



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 916**

51 Int. Cl.:
A61K 38/39 (2006.01) **A61P 9/10** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) **A61P 37/00** (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08725121 .1**
96 Fecha de presentación : **01.02.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2111228**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.10.2009**

54 Título: **Dominio ¹⁰Fn3 para el uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a angiogénesis inapropiada.**

30 Prioridad: **02.02.2007 US 899094 P**
02.08.2007 US 963208 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.11.2011

73 Titular/es: **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**
Route 206 & Province Line Road
Princeton, New Jersey 05843-4000, US

72 Inventor/es: **Mendlein, John y**
Furfine, Eric

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 916 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

Dominio ¹⁰Fn3 para el uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a angiogénesis inapropiada

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a proteínas innovadoras que bloquean la patología y biología mediadas por la ruta VEGF-VEGFR para el uso en el tratamiento de ciertas afecciones asociadas a angiogénesis inapropiada.

Introducción

10 La angiogénesis es el proceso por el que se forman los nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes o vénulas postcapilares; es un componente importante de muchos procesos fisiológicos incluyendo la ovulación, desarrollo embrionario, reparación de heridas, y generación vascular colateral en el miocardio. La angiogénesis también es central para un número de afecciones patológicas tales como crecimiento tumoral y metástasis, retinopatía diabética, y degeneración macular. En muchos casos, el proceso comienza con la activación de células endoteliales vasculares existentes en respuesta a una variedad de citocinas y factores de crecimiento. En el cáncer, las citocinas liberadas del tumor y factores angiogénicos estimulan las células endoteliales vasculares mediante la interacción con receptores superficiales de células específicas. Las células endoteliales activadas secretan enzimas que degradan la membrana basal de los vasos, permitiendo la invasión de las células endoteliales en el tejido tumoral. Una vez situadas, las células endoteliales se diferencian para formar nuevas divisiones de vasos de vasos preexistentes. Los nuevos vasos sanguíneos proporcionan nutrientes al tumor, facilitando el crecimiento adicional, y también proporcionan una vía para la metástasis.

20 Hasta la fecha, se han identificado numerosos factores angiogénicos, incluyendo el factor particularmente potente VEGF. VEGF fue inicialmente purificado a partir de los medios condicionados de células foliculo estrelladas y de una variedad de líneas celulares. Más recientemente se ha identificado un número de homólogos estructurales y alternativamente formas unidas de VEGF. Las diversas formas de VEGF se unen como ligandos de alta afinidad a una serie de receptores VEGF (VEGFR). Los VEGFR son receptores de tirosina quinasa, muchos de los que son reguladores importantes de angiogénesis. La familia de VEGFR incluye 3 importantes subtipos: VEGFR-1, VEGFR-2 (también conocido como Receptor del Dominio de Inserción Quinasa, "KDR", en seres humanos), y VEGFR-3. Entre las formas de VEGF, VEGF-A, VEGF-C y VEGF-D son conocidos por unirse y activar VEGFR-2.

25 El VEGF, actuando a través de sus receptores afines, puede funcionar como un mitógeno endotelial específico durante la angiogénesis. Además, existe evidencia sustancial de que VEGF y VEGFR son aumentados en afecciones caracterizadas por angiogénesis inapropiada, tales como cáncer. Como resultado, una gran cantidad de investigación se ha focalizado en la identificación de productos terapéuticos que reconozcan e inhiban VEGF o VEGFR.

30 En vista de los roles que VEGF y VEGFR tienen en los trastornos sería deseable generar productos terapéuticos y formulaciones para tratar las afecciones asociadas a angiogénesis inapropiada.

35 El documento WO2005/056764 describe polipéptidos de unión a VEGFR que comprenden un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰Fn3) y su uso en una afección caracterizada por angiogénesis inapropiada.

Resumen de la invención

40 La presente invención se refiere a un polipéptido para el uso en el tratamiento de una afección seleccionada de un trastorno autoinmune, un trastorno inflamatorio, una retinopatía, y un cáncer en el que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SED ID NO:4 y se une al VEGFR2 humano con una constante de disociación de 1µM o menos, en el que la administración del polipéptido da como resultado una concentración pico de entre 1 y 7 µM del polipéptido.

En algunas realizaciones, el polipéptido es administrado por vía intravenosa previo a la administración subcutánea. Por ejemplo, una primera dosis inicial de saturación intravenosa administrada seguida por terapia de administración subcutánea.

45 En algunas realizaciones, se administra menos que 2 ml de polipéptido en una única dosis. En algunas realizaciones, se administra menos que 1 ml de polipéptido en una única dosis

50 En algunas realizaciones, el polipéptido se administra por vía intravenosa al menos una vez, dos veces, o tres veces por semana. En algunas realizaciones, el polipéptido se administra por vía intravenosa una vez por semana. En algunas realizaciones, el polipéptido se administra por vía intravenosa una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, el polipéptido se administra por vía intravenosa menos que una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, el polipéptido se administra por vía subcutánea al menos una vez, dos veces, o tres veces por semana. En algunas realizaciones, el polipéptido se administra por vía subcutánea menos que una vez, dos veces, o tres veces por semana. En algunas realizaciones, el polipéptido se administra por vía subcutánea al menos una vez, dos veces, o tres veces por día. En algunas realizaciones, el polipéptido se administra por vía subcutánea dos veces

por día. En algunas realizaciones, el polipéptido se administra por vía subcutánea menos que una vez por día.

5 La solicitud describe procedimientos para determinar una dosificación efectiva del polipéptido para la administración a un sujeto que tiene una afección asociada a angiogénesis inapropiada. El procedimiento comprende determinar primero la concentración plasmática basal de VEGF-A, administrar una dosificación del polipéptido al sujeto, determinar la concentración plasmática de VEGF-A en el sujeto después de la administración, y después ajustar la dosificación del polipéptido para lograr al menos un incremento del 20% en la concentración plasmática de VEGF-A en el sujeto respecto de la concentración plasmática basal de VEGF-A.

10 En algunas realizaciones, la concentración plasmática de VEGF-A se determina al menos 2, 4, 6, 8, 12, o 24 horas después de la administración del polipéptido. En algunas realizaciones, la concentración plasmática de VEGF-A determinada es la concentración pico. En algunas realizaciones, la dosificación se ajusta para lograr al menos un incremento del 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% o más en la concentración plasmática de VEGF-A respecto de la concentración plasmática basal de VEGF-A. En algunas realizaciones, la dosificación se ajusta para lograr un incremento máximo en la concentración plasmática de VEGF-A respecto del valor basal.

15 En algunas realizaciones, la concentración plasmática basal de VEGF-A se determina mediante la medición de la concentración plasmática de VEGF-A en un sujeto previo al comienzo de la terapia con polipéptido, es decir, antes de que al sujeto se le haya administrado alguna vez un polipéptido de la invención. En algunas realizaciones, la concentración basal se determina mediante la medición de la concentración plasmática de VEGF-A en un sujeto que pasa por terapia con polipéptido previo a la administración del polipéptido, por ejemplo, cuando el polipéptido ha alcanzado su nivel valle. En algunas realizaciones, la concentración basal se determina en base a la concentración plasmática promedio de VEGF-A en una población.

20 En los procedimientos descritos más arriba, el polipéptido comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), comprendiendo el dominio ¹⁰F_n3 (i) un bucle AB, un bucle BC, un bucle CD, un bucle DE, un bucle EF, y un bucle FG (ii) posee al menos un bucle seleccionado de bucle BC, DE, y FG con una secuencia de aminoácidos alterada respecto de la secuencia del bucle correspondiente del dominio 10F_n3 humano, y (iii) se une a VEGFR2 humano con una constante de disociación de 1 μM o menor. El polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NO: 4 o SEC ID NO: 5.

25 La solicitud describe procedimientos para determinar la eficacia de un polipéptido en el tratamiento de un sujeto que tiene una afección asociada a angiogénesis inapropiada, que comprende determinar la concentración plasmática basal de VEGF-A, administrar una dosificación del polipéptido al sujeto, determinar la concentración plasmática de VEGF-A en el sujeto después de la administración, y determinar la eficacia del polipéptido en base al cambio de la concentración plasmática basal de VEGF-A en comparación con la concentración plasmática de VEGF-A determinada después de la administración del polipéptido.

30 En algunas realizaciones, la concentración plasmática de VEGF-A se determina al menos 2, 4, 6, 8, 12, o 24 horas después de la administración del polipéptido. En algunas realizaciones, la concentración plasmática de VEGF-A determinada es la concentración pico.

35 En algunas realizaciones, al menos un incremento del 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% o más en la concentración plasmática de VEGF-A después de la administración del polipéptido en comparación con la concentración basal de VEGF-A indica la eficacia del polipéptido en el tratamiento de un sujeto que tiene una afección asociada a angiogénesis inapropiada.

40 En el procedimiento descrito más arriba, el polipéptido comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), comprendiendo el dominio ¹⁰F_n3 (i) un bucle AB, un bucle BC, un bucle CD, un bucle DE, un bucle EF, y un bucle FG, (ii) posee al menos un bucle seleccionado del bucle BC, DE, y FG con una secuencia de aminoácidos alterada respecto de la secuencia del bucle correspondiente del dominio 10F_n3 humano, y (iii) se une a VEGFR2 humano con una constante de disociación de 1 μM o menor. El polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NO: 4 o SEC ID NO: 5.

45 La solicitud describe procedimientos para seguir una respuesta inmunogénica a un polipéptido administrado a un sujeto que comprende administrar una dosificación del polipéptido al sujeto, determinar la concentración plasmática de VEGF-A en el sujeto después de la administración, y comparar la concentración plasmática de VEGF-A determinada en el sujeto después de la administración y una concentración plasmática de VEGF-A determinada en el sujeto en uno o más puntos de tiempo previos. Una reducción en la concentración plasmática de VEGF-A determinada después de la administración respecto de la concentración determinada en uno o más puntos de tiempo previos indica una respuesta inmunogénica al polipéptido.

50 En algunas realizaciones, el punto de tiempo previo es antes de que el sujeto comenzara la terapia con polipéptido, es decir previo a que al sujeto se le haya administrado alguna vez el polipéptido. En algunas realizaciones, el punto de tiempo previo es uno, dos, tres, cuatro, cinco, o más meses previos. En algunas realizaciones, la concentración plasmática de VEGF-A determinada en uno o más puntos de tiempo previos es un promedio de la concentración plasmática de VEGF-A determinada en dos o más puntos de tiempo previos.

En algunas realizaciones, la concentración plasmática de VEGF-A determinada después de la administración del polipéptido se determina al menos 2, 4, 6, 8, 12, o 24 horas después de la administración del polipéptido. En algunas realizaciones, la concentración plasmática de VEGF-A determinada es la concentración pico.

5 En algunas realizaciones, al menos una reducción del 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% o más en la concentración plasmática de VEGF-A después de la administración del polipéptido en comparación con la concentración plasmática de VEGF-A determinada en uno o más puntos de tiempo previos indica una respuesta inmunogénica al polipéptido. En algunas realizaciones, la terapia con polipéptido es interrumpida con la indicación de una respuesta inmunogénica.

El sujeto tiene una afección asociada a angiogénesis inapropiada.

10 En el procedimiento descrito más arriba, el polipéptido comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), comprendiendo el dominio ¹⁰F_n3 (i) un bucle AB, un bucle BC, un bucle CD, un bucle DE, un bucle EF, y un bucle FG, (ii) posee al menos un bucle seleccionado del bucle BC, DE, y FG con una secuencia de aminoácidos alterada respecto de la secuencia del bucle correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 humano, y (iii) se une a VEGFR2 humano con una constante de disociación de 1 μM o menor. El polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NO: 4 o SEC ID NO: 5.

15 La solicitud describe procedimientos para controlar el riesgo de toxicidad de un polipéptido administrado a un sujeto, que comprende administrar una dosificación del polipéptido al sujeto, determinar la concentración plasmática de VEGF-A en el sujeto después de la administración, y comparar la concentración plasmática de VEGF-A determinada en el sujeto después de la administración y una concentración de toxicidad de VEGF-A. Una concentración plasmática de VEGF-A determinada después de la administración del polipéptido que es mayor que la concentración de toxicidad de VEGF-A indica un riesgo de toxicidad del polipéptido. En algunas realizaciones, la terapia con polipéptido es interrumpida con la indicación de un riesgo de toxicidad.

20 En algunas realizaciones, la concentración plasmática de VEGF-A determinada después de la administración del polipéptido se determina al menos 2, 4, 6, 8, 12, o 24 horas después de la administración del polipéptido. En algunas realizaciones, la concentración plasmática de VEGF-A determinada es la concentración pico.

25 En algunas realizaciones, la concentración de riesgo de toxicidad es una concentración plasmática de VEGF-A de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 μM o más. En algunas realizaciones, la concentración de riesgo de toxicidad se determina a partir de la concentración plasmática basal de VEGF-A del sujeto, es decir, la concentración plasmática de VEGF-A en un sujeto determinada previo al comienzo de la terapia con polipéptido. La concentración de riesgo de toxicidad es al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 veces o más la concentración de la concentración plasmática base de VEGF-A del sujeto. En algunas realizaciones, la concentración de riesgo de toxicidad de VEGF-A se determina en base a la concentración de riesgo de toxicidad promedio de VEGF-A en una población.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene una afección asociada a angiogénesis inapropiada.

35 En el procedimiento descrito más arriba, el polipéptido comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), comprendiendo el dominio ¹⁰F_n3 (i) un bucle AB, un bucle BC, un bucle CD, un bucle DE, un bucle EF, y un bucle FG, (ii) posee al menos un bucle seleccionado del bucle BC, DE, y FG con una secuencia de aminoácidos alterada respecto de la secuencia del bucle correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 humano; y (iii) se une a VEGFR2 humano con una constante de disociación de 1 μM o menor. El polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NO: 4 o SEC ID NO: 5.

40 En conformidad con la invención, el sujeto tiene una afección asociada a angiogénesis inapropiada seleccionada de un trastorno autoinmune, un trastorno inflamatorio, una retinopatía, y un cáncer.

45 En algunas realizaciones de los procedimientos descritos en la presente memoria, el polipéptido se administra como una formulación que comprende 1 a 15 mg/kg del polipéptido, 5 a 100 mM de acetato de sodio, 0 a 200 mM de cloruro de sodio, y 50 a 150 mM de manitol, en el que el pH de la formulación es de 4,5 a 6,0. La formulación también puede ser diluida previo a la administración.

50 Los polipéptidos de la invención se unen a VEGFR2 con alta afinidad. En algunas realizaciones, los polipéptidos se unen a VEGFR2 con una constante de disociación de aproximadamente 1 μM o menor, aproximadamente 10 nM o menor, o aproximadamente 1 nM o menor. En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención inhibe la unión de VEGF-A, VEGF-C y/o VEGF-D a VEGFR2 y no activa VEGFR2 humano en concentraciones sub CI50 en un ensayo basado en células con una CI50 menor que aproximadamente 1 nM o aproximadamente 100 pM. En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención induce apoptosis en un ensayo basado en células en una línea celular dependiente de la activación de VEGFR2. En algunas realizaciones, los ligandos de VEGFR2 bloquean las actividades de VEGFR2 tal como el control de apoptosis, fosforilación o dimerización.

55 A menudo será deseable, particularmente en las aplicaciones in vivo, que las proteínas de la invención que reconocen VEGFR2 como un agente terapéutico mono-específico o productos terapéuticos multiespecíficos

(incluyendo biespecífico o trispecífico) sean selectivas sobre VEGFR2 en comparación con VEGFR1 o VEGFR3. Dicha selectividad es preferentemente de al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 1000 veces, al menos aproximadamente 10.000 veces y al menos aproximadamente 100.000 veces. Además, puede ser deseable, particularmente para las proteínas con alta afinidad a VEGFR2 que no se unen en forma detectable a VEGFR1 o VEGFR3 en una concentración definida o inferior del agente terapéutico o proteína, dichas concentraciones son aproximadamente 100 nM, aproximadamente 1 μ M, o aproximadamente 10 μ M. Las relaciones de selectividad de las proteínas que se unen a VEGFR2 sobre VEGFR1 o VEGFR3 también puede expresarse mediante la comparación de Kd, CI50, y Ki's según lo medido o calculado dependiente del ensayo; o como una relación de los mismos parámetros bioquímicos o biológicos (por ejemplo, Kd, CI50, y Ki). Dichas relaciones preferentemente incluyen relaciones de la unión a VEGFR1 o VEGFR3 y VEGFR2 de aproximadamente 100, aproximadamente 1.000, aproximadamente 10.000 o aproximadamente 100.000. Otras proteínas de la invención que se unen a otras dianas, particularmente receptores de tirosina quinasa, preferentemente son selectivos para la diana deseada (por ejemplo, EGFR o Her2) en comparación con una diana estrechamente relacionada mediante la utilización de la guía de selectividad proporcionada en la presente memoria.

El polipéptido comprende una proteína adaptadora a base de fibronectina. En algunas realizaciones, el polipéptido que comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), comprendiendo el dominio ¹⁰F_n3 (i) un bucle AB, un bucle BC, un bucle CD, un bucle DE, un bucle EF, y un bucle FG, (ii) posee al menos un bucle seleccionado del bucle BC, DE, y FG con una secuencia de aminoácidos alterada respecto de la secuencia del bucle correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 humano, y (iii) se une a VEGFR2 humano con una constante de disociación de aproximadamente 1 μ M o menor. El bucle BC y bucle FG tienen una secuencia de aminoácidos alterada respecto de la secuencia del bucle correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 humano. La unión sustancialmente monovalente a VEGFR2 a través de las proteínas adaptadoras basadas en fibronectina es útil en la reducción de la activación de VEGFR2 en esta y otras realizaciones de la invención.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de la invención además comprenden uno o más restos farmacocinéticos (PK). Los restos PK mejoran una o más propiedades farmacocinéticas de los polipéptidos, por ejemplo, biodisponibilidad, vida media sérica, estabilidad in vivo, y distribución farmacológica. En algunas realizaciones, el resto PK es seleccionado de: un resto de polioxialquileno; una proteína de unión a albúmina sérica humana; ácido siálico; albúmina sérica humana, transferrina, y Fc o un fragmento de Fc. En algunas realizaciones, el resto PK es polietilenglicol (PEG). En algunas realizaciones, el resto PEG está covalentemente ligado al polipéptido de la invención a través de un aminoácido Cys o Lys. En algunas realizaciones, un polipéptido de la invención está ligado por al menos un enlace peptídico a una segunda proteína que se une a la albúmina sérica humana (HSA) con una afinidad de unión de aproximadamente 300 nM o menor.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de la invención además comprenden un segundo dominio que se une a una proteína humana. En algunas realizaciones la proteína humana se selecciona de IGF-IR, EGFR, receptor folato, Her2, Her3, c-kit, c-Met, FGFR1, FGFR2, PDGFR, VEGFR1, VEGFR2, VEGF3, Tie2, Ang1, Ang2, FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), EGF (factor de crecimiento epidérmico), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), VEGF-A (factor de crecimiento endotelial vascular-A), VEGF-C, y VEGF-D. En algunas realizaciones, la proteína humana es un receptor de tirosina. En algunas realizaciones, el segundo dominio se une a una proteína humana con una constante de disociación de aproximadamente 1 μ M o menor, aproximadamente 10 nM o menor, o aproximadamente 1 nM o menor.

En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una primera y segunda proteína, siendo cualquiera o ambas proteínas un anticuerpo de cadena sencilla y la primera y segunda proteínas están ligadas a través de un resto PEG. En algunas realizaciones, la primera proteína se une a VEGFR2.

En algunas realizaciones, el segundo dominio se selecciona de: un resto de anticuerpo menor que aproximadamente 50 kDa; un derivado de lipocalina; un derivado de tetranectina, un avímero; un derivado de anquirina, y un segundo décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), comprendiendo el segundo dominio ¹⁰F_n3 un bucle AB, un bucle BC, un bucle CD, un bucle DE, y un bucle FG, y posee al menos un bucle seleccionado del bucle BC, DE, y FG con una secuencia de aminoácidos aleatorizada respecto de la secuencia del bucle correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 humano, y se une a una proteína humana, que no están unida por el dominio ¹⁰F_n3 humano, con una disociación constante de aproximadamente 10 nM o menor. En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención y el segundo dominio están ligados en forma operativa a través de al menos un enlace disulfuro, un enlace péptido, un polipéptido, un azúcar polimérico, o un resto polietilenglicol (PEG). En algunas realizaciones, PEG está entre aproximadamente 0,5 kDa y aproximadamente 100 kDa.

En algunas realizaciones de la invención, los polipéptidos de la invención comprenden una primera y segunda proteína ligada a través de un polipéptido, en el que la primera o segunda proteína o conector polipeptídico posee un sitio proteasa que es escindible por una proteasa en la sangre o tejido diana. Dichas realizaciones pueden utilizarse para liberar dos o más proteínas terapéuticas para mejor administración o propiedades terapéuticas o producción más eficiente en comparación con la producción en forma separada de dichas proteínas.

En algunas realizaciones, una primera y segunda proteína son ligadas mediante la utilización de un polímero biocompatible tal como un azúcar polimérico. Dicho azúcar polimérico puede incluir un sitio de escisión enzimática

que es escindible por una enzima en la sangre o tejido diana. Dichas realizaciones pueden utilizarse para liberar dos o más proteínas terapéuticas para la mejor administración o propiedades terapéuticas o producción más eficiente en comparación con la producción en forma separada de dichas proteínas.

Otro aspecto de la invención es la unión operativa de una o más proteínas de la invención, u otras proteínas descritas en la presente memoria para fabricar una liproteína terapéutica de la invención, a través de un polímero para crear proteínas de función múltiple. Por ejemplo, el polímero podría ser un polipéptido, azúcar polimérico, polímero a base de carbón (por ejemplo, cadena alifática) o PEG. Un aspecto adicional de la invención incluye ligar una proteína de la invención que se une a VEGFR2 según lo que se describe en la presente memoria con PEG a otra proteína, tal como: un Fab, un Ab de cadena sencilla, anticuerpos de dominio, anticuerpos de camello y sus derivados (particularmente entidades menores que aproximadamente 50 kDa), resto de anticuerpo (por ejemplo, menores que aproximadamente 50 kDa), una Adteina (por ejemplo, una proteína entre 5 y 40 kDa que se une a una diana con una especificidad deseada mientras posee una o más propiedades farmacéuticas o bioquímicas descritas en la presente memoria, particularmente aquellas relacionadas a receptores de tirosina quinasa), una proteína adaptadora a base de fibronectina (por ejemplo, una AdnectinTM), o alternativas de anticuerpos, tales como Avímeros, microcuerpos, Trans-cuerpos, AffibodiesTM, AffilinsTM, o trinectinas (por ejemplo, tetranectinas) y otros derivados de proteínas como lipocalina, o anquirina (DARPin). En algunas realizaciones, las primera y segunda proteínas ligadas colectivamente poseen 1 o 0 enlaces disulfuro. Esto puede ser deseable para mejorar la producción de proteína en sistemas basados en células. Preferentemente, dicha primera proteína es sustancialmente un dominio único que posee unión sustancialmente monovalente a VEGFR2. Esto puede ser deseable para mejorar la producción de proteína en sistemas basados en células. Preferentemente, dicha primera proteína se une a VEGFR2 humano con una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o menor y posee al menos dos bucles estructurales que participan en la unión de dicha primera proteína a VEGFR2 humano. Preferentemente, dicha segunda proteína es una proteína adaptadora a base de fibronectina ligada por al menos un enlace peptídico a dicha primera proteína. En algunas realizaciones, dicha primera proteína y segunda proteína están ligadas por al menos un enlace disulfuro. Aunque esto puede lograrse en células, puede desearse llevar a cabo esta unión in vitro sin células. El polipéptido de la invención puede incluir una primera proteína que se une a VEGFR2 humano con una afinidad de unión de aproximadamente 300 pM o menor y posee al menos dos bucles estructurales que participan en la unión de dicha primera proteína a VEGFR2 humano. Preferentemente, dicha primera proteína se une a VEGFR2 humano con una afinidad de unión de aproximadamente 1 nM o menor y se une al receptor de insulina humano con una afinidad de unión de aproximadamente 1 μM o mayor. Preferentemente, el polipéptido de la invención además comprende un resto PEG operativamente ligado a dicha primera proteína o dicha segunda proteína. Preferentemente, dicha segunda proteína se une al receptor tirosina quinasa humano aumentado en un cáncer humano, en el que dicha segunda proteína se une al receptor tirosina quinasa humano con una afinidad de unión de aproximadamente 10 nM o menor y se une al receptor de insulina humano con una afinidad de unión de aproximadamente 1 μM o mayor.

En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención puede comprender una primera proteína y dicha segunda proteína que colectivamente tienen al menos 6 enlaces disulfuro o, en otro aspecto, colectivamente tienen al menos 8 enlaces disulfuro. Preferentemente, dicha primera proteína y dicha segunda proteína son un polipéptido sencillo expresado de un microbio. Preferentemente, dicha primera proteína se une a VEGFR2 humano con una afinidad de unión de aproximadamente 100 pM o menor y posee al menos dos bucles estructurales que participan en la unión de dicha primera proteína a VEGFR2 humano. En algunas realizaciones, al menos una de dicha primera proteína y dicha segunda proteína es un resto de anticuerpo. Preferentemente, dicho resto de anticuerpo es menor que aproximadamente 50 kDa o, en otro aspecto, es menor que aproximadamente 40 kDa. En algunas realizaciones, el resto de anticuerpo es un resto de anticuerpo de cadena sencilla. El agente terapéutico proteico incluye una realización en la que dicha segunda proteína se une a una de las siguientes proteínas: EGFR, Ang1, Ang2, FGF, EGF, HGF, factor de célula madre (SCF), VEGF-A, VEGF-C, y VEGF-D. En algunas realizaciones, la primera proteína y/o la segunda proteína son un derivado de lipocalina. En algunas realizaciones, al menos una de dicha primera proteína y dicha segunda proteína es un derivado de una tetranectina. En algunas realizaciones, al menos uno de dicho primer resto proteico y dicho segundo resto proteico es un derivado de un avímero.

Puede utilizarse PEG en muchos aspectos de la invención y pueden utilizarse diferentes tamaños según lo que se describe en la presente memoria para el agente terapéutico deseado u otro efecto in vivo, tal como imagen. Los PEG más grandes son preferentes para incrementar la vida media en el cuerpo, sangre, fluidos extracelulares no sanguíneos o tejidos. Para la actividad celular in vivo, son preferentes los PEG del intervalo de aproximadamente 10 a 60 kDa, así como los PEG menores que aproximadamente 100 kDa y más preferentemente menores que aproximadamente 60 kDa, aunque también pueden utilizarse tamaños mayores que aproximadamente 100 kDa. Para la aplicación de imagen in vivo, pueden utilizarse PEG más pequeños, en general menores que aproximadamente 20 kDa, que no incrementan la vida media tanto como los PEG mayores para permitir la distribución más rápida y menos vida útil.

En algunas realizaciones, los polipéptidos de la invención comprenden una primera proteína y segunda proteína operativamente ligadas a PEG a través de un Cys o Lys sencilla. En algunas realizaciones, al menos la primera o segunda proteína posee no más que una Cys o Lys sencilla. En algunas realizaciones, la Cys o Lys sencilla está ubicada en dicha primera o segunda proteína en una ubicación que no es natural en la secuencia de aminoácidos.

En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende una primera y segunda proteína, en el que dicha primera proteína inhibe la proliferación celular, posee una T_m de al menos 55°C, y una Cys o Lys que no es de tipo salvaje en la región de su secuencia de aminoácidos que no interfiere sustancialmente con la unión a VEGFR2 humano. En algunas realizaciones, la primera proteína y segunda proteína son un polipéptido sencillo expresado a partir de un microbio. En algunas realizaciones, la primera proteína se une a VEGFR2 humano con una afinidad de unión de aproximadamente 50 pM o menor y posee al menos dos bucles estructurales que participan en la unión de dicha primera proteína a VEGFR2 humano. En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención posee una vida media in vivo de al menos un día con administración IV. En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención posee un nivel de exposición en una concentración de al menos aproximadamente 10 veces la afinidad de unión de dicha primera proteína a VEGFR2 humano durante más de 24 horas en un roedor después de la administración. En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención posee un nivel de exposición en una concentración de al menos aproximadamente 100 veces la afinidad de unión de dicha primera proteína a VEGFR2 humano durante más de 24 horas en un roedor después de la administración subcutánea. En algunas realizaciones, la primera o segunda proteína es una proteína adaptadora a base de fibronectina.

Puede utilizarse una variedad de afinidades de los polipéptidos de la invención para VEGFR2, otras proteínas humanas, o restos PK dependiendo de la aplicación diagnóstica, terapéutica, in vitro o in vivo. Por ejemplo, son preferentes afinidades con una constante de disociación similar o menor que aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 1 pM o aproximadamente 100 fM, particularmente para VEGFR2. El ensayo in vivo de proteínas de la invención con diferente afinidad a la diana deseada ayuda en la selección de la afinidad deseada para aplicaciones in vivo. El ensayo in vitro dependiendo de la presencia de otras proteínas y cantidades de VEGFR2 en general puede utilizar proteínas de la invención de diferente afinidad en comparación con las aplicaciones in vivo. A menudo puede utilizarse menor afinidad o unión más débil in vitro.

Los polipéptidos comprenden proteínas adaptadoras a base de fibronectinas que se unen a una diana humana. En algunas realizaciones, los polipéptidos además comprenden restos PK según lo que se describe en la presente memoria. El resto PK puede estar ligado a la proteína estructural a base de fibronectina por cualquier conector apropiado, tal como aquellos descritos en la presente memoria.

Otro aspecto de la invención proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden los polipéptidos de la invención, estando la composición esencialmente libre de endotoxinas. Preferentemente, la composición sustancialmente está libre de contaminación microbiana haciéndola apropiada para la administración in vivo. La composición puede formularse, por ejemplo, para la administración subcutánea, IV, o IP.

Otro aspecto de la invención proporciona una célula que comprende un polinucleótido que codifica uno o más polipéptidos de la invención. Los vectores que contienen polinucleótidos para dichas proteínas también están incluidos. Las secuencias son preferentemente optimizadas para maximizar la expresión en el tipo de célula utilizada. Preferentemente, la expresión está en la E. coli. Las proteínas de la invención también pueden estar expresadas, por ejemplo, en microbios eucarióticos, que incluyen levadura (por ejemplo, pichia o cervasea) o algas verde azul. Las células de levadura pueden manipularse genéticamente para producir las glicosilaciones deseadas en cualquiera de las proteínas descritas en la presente memoria. Las células de la invención pueden ser una célula de mamífero. En un aspecto, la célula de mamífero puede manipularse genéticamente para producir las glicosilaciones deseadas en cualquiera de las proteínas descritas en la presente memoria. En un aspecto, la célula expresa una proteína adaptadora a base de fibronectina. En un aspecto, los polinucleótidos que codifican la proteína adaptadora a base de fibronectina son optimizados por codón para la expresión en el tipo de células seleccionado.

Otro aspecto de la invención se refiere al tratamiento de un sujeto que posee un cáncer mediante la administración de un polipéptido de la invención, sólo o en combinación con otros agentes terapéuticos o citotóxicos. En particular, los agentes terapéuticos o citotóxicos preferentes incluyen docetaxel, paclitaxel, doxorubicina, epirubicina, ciclofosfamida, trastuzumab, capecitabina, tamoxifen, toremifeno, letrozol, anastrozol, fulvestrant, exemestano, goserelina, oxaliplatino, carboplatino, cisplatino, dexametasona, antida, bevacizumab, 5-fluorouracil, leucovorina, levamisol, irinotecan, etoposido, topotecan, gemcitabina, vinorelbina, estramustina, mitoxantrona, abarelix, zoledronato, estreptozocina, rituximab, idarubicina, busulfan, clorambucilo, fludarabina, imatinib, citarabina, ibritumomab, tositumomab, interferon alfa- 2b, melfalam, bortezomib, altretamina, asparaginasa, gefitinib, erlonitib, anticuerpo del receptor anti-EGF (por ejemplo, cetuximab o panitumumab), ixabepilona, y una epotilona o derivado de la misma. Más preferentemente, el agente terapéutico es un agente de platino (tal como carboplatino, oxaliplatino, cisplatino), un taxano (tal como paclitaxel, docetaxel), gemcitabina, o camptotecina.

Además, puede ser preferente combinar un polipéptido de la invención con una segunda proteína terapéutica como una molécula única o tal vez como una molécula única con una tercera proteína terapéutica. Dicha entidad terapéutica comprende una proteína de la invención ligada a PEG u otro polímero (por ejemplo, disulfuro Cys- Cys o polipéptido) a una o más proteínas terapéuticas. Dichas proteínas terapéuticas incluyen derivados de anticuerpo (por ejemplo, Fabs, anticuerpos de camello y sus derivados, anticuerpos de dominio (por ejemplo, menores que aproximadamente 50 kDa en tamaño) y cadenas sencillas (preferentemente menores que aproximadamente 50 kDa en tamaño), Adnectins™ y proteínas preferentemente en el intervalo de ~5 a ~40 kDa.

Las dianas de proteínas de la invención incluyen, particularmente versiones humanas, aunque en algunos casos especies modelo tales como ratón, rata, mono y perro: IGF-IR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, c-Kit, tirosina quinasa similar al receptor p185 humana (HER2 o Her2), Her3, c-Met, receptor folato, PDGFR, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, VEGF A, VEGF C, VEGF D, CD20 humana, CD18 humana, CD11a humana, receptor-2 apoptosis humana (Apo-2), alfa.4.beta.7 integrina humana, GPIIb-IIIa integrina humana, factor de células madre (SCF), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR), y CD3 humana. Además, los aspectos de la invención incluyen proteínas multifuncionales que se unen a una primera diana y al menos a otra diana. Preferentemente, dichas proteínas están ligadas por las invenciones relacionadas con PEG descritas en la presente memoria, Aunque en muchas realizaciones dichas proteínas pueden estar conectadas por polipéptidos u otros conectores poliméricos o conectores no poliméricos.

Las proteínas de la invención ligadas en forma estable pueden ser útiles para el tratamiento terapéutico del cáncer. Las proteínas de la invención multispecíficas tienen la ventaja de modular, bloquear o inhibir más que una diana terapéutica cuando están dirigidas a 2, 3, 4 o más dianas terapéuticas o epitopos.

Se prevé que cualquier tipo de tumor y cualquier tipo de antígeno tumoral puede ser reconocido con la biología correspondiente del agente terapéutico. El cáncer puede ser uno o más de, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de colon, carcinoma ovárico, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma sinovial, cáncer pancreático, melanoma, mieloma múltiple, neuroblastoma, y rhabdomyosarcoma, u otro cáncer aún a ser determinado en el que los niveles de VEGFR2 son elevados, aumentados, mutados o alterados en la fisiología en comparación con células no oncogénicas.

Otros tipos ejemplares de tumores que pueden ser reconocidos incluyen leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, cáncer biliar, cáncer de mama, cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer colorectal, cáncer endometrial, cáncer esofágico, gástrico, de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, cáncer de pulmón, cáncer tiroideo medular, linfoma de no Hodgkin, mieloma múltiple, cáncer renal, cáncer ovárico, cáncer pancreático, glioma, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de próstata, y cáncer de vejiga urinaria.

Adicionalmente, las dianas asociadas al tumor pueden ser reconocidas por polipéptidos de la invención. En algunas realizaciones el reconocimiento de antígenos ayudará a localizar el agente terapéutico en términos de distribución de tejido o efecto incrementado en la concentración local en el tejido o tipo de célula deseada. Alternativamente, se puede proporcionar un mecanismo de acción adicional para combatir el cáncer junto con una de las dianas descritas en la presente memoria para la que se fabrica un agente terapéutico. Dichos antígenos o dianas incluyen, pero no se limitan a, anhidrasa carbónica IX, A3, antígeno específico para anticuerpo A33, antígeno BrE3, CD1, CD1a, CD3, CD5, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD45, CD74, CD79a, CD80, HLA-DR, NCA 95, NCA90, HCG y sus subunidades, CEA (CEACAM-5), CEACAM-6, CSAP, EGFR, EGP-1, EGP-2, Ep-CAM, Ba 733, HER2/neu, factor inducible por hipoxia (HIF), antígeno KC4, antígeno KS-1, KS1-4, Le-Y, factor de inhibición de macrófagos (MIF), MAGE, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, antígeno PAM- 4, PSA, PSMA, RS5, S100, TAG- 72, p53, tenascina, IL-6, IL-8, factor de crecimiento de insulina I (IGF-1), factor de crecimiento de insulina II (IGF-II), antígeno Tn, antígenos Thomson- Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, factor de crecimiento de placenta (P1GF), antígeno 17-1A-, marcador de angiogénesis (por ejemplo, fibronectina ED-B), un marcador oncogénico, un producto oncogénico, y otros antígenos asociados al tumor. Informes recientes sobre antígenos asociados a tumores incluyen Mizukami et al., (2005, Nature Med. 11:992-97); Hatfield et al., (2005, Curr. Cancer Drug Targets 5:229-48); Vallbohmer et al. (2005, J. Clin. Oncol. 23:3536-44); y Ren et al. (2005, Ann. Surg. 242:55-63).

En otras realizaciones, un agente antiangiogénico puede formar una porción de un agente terapéutico y puede estar operativamente ligado a una proteína de la invención. Los agentes antiangiogénicos de uso incluyen angiostatina, baculostatina, canstatina, maspina, anticuerpo o péptidos anti-VEGF, anticuerpo o péptidos de factor de crecimiento antiplacentario, anticuerpos anti- Flk-1, anticuerpo o péptidos anti-Flt-1, péptidos de laminina, péptidos de fibronectina, inhibidores activadores de plasminógeno, inhibidores de metaloproteinasas tisulares, interferones, interleucina 12, IP-10, Gro-beta., trombospondina, 2-metoxioestradiol, proteína relacionada con la proliferina, carboxiamidotriazol, CM101, Marimastat, polisulfato pentosan, angiopoietina 2, interferón alfa, herbimicina A, PNU145156E, fragmento de prolactina 16K, Linomida, talidomida, pentoxifilina, genisteina, TNP-470, endostatina, paclitaxel, accutina, angiostatina, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM-1470, factor de plaquetas 4 o minociclina.

Otro aspecto de la invención proporciona kits que comprenden uno o más de los elementos descritos en la presente memoria, y las instrucciones para el uso de aquellos elementos. En una realización preferente, un kit de la presente invención incluye una proteína de la invención, sola o con un segundo agente terapéutico. Las instrucciones para esta realización preferente incluyen instrucciones para inhibir el crecimiento de una célula cancerígena mediante la utilización de una proteína de la invención, sola o con un segundo agente terapéutico, y/o instrucciones para un procedimiento para tratar un paciente que posee un cáncer mediante la utilización de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 describe el efecto de bloqueo de Comp-I de la activación de VEGFR2 en un Ensayo de Proliferación de Líneas Celulares Pro-B Murinas. El eje X indica la concentración del Comp-I (nM), el eje Y indica la DO (490).

- La Figura 2 demuestra el efecto del tratamiento bisemanal con vehículo (-*-), 30 mg/kg de Comp-I (-▲-), o 5 mg/kg de bevacizumab (-X-) en el volumen tumoral en el modelo de xenoinjerto U87 en el transcurso de 20 días. Los días desde el tratamiento inicial están representados en el eje X; el volumen tumoral (mm^3) está representado en el eje y.
- 5 La Figura 3 demuestra el efecto del tratamiento con vehículo (D), 60 mg/kg de Comp-I (A), 60 mg/kg de sunitinib (B), y 60 mg/kg de sorafenib (C) del tamaño tumoral en un modelo de carcinoma de colon Colo205. El porcentaje de ratones con tumores menores que 500 mm^3 está representado en el eje y, el número de días después del tratamiento en el eje x.
- 10 La Figura 4 demuestra el efecto del Comp-I en la densidad microvascular en un modelo de xenoinjerto en ratón de glioblastoma humano U87. El anticuerpo monoclonal VEGFR2 anti-ratón en ratas DC101 (ATCC) también se ensayó. La densidad microvascular (mm^2)⁻¹ está representada en el eje y. El Comp-I se administró tres veces semanalmente en 3, 10, y 30 mg/kg. DC101 se administró en 40 mg/kg, dos veces por semana.
- La Figura 5 describe el incremento en la presión arterial observado después del tratamiento de ratas con Comp-I. El tiempo en horas está representado en el eje x, la presión arterial media (mm Hg) está representada en el eje y.
- 15 La primera flecha a lo largo del eje x indica la administración de vehículo, mientras la segunda flecha indica la administración del Comp-I. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.
- La Figura 6 demuestra que el perfil farmacocinético de la primera dosis es similar entre los sujetos del ensayo de fase I. Las concentraciones del Comp-I se midieron con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). El Comp-I (1.M) está representado en el eje y, el tiempo en semanas está representado en el eje x.
- 20 La Figura 7 demuestra que el perfil farmacocinético es similar después de 6 meses de tratamiento con 1 mg/kg de Comp-I semanal. Los resultados se muestran para el sujeto 1003. El Comp-I (FM) está representado en el eje y, el tiempo en semanas está representado en el eje x. El perfil PK del primer tratamiento está marcado por triángulos, el perfil PK después de 6 meses está marcado por cuadrados.
- La Figura 8 demuestra que los niveles valle del Comp-I son consistentes en el tiempo. El cambio porcentual de la concentración del Comp-I desde el primer punto más bajo está representado en el eje y como un promedio de las dos cohortes de pacientes.
- 25 Las Figuras 9A y 9B describen el porcentaje de animales que sobrevivieron con tumores más pequeños que 300 mm^3 (Figura 9A) y 1000 mm^3 (Figura 9B) con el tratamiento con Comp-I tres veces por semana.
- La Figura 10 describe los niveles de VEGF-A inducidos por Comp-I en ratones. N=3 para todos los grupos. Las barras de error indican la DT de la media.
- 30 La Figura 11 demuestra que los niveles plasmáticos de VEGF-A previos a la infusión son mayores que 70% de los niveles (pico) de cuatro horas posteriores a la infusión después de un tratamiento semanal. La concentración de VEGF-A (pM) está representada en el eje y.
- La Figura 12 demuestra el efecto del tratamiento con Comp-I en los niveles plasmáticos de VEGF-A. Los resultados del sujeto 1002 con 1 mg/kg de dosificación del Comp-I. La primera flecha indica el tratamiento inicial con Comp-I., la segunda flecha indica el tiempo del segundo tratamiento. La concentración de VEGF-A (pM) está representada en el eje y.
- 35 La Figura 13 muestra que los niveles de VEGFR2 soluble en plasma se mantienen significativamente arriba del valor basal en el tiempo después del tratamiento. La concentración de VEGFR2 (pM) soluble en plasma (eje x) de los tres sujetos está representada contra el número de días después del tratamiento inicial (eje y).
- 40 La Figura 14 describe la farmacocinética promedio del Comp-I para los 6 sujetos tratados semanalmente con 1 mg/kg (círculos) y los 6 sujetos tratados semanalmente con 3 mg/kg (cuadrados). El número de días desde la administración está representado en el eje x, la concentración del Comp-I (μM) está representada en el eje y.
- La Figura 15 describe un diagrama esquemático de un modelo de Berkley Madonna definido como un compartimento subcutáneo que se distribuye con un proceso de primer orden (k_1) a un compartimento sistémico en el que el fármaco es eliminado posteriormente por un proceso de primer orden (k_2).
- 45 La Figura 16 describe el modelo farmacocinético del Comp-I. Los días se representan en el eje x, la concentración plasmática del Comp-I (μM) representada en el eje y. El perfil farmacocinético previsto está representado para la dosificación subcutánea de 0,1 mg/kg una vez por día de Comp-I (marcada como "A"), dosificación subcutánea de 0,1 mg/kg una vez por día del Comp-I con una dosis de saturación inicial intravenosa de 1 mg/kg del Comp-I (marcada como "B"), y la administración intravenosa del Comp-I de 1 mg/kg una vez semanalmente.
- 50

Descripción detallada de la invención**Definiciones**

Por un "polipéptido" se quiere significar cualquier secuencia de dos o más aminoácidos, sin importar la longitud, modificación posterior a la traducción, o función. "Polipéptido," "péptido," y "proteína" se utilizan en forma intercambiable en la presente memoria. Los polipéptidos pueden incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales tales como aquellos descritos en la Patente Estadounidense Núm. 6.559.126. Los polipéptidos también pueden modificarse en cualquiera de una variedad de formas químicas estándar (por ejemplo, un aminoácido puede modificarse con un grupo protector; el aminoácido terminal carboxi puede convertirse en un grupo amida terminal; el residuo terminal amino puede modificarse con los grupos, por ejemplo, para aumentar la lipofilicidad; o el polipéptido puede glicosilarse químicamente o de otras maneras para incrementar la estabilidad o vida media in vivo. Las modificaciones del polipéptido pueden incluir la unión a otra estructura tal como un compuesto cíclico u otras moléculas al polipéptido y también pueden incluir polipéptidos que contienen uno o más aminoácidos en una configuración alterada (es decir, R o S; o, L o D). El término "polipéptido de dominio único" se utiliza para indicar que la actividad de unión a la diana (por ejemplo, actividad de unión a VEGFR2) del polipéptido del sujeto está situada dentro de un dominio estructural único, a diferencia de, por ejemplo, los anticuerpos y anticuerpos de cadena sencilla, en el que la actividad de unión al antígeno en general está contribuida por ambos un dominio variable de cadena pesada y un dominio variables de cadena liviana. Se contempla que una pluralidad de polipéptidos de dominio único del tipo desvelado en la presente memoria podría conectarse a una molécula compuesta con actividad incrementada. De la misma manera, un polipéptido de dominio único puede unirse (por ejemplo, como una proteína de fusión) a cualquier número de otros polipéptidos, tales como polipéptidos fluorescentes, polipéptidos de reconocimiento y polipéptidos que poseen un efecto distinto del agente terapéutico.

El término "PK" es un acrónimo de "farmacocinética" y abarca las propiedades de un compuesto que incluyen, a modo de ejemplo, absorción, distribución, metabolismo, y eliminación por un sujeto. Una "proteína de modulación PK" o "resto PK" se refiere a cualquier proteína, péptido, o resto que afecta las propiedades farmacocinéticas de una molécula biológicamente activa cuando se fusiona a o es administrado junto con la molécula biológicamente activa. Los ejemplos de una proteína de modulación PK o resto PK incluyen PEG, ligantes de albúmina sérica humana (HSA) (según lo desvelado en las Publicaciones Estadounidenses N° 20050287153 y 20070003549), albúmina sérica humana, fragmentos Fc o Fc, y azúcares (por ejemplo, ácido siálico).

Los polipéptidos de dominio único de inmunoglobulina o proteína adaptadora similar a la inmunoglobulina tenderán a compartir ciertas características estructurales. Por ejemplo, el polipéptido puede comprender entre aproximadamente 80 y aproximadamente 150 aminoácidos, cuyos aminoácidos están estructuralmente organizados en un conjunto de hebras beta o similares a beta, formando laminas beta, en las que las hebras beta o similares a beta están conectadas por porciones de bucles intervinentes. Las láminas beta forman el núcleo estable de los polipéptidos de dominio único, creando al mismo tiempo dos "caras" compuestas de bucles que conectan las hebras beta o similares a beta. Según lo que se describe en la presente memoria, estos bucles pueden variarse para crear sitios de unión de ligando adaptados, y, con control apropiado, dichas variaciones pueden generarse sin alterar la estabilidad general de la proteína. En anticuerpos, tres de estos bucles son las bien conocidas Regiones Determinantes de Complementariedad (o "CDR").

Las proteínas adaptadoras para la formación de polipéptidos de dominio único deben ser altamente solubles y estables en condiciones fisiológicas. Los ejemplos de proteínas adaptadoras de inmunoglobulina son la proteína adaptadora V_H o V_L de dominio único, así como un dominio V_{HH} de camélido de dominio único (una forma de dominio pesado variable encontrado en camélidos) u otros dominios variables de inmunoglobulina encontrados en la naturaleza o manipulados genéticamente en el laboratorio. En el formato de dominio único desvelado en la presente memoria, un polipéptido de inmunoglobulina no necesita formar un dímero con un segundo polipéptido para lograr la actividad de unión. Por consiguiente, cualquier de dichos polipéptidos que naturalmente contienen una cisteína que media la reticulación de disulfuro a una segunda proteína puede alterarse para eliminar la cisteína. Alternativamente, la cisteína puede retenerse para el uso en la conjugación de restos adicionales, tales como PEG, con el polipéptido de dominio único.

Otras proteínas adaptadoras pueden ser proteínas adaptadoras no anticuerpos. Por "proteína adaptadora no anticuerpo o dominio" se quiere significar un polipéptido no anticuerpo que posee un pliegue similar a la inmunoglobulina. Por "pliegue similar a la inmunoglobulina" se quiere significar un dominio proteico de entre aproximadamente 80-150 residuos de aminoácidos que incluye dos capas de láminas beta antiparalelas, y en el que las caras hidrofóbicas, planas de las dos láminas beta están empaquetadas una contra otra. Un ejemplo de dicha proteína adaptadora es la "proteína adaptadora a base de fibronectina", por la que se quiere significar un polipéptido en base a un dominio de fibronectina de tipo III (Fn3). Un ejemplo de proteínas adaptadora a base de fibronectina son los Adnectins™ (Adnexus Therapeutics, Inc.). La fibronectina es una proteína grande que desempeña papeles esenciales en la formación de matriz extracelular e interacciones célula-célula; consiste en muchas repeticiones de tres tipos (tipos I, II, y III) de pequeños dominios (Baron et al., 1991). La misma Fn3 es el paradigma de una gran subfamilia que incluye porciones de moléculas de adhesión celular, hormona de superficie celular y receptores de citocina, acompañamiento, y dominios de unión a carbohidratos. Para recapitulaciones véase Bork & Doolittle, Proc Natl Acad Sci EEUU. 1 de octubre de 1992; 89(19):8990-4; Bork et al., J Mol Biol. 30 de septiembre de

1994;242(4):309-20; Campbell & Spitzfaden, Structure. 15 de mayo de 1994;2(5):333-7; Harpez & Chothia, J Mol Biol. 13 de mayo de 1994; 238(4):528-39).

Preferentemente, la proteína adaptadora basada en fibronectina es una proteína adaptadora ¹⁰Fn3, por la que se quiere significar una variante de polipéptido basada en el modulo décimo de la proteína de fibronectina humana de tipo III en la que uno o más de los bucles accesibles a disolvente han sido aleatorizados o mutados, particularmente uno o más de los tres bucles identificados como bucle BC (aminoácidos 23-30), bucle DE (aminoácidos 52-56) y bucle FG (aminoácidos 77-87) (el esquema de numeración es en base a la secuencia en el modulo décimo de tipo salvaje del dominio de fibronectina humana de tipo III:

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATIS.

10 GLKPGVDYITITGYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEC ID NO:1). Preferentemente, las proteínas adaptadora a base de fibronectina son en base a SEC ID NO:1.

Se ha informado de una variedad de proteínas adaptadoras 10fen3 mutantes. En un aspecto, uno o más de Asp 7, Glu 9, y Asp 23 es reemplazado por otro aminoácido, tal como, por ejemplo, un resto de aminoácido cargado no negativo (por ejemplo, Asn, Lys, etc.). Se ha informado de que estas mutaciones tienen el efecto de promover mayor estabilidad de ¹⁰Fn3 mutante en un pH neutral en comparación con la forma natural (Véase, Publicación PCT Núm. WO02/04523). Se ha desvelado una variedad de alteraciones adicionales en la proteína adaptadora 10fen3 que son beneficiosas o neutrales. Véase, por ejemplo, Batori et al., Protein Eng. Diciembre de 2002; 15(12):1015-20; Koide et al., Biochemistry, 8 de agosto de 2001;40(34):10326-33.

20 Ambas proteínas ¹⁰Fn3 variante y natural se caracterizan por la misma estructura, a saber, siete secuencias de dominio de hebra beta designadas A hasta G y seis regiones en bucle (bucle AB, bucle BC, bucle CD, bucle DE, bucle EF, y bucle FG) que conectan las siete secuencias de dominio de hebra beta. Las hebras beta posicionadas más cerca de los extremos terminal N y C pueden adoptar una conformación similar a beta en la solución. En la SEC ID NO: 1, el bucle AB corresponde a los residuos 15-16, el bucle BC corresponde a los residuos 22-30, el bucle CD corresponde a los residuos 39-45, el bucle DE corresponde a los residuos 51-55, el bucle EF corresponde a los residuos 60-66, y el bucle FG corresponde a los residuos 76-87. El bucle BC, bucle DE, y bucle FG están todos ubicados en el mismo extremo del polipéptido. En forma similar, las proteínas adaptadoras de inmunoglobulina tienden a tener al menos siete hebras beta o similares a beta, y a menudo nueve hebras beta o similares a beta. Las proteínas adaptadoras a base de fibronectina pueden incluir otros dominios de fibronectina de tipo Fn3 siempre que exhiban actividades útiles y propiedades similares a los dominios de tipo ¹⁰Fn3.

30 Un polipéptido de dominio único desvelado en la presente memoria puede tener al menos cinco a siete hebras beta o similares a beta distribuidas entre al menos dos láminas beta, y al menos una porción bucle que conecta dos hebras beta o similares a beta, cuya porción en bucle participa en la unión a VEGFR2, en la que la unión se caracteriza por una constante de disociación que es menor que $1 \times 10^{-6} M$, y preferentemente menor que $1 \times 10^{-8} M$. Según lo que se describe en la presente memoria, los polipéptidos que poseen una constante de disociación menor que $5 \times 10^{-9} M$ son particularmente deseables para el uso in vivo del agente terapéutico para inhibir la señalización del ligando. Los polipéptidos que poseen una constante de disociación de entre $1 \times 10^{-6} M$ y $5 \times 10^{-9} M$ pueden ser deseables para el uso en la detección o etiquetado, ex vivo o in vivo, de las proteínas. VEGFR2

Opcionalmente, la "proteína de unión a VEGFR2" se unirá específicamente a VEGFR2 respecto de otras proteínas relacionadas de la misma especie. Por "se une específicamente" se quiere significar un polipéptido que reconoce e interactúa con una proteína diana (por ejemplo, VEGFR2) pero que sustancialmente no reconoce e interactúa con otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica. En realizaciones preferentes un polipéptido de la invención se unirá específicamente a un VEGFR2 con un K_D al menos tan estrecho como 500 nM. Preferentemente, el polipéptido se unirá específicamente a un VEGFR2 con un K_D de 1 pM a 500 nM, más preferentemente 1 pM a 100 nM, más preferentemente 1 pM a 10 nM, y mucho más preferentemente 1 pM a 1 nM o inferior.

Una "región Fc funcional" posee al menos una "función efectora" de una región Fc de secuencia original. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC); fagocitosis; reducción de los receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor celular B; BCR), etc. Dichas funciones efectoras en general requieren que la región Fc sea combinada con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y puede evaluarse mediante la utilización de diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar dichas funciones efectoras de anticuerpos.

Una "región Fc de secuencia original" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza.

55 Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una región Fc de secuencia original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Preferentemente, la región Fc variante posee al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia original o la región Fc de un polipéptido progenitor, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de

aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia original o en la región Fc del polipéptido progenitor. La región Fc variante en la presente memoria preferentemente tendrá al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia original y/o con una región Fc de un polipéptido progenitor, y mucho más preferentemente al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia con la misma, más preferentemente al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con la misma.

"Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos" y "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan los receptores Fc (FcR) (por ejemplo, células citotóxicas (NK), neutrófilos, y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan FcyRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcyRI, FcyRII y FcyRIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede llevarse a cabo un ensayo de ADCC in vitro, tal como aquel descrito en las Patentes Estadounidenses Núm. 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) y células citotóxicas (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo, en un modelo animal tal como aquel desvelado en Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

"Identidad porcentual (%) de la secuencia de aminoácidos" en la presente memoria está definida como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido en una secuencia seleccionada, después de alinear las secuencias e introducir brechas, si es necesario, para lograr la máxima identidad porcentual de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación para los fines de determinar la identidad porcentual de la secuencia de aminoácidos puede lograrse de diferentes maneras que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, mediante la utilización de software informático públicamente disponible tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, que incluye cualquier algoritmo necesario para lograr la máxima alineación en una longitud completa de las secuencias que están siendo comparadas. Para los fines en la presente memoria, sin embargo, los valores de identidad % de secuencia de aminoácidos se obtienen según lo que se describe más abajo mediante la utilización del programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 creado por Genentech, Inc. ha sido presentado con documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington D.C., 20559, en el que está registrado bajo el Registro de Derecho de Autor de Estados Unidos Núm. TXU510087, y está públicamente disponible a través de Genentech, Inc., South San Francisco, Calif. El programa ALIGN-2 debe compilarse para el uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente digital UNIX V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

Para los fines en la presente memoria, la identidad % de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada y, con, o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de aminoácidos A dada que posee o comprende una cierta identidad % de la secuencia de aminoácidos y, con, o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula de la siguiente manera: 100 veces la fracción X/Y en la que X es el número de residuos de aminoácidos clasificado como pares idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en que la alineación del programa de A y B, y en el que Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, la identidad % de la secuencia de aminoácidos de A y B no igualará la identidad % de la secuencia de aminoácidos de B y A.

Una "cadena de polipéptidos" es un polipéptido en el que cada uno de los dominios del mismo está unido a los otros dominio/s mediante enlaces peptídicos, en contraposición a las interacciones no covalentes o enlaces disulfuro.

Un polipéptido "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían con los usos terapéutico o diagnóstico para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferentes, el polipéptido será purificado (1) hasta más que 95% en peso del polipéptido según lo determinado por el procedimiento de Lowry, y mucho más preferentemente más que 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos interna o terminal N mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones de reducción o no reducción mediante la utilización de tinción con Coomassie blue o, preferentemente, plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido in situ dentro de las células recombinantes ya que al menos un componente del medio natural del polipéptido no estará presente. Comúnmente, sin embargo, el polipéptido aislado será preparado por al menos una etapa de purificación.

Las dianas también pueden ser fragmentos de dichas dianas. De ese modo una diana también es un fragmento de dicha diana, capaz de producir una respuesta inmune. Una diana también es un fragmento de dicha diana, capaz de unirse a un anticuerpo de dominio único dirigido contra la diana de longitud completa.

Un fragmento según lo utilizado en la presente memoria se refiere a menos que 100% de la secuencia (por ejemplo, 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% etc.), pero que comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más aminoácidos. Un fragmento tiene suficiente longitud para que la interacción de interés se mantenga con afinidad de 1.veces. 10.sup.-6M o mejor.

5 Un fragmento según lo utilizado en la presente memoria también se refiere a inserciones opcionales, eliminaciones y sustituciones de uno o más aminoácidos que no alteran sustancialmente la capacidad de la diana de unirse a un anticuerpo de dominio único dirigido contra la diana natural. El número de inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos es preferentemente hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 10 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 o 70 aminoácidos.

Una proteína de la invención que "induce la muerte celular" es una que hace que una célula viable se vuelva no viable. La célula en general es una que expresa el antígeno al que se une la proteína, especialmente en la que la célula sobreexpresa el antígeno. Preferentemente, la célula es una célula cancerígena, por ejemplo, una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreática o de vejiga. In vitro, 15 la célula puede ser, por ejemplo, una célula SKBR3, BT474, Calu 3, MDA-MB453, MDA-MB-361 o SKOV3. La muerte celular in vitro puede ser determinada en ausencia de células efectoras inmunes y de complemento para distinguir la muerte celular inducida por citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). De ese modo, el ensayo para la muerte celular puede llevarse a cabo mediante la utilización de suero inactivado con calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de 20 células efectoras inmunes. Para determinar si la proteína de la invención es capaz de inducir la muerte celular, pérdida de integridad de membrana según lo evaluado por la captación de yoduro de propidio (PI), azul tripán (véase Moore et al. Cytotechnology 17:1-11 (1995)) o 7AAD puede evaluarse respecto de células no tratadas.

Una proteína de la invención que "induce apoptosis" es una que induce la muerte celular programada según lo determinado mediante la unión de moléculas o eventos relacionados con apoptosis, tales como anexina V, 25 fragmentación de ADN, reducción celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular, y/o formación de vesículas de membrana (cuerpos apópticos denominados). La célula es una que expresa el antígeno al que la proteína se une y puede ser una que sobreexpresa el antígeno. La célula puede ser una célula tumoral, por ejemplo una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, tiroides, pancreática o de vejiga. In vitro, la célula puede ser, por ejemplo, células SKBR3, BT474, Calu 3, MDA-MB453, MDA-MB-361 o 30 SKOV3. Diversos procedimientos están disponibles para evaluar los eventos celulares asociados a apoptosis. Por ejemplo, la translocación de serina fosdatidil (PS) puede medirse mediante la unión de anexina; la fragmentación de ADN puede evaluarse a través de una escalera de ADN según lo desvelado en el ejemplo en la presente memoria; y la condensación de cromatina/nuclear junto con la fragmentación de ADN puede evaluarse mediante cualquier incremento en las células hipodiploides. Preferentemente, la proteína que induce apoptosis es una que da como 35 resultado aproximadamente 2 a 50 veces, preferentemente aproximadamente 5 a 50 veces, y mucho más preferentemente aproximadamente 10 a 50 veces, la inducción de la unión de anexina respecto de la células no tratada en un ensayo de unión de anexina que utiliza las células que expresan el antígeno al que se une la proteína de la invención.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un fármaco efectiva para tratar una 40 enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso de cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir el número de células cancerígenas; reducir el tamaño tumoral; inhibir (es decir, hacer más lenta en alguna medida y preferentemente interrumpir) la infiltración de células cancerígenas en órganos periféricos; inhibir (es decir, hacer más lenta en alguna medida y preferentemente interrumpir) la metástasis de tumor; inhibir, en 45 alguna medida, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en alguna medida uno o más de los síntomas asociados al trastorno. En la medida en que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o eliminar las células cancerígenas existentes, el mismo puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia para el cáncer, la eficacia in vivo, por ejemplo, puede medirse mediante la evaluación del tiempo hasta el avance de la enfermedad (TTP) y/o determinando las tasas de respuesta (RR).

Perspectiva general

50 La solicitud se refiere en parte a formulaciones y modificaciones de los polipéptidos de unión a VEGFR2 según lo que se describe en las Publicaciones Estadounidenses Núm. 20070148126 y 20070160533. Estos polipéptidos de unión pertenecen a una clase de proteínas de dominios adaptadores a base de fibronectina y demuestran especificidad para VEGFR2 sobre VEGFR1. Otros inhibidores de VEGFR, tales como bevacizumab, sunitinib, y sorafenib, afectan la señalización de ambos VEGFR1 y VEGFR2.

55 La presente solicitud proporciona nuevas proteínas que se unen a VEGFR2 con propiedades ventajosas, que incluyen, pero no se limitan a: modos de unión monovalente o multivalente (por ejemplo, uno o más que un dominio que se une a una diana particular (que incluye VEGFR2 y otros receptores de tirosina quinasa); alta selectividad para la diana deseada sobre otros receptores, particularmente con respecto a proteínas que se unen a VEGFR2 selectivamente sobre VEGFR1 o VEGFR3; afinidad ajustable, que incluye un intervalo de aproximadamente 100 nM 60 a menos que aproximadamente 10 pM (que incluye afinidad femtomolar); actividad antagonista específica mientras

5 posee actividad agonista mínima o no detectable; bloqueo de la activación o unión al ligando VEGFR2; unión mono-específica o multiespecífica a dianas deseadas; unión a epítipo único o múltiples; vida media sérica prolongada en rata; dosificación subcutánea (SC) o intravenosa (IV); tamaño pequeño (por ejemplo -5 kDa a -40 kDa); T_m por encima de aproximadamente 55°C o por encima de aproximadamente 60°C; y naturaleza sustancialmente monomérica (por ejemplo pico único en cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), tal como aproximadamente 90% del área, aproximadamente 95% del área o aproximadamente 98% del área).

10 La tecnología PROfusion™ se utilizó previamente para seleccionar colecciones de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de dominio único construidos mediante la utilización de una proteína adaptadora basada en el décimo dominio tipo tres de fibronectina humana (¹⁰F_n3) o construida a partir de dominios variables de cadenas ligeras de anticuerpo de los polipéptidos expresados, denominados "biblioteca" de proteínas adaptadoras, se seleccionaron los polipéptidos que podrían unirse a una diana con alta afinidad. Aislamos de esta biblioteca de proteínas adaptadoras nuevos polipéptidos de dominio único que se unen a VEGFR- 2 y que, en algunos casos, inhiben las actividades biológicas de VEGFR- 2. Dichos polipéptidos pueden utilizarse como péptidos VEGFR-2 pequeños, independientes o pueden situarse en otras proteínas, particularmente proteínas que comparten una inmunoglobulina o pliegue similar a la inmunoglobulina. (Para una descripción detallada de la tecnología de fusión de ARN-proteína y procedimientos de selección de biblioteca de proteína adaptadora en base a fibronectina véase Szostak et al., las Patentes Estadounidenses Núm.: 6.258.558; 6.261.804; 6.214.553; 6.281.344; 6.207.446; 6.518.018; Publicación PCT Núm. WO 00/34784; WO 01/64942; WO 02/032925; y Roberts y Szostak, Proc Natl. Acad. Sci. 94:12297-12302, 1997.)

Proteínas de unión a VEGFR-2

20 Los polipéptidos de unión a VEGFR-2 se generaron según lo que se describe en las Publicaciones Estadounidenses Núm. 20070148126 y 20070160533 y la Publicación PCT Núm. WO05/056764. Las secuencias de polipéptidos ¹⁰F_n3 de unión a VEGFR-2 útiles para la invención son las siguientes:

SEC ID NO:4

25 GEVVAATPTSLISWRHPHFPTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLKPGVDY TITITVYAVTDG
GRLLSIPISINYRTEIDKPCQ

SEC ID NO:5

EVVAATPTSLISWRHPHFPTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLKPGVDYTI TVYAVTDGRNGRLL-
SIPISINYRT

30 Las proteínas de la invención incluyen las secuencias de aminoácidos desveladas con las eliminaciones de los primeros 8 aminoácidos y pueden incluir aminoácidos adicionales en los terminales N o C. Por ejemplo, una secuencia adicional MG pueden colocarse en el extremo terminal N. La re-adición de los 8 aminoácidos normales en el extremo terminal N también produce una proteína de unión a VEGFR2 con propiedades deseables. En algunas realizaciones, el extremo terminal N metionina es escindido. Para el uso in vivo, puede generarse una forma apropiada para la pegilación. En una realización, puede añadirse una cola terminal C que comprende una cisteína.

Realizaciones de proteínas adicionales

40 Las proteínas de la invención incluyen un polipéptido de dominio único descrito en la presente memoria que es en general un polipéptido que se une a una diana, tal como VEGFR2, y en el que la actividad de unión a la diana situada dentro de un dominio estructural único, según lo diferenciado de, por ejemplo, anticuerpos y anticuerpos de cadena sencilla, en el que la actividad de unión al antígeno en general está contribuida por ambos un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera. La divulgación también proporciona proteínas más grandes que pueden comprender polipéptidos de dominio único que se unen a la diana. Por ejemplo, una pluralidad de polipéptidos de dominio único pueden conectarse para crear una molécula compuesta con un incremento en la actividad o multivalencia. En forma similar, un polipéptido de dominio único puede unirse (por ejemplo, como una proteína de fusión) a cualquier número de otros polipéptidos. En ciertos aspectos un polipéptido de dominio único puede comprender al menos cinco a siete hebras beta o similares distribuidas entre al menos dos láminas beta, según lo ejemplificado por los dominios de inmunoglobulina y similares a la inmunoglobulina. Una hebra similar a beta es una cadena de aminoácidos que participan en la estabilización de un polipéptido de dominio único pero no necesariamente adopta una conformación de hebra beta. Si una hebra similar a beta participa en la estabilización de la proteína puede evaluarse mediante la eliminación del cordón o mediante la alteración de la secuencia del cordón y analizando si la estabilidad de la proteína se disminuye. La estabilidad puede evaluarse, por ejemplo, mediante estudios de desnaturalización y renaturalización térmica. Preferentemente, un polipéptido de dominio único incluirá no más que dos hebras similares a beta. Una hebra similar a beta usualmente no adoptará una conformación de hélice alfa pero puede adoptar una estructura espiral al azar. En el contexto de un dominio de inmunoglobulina o un dominio similar a inmunoglobulina, una hebra similar a beta mucho más a menudo se producirá en la posición en la estructura que de otra manera estaría ocupada por la mayor parte de la hebra beta de extremo terminal N y la mayor parte de la hebra beta de extremo terminal C. Una cadena de aminoácidos que, si se encuentra en el interior de una secuencia proteica normalmente formaría una hebra beta, puede, cuando se encuentra en la posición más cercana a un extremo terminal N o C, adoptar una conformación que no es

claramente una hebra beta y es denominada en la presente memoria como una hebra similar a beta.

En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona polipéptidos de dominio único que se unen a VEGFR2. Preferentemente los polipéptidos de dominio único se unen a VEGFR2 humano y una especie modelo VEGFR2. Un polipéptido de dominio único puede comprender entre aproximadamente 80 y aproximadamente 150 aminoácidos que poseen una organización estructural que comprende: al menos siete hebras beta o hebras similares a beta distribuidas entre al menos dos láminas beta, y al menos una porción en bucle que conecta dos hebras beta o hebras similares a beta, cuya porción en bucle participa en la unión a VEGFR2. En otras palabras una porción en bucle puede conectar dos hebras beta, dos hebras similares a beta o una hebra beta y una hebra similar a beta. Típicamente, una o más de las porciones en bucle participarán en la unión a VEGFR2, aunque es posible que una o más de las porciones de hebra beta o similar a beta también participarán en la unión a VEGFR2, particularmente aquellas porciones de hebra beta o similar a beta que están situadas lo más cercano a las porciones en bucle. Un polipéptido de dominio único puede comprender una unidad estructural que es un dominio de inmunoglobulina o un dominio similar a la inmunoglobulina. Un polipéptido de dominio único puede unirse a cualquier parte de VEGFR2, aunque son preferentes los polipéptidos que se unen a un dominio extracelular de un VEGFR2. La unión puede evaluarse en términos de constantes de equilibrio (por ejemplo, disociación, K_D) y en términos de constantes cinéticas (por ejemplo, constante de velocidad, k_{on} y constante de disociación, k_{off}). Un polipéptido de dominio único típicamente se seleccionará para unirse a VEGFR2 con una K_D menor que aproximadamente $10^{-6}M$, o menor que aproximadamente $10^{-7}M$, aproximadamente $5 \times 10^{-8}M$, aproximadamente $10^{-8}M$ o menor que aproximadamente $10^{-9}M$. Los polipéptidos de unión a VEGFR2 pueden competir para la unión con uno, o dos o más miembros de la familia VEGF, particularmente VEGF-A, VEGF-C y VEGF-D, y pueden inhibir uno o más eventos biológicos mediados por VEGFR2, tales como proliferación de células cancerígenas y metástasis de cáncer. Los polipéptidos de unión a VEGFR2 pueden utilizarse para fines terapéuticos así como para cualquier fin que incluya la detección o unión de VEGFR2. Los polipéptidos para el uso terapéutico en general tendrán un K_D menor que $5 \times 10^{-8}M$, menor que $10^{-8}M$ o menor que $10^{-9}M$, aunque valores mayores de K_D pueden ser tolerados en el que la k_{off} es suficientemente baja y la k_{on} es suficientemente alta. En ciertas realizaciones, un polipéptido de dominio único que se une a VEGFR2 comprenderá un consenso o una o más secuencias de las secuencias de unión a VEGFR2 seleccionadas de los clones de unión a VEGFR2 descritos en la presente memoria. Preferentemente, dicha secuencia estará situada en un bucle, particularmente los bucles BC, DE, y FG según lo que se describe en la Publicación PCT Núm. WO2005/056764A2 por Chen et al.

El polipéptido de dominio único comprende un dominio similar a la inmunoglobulina. Uno, dos, tres o más bucles del dominio similar a la inmunoglobulina pueden participar en la unión a VEGFR2. El dominio similar a la inmunoglobulina es un dominio de fibronectina tipo III (Fn3). Dicho dominio puede comprender, en el orden de extremo terminal N a extremo terminal C, una hebra beta o similar a beta, A; un bucle, AB; una hebra beta o similar a beta, B; un bucle, BC; una hebra beta o similar a beta C; un bucle CD; una hebra beta o similar a beta D; un bucle DE; una hebra beta o similar a beta, E; un bucle, EF; una hebra beta o similar a beta F; un bucle FG; y una hebra beta o similar a beta G. Opcionalmente, cualquiera o todos los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG pueden participar en la unión a VEGFR2, aunque los bucles preferentes son BC, DE y FG y en particular los bucles BC y FG. El dominio Fn3 es un dominio Fn3 obtenido a partir de fibronectina humana, particularmente el décimo dominio Fn3 de fibronectina, denominado $^{10}Fn3$. Debe observarse que ninguno de los polipéptidos de unión a VEGFR2 desvelados en la presente memoria tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica al $^{10}Fn3$ original; la secuencia se ha modificado para obtener proteínas de unión a VEGFR2, pero las proteínas que poseen las características estructurales básicas de $^{10}Fn3$, y particularmente aquellas que retienen la homología de secuencia reconocible con el $^{10}Fn3$ original son sin embargo denominadas en la presente memoria como "polipéptidos $^{10}Fn3$ ". Esta nomenclatura es similar a aquella encontrada en el campo de anticuerpos en la que, por ejemplo, un dominio V_L de anticuerpo recombinante generado contra una proteína diana particular puede no ser idéntico a cualquier dominio V_L de origen natural pero sin embargo la proteína es en forma reconocible una proteína V_L . Un polipéptido $^{10}Fn3$ puede ser al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, o 90% idéntico al dominio $^{10}Fn3$ humano, que se muestra en SEC ID NO: 1. Mucha de la variabilidad se producirá en general en uno o más de los bucles. Cada una de las hebras beta o similares a beta de un polipéptido $^{10}Fn3$ puede consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 100% idéntica a la secuencia de una hebra beta o similar a beta correspondiente de SEC ID NO: 1, siempre que dicha variación no altere la estabilidad del polipéptido en condiciones fisiológicas. Un polipéptido $^{10}Fn3$ puede tener una secuencia en cada uno de los bucles AB, CD, y EF que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 100% idéntica a la secuencia de un bucle correspondiente de SEC ID NO: 1. En muchos casos, cualquiera o todos los bucles BC, DE, y FG se conservarán poco respecto de la SEC ID NO: 1. Por ejemplo, todos los bucles BC, DE, y FG pueden ser menos que 20%, 10%, o 0% idénticos a sus bucles correspondientes en la SEC ID NO:1. En algunas realizaciones, solamente los bucles BC y FG se conservarán poco respecto de la SEC ID NO: 1.

En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona polipéptidos que comprenden un décimo dominio de fibronectina de tipo III ($^{10}Fn3$), comprendiendo el dominio $^{10}Fn3$ un bucle, AB; un bucle, BC; un bucle, CD; un bucle, DE; un bucle EF; y un bucle FG; y posee al menos un bucle seleccionado del bucle BC, DE, y FG con una secuencia de aminoácidos alterada respecto de la secuencia del bucle correspondiente del dominio $^{10}Fn3$ humano. Por "alterada" se quiere significar una o más alteraciones de secuencias de aminoácidos respecto de una secuencia molde (dominio de fibronectina humana correspondiente) e incluye adiciones, eliminaciones, y sustituciones de

aminoácidos. La alteración de una secuencia de aminoácidos puede lograrse a través de la variación de secuencia intencional, ciega, o espontánea, en general de un ácido nucleico que codifica la secuencia, y puede producirse mediante cualquier técnica, por ejemplo, PCR, PCR propenso a error, o síntesis química de ADN.

5 Las secuencias adicionales pueden añadirse al extremo terminal N o C. Por ejemplo, una secuencia adicional MG puede ser colocada en el extremo terminal N. M usualmente será escindido, dejando una secuencia GVS en el extremo terminal N. En algunas realizaciones, las secuencias conectoras pueden colocarse en el extremo terminal C del dominio ¹⁰Fn3.

10 La divulgación proporciona un polipéptido no anticuerpo que comprende un dominio que posee un pliegue similar a la inmunoglobulina que se une a VEGFR2. El polipéptido no anticuerpo puede tener un peso molecular menor que 20 kDa, o menor que 15 kDa y en general se obtendrá (por, por ejemplo, alteración de la secuencia de aminoácidos) a partir de una proteína de referencia, o "adaptadora", tal como una proteína adaptadora Fn3. El polipéptido no anticuerpo puede unirse a VEGFR2 con una KD menor que 10^{-6} M, o menor que 10^{-7} M, menor que 5×10^{-8} M, menor que 10^{-8} M o menor que 10^{-9} M. La proteína de referencia no alterada no se unirá significativamente a VEGFR2 o se unirá con una KD mayor que 10^{-6} M. El polipéptido no anticuerpo puede inhibir la señalización de VEGFR2, particularmente donde el polipéptido no anticuerpo posee una KD menor que 5×10^{-8} M, menor que 10^{-8} M o menor que 10^{-9} M, aunque valores más altos de KD pueden ser tolerados cuando k_{off} es suficientemente baja (por ejemplo, menor que 5×10^{-4} s⁻¹). El pliegue similar a la inmunoglobulina puede ser un polipéptido ¹⁰Fn3.

20 En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona un polipéptido que comprende un dominio único que posee un pliegue de inmunoglobulina que se une a VEGFR2. El polipéptido puede tener un peso molecular menor que 20 kDa, o menor que 15 kDa y en general se obtendrá (mediante, por ejemplo, la alteración de la secuencia de aminoácidos) a partir de un dominio variable de una inmunoglobulina. El polipéptido puede unirse a VEGFR2 con una KD menor que 10-6M, o menor que 10^{-7} M, menor que 5×10^{-8} M, menor que 10^{-8} M o menor que 10^{-9} M. El polipéptido puede inhibir la señalización de VEGFR2, particularmente cuando el polipéptido posee una KD menor que 5×10^{-8} M, menor que 10^{-8} M o menor que 10^{-9} M, aunque valores más altos de KD pueden ser tolerados cuando k_{off} es suficientemente baja o cuando k_{on} es suficientemente alta. En ciertas realizaciones preferentes, un polipéptido de dominio único que posee un pliegue de inmunoglobulina obtenido de un dominio variable de cadena liviana de inmunoglobulina y capaz de unirse a VEGFR2 puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de los clones de unión a VEGFR2 descritos en la presente memoria.

30 Un resto PEG u otro resto de interés puede estar unido covalentemente a la cisteína en la posición de aproximadamente 85 a 100 dependiendo de la proteína. El resto PEG también puede estar unido covalentemente a un resto amina en el polipéptido. El resto amina puede ser, por ejemplo, una amina primaria encontrada en el extremo terminal N de un polipéptido o un grupo amina presente en un aminoácido, tal como lisina o arginina. En ciertas realizaciones, el resto PEG está unido en una posición en el polipéptido seleccionado del grupo constituido por: a) el extremo terminal N; b) entre el extremo terminal N y la hebra beta o hebra similar a beta más extremo terminal N; c) un bucle posicionado en una cara del polipéptido opuesta al sitio de unión a la diana; d) entre el extremo terminal C y la hebra beta o hebra similar a beta más extremo terminal C; y e) en el extremo terminal C.

40 En ciertas realizaciones, cualquiera de los polipéptidos de unión a VEGFR2 descritos en la presente memoria pueden unirse a uno o más restos adicionales, que incluyen, por ejemplo, un resto que también se une a VEGFR2 (por ejemplo, un segundo polipéptido de unión a VEGFR2 idéntico o diferente), un resto que se une a una diana diferente (por ejemplo, para crear un agente de unión de especificidad dual), un resto de etiquetado, un resto que facilita la purificación de proteína o un resto que proporciona farmacocinética mejorada. La farmacocinética mejorada puede evaluarse en conformidad con la necesidad terapéutica percibida. A menudo es deseable incrementar la biodisponibilidad y/o incrementar el tiempo entre las dosis, posiblemente mediante el incremento del tiempo que una proteína permanece disponible en el suero después de la dosificación. En algunos casos, es deseable mejorar la continuidad de la concentración sérica de la proteína en el tiempo (por ejemplo, reducir la diferencia en la concentración sérica de la proteína poco después de la administración y poco antes de la siguiente administración). Los restos que tienden a reducir la velocidad de la depuración de una proteína de la sangre, en la presente memoria se denominan "restos PK", incluyen restos polioxialquileno, por ejemplo, polietilenglicol, azúcares (por ejemplo, ácido siálico), y restos de proteína bien tolerados (por ejemplo, Fc, fragmentos Fc o albúmina sérica). Los polipéptidos de la invención pueden fusionarse a la albúmina o un fragmento (porción) o variante de albúmina según lo que se describe en la Publicación EEUU Núm. 20070048282. El polipéptido de dominio único puede unirse a un resto que reduce la tasa de depuración del polipéptido en un mamífero (por ejemplo, ratón, rata, o ser humano) en más que tres veces respecto del polipéptido no modificado. Otras mediciones de farmacocinética mejorada pueden incluir vida media sérica, que a menudo se divide en una fase alfa y una fase beta. Cualquiera o ambas fases pueden mejorarse significativamente mediante la adición de un resto apropiado. Cuando se emplea polietilenglicol, una o más PEG moléculas pueden unirse en diferentes posiciones en la proteína, y dicha unión puede lograrse mediante la reacción con aminas, tioles u otros grupos reactivos apropiados. La pegilación puede lograrse mediante la pegilación dirigida al sitio, en la que un grupo reactivo apropiado es introducido en la proteína para crear un sitio en el que se produce preferencialmente la pegilación. En una realización preferente, la proteína se modifica para tener un residuo de cisteína en una posición deseada, permitiendo la pegilación dirigida al sitio en la cisteína. PEG puede variar ampliamente en el peso molecular y puede ser ramificado o lineal. Notablemente, la presente divulgación establece que la pegilación es compatible con la actividad de unión a la diana de polipéptidos ¹⁰Fn3 y, además que

la pegilación mejora la farmacocinética de dichos polipéptidos. Por consiguiente, en una realización, la divulgación proporciona formas pegiladas de polipéptidos ¹⁰Fn3, sin importar la diana que puede ser unido por dichos polipéptidos.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende un conjugado de una proteína adaptadora en base a fibronectina y un resto PK. La proteína adaptadora en base a fibronectina puede unirse a cualquier proteína humana y preferentemente se obtiene de un dominio ¹⁰Fn3. El resto PK puede ser cualquier resto que mejora la farmacocinética de la proteína adaptadora en base a fibronectina. En algunas realizaciones, el resto PK al menos duplica la vida media sérica de la proteína adaptadora. En algunas realizaciones, el resto PK está ligado a la proteína adaptadora a través de un conector polipeptídico. Los conectores polipeptídicos ejemplares incluyen PSTSTST (SEC ID NO: 63), EIDKPSQ (SEC ID NO: 64), y conectores GS, tales como GSGSGSGSGS (SEC ID NO: 65) y multimeros de los mismos. En algunas realizaciones el resto PK es albúmina sérica humana. En algunas realizaciones, el resto PK es transferrina.

15 En ciertos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para utilizar una proteína de unión a VEGFR2 para inhibir la actividad biológica de VEGFR2 en una célula o para inhibir una actividad biológica mediada por VEGFR2. La célula puede situarse in vivo o ex vivo, y puede ser, por ejemplo, una célula de un organismo viviente, una célula cultivada o una célula en una muestra de tejido. El procedimiento puede comprender contactar dicha células con cualquiera de los polipéptidos inhibidores de VEGFR2 desvelados en la presente memoria, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inhibir dicha actividad biológica.

20 En ciertos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para tratar un sujeto que tiene una afección que responde a la inhibición de VEGFR2. Dicho procedimiento puede comprender administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de cualquiera de los polipéptidos inhibidores de VEGFR2 descritos en la presente memoria. Una afección puede ser una que se caracteriza por biología inapropiada de VEGFR2. Puede utilizarse cualquiera de los polipéptidos inhibidores de VEGFR2 descritos en la presente memoria para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno, particularmente un trastorno seleccionado del grupo constituido por: un trastorno autoinmune, una restenosis, y un cáncer.

25 En ciertos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para detectar VEGFR2 en una muestra. Un procedimiento puede comprender contactar la muestra con un polipéptido de unión a VEGFR2 descrito en la presente memoria, en el que dicho contacto se lleva a cabo en condiciones que permiten la formación del complejo polipéptido-VEGFR2; y detectar dicho complejo, detectando mediante el mismo dicho VEGFR2 en dicha muestra. La detección puede llevarse a cabo mediante la utilización de cualquier técnica conocida en la técnica, tal como, por ejemplo, radiografía, ensayo inmunológico, detección por fluorescencia, espectroscopia en masa, o resonancia de plasmones superficiales. La muestra a menudo será una muestra biológica, tal como una biopsia, y particularmente una biopsia de un tumor, un tumor sospechado. La muestra puede ser de un ser humano u otro mamífero. El polipéptido de unión a VEGFR2 puede etiquetarse con un resto de etiquetado, tal como un resto radioactivo, un resto fluorescente, un resto cromogénico, un resto quimioluminiscente, o un resto hapteno. El polipéptido de unión a VEGFR2 puede inmovilizarse en un soporte sólido.

30 Otro aspecto de la divulgación se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido desvelado en la presente memoria. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido seleccionado del grupo constituido por cualquiera de las secuencias de proteína en las tablas desveladas en la presente memoria.

35 Otro aspecto de la divulgación se refiere a un vector de expresión que comprende un ácido nucleico operativamente conectado con un promotor, en el que el ácido nucleico codifica un polipéptido desvelado en la presente memoria. Otro aspecto de la divulgación se refiere a una célula que comprende un ácido nucleico desvelado en la presente memoria. También se proporciona un procedimiento para producir el polipéptido que se une a VEGFR2 que comprende: expresar un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la divulgación. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico puede comprender una secuencia que codifica un polipéptido seleccionado del grupo constituido por cualquiera de las secuencias en las tablas desveladas en la presente memoria y sus proteínas correspondientes. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico se expresa en una célula. Alternativamente, el ácido nucleico se expresa en un sistema libre de células.

40 En ciertos aspectos, la divulgación proporciona descubrimientos que puede ser aplicables a cualquier polipéptido ¹⁰Fn3, sin importar la diana a la que el polipéptido está modificado genéticamente para unirse. Según lo observado mas arriba, la divulgación demuestra que PEG puede utilizarse exitosamente para mejorar la farmacocinética de un polipéptido ¹⁰Fn3. No interfiriendo al mismo tiempo en forma significativa con la unión a la diana. Por consiguiente, la divulgación proporciona polipéptidos ¹⁰Fn3 pegilados que se unen a la diana y han mejorado la farmacocinética respecto del polipéptido no pegilado. En otras realización, la divulgación demuestra que una eliminación de los primeros ocho aminoácidos de un polipéptido ¹⁰Fn3 puede incrementar la afinidad de unión a la diana. Por consiguiente, la divulgación proporciona polipéptidos ¹⁰Fn3 que carecen de los ocho aminoácidos iniciales (aminoácidos numerados en referencia a la secuencia de SEC ID NO:1). Se entiende que uno o dos aminoácidos pueden añadirse de nuevo a la forma eliminada del polipéptido para facilitar la traducción y el procesamiento apropiado. La divulgación demuestra que la administración subcutánea de un polipéptido ¹⁰Fn3 da

como resultado una liberación retardada del polipéptido en el flujo sanguíneo y una reducción en la concentración sérica máxima del 10F n3 polipéptido. Por consiguiente, la divulgación proporciona procedimientos para administrar un polipéptido $^{10}\text{Fn3}$ a un paciente mediante una administración subcutánea. Esta vía de administración puede ser útil para lograr una liberación retardada respecto de la administración intravenosa, y/o para reducir la concentración sérica máxima del polipéptido $^{10}\text{Fn3}$ en al menos 25% o al menos 50% respecto de la concentración sérica máxima lograda por la administración intravenosa de una dosificación igual. El polipéptido $^{10}\text{Fn3}$ administrado puede unirse a un resto que aumenta la vida media sérica (o reduce la tasa de depuración, o afecta en forma similar otro parámetro farmacocinético) del polipéptido $^{10}\text{Fn3}$, tal como un resto de polietilenglicol.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona polipéptidos de dominio único que se unen a una proteína diana preseleccionada de un primer mamífero y a un homólogo de la misma de un segundo mamífero. Dichos polipéptidos de dominio único son particularmente útiles cuando el primer mamífero es un ser humano y el segundo mamífero es un mamífero deseable en el que se conduce el ensayo preclínico, tal como un ratón, rata, cerdo de guinea, perro, o primate no humano. La divulgación demuestra que los polipéptidos de dominio único pueden manipularse genéticamente para tener dicha especificidad dual, y que la especificidad dual simplifica el desarrollo del fármaco permitiendo el ensayo del mismo polipéptido en células humanas, sujetos humanos y modelos animales. Preferentemente, la proteína diana preseleccionada del primer mamífero y el homólogo de la misma del segundo mamífero son suficientemente similares en secuencia de aminoácidos para permitir la generación de polipéptidos de especificidad dual. Por ejemplo, la proteína diana preseleccionada y el homólogo del segundo mamífero pueden compartir al menos 80%, 90%, o 95% de identidad en toda una región de al menos 50 aminoácidos, y opcionalmente pueden compartir al menos 80%, 90%, o 95% de identidad en toda la secuencia proteica entera o en toda la secuencia del dominio extracelular, en el caso de una proteína de membrana. Un polipéptido de dominio único con este tipo de característica de unión de especificidad dual puede comprender una inmunoglobulina o dominio similar a la inmunoglobulina, y preferentemente se unirá a ambos la proteína humana diana preseleccionada y el homólogo de la misma con una constante de disociación menor que $1 \times 10^{-6}\text{M}$, $1 \times 10^{-7}\text{M}$, $5 \times 10^{-8}\text{M}$, $1 \times 10^{-8}\text{M}$ o $1 \times 10^{-9}\text{M}$.

Realizaciones multiespecíficas y biespecíficas adicionales

En muchas realizaciones, será deseable fabricar composiciones multiespecíficas, por ejemplo composiciones que se unen a más que una diana u otra proteína de interés. En un aspecto, las proteínas de la invención comprenden una primera proteína con una afinidad de unión de aproximadamente 10 nM (otra afinidad apropiada descrita en la presente memoria) a la primera diana deseada (por ejemplo VEGFR-2) o menor y se une a una diana relacionada, no deseada, (por ejemplo VEGFR-1 y VEGFR-3) con una afinidad de unión de aproximadamente 1 μM (otras afinidad apropiada descrita en la presente memoria) o mayor y es preferentemente un dominio único o sustancialmente monovalente y está ligado a o unido a una segunda proteína con una afinidad de unión de aproximadamente 10 nM (otra afinidad apropiada descrita en la presente memoria) a una segunda diana deseada, (por ejemplo EGFR, c-Met, C-kit, Her2, FGFR1, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, receptor de folato) o menor y se une a una diana relacionada, no deseada (por ejemplo receptor de insulina humana) con una afinidad de unión de aproximadamente 1 μM (otra afinidad apropiada descrita en la presente memoria) o mayor y es preferentemente un dominio único o sustancialmente monovalente. Dichas moléculas con afinidad biespecífica además pueden unirse a otras moléculas, que incluyen otras proteínas descritas en la presente memoria.

En un aspecto, las proteínas de la invención comprenden una primera proteína con una afinidad de unión de aproximadamente 10 nM (otra afinidad apropiada descrita en la presente memoria) a la primera diana deseada (por ejemplo VEGFR-2) o menor y se une a una diana relacionada, no deseada (por ejemplo VEGFR-1 y VEGFR-3) con una afinidad de unión de aproximadamente 1 μM (otra afinidad apropiada descrita en la presente memoria) o mayor y es preferentemente un dominio único o sustancialmente monovalente y está ligado a una segunda proteína con una afinidad de unión de aproximadamente 10 nM (otra afinidad apropiada descrita en la presente memoria) a una segunda diana deseada (por ejemplo VEGFR-1) o menor y se une a una diana relacionada, no deseada (por ejemplo VEGFR-2 y VEGFR-3) con una afinidad de unión de aproximadamente 1 μM (otra afinidad apropiada descrita en la presente memoria) o mayor y es preferentemente un dominio único o sustancialmente monovalente. Dichas moléculas con afinidad biespecífica además pueden unirse a otras moléculas, que incluyen otras proteínas descritas en la presente memoria.

Realizaciones adicionales de PEG

En un aspecto de la invención, puede utilizarse PEG (o una molécula funcionalmente similar) para conectar dos proteínas que son restos no anticuerpo que se unen a una diana única, particularmente proteínas en las que cada proteína de unión está compuesta por un dominio único o múltiples dominios, usualmente en la que cada dominio tiene aproximadamente 50 o aproximadamente 60 o aproximadamente 75 aminoácidos o más (en oposición a los péptidos pequeños de 5 a 20 aminoácidos). Preferentemente, las proteínas adaptadoras basadas en fibronectina, tales como Adnectins™, pueden utilizarse favorablemente en dichas realizaciones y más preferentemente con la manipulación genética apropiada de los aminoácidos Cys o Lys.

Además, los aspectos no PEG y PEG de la invención incluyen restos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos de camello y sus derivados, así como anticuerpos de dominio y cadena única; y particularmente aquellos expresados a partir de microbios) y restos similares a anticuerpos (por ejemplo, derivados de lipocalinas, anquirinas, múltiples

dominios Cys-Cys, y tetranectinas; y particularmente aquellos expresados a partir de microbios), particularmente aquellos menores que aproximadamente 40 kDa que se conectan por PEG, y más particularmente aquellos que poseen un número limitado de aminoácidos cys.

5 Existen muchas propiedades y ventajas de proteínas de la invención ligadas a PEG previamente no reconocidas o descubiertas. Cuando dichas proteínas están expresadas en microbios, puede ser preferente aislar los dominios y después ligarlos a través de PEG u otro conector polimérico. PEG, u otros conectores funcionalmente operativamente poliméricos, puede utilizarse para variar en forma óptima la distancia entre cada resto de proteína para crear una proteína con una o más de las siguientes características: 1) reducción o incremento en el impedimento estérico de unión de uno o más dominios de proteína cuando se une a una proteína de interés (por ejemplo, una diana), 2) conecta dos o más dominios que se unen a diferentes dianas, 3) incrementa la estabilidad o solubilidad de la proteína sin buscar sustituciones adicionales de aminoácidos incrementando la estabilidad o solubilidad (por ejemplo, solubilidad al menos aproximadamente 20mg/ml, o al menos aproximadamente 50mg/ml), 4) disminuye la agregación de proteína sin buscar sustituciones adicionales de aminoácidos para disminuir la estabilidad (por ejemplo, según lo medido por SEC), 4) incrementa la fuerza o afinidad general de la proteína para la proteína de interés mediante la adición de dominios de unión adicionales. Las ventajas adicionales de las proteínas conectadas a PEG incluyen la fabricación rápida de modos de unión mono-específica, multivalente, así como modos de unión multiespecífica, monovalente o multivalente dependiendo del número de los restos de reconocimiento de proteínas que están incluidos en la proteína conectada a PEG.

20 Los polipéptidos ¹⁰F_n3 de la invención pueden pegilarse y retener la actividad de unión al ligando. En una realización preferente, el polipéptido ¹⁰F_n3 pegilado es producido por pegilación dirigida al sitio, particularmente por conjugación de PEG con un resto cisteína en el extremo terminal N o C. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un polipéptido ¹⁰F_n3 de unión a la diana con propiedades farmacocinéticas mejoradas, el polipéptido que comprende: un dominio ¹⁰F_n3 que posee de aproximadamente 80 a aproximadamente 150 aminoácidos, en el que al menos uno de los bucles de dicho dominio ¹⁰F_n3 participa en la unión a la diana; y un resto PEG unido covalentemente, en el que dicho polipéptido ¹⁰F_n3 se une a la diana con una KD menor que 100 nM u posee una tasa de depuración menor que 30 ml/hr/kg en un mamífero. El resto PEG puede unirse al polipéptido ¹⁰F_n3 por pegilación dirigida al sitio, tal como por unión a un residuo Cys, en el que el residuo Cys puede colocarse en el extremo terminal N del polipéptido ¹⁰F_n3 o entre el extremo terminal N y la hebra beta o similar a beta más extremo terminal N o en el extremo terminal C del polipéptido ¹⁰F_n3 o entre el extremo terminal C y la hebra beta o similar a beta más extremo terminal C. Un residuo Cys puede estar situado también en otras posiciones, particularmente cualquiera de los bucles que no participan en la unión a la diana. Un resto PEG también puede unirse por otras químicas, incluyendo por conjugación con aminos. Además, la invención incluye este tipo de conjugación PEG terminal N o C con los restos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos de camello y sus derivados, así como anticuerpos de dominio y cadena sencilla; y particularmente aquellos expresados a partir de microbios) y restos similares a anticuerpos (por ejemplo, derivados de lipocalinas, anquirinas, múltiples dominios Cys-Cys, y tetranectinas; y particularmente aquellos expresados a partir de microbios), particularmente aquellos menores que 40 kDa que se conectan por PEG, y más particularmente aquellos que poseen un número limitado de aminoácidos cys.

40 En una realización específica de la presente invención, las formas modificadas de los polipéptidos solubles del sujeto comprenden ligar los polipéptidos solubles del sujeto a polímeros no proteínicos. En una realización específica, el polímero es polietilenglicol ("PEG"), polipropilenglicol, o polioxialquilenos, en la manera expuesta en las Patentes Estadounidenses Núm. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. Los ejemplos del polipéptido modificado de la invención incluyen proteínas PEGiladas descritas además en la presente memoria.

45 El PEG es un polímero soluble en agua, bien conocido que está comercialmente disponible o puede prepararse por polimerización por apertura de anillo de etilenglicol en conformidad con los procedimientos bien conocidos en la técnica (Sandler y Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, Nueva York, Vol. 3, páginas 138-161). El término "PEG" se utiliza ampliamente para abarcar cualquier molécula de polietilenglicol, sin importar el tamaño o modificación en un extremo del PEG, y puede estar representado por la fórmula: X-O(CH₂CH₂O)_n-1CH₂CH₂OH (1), en la que n es 20 a 2300 y X es H o una modificación terminal, por ejemplo, un alquilo C₁₋₄. En una realización, el PEG de la invención termina en un extremo con hidroxilo o metoxi, es decir, X es H o CH₃ ("metoxi PEG"). Un PEG puede contener otros grupos químicos que son necesarios para las reacciones de unión; que resultan de la síntesis química de la molécula; o que es un espaciador para la distancia óptima de las partes de la molécula. Además, dicho PEG puede consistir en uno o más cadenas laterales de PEG que están ligadas juntas. Los PEG con más que una cadena de PEG son denominados PEG ramificados o de múltiples brazos. Los PEG ramificados pueden prepararse, por ejemplo, mediante la adición de óxido de polietileno a diversos polioles, que incluyen glicerol, pentaeritritol, y sorbitol. Por ejemplo, un PEG ramificado de 4 brazos puede prepararse a partir de pentaeritritol y óxido de etileno. Los PEG ramificados se describen en, por ejemplo, la Solicitud Europea Publicada Núm. 473084A y la Patente Estadounidense Núm. 5.932.462. Una forma de PEG incluye dos cadenas laterales de PEG (PEG2) ligadas a través de los grupos amino primarios de una lisina (Monfardini, C., et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69).

60 En una realización preferente, el polipéptido ¹⁰F_n3 pegilado es producido por pegilación específica sitio, particularmente por conjugación de PEG a un resto cisteína en el extremo terminal N o C. Por consiguiente, la

presente divulgación proporciona un polipéptido $^{10}\text{Fn}_3$ de unión a la diana con propiedades farmacocinéticas mejoradas, el polipéptido que comprende: un dominio $^{10}\text{Fn}_3$ que posee de aproximadamente 80 a aproximadamente 150 aminoácidos, en el que al menos uno de los bucles de dicho dominio $^{10}\text{Fn}_3$ participa en la unión a la diana; y un resto PEG covalentemente unido, en el que dicho polipéptido $^{10}\text{Fn}_3$ se une a la diana con una KD menor que 100 nM y posee una tasa de depuración menor que 30 ml/hr/kg en un mamífero. El resto PEG puede unirse al polipéptido $^{10}\text{Fn}_3$ mediante pegilación dirigida al sitio, tal como por unión a un residuo Cys, en el que el residuo Cys puede posicionarse en el extremo terminal N del polipéptido $^{10}\text{Fn}_3$ o entre el extremo terminal N y la hebra beta o similar a beta más extremo terminal N o en el extremo terminal C del polipéptido $^{10}\text{Fn}_3$ o entre el extremo terminal C y la hebra beta o similar a beta más extremo terminal C. Un residuo Cys puede situarse también en otras posiciones, particularmente cualquiera de los bucles que no participan en la unión a la diana. Un resto PEG también puede ser unido por otra química, que incluye por conjugación con amina.

La conjugación de PEG con péptidos o proteínas en general incluye la activación de PEG y el acoplamiento de los intermedios de PEG activado directamente a las proteínas/péptidos dianas o a un conector, que es posteriormente activado y acoplado a las proteínas/péptidos dianas (véase Abuchowski, A. et al, J. Biol. Chem., 252, 3571 (1977) y J. Biol. Chem., 252,3582 (1977), Zalipsky, et al., y Harris et. al., in: Poly (ehylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications; (J. M. Harris ed.) Plenum Press: Nueva York, 1992; Capítulo 21 y 22). Se observa que un polipéptido de unión que contiene una molécula de PEG también se conoce como una proteína conjugada, mientras que la proteína que carece una molécula de PEG unida puede denominarse no conjugada.

Puede seleccionarse una variedad de formas de masa molecular de PEG, por ejemplo, de aproximadamente 1.000 Daltons (Da) a 100.000 Da (n es 20 a 2300), para la conjugación con polipéptidos de unión de la invención. El número de unidades de repetición "n" en el PEG se aproxima para la masa molecular descrita en Daltons. Es preferente que la masa molecular combinada de PEG en un conector activado sea apropiada para el uso farmacéutico. Así, en una realización, la masa molecular de las moléculas de PEG no excede 100.000 Da. Por ejemplo, si tres moléculas de PEG están unidas a un conector, en el que cada molécula de PEG posee la misma masa molecular de 12.000 Da (cada n es aproximadamente 270), entonces la masa molecular total de PEG en el conector es aproximadamente 36.000 Da (n total es aproximadamente 820). Las masas moleculares del PEG unido al conector también pueden ser diferentes, por ejemplo, de tres moléculas en un conector dos moléculas de PEG pueden ser de 5.000 Da cada una (cada n es aproximadamente 110) y una molécula de PEG puede ser de 12.000 Da (n es aproximadamente 270).

En una realización específica de la invención, un polipéptido de unión a VEGFR2 está covalentemente ligado a un grupo poli(etilenglicol) de la fórmula: $-\text{CO}- (\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$, con el $-\text{CO}$ (es decir carbonilo) del grupo poli(etilenglicol) formando un enlace amida con uno de los grupos amino del polipéptido de unión; en el que R es alquilo inferior; x es 2 o 3; m es de aproximadamente 450 a aproximadamente 950; y n y m se eligen de manera que el peso molecular del conjugado menos el polipéptido de unión sea de aproximadamente 10 a 40 kDa. En una realización, un grupo ϵ -amino del polipéptido de unión de una lisina es el grupo amino (libre) disponible.

Los conjugados anteriores pueden estar presentados más específicamente por la fórmula (II): $\text{P-NHCO}-(\text{CH}_2)_x-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m-\text{OR}$ (II), en la que P es el grupo de un polipéptido de unión según lo que se describe en la presente memoria, (es decir son el grupo amino o grupos amino que forman una unión amida con el carbonilo que se muestra en la fórmula (II)); y en el que R es alquilo inferior; x es 2 o 3; m es de aproximadamente 450 a aproximadamente 950 y se elige de manera que el peso molecular del conjugado menos el polipéptido de unión sea de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 kDa. Según lo utilizado en la presente memoria, los intervalos dados de "m" tienen un significado de orientación. Los intervalos de "m" están determinados en cualquier caso, y exactamente, por el peso molecular del grupo PEG

Un experto en la técnica puede seleccionar una masa molecular apropiada para PEG, por ejemplo, en base a cómo el polipéptido de unión pegilado será utilizado terapéuticamente, la dosificación deseada, tiempo de circulación, resistencia a la proteólisis, inmunogenicidad, y otras consideraciones. Para un debate de PEG y su uso para potenciar las propiedades de las proteínas, véase N. V. Katre, *Advanced Drug Delivery Reviews* 10: 91-114 (1993).

En una realización de la invención, las moléculas de PEG puede activarse para reaccionar con grupos amino en un polipéptido de unión, tal como con lisinas (Bencham C. O. et al., *Anal. Biochem.*, 131, 25 (1983); Veronese, F. M. et al., *Appl. Biochem.*, 11, 141 (1985); Zalipsky, S. et al., *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*, adrs 9-110 ACS Symposium Series 469 (1999); Zalipsky, S. et al., *Europ. Polym. J.*, 19, 1177-1183 (1983); Delgado, C. et al., *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 12, 119-128 (1990)).

En una realización específica, se utilizan ésteres de carbonato de PEG para formar los conjugados de PEG-polipéptido de unión. Puede utilizarse N,N'-disuccinimidilcarbonato (DSC) en la reacción con PEG para formar el PEG-carbonato de succinimidilo mezclado activo que posteriormente puede hacerse reaccionar con un grupo nucleofílico de un conector o un grupo amino de un polipéptido de unión (véase la Patente Estadounidense Núm. 5.281.698 y la Patente Estadounidense Núm. 5.932.462). En un tipo de reacción similar, 1,1'-(dibenzotriazolil)carbonato y di-(2-piridil)carbonato pueden hacerse reaccionar con PEG para formar carbonato mixto de PEG-benzotriazolilo y de PEG-piridilo (Patente Estadounidense Núm. 5.382.657), respectivamente.

La pegilación de un polipéptido ¹⁰F_n3 puede llevarse a cabo en conformidad con los procedimientos el estado de la técnica, por ejemplo por reacción del polipéptido de unión con PEG electrofílicamente activos (proveedor: Shearwater Corp., USA, www.shearwatercorp.com). Los reactivos PEG preferentes de la presente invención son, por ejemplo, propionatos de N-hidroxisuccinimidilo (PEG-SPA), butanoatos (PEG-SBA), PEG-propionato de succinimidilo o N-hidroxisuccinimidias ramificadas tales como mPEG2-NHS (Monfardini, C., et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69). Dichos procedimientos pueden utilizarse para pegar un grupo amino ε de una lisina del polipéptido de unión o el grupo amino del extremo terminal N del polipéptido de unión.

En otra realización, las moléculas de PEG pueden acoplarse a los grupos sulfhidrilo en un polipéptido de unión (Sartore, L., et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 27, 45 (1991); Morpurgo et al., Biocon. Chem., 7, 363-368 (1996); Goodson et al., Bio/Technology (1990) 8, 343; Patente Estadounidense Núm. 5.766.897). Las Patentes Estadounidenses Núm. 6.610.281 y 5.766.897 describen especies de PEG reactivas ejemplares que pueden acoplarse a los grupos sulfhidrilo.

En algunas realizaciones en las que las moléculas de PEG están conjugadas con los residuos de cisteína en un polipéptido de unión, los residuos de cisteína son originales del polipéptido de unión, mientras que en otras realizaciones, uno o más residuos de cisteína son manipulados genéticamente en el polipéptido de unión. Pueden introducirse mutaciones en una secuencia que codifica el polipéptido de unión para generar residuos de cisteína. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante la mutación de uno o más residuos de aminoácidos a cisteína. Los aminoácidos preferentes para mutar a un residuo de cisteína incluyen serina, treonina, alanina y otros residuos hidrófilos. Preferentemente, el residuo que debe ser mutado a cisteína es un residuo expuesto a la superficie. Los algoritmos son bien conocidos en la técnica para predecir la accesibilidad superficial de los residuos en base a la secuencia primaria o una proteína. Alternativamente, los residuos superficiales puede predecirse mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos de polipéptidos de unión, dado que se ha resuelto la estructura de cristales del marco en base a qué polipéptidos de unión son diseñados y desarrollados (véase Himanen et al., Nature. (2001) 20-27;414(6866):933-8) y de ese modo los residuos expuestos a la superficie son identificados. En una realización, los residuos de cisteína son introducidos en los polipéptidos de unión en o cerca del extremo terminal N y/o C, o dentro de las regiones en bucle.

En algunas realizaciones, el polipéptido de unión pegilado comprende una molécula de PEG covalentemente unida al grupo amino alfa del aminoácido del extremo terminal N. La aminación reductora del extremo terminal N específica del sitio se describe en Pepinsky et al., (2001) JPET, 297,1059, y la Patente Estadounidense Núm. 5.824.784. El uso de un aldehído-PEG para la aminación reductora de una proteína que utiliza otros grupos amino nucleofílicos disponibles se describe en la Patente Estadounidense Núm. 4.002.531, en Wieder et al., (1979) J. Biol. Chem. 254,12579, y en Chamow et al., (1994) Bioconjugate Chem. 5, 133.

En otra realización, el polipéptido de unión pegilado comprende una o más moléculas de PEG covalentemente unidas a un conector, que a su vez está unido al grupo amino alfa del residuo de aminoácido en el extremo terminal N del polipéptido de unión. Dicho enfoque es desvelado en la Publicación Estadounidense Núm. 2002/0044921 y Publicación PCT Núm. WO94/01451.

En una realización, un polipéptido de unión es pegilado en el extremo terminal C. En una realización específica, una proteína es pegilada en el terminal C mediante la introducción de azido-metionina terminal C y la posterior conjugación de un compuesto de metil-PEG-triarilfosfina a través de la reacción de Staudinger. Este procedimiento de conjugación del terminal C se describe en Cazalis et al., C-Terminal Site-Specific Pegylation of a Truncated Thrombomodulin Mutant with Retention of Full Bioactivity, Bioconjug Chem. 2004;15(5):1005-1009.

La monopegilación de un polipéptido de unión también puede producirse en conformidad con los procedimientos generales descritos en la Publicación PCT Núm. WO94/0145. El documento WO94/01451 describe un procedimiento para preparar un polipéptido recombinante con un grupo reactivo alfa-carbono del aminoácido terminal modificado. Las etapas del procedimiento incluyen formar el polipéptido recombinante y protegerlo con uno o más grupo protectores biológicamente añadidos en el alfa-carboxilo terminal C y alfa-amina terminal N. El polipéptido después puede hacerse reaccionar con los agentes químicos protectores para proteger selectivamente los grupos de cadena lateral reactivos y prevenir de ese modo que los grupos de cadena lateral sean modificados. El polipéptido después es escindido con un reactivo de escisión específico para el grupo protector biológico para formar un grupo reactivo carbono alfa del aminoácido terminal desprotegido. El grupo carbono alfa del aminoácido terminal no protegido es modificado con un agente modificador químico. El polipéptido copia sencillo modificado terminalmente protegido en la cadena lateral después es desprotegido en los grupos de cadena lateral para formar un polipéptido copia sencillo recombinante terminalmente modificado. El número y secuencia de etapas en el procedimiento puede variarse para lograr la modificación selectiva en el aminoácido terminal N y/o C del polipéptido.

La relación de un polipéptido de unión a PEG activado en la reacción de conjugación puede ser de aproximadamente 1:0,5 a 1:50, entre de aproximadamente 1:1 a 1:30, o de aproximadamente 1:5 a 1:15. Pueden utilizarse diversos tampones acuosos en el presente procedimiento para catalizar la adición covalente de PEG al polipéptido de unión. En una realización, el pH de un tampón utilizado es de aproximadamente 7,0 a 9,0. En otra realización, el pH está en un intervalo levemente básico, por ejemplo, de aproximadamente 7,5 a 8,5. Pueden utilizarse tampones que poseen una pKa cerca del intervalo de pH neutro, por ejemplo, tampón de fosfato. Otras

relaciones se utilizarán al fabricar proteínas conectadas a PEG multiespecífico, tal como aproximadamente 1:4 a 1:8, o aproximadamente 1:3 a 1:5

Pueden utilizarse las técnicas convencionales de separación y purificación conocidas en la técnica para purificar polipéptidos de unión PEGilados, tal como exclusión por tamaño (por ejemplo, filtración con gel) y cromatografía de intercambio iónico. Los productos también pueden separarse mediante la utilización de SDS-PAGE. Los productos que pueden separarse incluyen polipéptido de unión mono, di, tri, poli pegilado y no pegilado, así como libre de PEG. El porcentaje de conjugados mono-PEG puede controlarse mediante la combinación de fracciones más amplias alrededor del pico de elución para incrementar el porcentaje de mono-PEG en la composición. Aproximadamente el noventa por ciento de los conjugados mono-PEG representa un buen equilibrio de producción y actividad. Pueden ser deseables las composiciones en las que, por ejemplo, al menos noventa y dos por ciento o al menos noventa y seis por ciento de los conjugados son especies mono-PEG. En una realización de la presente invención el porcentaje de conjugados mono-PEG es de noventa por ciento a noventa y seis por ciento.

En una realización, el polipéptido de unión PEGilado de la invención contiene uno, dos o más restos PEG. En una realización, el/los resto/s PEG están unidos a un aminoácido residuo que está en la superficie de la proteína y/o lejos de la superficie que contacta el ligando diana. En una realización, La masa molecular total o combinada de PEG en PEG-polipéptido de unión es de aproximadamente 3.000 Da a 60.000 Da, opcionalmente de aproximadamente 10.000 Da a 36.000 Da. En una realización, el PEG en el polipéptido de unión pegilado es un PEG de cadena recta, sustancialmente lineal.

En una realización de la invención, el PEG en el polipéptido de unión pegilado no es hidrolizado del residuo de aminoácido pegilado utilizando un ensayo de hidroxilamina, por ejemplo, 450 mM de hidroxilamina (pH 6,5) durante 8 a 16 horas a temperatura ambiente, y de ese modo es estable. En una realización, más que el 80% de la composición es mono-PEG-polipéptido de unión estable, más preferentemente al menos el 90%, y mucho más preferentemente al menos el 95%.

En otra realización, los polipéptidos de unión pegilados de la invención preferentemente retendrán al menos aproximadamente el 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de la actividad biológica asociada a la proteína no modificada. En una realización, la actividad biológica se refiere a su capacidad de unirse a VEGFR-2, según lo evaluado por KD, k_{on} o k_{off} . En una realización específica, la proteína del polipéptido de unión pegilado muestra un incremento en la unión a VEGFR2 respecto del polipéptido de unión no pegilado.

La tasa de depuración sérica del polipéptido modificado con PEG puede reducirse en aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o aún 90%, respecto de la tasa de depuración del polipéptido de unión no modificado. El polipéptido modificado con PEG puede tener una vida media ($t_{1/2}$) que es potenciada respecto de la vida media de la proteína no modificada. La vida media del PEG-polipéptido de unión puede potenciarse en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 400% o 500%, o aún en 1000% respecto de la vida media del polipéptido de unión no modificado. En algunas realizaciones, la vida media de la proteína se determina in vitro, tal como en una solución salina tamponada o en suero. En otras realizaciones, la vida media de la proteína es una vida media in vivo, tal como la vida media de la proteína en el suero u otro fluido corporal de un animal.

Realizaciones adicionales de vectores y polinucleótidos

Los ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las diversas proteínas o polipéptidos desvelados en la presente memoria pueden sintetizarse químicamente. Puede seleccionarse la utilización de codón para mejorar la expresión en una célula. Dicha utilización del codón dependerá del tipo de célula seleccionada. Se han desarrollado patrones de uso de codón especializados para *E. coli* y otras bacterias, así como células de mamíferos, células vegetales, células de levadura y células de insectos. Véase por ejemplo: Mayfield et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 21 de enero de 2003; 100(2):438-42; Sinclair et al. Protein Expr Purif. Octubre de 2002; 26(1):96-105; Connell ND. Curr Opin Biotechnol. Octubre de 2001; 12(5):446-9; Makrides et al. Microbiol Rev. Septiembre de 1996; 60(3):512-38; y Sharp et al. Yeast. Octubre de 1991;7(7):657-78.

Las técnicas generales para la manipulación de ácidos nucleicos se describen por ejemplo en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volúmenes. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición, 1989, o F. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing y Wiley-Interscience: Nueva York, 1987) y actualizaciones periódicas. El ADN que codifica el polipéptido está operativamente ligado a elementos reguladores de transcripción y traducción apropiados obtenidos de genes de mamíferos, virales o insectos. Dichos elementos reguladores incluyen un promotor transcripcional, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión ribosómica al ARNm apropiados, y secuencias que controlan la finalización de la transcripción o traducción. Se incorporan adicionalmente la capacidad de replicar en un huésped, usualmente conferida por un origen de réplica, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes.

Las proteínas de la presente invención pueden producirse en forma recombinante y no solamente directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u

otro polipéptido que posee un sitio de escisión específico en el extremo terminal N de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa de señal) por la células huésped. Para las células huésped procarióticas que no reconocen y procesan una secuencia señal original, la secuencia señal es sustituida por una secuencia señal procariótica seleccionada, por ejemplo, del grupo de las líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, 1pp, o enterotoxina estable con calor II. Para la secreción de levadura la secuencia señal puede ser sustituida, por ejemplo, por la líder de invertasa de levadura, líder del factor alfa (que incluye las líderes del factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o la líder de la fosfatasa ácida, la líder de la glucoamilasa de *C. albicans* o la señal descrita en la Publicación PCT Núm. WO 90/13646. En la expresión celular en mamíferos, están disponibles las secuencias señal de mamíferos así como las líderes secretoras virales, por ejemplo, la señal gD de herpes simple. El ADN para dichas regiones precursoras puede estar ligado en el marco de lectura al ADN que codifica la proteína.

Los vectores de expresión y de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Generalmente, en los vectores de clonación esta secuencia es una que permite al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye los orígenes de la replicación o las secuencias que se replican autónomamente. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras, y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayor parte de bacterias Gram negativas, el origen del plásmido de 2.mu. es adecuado para las levaduras, y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamíferos. Generalmente, el origen del componente de la replicación no se necesita para los vectores de expresión en mamíferos (se puede usar normalmente el origen de SV40 debido a que contiene el promotor temprano).

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típica codifican las proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de los medios complejos, *por ejemplo*, el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que se transforman satisfactoriamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y de esta manera sobrevive el régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e hidromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados de células de mamíferos o eucarióticas son aquellos que permiten la identificación de células competentes para capturar el ácido nucleico del anticuerpo monovalente, tales como DHFR, timidina quinasa, metalotioneina-I y -II, preferentemente genes de metalotioneina de primate, adenosina deaminasa, ornitina decarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR primero son identificadas mediante el cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped adecuada cuando se emplea DHFR natural es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR.

Alternativamente, las células huésped (particularmente huéspedes naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o transformadas simultáneamente con secuencias de ADN que codifican el anticuerpo monovalente, proteína DHFR natural, y otro marcador seleccionable tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse mediante crecimiento celular en medio que contenga un agente de selección del marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la Patente Estadounidense Núm. 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido YRp7 de levadura (Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección de una cepa mutante que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona a continuación un entorno efectivo para detectar la transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano. Similarmente, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan mediante plásmidos conocidos que soportan el gen *Leu2*.

Adicionalmente, se pueden usar vectores derivados del plásmido circular de 1,6mu.m pKD1 para la transformación de las levaduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, se ha informado de un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina recombinante de ternero para *K. lactis* Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). También se han desvelado vectores de expresión de copias múltiples estables para la secreción de albúmina de suero humano recombinante madura mediante cepas industriales de *Kluyveromyces* (Fleer et al., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)).

Los vectores de expresión y de clonación contienen normalmente un promotor que el organismo huésped reconoce

y que se une de manera operativa con el ácido nucleico que codifica la proteína de la invención, por ejemplo, una proteína adaptadora a base de fibronectina. Los promotores apropiados para el uso con huéspedes procarióticos incluyen el promotor *phoA*, sistemas promotores *bet*-lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor triptófano (*trp*), y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, otros promotores bacterianos son apropiados. Los promotores para el uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) ligadas de manera operativa al ADN que codifica la proteína de la invención.

Se conocen secuencias promotoras de los eucariotas. Virtualmente, todos los genes eucarióticos tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases en la dirección 5' del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia que se encuentra de 70 a 80 bases en la dirección 5' del inicio de la transcripción de muchos genes es la región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayor parte de los genes eucarióticos está una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia de codificación. Todas estas secuencias se insertan de manera adecuada en los vectores de expresión eucarióticos.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para el uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa, hexoquinasa, piruvato decarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que poseen la ventaja adicional de transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol dehidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradadoras asociadas a metabolismo de nitrógeno, metalotioneina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores apropiados para el uso en la expresión de levaduras además se describen en la Publicación de Patente EP Núm. 73.657. Los potenciadores de levaduras también se utilizan en forma ventajosa con promotores de levaduras.

La transcripción desde vectores en células huésped de mamíferos puede controlarse, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus polio, virus de viruela aviar, adenovirus (tales como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis B y mucho más preferentemente Virus de simio 40 (SV40), de promotores heterólogos mamíferos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores choque de calor, siempre que esos promotores sean compatibles con los sistemas celulares huésped.

Los promotores iniciales y finales del virus SV40 se obtienen en forma conveniente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen viral de replicación SV40. El promotor inmediato inicial del citomegalovirus humano se obtiene en forma conveniente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar el ADN en huéspedes mamíferos utilizando virus de papiloma bovino como un vector es desvelado en la Patente Estadounidense Núm. 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la Patente Estadounidense Núm. 4.601.978. Véase también Reyes et al., *Nature* 297:598-601 (1982) en la expresión de ADNc beta-interferon humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa de virus de herpes simple. Alternativamente, la repetición terminal larga del virus de sarcoma de rous puede utilizarse como promotor.

La transcripción de un ADN que codifica proteínas de la invención mediante eucariotas superiores es a menudo incrementada por la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras son conocidas a partir de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína, e insulina). Típicamente, sin embargo, uno utilizará un potenciador de un virus de célula eucariótica. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 en el lado final del origen de la réplica (bp 100-270), el potenciador de promotor inicial de citomegalovirus, potenciador polio del lado final del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) sobre elementos de potenciación para la activación de promotores eucarióticos. El potenciador puede ser unido en el vector en la posición 5' o 3' a la secuencia que codifica el anticuerpo multivalente, pero preferentemente se ubica en el sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión utilizados en las células eucariotas huésped (por ejemplo, células de levadura, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos, o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la finalización de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles en las regiones no traducidas 5' y ocasionalmente 3', de los ADNs o ADNcs eucarióticos o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo multivalente. Un componente de terminación de transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

El ADN recombinante también puede incluir cualquier tipo de secuencia marcadora de proteínas que pueda ser útil para purificar la proteína. Los ejemplos de marcadores de proteína incluyen pero no se limitan a un marcador de histidina, un marcador FLAG, un marcador de myc, un marcador de HA, o un marcador de GST. Los vectores de clonación y expresión adecuados para el uso con huéspedes celulares bacterianos, micóticos, de levadura, y

mamíferos pueden encontrarse en *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, (Elsevier, Nueva York, 1985).

La construcción de expresión se introduce en la célula huésped mediante la utilización de un procedimiento adecuado para la célula huésped, tal como será evidente para uno con experiencia en la técnica. Una variedad de procedimientos para introducir ácidos nucleicos en células huésped son conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, electroporación; transfección que emplea cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano, u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección (en la que el vector es un agente infeccioso).

Las células huésped apropiadas incluyen procariotas, levadura, células de mamíferos, o células bacterianas. Las bacterias apropiadas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo, *E. coli* o especies de *Bacillus*. La levadura, preferentemente de especies de *Saccharomyces*, tal como *S. cerevisiae*, también puede utilizarse para la producción de polipéptidos. Diversos sistemas de cultivos celulares de mamíferos o insectos también pueden emplearse para expresar proteínas recombinantes. Los sistemas de *Baculovirus* para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos están recapituladas por Luckow and Summers, (*Bio/Technology*, 6: 47, 1988). Los ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos incluyen células endoteliales, células de riñón de mono COS-7, células CV-1, células L, C127, 3T3, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario de ser humano, HeLa, 293, 293T, y líneas celulares BHK. Los polipéptidos purificados se preparan mediante el cultivo de sistemas de vectores/huéspedes apropiados para expresar las proteínas recombinantes. Para muchas aplicaciones, el tamaño pequeño de muchos de los polipéptidos desvelados en la presente memoria haría la expresión en *E. coli* como el procedimiento preferente para expresión. La proteína es después purificada de los medios de cultivo o extractores celulares.

Realizaciones adicionales de células y expresión

Las proteínas preferentes para las realizaciones de células y producción son las proteínas adaptadoras basadas en fibronectina y proteínas relacionadas. Las células huésped apropiadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en la presente memoria son las células procariotas, levaduras, o eucariotas superiores descritas más arriba. Las procariotas apropiadas para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo, *Enterobacterias* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41 P desvelada en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferente es *E. coli* 294 (ATCC 31,446), aunque otras cepas son apropiadas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325). Estos ejemplos son ilustrativos en vez de restrictivos.

Además de las procariotas, los microbios eucarióticos tales como hongos filamentosos o levadura son huéspedes de clonación o expresión apropiados para los vectores que codifican proteínas. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura común de los panaderos, es la más comúnmente utilizada entre los microorganismos huésped eucarióticos inferiores. Sin embargo, una serie de otros géneros, especies, y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en la presente memoria, tales como huéspedes *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilorum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (Publicación de Patente EP Núm. 402.226); *Pichia pastoris* (Publicación de Patente EP Núm. 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (Publicación de Patente EP Núm. 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y huéspedes *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células huésped apropiadas para la expresión de proteínas glicosiladas de la invención se obtienen de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas baculovirales y variantes y células huésped de insectos permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de las frutas), y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas virales para la transfección están públicamente disponibles, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus pueden utilizarse como el virus en la presente memoria en conformidad con la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

En algunos casos será deseable producir proteínas en células de vertebrados, tales como glicosilación, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejido) se ha vuelto un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrional humano (células 293 o 203 subclonadas para el crecimiento en el cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36: 59. (1977)); las células renales de bebé de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); células renales de mono (CV1, ATCC CCL 70); células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata

búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL 51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; una línea de hepatoma humano (Hep G2); y células de mieloma o linfoma (por ejemplo, células Y0, J558L, P3 y NS0) (véase la Patente Estadounidense Núm. 5.807.715). Los cultivos celulares vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, y tabaco también pueden utilizarse como huéspedes.

Las células huéspedes son transformadas con los vectores de clonación o expresión descritos en la presente memoria para la producción de proteínas y son cultivados en medios con nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Células de cultivo

Las células huésped utilizadas para producir las proteínas de la presente invención pueden ser cultivadas en una variedad de medios. Los medios comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Mínimo Esencial ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio Mínimo Esencial modificado de Dulbecco ([DMEM], Sigma) son adecuados para el cultivo de células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), Patentes Estadounidenses Núm. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; WO90/03430; WO87/00195; o Patente Estadounidense Núm. Re. 30,985; pueden utilizarse como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede suplementar cuanto sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tal como la insulina, transferrina, o el factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos de traza (definidos como compuestos inorgánicos generalmente presentes en concentraciones finales del orden micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Se puede también incluir cualquier otro suplemento en concentraciones apropiadas que serían conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son aquellas previamente utilizadas con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el artesano con experiencia común.

Las proteínas desveladas en la presente memoria también pueden producirse mediante la utilización de sistemas de traducción de células. Para dichos fines los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido deben modificarse para permitir la transcripción in vitro para producir ARNm y para permitir la traducción libre de células del ARNm en el sistema particular libre de células que esté siendo utilizado (eucarióticos tales como un sistema de traducción libre de células de mamífero o levadura o procarióticos tales como un sistema de traducción libre de células bacterianas).

Las proteínas de la invención también pueden producirse mediante síntesis química (por ejemplo, mediante los procedimientos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª edición, 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Las modificaciones a la proteína también pueden producirse mediante síntesis química.

Las proteínas de la presente invención pueden purificarse mediante procedimientos de aislamiento /purificación para proteínas en general conocidos en el campo de la química de proteínas. Los ejemplos no restrictivos incluyen extracción, recristalización, precipitación (por ejemplo, con sulfato de amonio o sulfato de sodio), centrifugación, diálisis, ultrafiltración, cromatografía por adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de fase normal, cromatografía de fase inversa, filtración en gel, cromatografía por permeación en gel, cromatografía por afinidad, electroforesis, distribución en contracorriente o cualquier combinación de las mismas. Después de la purificación, los polipéptidos pueden intercambiarse en diferentes tampones y/o concentrarse mediante cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, filtración y diálisis.

El polipéptido purificado preferentemente es al menos 85% puro, más preferentemente al menos 95% puro, y mucho más preferentemente al menos 98% puro. Sin importar el valor numérico exacto de la pureza, el polipéptido es suficientemente puro para el uso como un producto farmacéutico.

Realizaciones adicionales de glicosilación

En algunas realizaciones puede ser preferente glicosilar las proteínas de la invención. Preferentemente, dichas proteínas son proteínas adaptadoras basadas en fibronectina. Las proteínas adaptadoras basadas en fibronectina normalmente no contienen sitios de glicosilación, sin embargo, dicha glicosilación puede ser manipulada genéticamente en la proteína.

La glicosilación de proteínas es típicamente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un residuo asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral asparagina. Estas pueden manipularse genéticamente formando las proteínas de la invención, en particular proteínas adaptadoras a base de fibronectina y sus polinucleótidos correspondientes. De ese modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los

azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, mucho más comúnmente serina o treonina, aunque también puede utilizarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

5 La adición de los sitios de glicosilación a las proteínas de la invención se lleva a cabo en forma conveniente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera tal que contenga uno o más de las secuencias tripeptídicas descritas más arriba (para los sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glicosilación ligada a O).

10 Las moléculas de ácido nucleico que codifican dichas variantes de secuencia de aminoácidos de las proteínas de la invención son preparadas mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de cassette de una variante preparada antes o una versión de no variante de la proteína (por ejemplo, proteína adaptadora en base a fibronectina).

15 Puede ser deseable modificar las proteínas de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, para potenciar la citotoxicidad mediada por las células dependiente del antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede lograrse mediante la introducción de una porción activa de una región Fc, así como una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de la proteína (por ejemplo, proteína adaptadora en base a fibronectina), generando de ese modo una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

20 En una realización, la variante de región Fc puede mediar la citotoxicidad mediada por las células dependiente del anticuerpo (ADCC) en presencia de células efectoras humanas más efectivamente, o puede unirse a un receptor gamma Fc (Fc γR) con mejor afinidad, que una región Fc de secuencia original. Dichas variantes de región Fc pueden comprender una modificación de aminoácido en cualquiera de una o más de las posiciones 256, 290, 298, 312, 326, 330, 333, 334, 360, 378 o 430 de la región Fc, en la que la numeración de los residuos en la región Fc es aquella del índice EU como en Kabat.

Toxinas y otras moléculas ligadas a proteínas de la invención

30 Las proteínas de la invención según lo desvelado en la presente memoria, pueden estar ligadas a un agente citotóxico. Dichas realizaciones pueden prepararse mediante procedimientos in vitro o in vivo según sea apropiado. Los procedimientos in vitro, incluyen química de conjugación bien conocida en la técnica que incluye química compatible con proteínas, tales como química para aminoácidos específicos, tales como Cys y Lys. A fin de conectar un agente citotóxico a la proteína de la invención, se utiliza un grupo conector o grupo reactivo. Los grupos conectores apropiados son bien conocidos en la técnica e incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles al ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles a la peptidasa y grupos lábiles a la esterasa. Los grupos conectores preferentes son los grupos disulfuro y grupos tioéter. Por ejemplo, los conjugados pueden construirse mediante la utilización de una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter entre el anticuerpo y el agente citotóxico. Los agentes citotóxicos preferentes son maitansinoides, taxanos y análogos de CC-1065.

40 Los procedimientos in vivo incluyen conectar proteínas tóxicas, de marcado o etiquetado a proteínas de la invención como proteínas de fusión. Un polipéptido sencillo se produce mediante la utilización de un polinucleótido de codificación para el polipéptido deseado. Las proteínas tóxicas pueden controlarse mediante la expresión en células insensibles o resistentes a la toxina o con promotores inducibles en células que son sensibles.

45 Aunque no de manera limitante, en diversas realizaciones, las proteínas de la invención pueden estar ligadas a proteínas, tales como una toxina bacteriana, una toxina vegetal, ricina, abrina, una ribonucleasa (RNasa), DNasa I, una proteasa, enterotoxina-A estafilocócica, proteína antiviral de hierba carmesí, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de Pseudomonas, endotoxina de Pseudomonas, Ranpimasa (Rap), Rap (N69Q), una enzima, o una proteína fluorescente.

50 Los maitansinoides y los análogos de maitansinoides están entre los agentes citotóxicos preferentes. Los ejemplos de maitansinoides apropiados incluyen maitansinol y análogos de maitansinol. Los maitansinoides apropiados son desvelados en las Patentes Estadounidenses Núm. 4.424.219; 4.256.746; 4.294.757; 4.307.016; 4.313.946; 4.315.929; 4.331.598; 4.361.650; 4.362.663; 4.364.866; 4.450.254; 4.322.348; 4.371.533; 6.333.410; 5.475.092; 5.585.499; y 5.846.545.

55 Los taxanos también son agentes citotóxicos preferentes. Los taxanos apropiados para el uso en la presente invención son desvelados en las Patentes Estadounidenses Núm. 6.372.738 y 6.340.701.

CC-1065 y sus análogos también son fármacos citotóxicos preferentes para el uso en la presente invención. CC-1065 y sus análogos son desvelados en las Patentes Estadounidenses Núm. 6.372.738; 6.340.701; 5.846.545 y

5.585.499.

Un candidato atractivo para la preparación de dichos conjugados citotóxicos es CC-1065, que es un potente antibiótico antitumoral aislado del caldo de cultivo de *Streptomyces zelensis*. CC-1065 es aproximadamente 1000 veces más potente in vitro que los fármacos anticáncer comúnmente utilizados, tales como doxorubicina, metotrexato y vincristina (B. K. Bhuyan et al., *Cancer Res.*, 42, 3532-3537 (1982)).

Los fármacos citotóxicos tales como metotrexato, daunorubicina, doxorubicina, vincristina, vinblastina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, y caliqueamicina también son apropiados para la preparación de los conjugados de la presente invención, y las moléculas del fármaco también pueden ser ligadas a las moléculas de anticuerpo a través de una molécula vehículo intermedia tal como albúmina sérica.

10 Para las aplicaciones de diagnóstico, los anticuerpos de la presente invención típicamente serán marcados con un resto detectable. El resto detectable puede ser cualquiera que sea capaz de producir, directamente o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como H3, C14 o 13, P32, S35, o I131; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante.

15 Conjugación

Puede emplearse cualquier procedimiento conocido en la técnica para conjugar una proteína con el resto detectable, incluyendo aquellos procedimientos descritos por Hunter, et al., *Nature* 144:945 (1962); David, et al., *Biochemistry* 13:1014 (1974); Pain, et al., *J. Immunol. Meth.* 40:219 (1981); y Nygren, J. *Histochem. y Cytochem.* 30: 407 (1982).

20 Los procedimientos in vitro, incluyen química de conjugación bien conocida en la técnica que incluye química compatible con proteínas, tales como química para aminoácidos específicos, tales como Cys y Lys. A fin de conectar un resto (tal como PEG) a una proteína de la invención, se utiliza un grupo conector o grupo reactivo. Los grupos conectores apropiados son bien conocidos en la técnica e incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles al ácido, grupos fotolábiles, grupos lábiles a la peptidasa y grupos lábiles a la esterasa. Los grupos conectores preferentes son los grupos disulfuro y grupos tioéter dependiendo de la aplicación. Para las proteínas adaptadoras basadas en fibronectina u otras proteínas sin un aminoácido cys, un cys puede manipularse genéticamente en una ubicación para permitir que la actividad de la proteína exista creando al mismo tiempo una ubicación para la conjugación.

Usos ejemplares

30 Las proteínas de unión a VEGFR-2 descritas en la presente memoria y sus variantes relacionadas son útiles en una serie de aplicaciones mediante la competencia por o el bloqueo de la unión a un VEGFR-2 así como la administración de restos de imágenes o citotóxicos a células, preferentemente células que expresan VEGFR-2.

35 El tamaño pequeño y la estructura estable de estas moléculas pueden ser particularmente valiosos con respecto a la fabricación del fármaco, rápida depuración del cuerpo para ciertas aplicaciones en las que se desea rápida depuración o la formulación en sistemas de administración nuevos que son apropiados o mejorados mediante la utilización de una molécula con dichas características.

40 En base a su eficacia como inhibidores de la actividad biológica de VEGF, los polipéptidos de la invención son efectivos contra un número de afecciones asociadas a angiogénesis inapropiada, que incluyen pero no se limitan a trastornos autoinmunes (por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal o psoriasis); trastornos cardíacos (por ejemplo, arteriosclerosis oestenosis de vasos sanguíneos); retinopatías (por ejemplo, retinopatías proliferativas en general, retinopatía diabética, glaucoma neovascular o degeneración macular relacionada con la edad), enfermedad renal (por ejemplo, nefropatía diabética, nefrosclerosis maligna, síndromes de microangiopatía trombótica; rechazo al trasplante; enfermedad renal inflamatoria; glomerulonefritis; glomerulonefritis mesangioproliferativa; síndrome urémico-hemolítico; y nefrosclerosis hipertensiva); hemangioblastoma; hemangiomas; hiperplasias de tiroide; trasplantes de tejido; inflamación crónica; síndrome de Meigs; efusión del pericardio; efusión pleural; enfermedades autoinmunes; diabetes; endometriosis; asma crónico; fibrosis no deseable (particularmente fibrosis hepática) y cáncer, así como complicaciones que surgen del cáncer, tal como efusión pleural y ascitis. Preferentemente, los polipéptidos de unión a VEGFR de la invención pueden utilizarse para el tratamiento de, prevención de enfermedades hiperproliferativas o cáncer y la diseminación metastásica de cánceres. Los ejemplos no restrictivos de cánceres incluyen cáncer de vejiga, sangre, hueso, cerebro, mama, cartílagos, colon, riñón, hígado, pulmón, ganglios linfáticos, tejido nervioso, ovario, páncreas, próstata, musculoesquelético, piel, médula espinal, bazo, estómago, testículos, timo, tiroides, tráquea, tracto urogenital, uréter, uretra, útero, o vagina. Pueden encontrarse afecciones tratables adicionales en la Patente Estadounidense Núm. 6.524.583. Otras referencias que describen los usos para los polipéptidos de unión a VEGFR-2 incluyen: McLeod DS et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Febrero de 2002; 43(2):474-82; Watanabe et al. *Exp Dermatol.* Noviembre de 2004; 13(11):671-81; Yoshiji H et al., *Gut.* Septiembre de 2003; 52(9): 1347-54; Verheul et al., *Oncologist.* 2000;5 Suppl 1:45-50; Boldicke et al., *Stem Cells.* 2001;19(1):24-36.

Según lo que se describe en la presente memoria, las enfermedades asociadas a la angiogénesis incluyen, pero no se limitan a, cáncer dependiente de angiogénesis, que incluye, por ejemplo, tumores sólidos, tumores de origen

sanguíneo tales como leucemias, y metástasis tumoral; tumores benignos, por ejemplo hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomias, y granulomas piogénicos; trastornos inflamatorios tales como inflamación inmune y no inmune; reumatismo articular crónico y psoriasis; enfermedades angiogénicas oculares, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía de premadurez, degeneración macular, rechazo al injerto corneal, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rubeosis; Síndrome de Osler-Webber; angiogénesis miocárdial; neovascularización de plaquetas; telangiectasia; articulaciones hemofílicas; angiofibroma; y granulación de herida y curación de herida; escleroderma, psoriasis, telangiectasia, granuloma piogénico, colaterales coronarios, angiogénesis del miembro isquémico, enfermedades corneales, rubeosis, artritis, neovascularización diabética, fracturas, vasculogenesis, hematopoyesis.

10 **Agentes adicionales que pueden utilizarse con las realizaciones apropiadas de la invención**

En otros tratamientos terapéuticos o composiciones, las proteínas de la invención son coadministradas o administradas secuencialmente con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los agentes terapéuticos apropiados incluyen, pero no se limitan a, agentes terapéuticos reconocidos, otros agentes biológicos reconocidos, y agentes citotóxicos o citostáticos. En algunos casos será preferente administrar agentes en el mismo u otro vial, jeringa u otro dispositivo de administración que retiene la formulación líquida, terapéuticamente aceptables.

Los agentes terapéuticos para el cáncer son aquellos que buscan eliminar o limitar el crecimiento de células cancerígenas teniendo al mismo tiempo mínimos efectos en el paciente. De ese modo, dichos agentes pueden explotar cualquier diferencia en las propiedades de células cancerígenas (por ejemplo, metabolismo, vascularización o presentación de antígeno superficial celular) de las células huésped saludables. Las diferencias en la morfología del tumor son sitios potenciales para la intervención: por ejemplo, el segundo agente terapéutico puede ser un anticuerpo tal como un anticuerpo anti-VEGF que es útil en retardar la vascularización del interior de un tumor sólido, haciendo más lenta de ese modo su velocidad de crecimiento. Otros agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, aditamentos tales como granisetron HCl, inhibidores de andrógenos tales como acetato de leuprolida, antibióticos tales como doxorubicina, antiestrógenos tales como tamoxifen, antimetabolitos tales como interferon alfa- 2a, agentes citotóxicos tales como taxol, inhibidores de enzimas tales como inhibidor de ras farnesil-transferasa, inmunomoduladores tales como aldesleuquina, y derivados de mostaza nitrogenada tales como melfalan HCl, y similares.

Los agentes terapéuticos que pueden combinarse con proteínas de la invención para un mejoramiento en la eficacia anti-cáncer incluyen diversos agentes utilizados en la práctica de oncología (Referencia: Cancer, Principles & Practice of Oncology, DeVita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A., 6° edición, Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001), tales como docetaxel, paclitaxel, doxorubicina, epirubicina, ciclofosfamida, trastuzumab, capecitabina, tamoxifen, toremifeno, letrozol, anastrozol, fulvestrant, exemestano, goserelina, oxaliplatino, carboplatino, cisplatino, dexametasona, antida, bevacizumab, 5-fluorouracilo, leucovorina, levamisol, irinotecan, etoposida, topotecan, gemcitabina, vinorelbina, estramustina, mitoxantrona, abarelix, zoledronato, estreptozocina, rituximab, idarubicina, busulfano, clorambucil, fludarabina, imatinib, citarabina, ibritumomab, tositumomab, interferon alfa-2b, melfalam, bortezomib, altretamina, asparaginasa, gefitinib, erlonitib, anticuerpo receptor anti-EGF (por ejemplo, cetuximab o panitumab), ixabepilona, eptilonas o derivados de los mismos, y conjugados de fármacos citotóxicos y anticuerpos contra los receptores superficiales celulares. Los agentes terapéuticos preferentes son agente de platino (tales como carboplatino, oxaliplatino, cisplatino), taxanos (tales como paclitaxel, docetaxel), gemcitabina, y camptotecina.

Uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse antes, en forma concurrente, o después del anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de la invención. El artesano experto entenderá que para cada agente terapéutico puede haber ventajas en un orden particular de administración. En forma similar, el artesano experto entenderá que para cada agente terapéutico, variará la longitud de tiempo entre la cual el agente, y un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de la invención se administran.

45 **Formulación y administración**

Las formulaciones terapéuticas de la invención son preparadas para el almacenamiento mediante el mezclado de las proteínas descritas que poseen el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16° edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones secas. Los vehículos, excipientes, o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; parabenos de alquilo tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos que aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Las formulaciones en la presente memoria también pueden contener más que un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que esté siendo tratada, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan en forma adversa uno con otro. Los ejemplos de combinaciones de compuestos activos se proporcionan en la presente memoria. Dichas moléculas están presentes en forma apropiada en combinación en cantidades que son efectivas para el fin previsto.

Los principios activos también pueden encerrarse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16° edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones que deben ser utilizadas para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos apropiados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos que contienen las proteínas de la invención, cuyas matrices están en forma de artículos con forma, por ejemplo, películas, o microcápsula. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente Estadounidense Núm. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de vinilo-etileno no degradable, copolímeros de ácido láctico- ácido glicólico no degradable tal como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico- ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)- 3-hidroxi-butírico. Si bien los polímeros tales como acetato de vinilo-etileno y ácido láctico- ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas de la invención pueden permanecer en el cuerpo durante un tiempo largo, las mismas pueden desnaturalizarse o agregarse como resultados de la exposición a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse abordajes racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlace S-S intermolecular a través del intercambio de tiodisulfuro, puede lograrse la estabilización mediante la modificación de los residuos sulfhidrilos, liofilización a partir de soluciones ácidas, control del contenido de humedad, utilización de aditivos apropiados, y desarrollo de composiciones de matriz polimérica específica.

Los vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables, apropiados son bien conocidos y pueden ser determinados por aquellos con experiencia en la técnica a medida que la situación clínica lo garantice. Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes apropiados incluyen: (1) solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH aproximadamente 7,4, que contiene aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina sérica humana, (2) 0,9% de solución salina (0,9% p/v de NaCl, y (3) 5% (p/v) de dextrosa.

En algunas realizaciones, la formulación comprende 5-100 mM de acetato de sodio, manitol o un excipiente comparable (por ejemplo, sorbitol) en concentraciones de 50 mM a e incluyendo concentraciones hipertónicas, opcionalmente cloruro de sodio de 0 a aproximadamente 200 mM, con un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 7,5. En algunas realizaciones, la formulación comprende 5-100 mM de acetato de sodio, 0 a aproximadamente 200 mM de cloruro de sodio, y 50-150 mM de manitol, en la que el pH es de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,0. En una realización, la formulación comprende aproximadamente 10 mM de acetato de sodio, aproximadamente 100 mM de cloruro de sodio, y aproximadamente 110 mM de manitol con un pH de aproximadamente 4,5. En otra realización, la formulación comprende aproximadamente 10 mM de acetato de sodio y aproximadamente 100 mM de manitol en un pH de aproximadamente 4,5 a 6. La proteína de la invención se formulará en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml. En una realización, la concentración de la proteína es de 1 a 15 mg/ml. En una realización la concentración de la proteína es de aproximadamente 9 a aproximadamente 11 mg/ml.

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, preferentemente de aproximadamente 1 mg/metro cuadrado a aproximadamente 2000 mg/metro cuadrado de proteína es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, más preferentemente de aproximadamente 10 mg/metro cuadrado a aproximadamente 1000 mg/metro cuadrado de anticuerpo si, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se repite hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles y no se excluyen.

Para las aplicaciones terapéuticas, las proteínas o conjugados de la invención son administrados a un sujeto, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Pueden administrarse por vía intravenosa como una inyección rápida o mediante infusión continua durante un período de tiempo, mediante vía intramuscular, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, topical, o inhalación. La proteína también puede administrarse mediante las vías intratumoral, peritumoral, intralesional, o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos locales así como sistémicos. Un experto en la técnica reconocerá que la dosificación apropiada de una proteína de la invención

depende de muchos factores incluyendo la biodisponibilidad.

En algunas realizaciones, las proteínas de la invención se administran por vía intravenosa a un sujeto que tiene una afección asociada a angiogénesis inapropiada. En algunas realizaciones, la proteína se administra en una dosificación entre aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4 mg/kg. En algunas realizaciones la proteína se administra en una dosificación de aproximadamente 1 mg/kg o aproximadamente 3 mg/kg. La proteína puede administrarse al menos una vez por mes, una vez por semana, dos veces por semana, o una vez por día.

En algunas realizaciones, las proteínas de la invención se administran por vía subcutánea. Las proteínas se formulan generando composiciones farmacéuticamente aceptables y pueden administrarse dos veces diarias, una vez diaria, en días alternativos, o semanalmente. En algunas realizaciones, las proteínas se administran entre 0,5 mg/kg a 2 mg/kg o entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,3 mg/kg. En algunas realizaciones, las proteínas se administran en 0,1, 0,2, 0,3, o 0,4 mg/kg diarios. En algunas realizaciones, al paciente primero se le administra una carga intravenosa de proteína, por ejemplo de 0,5 a 2mg/kg, y posteriormente se le administra la proteína por vía subcutánea.

La dosificación y cronograma de dosis del polipéptido puede ajustarse en base a la concentración plasmática del polipéptido que debe ser lograda en el sujeto. En conformidad con la invención, la administración del polipéptido da como resultado una concentración pico de entre 1 y 7 μ M.

La dosificación y cronograma de dosis del polipéptido puede ajustarse en base a la concentración plasmática de VEGF-A que debe ser lograda en el sujeto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la administración del polipéptido da como resultado una concentración pico de entre 5 y 40 pM, entre 10 y 30 pM, entre 10 y 25 pM, o entre 10 y 20 pM.

La presente invención también incluye kits que comprenden uno o más de los elementos descritos en la presente memoria, e instrucciones para el uso de aquellos elementos. En una realización preferente, un kit de la presente invención incluye un polipéptido de la invención y un agente terapéutico. Las instrucciones para esta realización preferente incluyen instrucciones para inhibir el crecimiento de una células cancerígena mediante la utilización de la proteína de la invención, y el agente terapéutico; y/o instrucciones para un procedimiento para tratar un paciente que posee un cáncer mediante la utilización de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o conjugado de la invención, y el agente terapéutico.

Preferentemente; el agente terapéutico utilizado en el kit se selecciona del grupo constituido por docetaxel, paclitaxel. Doxorubicina, epirubicina, ciclofosfamida, trastuzumab, capecitabina, tamoxifen, toremifeno, letrozol, anastrozol, fulvestrant, exemestán, goserelina, oxaliplatino, carboplatino, cisplatino, dexametasona, antida, bevacizumab: 5-fluorouracilo; leucovorina, levamisol, irinotecan, etoposida, topotecan, gemcitabina, vinorelbina, estramustina, mitoxantrona, abarelix, zoledronato, estreptozocina, rituximab, idarubicina, busulfan. clorambucil. fludarabina, imatinib; citarabina, ibritumomab, tositumomab, interferon alfa-2b, melfalam, bortezomib, altretamina, asparaginasa, gefitinib, erlonitib, anticuerpo receptor anti-EGF (por ejemplo, cetuximab o panitumumab), ixabepilona, y una epotilona o derivado de los mismos. Más preferentemente, el agente terapéutico es una gente de platino tal como carboplatino; oxaliplatino, cisplatino, un taxano (tal como paclitaxel, docetaxel) gemcitabina o camptotecina.

Los elementos de los kits de la presente invención son en una forma apropiada para un kit, tal como una solución o polvo liofilizado. La concentración o cantidad de los elementos de los kits será entendida por los artesanos expertos variando dependiendo de la identidad y uso previsto de cada elemento del kit.

Cuando se suministra un kit, los diferentes componentes de la composición pueden envasarse en envases separados y mezclarse inmediatamente antes del uso. Dichos envasado de los componentes en forma separada puede permitir el almacenamiento a largo plazo si perder las funciones de los componentes activos.

Los reactivos incluidos en los kits pueden suministrarse en envases de cualquier clase en los que la vida de los diferentes componentes sea preservada y no sean absorbidos o alterados por los materiales del envase. Por ejemplo: ampollas de vidrio selladas pueden contener los agentes terapéuticos liofilizados, o tampones que han sido envasados bajo un gas neutral, no reactivo, tal como nitrógeno. Las ampollas pueden consistir en cualquier material apropiado, tal como vidrio, polímeros orgánicos, tales como policarbonato, poliestireno, etc., cerámica, metal o cualquier otro material típicamente empleado para retener reactivos similares. Otros ejemplos de envases apropiados incluyen botellas simples que pueden fabricarse a partir de sustancias similares a las ampollas, y envoltorios, que pueden comprender interiores revestidos en láminas, tales como aluminio o una aleación. Otros envases incluyen tubos de ensayo, viales, frascos, botellas, bolsas IV, jeringas o similares. Los envases pueden tener un puerto de acceso estéril, tal como una botella que posee un tapón que puede ser perforado por una aguja de inyección hipodérmica. Otros envases pueden tener dos compartimentos que están separados por una membrana fácilmente removible que con la remoción permite que los componentes sean mezclados. Las membranas removibles pueden ser de vidrio, plástico, goma, etc.

Los kits también pueden suministrarse con materiales de instrucción. Las instrucciones pueden estar impresas en papel u otro sustrato, y/o pueden suministrarse como un medio legible electrónico; tal como un disco flexible, CD-ROM, DVD-ROM, disco Zip; cinta de vídeo, cinta de audio, dispositivo de memoria flash, etc. Las instrucciones

detalladas no pueden estar físicamente asociadas al kit, en vez, un usuario puede dirigirse a un sitio web de internet especificado por el fabricante o distribuidor del kit, o pueden suministrarse como un correo electrónico.

Los cánceres y células de los mismos denominadas en las instrucciones de los kits incluyen cáncer de mama, cáncer de colon, carcinoma de ovario, osteosarcoma, cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma sinovial, cáncer pancreático, melanoma, mieloma múltiple, neuroblastoma, y rabdomiosarcoma.

La dosificación de agentes terapéuticos o citotóxicos administrados en los procedimientos descritos en la presente memoria puede ser determinada fácilmente por aquellos expertos en la técnica. Los prospectos farmacéuticos también pueden consultarse al determinar la dosificación apropiada. A modo de ejemplo, se hace referencia a los prospectos para SutentTM, NexavarTM, bevacizumab: trastuzumab: gemcitabina, temozolomida, GleeevacTM, paclitaxel; y doxetaxel.

Un aspecto de la invención proporciona el uso de concentraciones plasmáticas de VEGF-A para determinar una dosificación efectiva de las proteínas que deben ser administradas. Los niveles plasmáticos de VEGF-A se han vinculado como un marcador para la inhibición de VEGFR2 mediante anticuerpos anti-VEGFR2 (Bocci. et al. Cáncer Res. 64: 6816-6625 (2004))

Las concentraciones plasmáticas de VEGF-A pueden determinarse en un sujeto mediante una variedad de ensayos conocidos. Los inmunoensayos son comúnmente utilizados para cuantificar los niveles de proteínas en muestras celulares, y muchas otras técnicas de inmunoensayos son conocidas en la técnica. Los inmunoensayos ejemplares que pueden conducirse en conformidad con la invención incluyen inmunoensayo de polarización por fluorescencia (FPFA), inmunoensayo de fluorescencia (HA), inmunoensayo de enzimas (EI), inmunoensayo de inhibición nefelométrica (NIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), y radioinmunoensayo (RIA). Un resto indicador, o grupo etiqueta, puede unirse a los anticuerpos del sujeto y se selecciona de modo de cumplir las necesidades de diversos usos del procedimiento que a menudo están impuestas por la disponibilidad de equipo de ensayo y procedimientos de inmunoensayo compatible. Las técnicas generales que deben utilizarse en la realización de los diversos inmunoensayos observadas más arriba son conocidas por aquellos con experiencia común en la técnica.

Una concentración plasmática basal de VEGF-A puede determinarse en un sujeto previo al comienzo de la terapia con polipéptidos. El valor basal también puede determinarse entre la administración del polipéptido, por ejemplo, en el nivel valle del polipéptido. El valor basal también puede determinarse a partir de un valor de referencia, tal como a partir de la concentración plasmática promedio de VEGF-A en una población.

La concentración plasmática de VEGF-A se determina en un sujeto después de la administración de una proteína de la invención. La concentración plasmática puede determinarse después de aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36, o 48 horas o después de varios días o más después de la administración de una proteína de la invención y la concentración determinada puede ser la concentración plasmática pico de VEGF-A. La dosificación administrada al sujeto se ajusta para lograr al menos un incremento del 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% o más en la concentración plasmática de VEGF-A sobre la concentración basal. La dosificación administrada al sujeto puede ajustarse para lograr un incremento máximo en la concentración plasmática de VEGF-A en el sujeto. Una persona experta en la técnica apreciará que la concentración plasmática máxima de VEGF-A variará entre los sujetos. Si bien no intentamos ceñirnos a la teoría, se cree que las concentraciones plasmáticas de VEGF-A son una medición indirecta de la ocupación de VEGFR2. Por ello, cuanto mayor es el incremento en la concentración de VEGF-A, más receptores de VEGFR2 se unen a las proteínas de la invención y en consecuencia mayor es la inhibición de VEGFR2.

Otro aspecto de la invención proporciona que la eficacia de una proteína de la invención en el tratamiento de un sujeto que tiene una afección asociada a angiogénesis inapropiada puede determinarse mediante la concentración plasmática de VEGF-A de un sujeto. La concentración plasmática de VEGF-A en un sujeto se determina después de la administración de una proteína de la invención. La concentración plasmática puede determinarse después de aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36, o 48 horas o después de varios días o más después de la administración de una proteína de la invención y la concentración determinada puede ser la concentración plasmática pico de VEGF-A. La eficacia del tratamiento se determina en base al cambio de los niveles de VEGF-A en el sujeto sobre el valor basal. Un gran incremento en la concentración plasmática de VEGF-A respecto del valor basal indica un buen pronóstico para el tratamiento.

Otro aspecto de la invención proporciona procedimientos para monitorear el riesgo de toxicidad en base a la concentración plasmática de VEGF-A. La concentración plasmática de VEGF-A se determina en un paciente después de la administración de un polipéptido de la invención. La concentración plasmática puede determinarse después de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36, o 48 horas o después de varios días o más después de la administración de una proteína de la invención y la concentración determinada puede ser la concentración plasmática pico de VEGF-A. La concentración plasmática de VEGF-A del sujeto después se compara con una concentración de riesgo de toxicidad de VEGF-A. Una concentración de riesgo de toxicidad puede ser al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 pM o más de la concentración plasmática de VEGF-A. Una concentración de riesgo de toxicidad también puede calcularse en base a la concentración plasmática basal de VEGF-A de un sujeto determinada antes

de iniciada la terapia con polipéptidos. La concentración de riesgo de toxicidad puede ser al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 veces o más la concentración plasmática basal de VEGF-A del sujeto. El riesgo de toxicidad también puede determinarse a partir de las concentraciones plasmáticas promedio de VEGF-A que inducen las toxicidades restrictivas de las dosis en una población. Una persona experta es capaz de evaluar el riesgo de toxicidad como uno de los muchos factores que afectan el tratamiento del paciente.

Otro aspecto de la invención proporciona procedimientos para seguir una respuesta inmunogénica a una proteína de la invención. Un polipéptido se administra a un sujeto seguido por la determinación de la concentración plasmática de VEGF-A en el sujeto. La concentración plasmática puede determinarse después de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36, o 48 horas o después de varios días o más después de la administración de una proteína de la invención y la concentración determinada puede ser la concentración plasmática pico de VEGF-A. La concentración plasmática de VEGF-A del sujeto después se compara con la concentración plasmática de VEGF-A determinada en uno o más puntos de tiempo previos. La concentración plasmática de VEGF-A previamente determinada puede ser una concentración pico. Los puntos de tiempo previos incluyen un punto después de una administración previa del polipéptido. La concentración determinada en uno o más puntos de tiempo previos incluye un promedio de la concentración plasmática de VEGF-A determinada en dos o más puntos de tiempo previos.

Si bien no deseamos vincularnos a la teoría, un sujeto puede comenzar a producir anticuerpos neutralizantes que se unen a una proteína de la invención evitando la unión a VEGFR2. Como resultado, las concentraciones plasmáticas de VEGF-A se reducen o no aumentan después de la administración del polipéptido en la misma medida que en las administraciones previas.

Ejemplos

La invención ahora se describe por referencia a los siguientes ejemplos, que son solamente ilustrativos, y no tienen como objeto limitar la presente invención. Si bien la invención se ha descrito en detalle y con referencia a realizaciones específicas de las mismas, será evidente para aquel con experiencia en la técnica que pueden realizarse diversos cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la misma.

Los ejemplos de más abajo se llevaron a cabo con el Comp-I, un ligante de VEGFR2 de proteína adaptadora de dominio basada en fibronectina.

Ejemplo 1: Ensayo de proliferación de líneas celulares Pro-B murinas

Se colocaron células Ba/F3 murinas que expresan en forma estable la proteína de fusión VEGFR2 (que comprende el dominio extracelular de hVEGFR2 y el dominio intracelular de hEpoR) en placas de 96 pocillos en 25.000 células/pocillo en 90 ml de medio de crecimiento que contenía 15 ng/ml de VEGF-A, VEGF-C, o VEGF-D. Las diluciones en serie del Comp-I se prepararon en 10x la concentración final, y se añadieron 10 ml del Comp-I a cada pocillo. Se incubaron las placas a 37°C/5% CO₂ durante 48-72 horas. Se añadió reactivo de ensayo de proliferación celular (CellTiter 96, Promega) a cada pocillo (20 ml/pocillo), y las placas además se incubaron durante 3-4 horas. Al final de período de incubación, se leyó la absorbancia (A490) en un lector de placa de 96 pocillos. La Figura 1 describe los resultados de la inhibición del Comp-I en la proliferación mediada por VEGF-A, VEGF-C, y VEGF-D.

Ejemplo 2: Inhibición de tumor

El Comp-I demuestra la inhibición de tumor en un intervalo amplio de modelos de tumores de ratón y seres humanos, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1.

Línea celular	Tejido	Tumor de origen	Especie	Modelo	Inhibición
B16-F10	Piel	Melanoma	Ratón	Singénico s.c	√
CT26	Colon	Carcinoma	Ratón	Singénico s.c.	√
A2058	Piel	Melanoma	Humana	Xenogénico s.c.	√
Colo-205	Colon	Carcinoma	Humana	Xenogénico s.c.	√
U87	Cerebro	Glioblastoma	Humana	Xenogénico s.c.	√
A549	Pulmón	Adenocarcinoma NSCLC	Humana	Xenogénico s.c.	√

Tabla 1. (continuación)

Línea celular	Tejido	Tumor de origen	Especie	Modelo	Inhibición
Mia2	Páncreas	Carcinoma	Humana	Ortotópico	√

5 El efecto del tratamiento con Comp-I y bevacizumab se evaluó en un modelo de xenoinjerto U87 de glioblastoma humano (Figura 2). En resumen, los ratones macho atímicos, de 6-7 semanas de edad, fueron implantados con células tumorales de glioblastoma U87 (5×10^6) por vía subcutánea en el costado derecho. Se monitoreó el crecimiento del tumor 2 veces por semana utilizando medición con calibrador. Se inició el tratamiento con el fármaco después de que los tumores alcanzaron un tamaño de al menos 50 mm^3 . La inhibición del crecimiento tumoral sobre el vehículo fue mayor en el Comp-I (56%) en comparación con el tratamiento con bevacizumab (35%).

10 El efecto antitumoral del Comp-I fue comparado con el tratamiento con bevacizumab en un modelo de tumores de colon (carcinoma de colon Colo205) y cerebro (glioblastoma U87). El Comp-I demostró un efecto 57% mayor en la reducción tumoral en el modelo de tumor de colon y un efecto 59% mayor en la reducción tumoral en el modelo de tumor de cerebro en comparación con el tratamiento con bevacizumab.

15 El efecto antitumoral del Comp-I también se comparó con el tratamiento con sunitinib y sorafenib en un modelo de carcinoma de colon Colo205. La Figura 3 describe un análisis de supervivencia de Kaplan Meier en el período de tiempo para que los tumores individuales alcancen un tamaño dado. En este experimento, los tratamientos se iniciaron cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 200 mm^3 , y el gráfico proporciona puntuaciones del tiempo que le lleva a cada tumor individual alcanzar 500 mm^3 . El tratamiento con el Comp-I dio como resultado 100% de los tumores restantes por debajo de los 500 mm^3 , mientras solamente aproximadamente el 60% de los tumores permanecieron por debajo de los 500 mm^3 con el tratamiento de sunitinib o sorafenib. Los tres compuestos fueron administrados en 60 mg/kg .

20 Se llevó a cabo un estudio adicional utilizando el modelo de carcinoma de colon Colo205 para ensayar la toxicidad del tratamiento con sunitinib (60 mg/kg/día), sorafenib (80 mg/kg/día), y Comp-I (30 mg/kg/día). No se observó ninguna toxicidad en 15/15 ratones tratados con Comp-I. Sin embargo, los ratones tratados con sunitinib demostraron una pérdida en músculo y grasa y solamente 12/15 ratones sobrevivieron. Los ratones tratados con sorafenib demostraron escamación de piel y salpullido y 14/15 ratones sobrevivieron. Estos resultados sugieren que la inhibición de múltiples quinasas (por sorafenib y sunitinib) puede causar más toxicidad que los bloqueadores de VEGFR2 mono-específicos (come-I) a niveles de dosificación que dan como resultado eficacia similar.

Ejemplo 3: Densidad de los vasos sanguíneos

30 El efecto del tratamiento con Comp-I en la densidad microvascular se evaluó en un modelo de xenoinjerto de ratón de glioblastoma humano U87. (Figura 4). El análisis histológico de los tumores extirpados después del tratamiento mostró que la inhibición del crecimiento por el Comp-I se asoció a una densidad de microvasos en mayor parte reducida y fue comparablemente eficaz a DC101, el anticuerpo monoclonal de VEGFR2anti-ratón.

Ejemplo 4: Efectos de la presión arterial

35 El efecto del tratamiento con Comp-I en la presión arterial se determinó en ratas (Figura 5). Las ratas macho Sprague-Dawley (250 g) fueron encerradas solas en jaulas mantenidas en un medio de temperatura ($22\text{-}25^\circ\text{C}$) y humedad (60-70%) controladas con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y se les proporcionó alimento para roedores estandarizado (Purina 5001) y agua a demanda. Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 m/kg ip) y se les implantó quirúrgicamente dispositivos transmisores de telemetría de presión arterial Physiotel TM C50-PXT (Data Sciences International, St Paul, MN) mediante inserción y sujetando la punta del catéter de presión del transmisor en la aorta abdominal. Se permitió que los animales instrumentados se recuperaran durante al menos una semana después de la cirugía. Para el estudio, se administró primero el vehículo por inyección intravenosa y se registró la presión arterial media (MAP) cada 30 minutos durante 48 horas para establecer un valor basal. Después se administró el Comp-I (50 mg/kg) a los mismos animales por inyección intravenosa y se registró la presión arterial cada 30 minutos durante las 48 horas iniciales después del tratamiento. A partir de ese momento, se registró la presión arterial cada hora durante 5 días (día 7 posterior al tratamiento) y después cada 4 horas durante otros 7 días (día 14 posterior al tratamiento). Todos los puntos de datos representan la media de todas las mediciones de presión arterial durante un período de 24 horas \pm SEM.

Ejemplo 5: Estudio de fase I

50 Se condujo un estudio de fase I para determinar la seguridad, tolerabilidad, dosis máxima tolerada (MID), farmacocinética (PK), y respuesta al biomarcador (PD) asociados con la administración del Comp-I. Fueron incluidos pacientes con tumor sólido o linfoma de Hodgkin y sin opción a tratamiento estándar; ECOG 0-2; y función orgánica adecuada. Se reclutaron doce pacientes para dos cohortes de dosificación semanal. Los pacientes 1002-1005, 2001, y 2002 recibieron 1 mg/kg/semana de Comp-I. Los pacientes 1006, 1008, 1009, 2003-2005 recibieron 3

mg/kg/semana del Comp-I. Las edades variaban de 31 a 79 con una edad media de 57. Los tipos de cáncer incluyeron carcinoma de próstata refractario a hormonas (3), carcinoma de colon (2), timoma (1), carcinoma neuroendocrino metastásico (1), carcinoma de células transicionales de riñón (1), carcinoma de células escamosas anales (1), carcinoma endometrial (1), carcinoma de células en anillo de sello (1), y carcinoma adenocístico (1).
 5 Once sujetos tuvieron quimioterapia previa, 6 sujetos tuvieron radioterapia previa, 4 sujetos tuvieron terapia hormonal previa, 6 sujetos tuvieron cirugía previa, y 2 pacientes fueron previamente tratados con bevacumab.

La MTD fue 2 mg/kg/semana. Las toxicidades restrictivas de dosis incluyeron elevación de lipasa Gr4 (1; 1 mg/kg QW); proteinuria Gr3 (2; 3 mg/kg QW); disfunción Gr3 LV (1; 3 mg/kg QW) Adicionalmente, hubo hipertensión Gr1 reversible (1; mg/kg QW); proteinuria Gr1 reversible (1; 1 mg/kg QW); y proteinuria Gr2 reversible (1; 1 mg/kg QW).
 10 No hubo ninguna reacción por infusión aguda o inmunogenicidad clínicamente significativa.

Si bien convencionalmente se ven como efectos laterales, tanto la hipertensión como la proteinuria también pueden utilizarse como marcadores para la inhibición de la señalización de VEGFR (van Heeckeren. WJ et al. J Clinical Oncol 25:2993-2995 (2007). La presencia de estos marcadores en los sujetos de fase I indica la eficacia in vivo de la inhibición de señalización de VEGFR en seres humanos.

La Figura 6 demuestra que el perfil farmacocinético de la primera dosis del Comp-1 es similar entre los sujetos. Obsérvese que la espiga en la concentración del Comp-I es el pico de la segunda dosis administrada. Las concentraciones del fármaco se midieron con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en el que el fármaco se capturó del plasma con un anticuerpo monoclonal anti-PEG y el fármaco inmovilizado se detectó con una fusión de proteína de VEGFR-2 biotinilada con dominio IgG Fc humano, seguido por una mezcla de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante. La Figura 7 demuestra que el perfil farmacocinético es similar después de 6 meses del tratamiento con Comp-I semanal de 1 mg/kg (Paciente 1003). La Figura 8 demuestra que los niveles valles de Comp-I son consistentes en el tiempo en ambas cohortes de tratamiento. La Figura 14 y la Tabla 2 describen la farmacocinética del tratamiento con Comp-I semanal de 1 mg/kg y 3 mg/kg.

Tabla 2

	1mg/kg QW (n = 6)	3mg/kg QW (n = 6)
Cmax (uM/l) media (intervalo)	2,7 (2,0-3,8)	8,7 (7,2-10,8)
AUC (uM*día) media (intervalo)	9,1 (8,0-10,6)	29,1 (25,4-33,8)
T1/2 (h) mediana (intervalo)	68,7 (56,9 -157,2)	61,1(49,4-89,3)
CL (L/día/kg) media (DT)	0,011 (0,001)	0,010 (0,001)

Ejemplo 6: VEGF-A como un biomarcador

El modelo Co1o225 se utilizó para optimizar la dosificación del Comp-I y para medir los biomarcadores de actividad. Las células tumorales se implantaron en ratones NCRNU-M hembra y se inició el tratamiento con el fármaco después de que los tumores alcanzaron un tamaño de al menos 50 mm³ (Figuras 9A y 9B). El Comp-I se administró en 1, 5, 30, 60, y 120 mg/kg tres veces por semana. Se definió la supervivencia porcentual con aquellos animales que sobrevivieron con tumores más pequeños que el corte observado (300 y 1000 mm³). La administración intraperitoneal del Comp-I en 60 mg/kg tres veces semanalmente dio como resultado la máxima actividad antitumoral para este fármaco. La administración de 120 mg/kg no mejoró la supresión del tumor según lo medido por el corte riguroso del tiempo para que los tumores alcancen 300 mm³. El análisis de los resultados con un corte menos riguroso de 1000 mm³ indicó que las dosis bajas como 5 mg/kg tienen eficacia sustancial en comparación con los grupos de control de vehículo. Además, si bien la dosis de 30 mg/kg no fue máximamente eficaz, la misma fue altamente efectiva en comparación con el vehículo y las dosis de 1 o 5 mg/kg.

Un cronograma de dosis similar se utilizó durante hasta 12 días en ratones libres de tumores de la misma cepa utilizada en el modelo Colo205 más arriba para establecer las concentraciones de Comp-I y VEGF-A como marcadores biológicos asociados a la eficacia en el modelo de tumor (Figura 10). El Comp-I indujo un incremento dependiente de la dosis y el tiempo en VEGF-A murino. Para cualquier dosis dada, VEGF-A aumentó hasta un máximo sostenido aproximado en 24 horas después de comenzar la administración del fármaco. La dosis requerida para la inducción máxima del incremento de VEGF-A fue 60 mg/kg tres veces semanalmente, análoga a la dosis requerida para la supresión máxima de tumor de un xenoinjerto Colo205 en la misma cepa de ratón.

También se utilizó VEGF-A como respuesta del biomarcador al tratamiento con Comp-I en el estudio de fase I. Los niveles de VEGF-A humano se evaluaron utilizando un ensayo ELISA sándwich comercialmente disponible (R&D systems Inc) siguiendo las especificaciones del fabricante con la excepción de la dilución de plasma que se diluyó

1:2. Los niveles de VEGF-A plasmático previo a la infusión (valle) son mayores que el 70% de los niveles (pico) cuatro horas posteriores a la infusión siguiendo un tratamiento semanal (Figura 11). Los niveles de VEGF-A se midieron en el sujeto 1002 antes y después del tratamiento con Comp-I (Figura 12). Los niveles valle de VEGF-A en los sujetos tratados con 1 mg/kg por semana de Comp-I permanecieron elevados después de 4 meses de tratamiento (Tabla 3). Los niveles de VEGFR2 soluble también se utilizaron como una respuesta del biomarcador al tratamiento con Comp-I (Figura 13). Los niveles de VEGFR-2 soluble humano se evaluaron mediante la utilización de un ensayo ELISA sándwich comercialmente disponible (R&D systems Inc) siguiendo las especificaciones del fabricante con la única diferencia de que se inoculó 1 uM de Comp-I en la curva estándar y muestras para normalizar los niveles de Comp-I variables en las muestras plasmáticas.

Tabla 3. VEGF-A (pM) en 6 sujetos

	1002	1003	1004	1005	2001	2002
1 semana	12,02	18,77	5,95	3,56	16,9	11,46
3 semanas		11,19	9,76	3,83	20,03	12,32
1 mes		17,6	5,35	5,9		
2 meses		14,81				
3 meses		9,99				
4 meses		19,13				

Los resultados del estudio de Fase I demuestran la farmacocinética previsible de la administración del Comp-I, así como la farmacodinámica previsible en base a los niveles de VEGF-A. Las concentraciones de Comp-I alcanzadas en el plasma humano se correlacionan con la exposición plasmática que estaba asociada a la actividad antitumoral de ratón. Las observaciones clínicas del bloqueo de VEGFR-2 que incluyen proteinuria e hipertensión también se observaron en ambos cohortes de pacientes.

Ejemplo 7: Modelo de dosificación subcutánea

La administración del Comp-I se modeló utilizando el programa Berkeley Madonna (desarrollado por Robert Macey y George Oster de la Universidad de California en Berkeley) para identificar la magnitud de dosis y frecuencia de administración subcutánea requerida para alcanzar las concentraciones farmacológicas potencialmente eficaces. El modelo se define como un compartimento subcutáneo que se distribuye con un proceso de primer orden (k_1) a un compartimento sistémico en el que el fármaco es posteriormente eliminado por un proceso de primer orden (k_2 , Figura 15). El compartimento subcutáneo se supuso como aproximadamente 1 ml que se diluyó hasta aproximadamente 5 l en el compartimento sistémico.

La constante de velocidad de absorción (k_1) se supuso que era 1,4 día⁻¹, lo que está en el intervalo del interferón pegilado (prospecto Pegasys) en el que la C_{max} se alcanza entre las 72 y 96 horas. La constante de velocidad de eliminación (k_2) se supuso que era 0,23 día⁻¹, similar al intervalo para el Comp-I en un estudio clínico de fase 1. La frecuencia de dosis era una vez por día. Las múltiples administraciones se modelaron utilizando la función de "pulso" del programa.

Utilizar la administración subcutánea sola da como resultado una lenta acumulación hasta concentraciones de fármaco en estado estacionario (Figura 16; "A"). Una única administración en inyección rápida intravenosa de Comp-I, con una constante de velocidad de eliminación de 4,23 día⁻¹, seguido por la administración subcutánea de 0,1 mg/kg/día comenzando el día 3 da como resultado una acumulación más rápida hasta las concentraciones de fármaco en estado estacionario (Figura 16, "B"). La única administración en inyección rápida intravenosa suministra niveles sistémicos potencialmente eficaces rápidos que posteriormente son mantenidos por la administración subcutánea.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido para el uso en el tratamiento de una afección seleccionada de un trastorno autoinmune, un trastorno inflamatorio, una retinopatía, y un cáncer, comprendiendo el polipéptido la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NO 4 y se une a VEGFR2 humano con una constante de disociación de $1 \mu\text{M}$ o menor, en el
- 5 que la administración del polipéptido da como resultado una concentración pico de entre 1 y $7 \mu\text{M}$ del polipéptido.

Figura 1

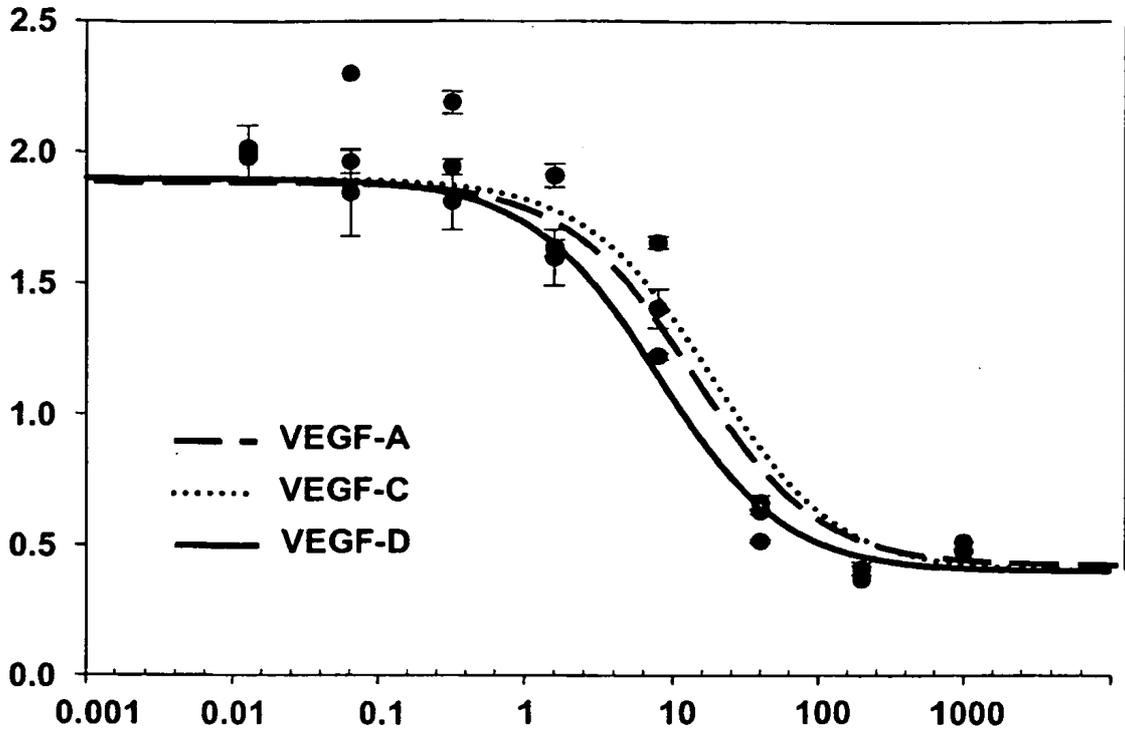


Figura 2

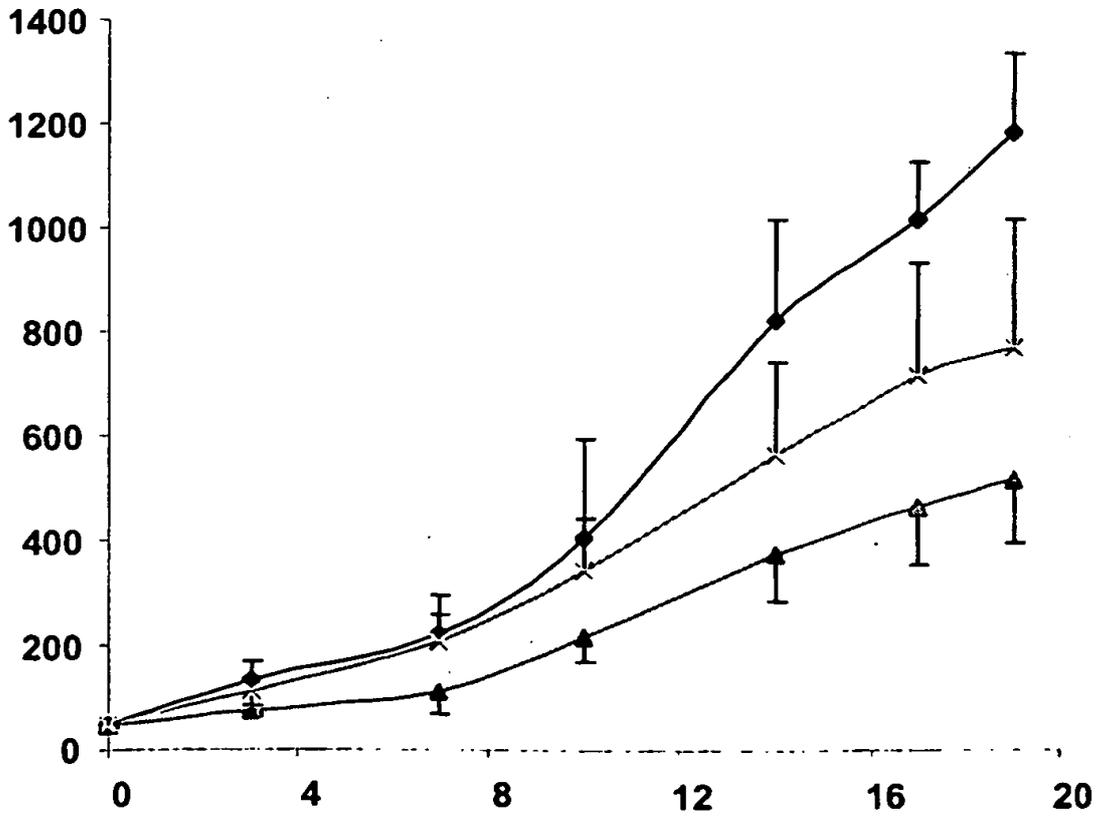


Figura 3

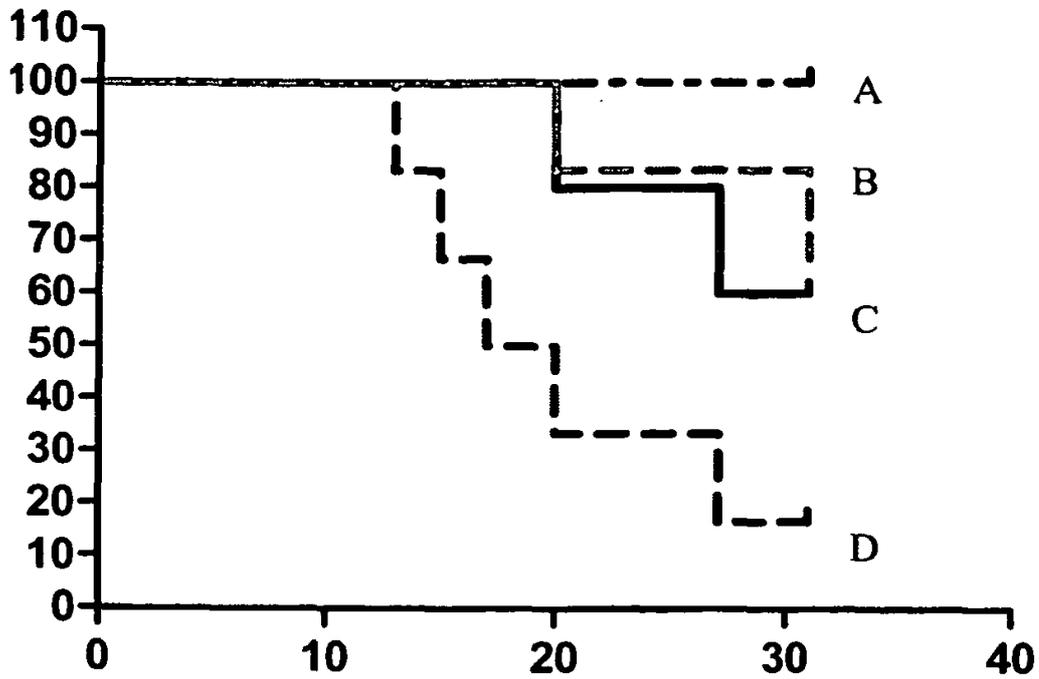


Figura 4

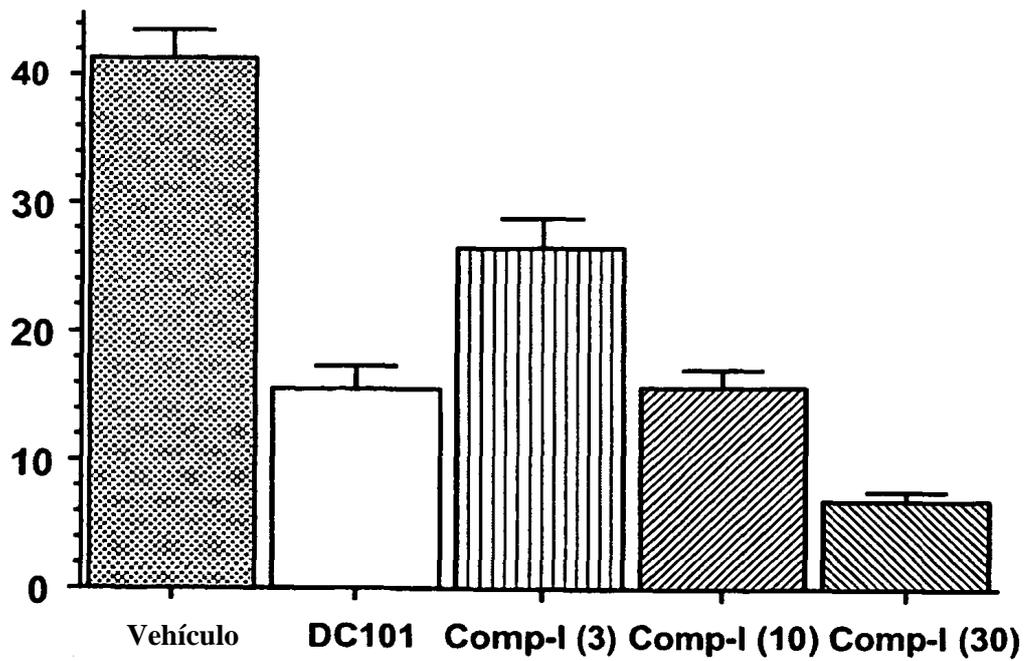


Figura 5

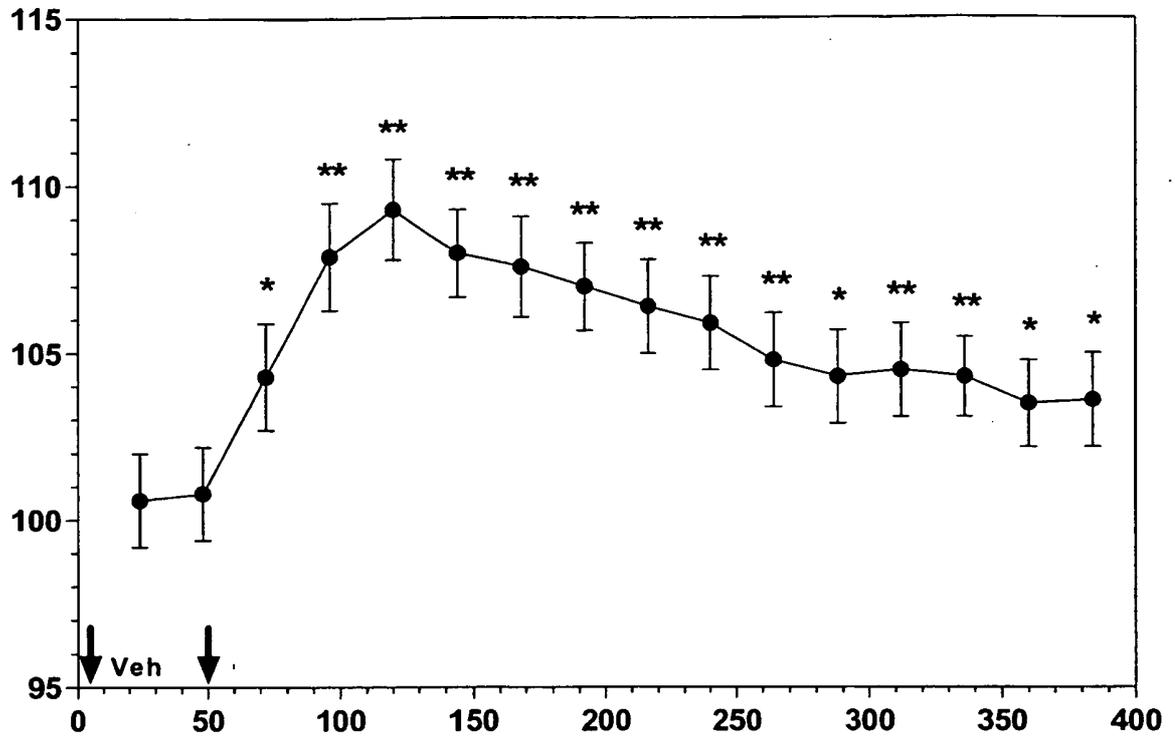


Figura 6

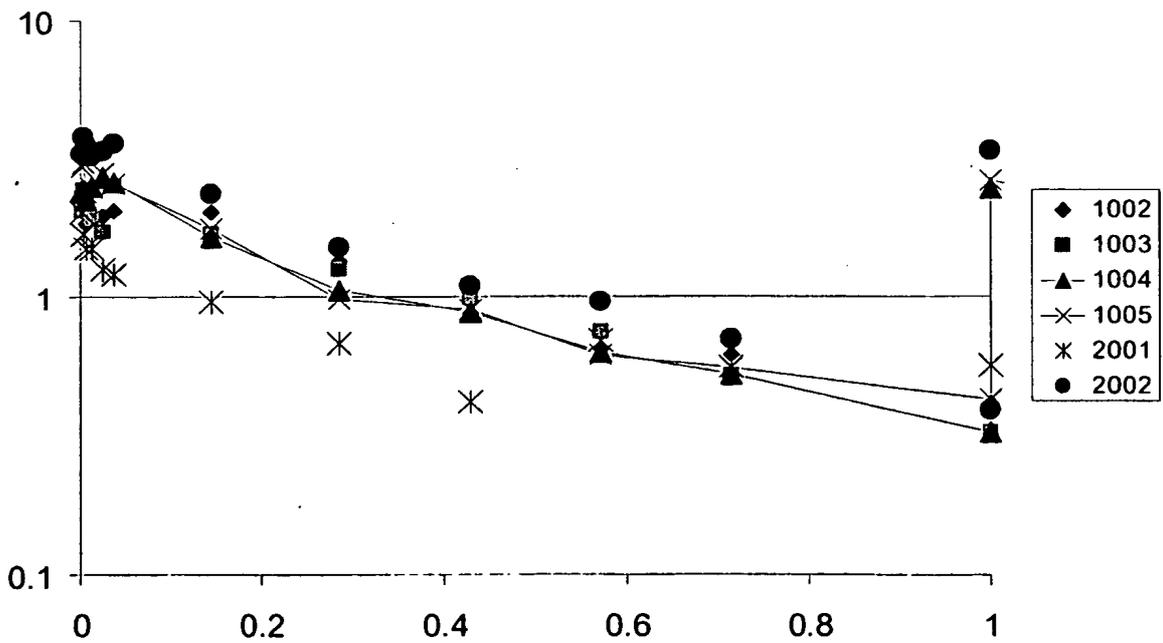


Figura 7

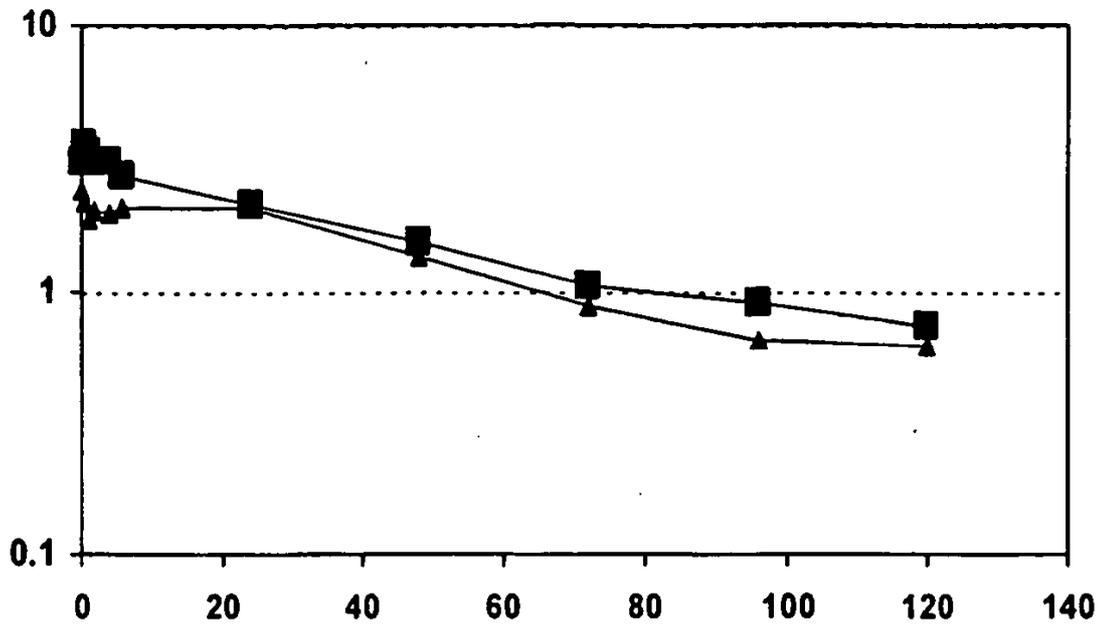


Figura 8

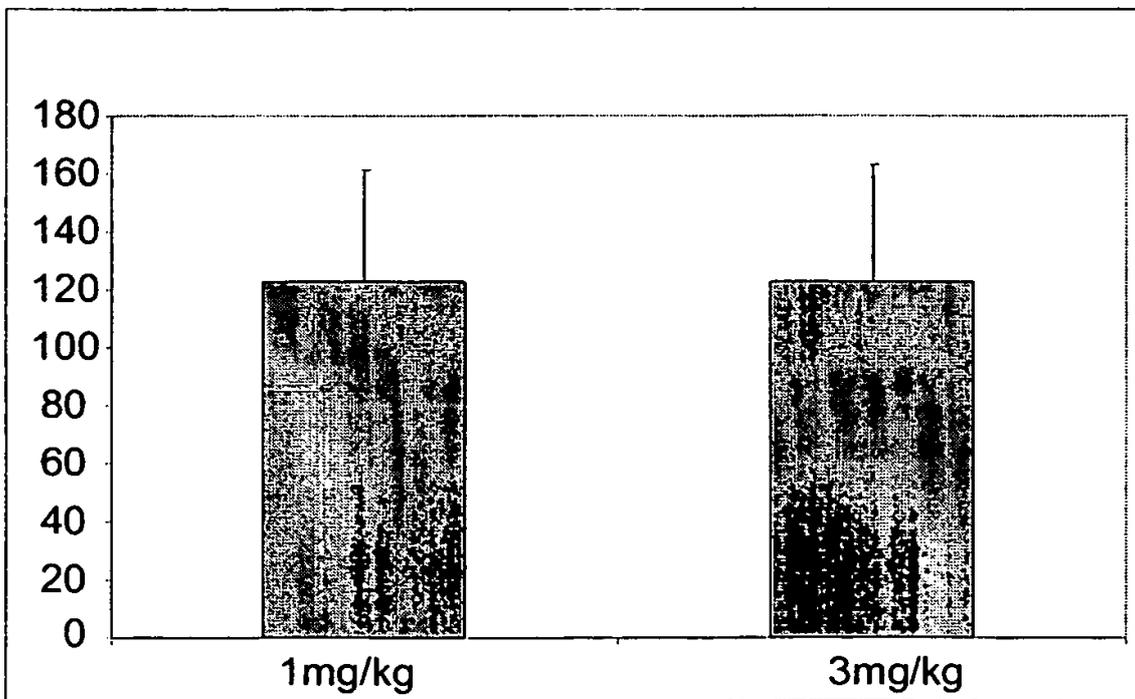


Figura 9A

Porcentaje por grupo para alcanzar 300m ³						
Días	Vehículo	1 mg/kg	5 mg/kg	30 mg/kg	60 mg/kg	120 mg/kg
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	22,22	100,00	11,11			11,11
4	33,33	11,11	22,22			
8	44,44	55,56	55,56			
11	66,67	77,78	77,78		22,22	
15	77,78	88,89		11,11		
18	88,89			33,33		
22			88,89			
25				55,56		
29				66,67		
35	88,89				33,33	
43				77,78		33,33
46					44,44	44,44
57					66,67	55,56
60		100,00				77,78
64				77,78	66,67	77,78

Figura 9B

Porcentaje por grupo para alcanzar 1000mm ³						
Días	Vehículo	1 mg/kg	5 mg/kg	30 mg/kg	60 mg/kg	120 mg/kg
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22	22,22					
25		22,22				
29	55,56		11,11			
35	77,78		22,22			
39		55,56				
43		66,67	33,33			
46			55,56	11,11		
50		77,78				
64		77,78	55,56	22,22	0,00	0,00

Figura 10

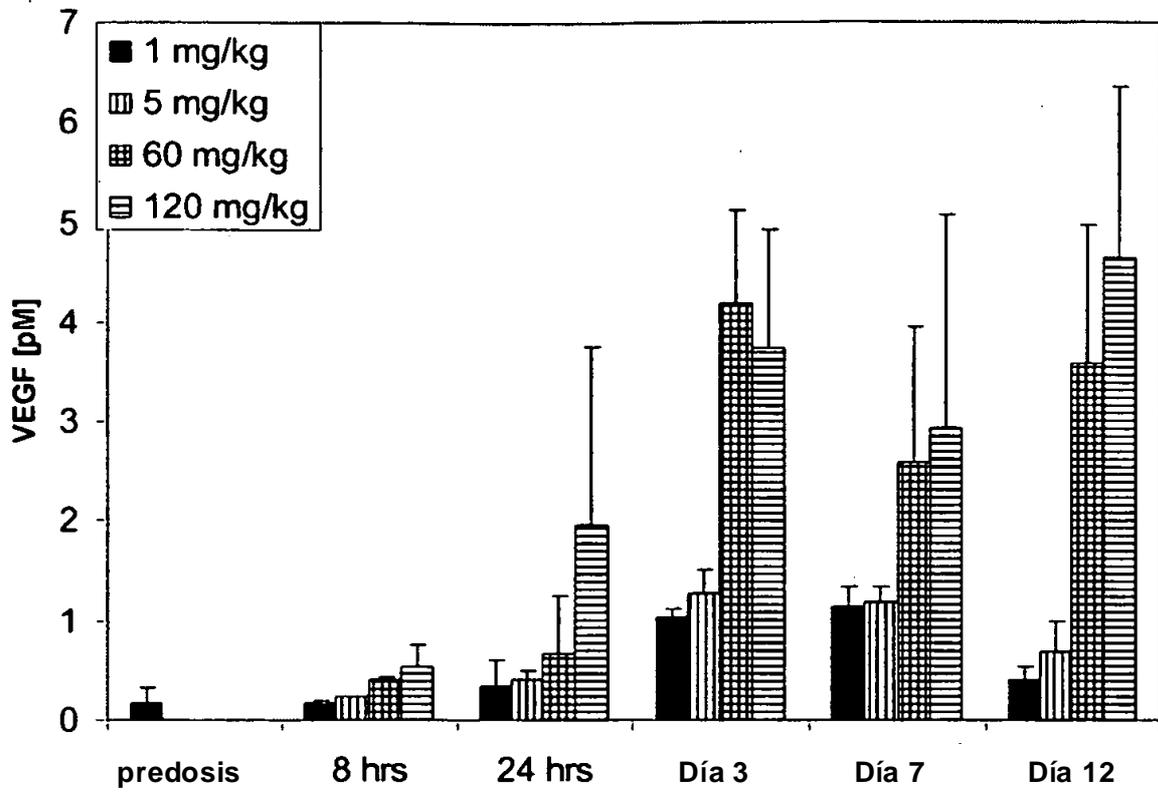


Figura 11

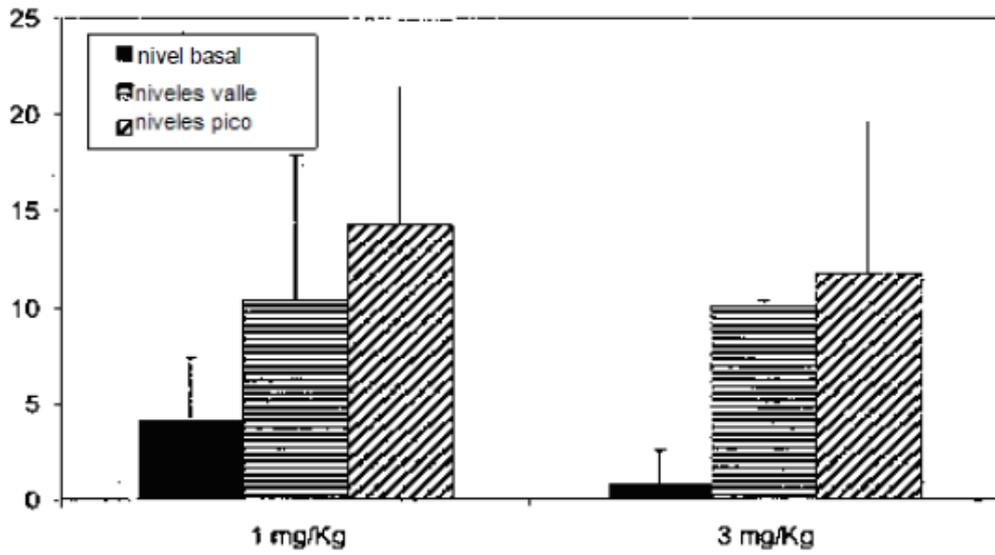


Figura 12

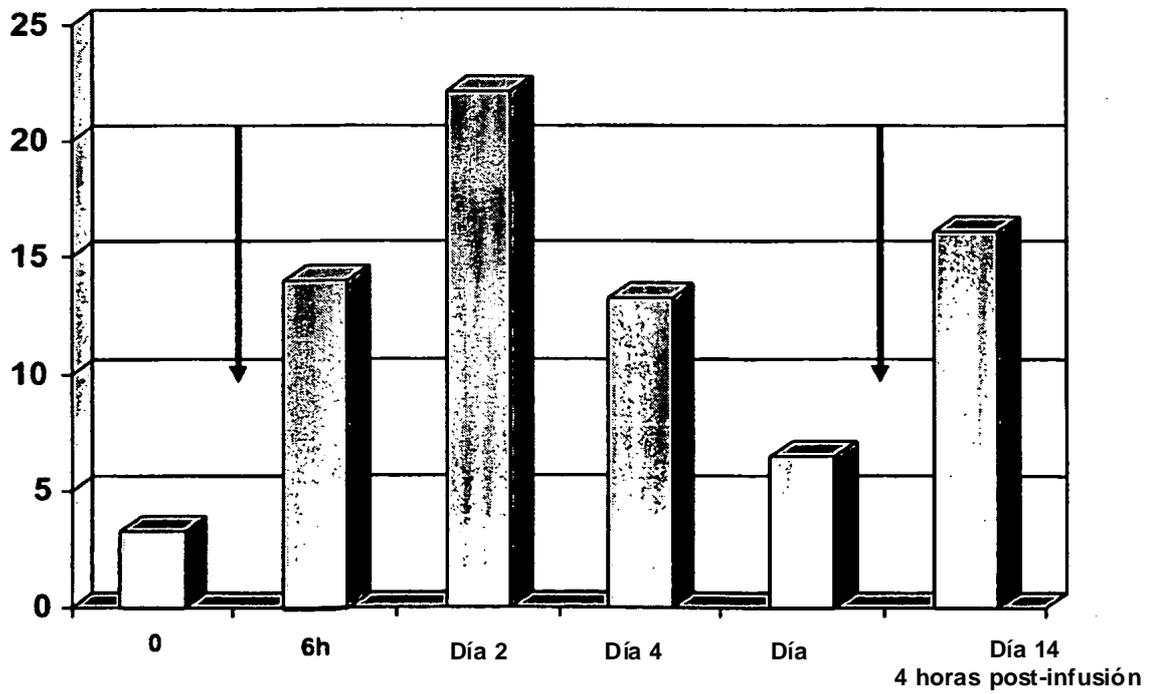


Figura 13

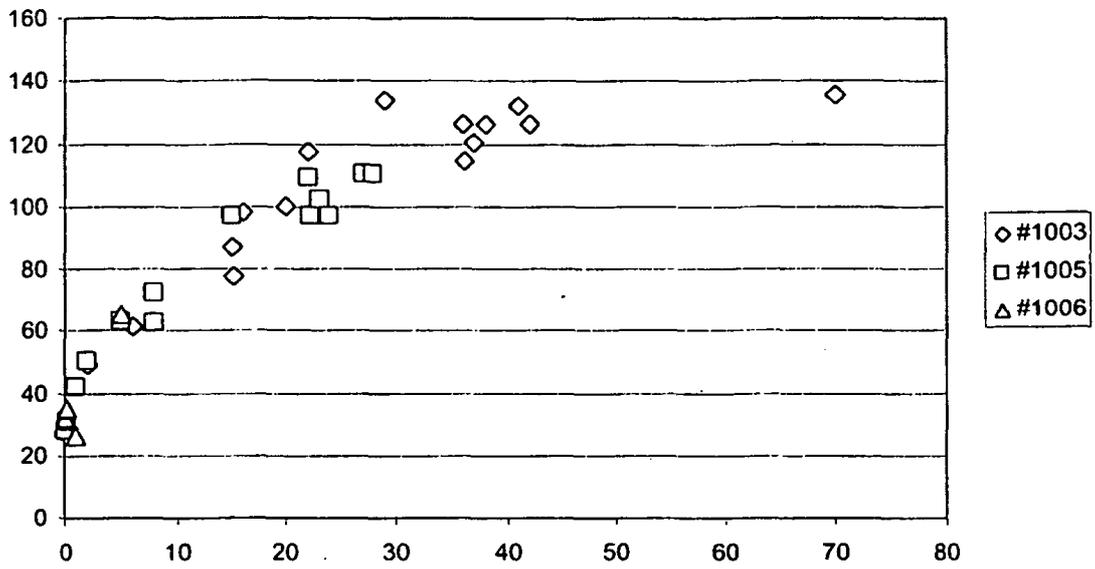


Figura 14

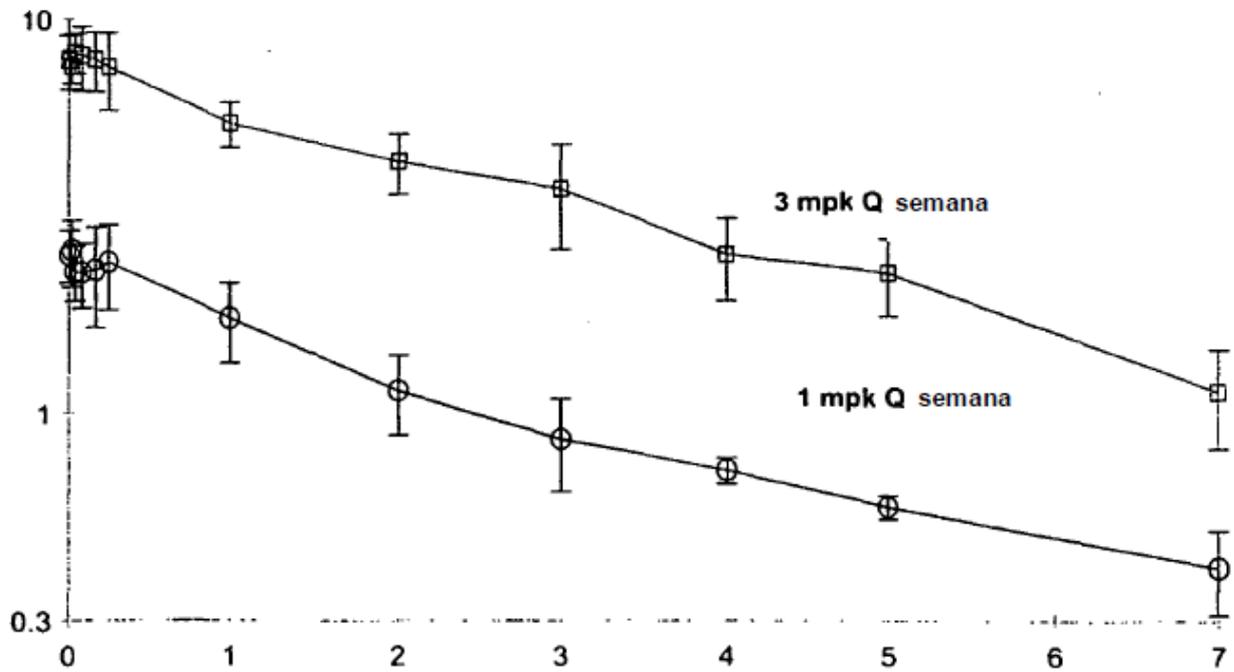


Figura 15

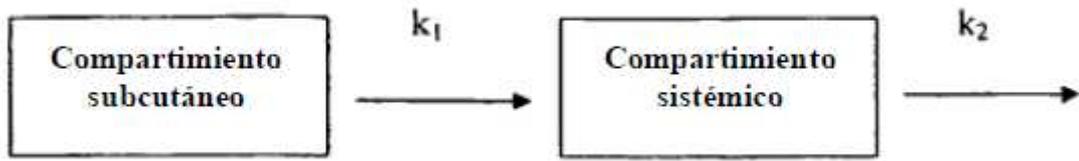


Figura 16

