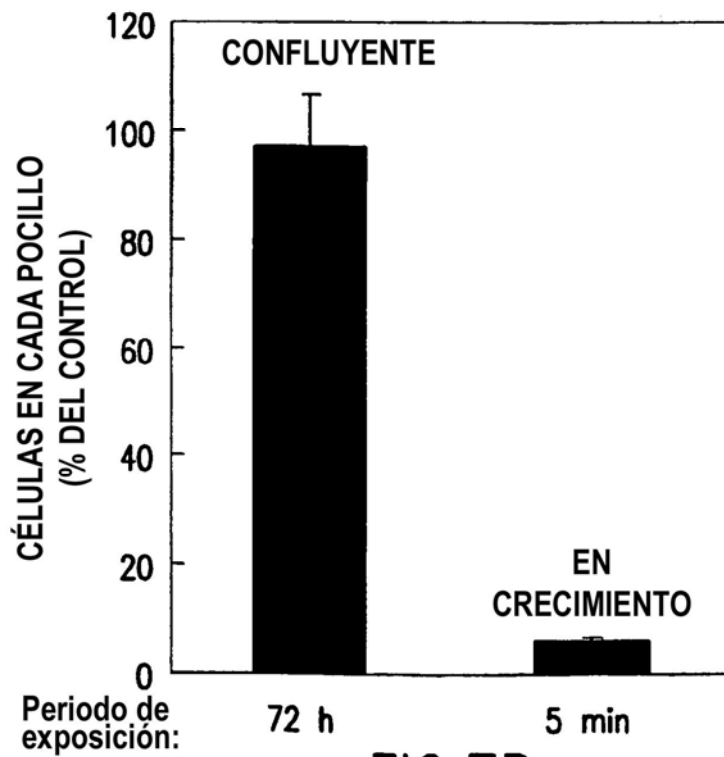


FIG.7B