

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 014**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/71** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)  
**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05752254 .2**  
96 Fecha de presentación: **08.06.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1767546**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

54 Título: **Proteína quimérica inhibidora de la angiogénesis y el uso**

30 Prioridad:  
**08.06.2004 CN 200410044965**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.05.2012**

73 Titular/es:  
**CHENGDU KANGHONG BIOTECHNOLOGIES  
CO., LTD.  
NO. 36 SHUXI RD JINNIU DISTRICT  
CHENGDU CITY 610036, SICHUAN, CN**

72 Inventor/es:  
**LIU, Zheng**

74 Agente/Representante:  
**Arias Sanz, Juan**

ES 2 381 014 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

Proteína quimérica inhibidora de la angiogénesis y el uso

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a la tecnología de ingeniería genética, más específicamente a secuencias de ADN que codifican para proteínas quiméricas recombinantes inhibidoras de la angiogénesis, a las proteínas quiméricas codificadas del presente documento, a aplicaciones terapéuticas de las mismas y a composiciones farmacéuticas que contienen las proteínas quiméricas.

**Antecedentes de la invención**

10 La angiogénesis es un proceso de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos existentes. La mayor parte del sistema vascular adulto es quiescente, sólo se produce angiogénesis en algunos mecanismos fisiológicos y patológicos, tales como tumor, retinopatías diabéticas, artritis, órganos anémicos, hiperplasia del endometrio, etc. La angiogénesis desempeña papeles clave en el crecimiento rápido de células tumorales durante el desarrollo tumoral (Hanahan y Folkman: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, Cell, 1996, 86:353-364). Estudios de modelos de cáncer con animales y ensayos  
15 clínicos con seres humanos ya han demostrado que la inhibición de la angiogénesis tumoral pudo inhibir de manera eficaz el crecimiento y el desarrollo tumorales, por tanto prolongar la vida del paciente. La angiogénesis está mediada y regulada por muchos factores biológicos. Las células principales que median la angiogénesis son células endoteliales vasculares que forman la pared interna de los vasos sanguíneos. Diversos factores de crecimiento pueden unirse a receptores relevantes en la superficie de las células endoteliales vasculares, regular procesos celulares a través de la transducción de señales intracelulares, y por tanto mediar la angiogénesis.

Entre diversos factores de crecimiento, VEGF (factor de crecimiento de células endoteliales vasculares) es el factor angiogénico más importante (Ferrara: VEGF and the quest for tumor angiogenesis factor, Nat. Rev. Cancer, 2002, 10: 795-803; Ferrara: Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications, Semin. Oncol., 2002, 29 (6 supl.): 10-14). VEGF podría secretarse por muchos tipos de  
25 células, pero a menudo se sobreexpresa en células tumorales. VEGF funciona mediante la unión a receptores apropiados. Existen principalmente dos tipos de receptores de VEGF: FLT-1 (tirosina cinasa de tipo fms) y KDR. En cuanto a las estructuras moleculares, estos dos receptores consisten ambos en tres regiones funcionales diferentes: la primera región es la región extracelular, que consiste en siete dominios de tipo inmunoglobulina (de tipo Ig) (d1-d7), que tiene afinidad específica por VEGF, y es la región clave para la unión a VEGF; la segunda región es la  
30 región transmembrana que contiene residuos de aminoácidos hidrófobos; la tercera región es el dominio intracelular que contiene un grupo con funcionamiento de tirosina quinasa, que se fosforila después de que se activa el receptor por VEGF, desencadenando la transducción de señales intracelulares, que conduce a efectos funcionales de células endoteliales y angiogénesis.

35 FLT-1 y KDR se distribuyen principalmente en las células endoteliales vasculares. Por tanto, la actividad mediadora de VEGF en células endoteliales vasculares es altamente específica. VEGF promueve diferenciaciones de células endoteliales, guía las migraciones de células endoteliales, inhibe la apoptosis, induce cambios morfológicos vasculares, y es un factor proangiogénico altamente eficaz.

40 El nivel de expresión de VEGF en tejidos tumorales es superior a aquél en los tejidos normales. Además, el crecimiento rápido de células tumorales conduce a menudo a hipoxia dentro del tumor, y la hipoxia induce además la expresión de VEGF. Por tanto, VEGF es el factor clave que promueve la angiogénesis tumoral. Muchos estudios con animales han mostrado que inhibiendo la unión a VEGF a sus receptores pudo inhibirse de manera eficaz la angiogénesis tumoral, y por tanto inhibir el crecimiento tumoral. En otras enfermedades relacionadas con la angiogénesis, tales como retinopatías diabéticas y artritis, etc., VEGF también está implicado estrechamente en el desarrollo de estas enfermedades (Ferrara: Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic  
45 angiogenesis: therapeutic implications. Semin. Oncol. 2002, 29 (6 supl.): 10-14).

Debido a los papeles críticos de VEGF en cánceres y otras enfermedades, las proteínas o químicos que inhiben específicamente VEGF tienen potenciales terapéuticos. Por ejemplo, estudios han mostrado que el anticuerpo neutralizante contra VEGF pudo inhibir de manera eficaz el crecimiento tumoral (Jain: Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor, Semin. Oncol., 2002, 29 (6 supl.): 3-9). Por tanto, el desarrollo de inhibidores de VEGF eficaces novedosos es importante en investigación clínica. Puesto que FLT-1 y KDR son elementos de unión naturales de VEGF, hubo estudios que investigaron los papeles antiangiogénicos del FLT-1 soluble (el dominio extracelular de FLT-1) y el KDR soluble (el dominio extracelular de KDR) (Yoko Hasumi: Soluble FLT-1 Expression Suppresses Carcinomatous Ascites in Nude Mice Bearing Ovarian Cancer. Cancer Research 62, 2002: 2019-2023). El FLT-1 soluble pudo inhibir de manera eficaz el crecimiento de células  
50 endoteliales vasculares *in vitro*, pero tiene una corta semivida sérica y no puede alcanzar una concentración sérica eficaz. De manera similar, el KDR soluble también pudo inhibir el crecimiento de células endoteliales vasculares *in vitro*, pero su actividad antitumoral en modelos con animales no fue satisfactoria (Yoko Hasumi: Soluble FLT-1 Expression Suppresses Carcinomatous Ascites in Nude Mice Bearing Ovarian Cancer. Cancer Research 62, 2002:

2019-2023).

La patente estadounidense n.º 6.100.071 da a conocer proteínas receptoras de VEGF quiméricas que comprenden secuencias derivadas de los receptores flt-1 y KDR. La publicación de patente internacional n.º WO 00/75319 da a conocer polipéptidos quiméricos modificados del receptor Flt-1. Shinkai *et al.* (J. Biol. Chem. (1998) 273(47), págs. 31283-31288) dan a conocer mutantes de delección del receptor KDR y examinan las afinidades de unión de estos mutantes para VEGF. Ninguno de estos documentos da a conocer proteínas quiméricas tal como se reivindica actualmente.

Para superar las deficiencias de la técnica anterior, la presente invención proporciona proteínas quiméricas novedosas que contienen diferentes fragmentos de FLT-1 y KDR para bloquear de manera eficaz la actividad biológica de VEGF e inhibir la angiogénesis.

### Sumario de invención

La invención proporciona proteínas quiméricas recombinantes novedosas que bloquean la actividad biológica de VEGF e inhiben la angiogénesis, secuencias de ADN que codifican para las proteínas quiméricas mencionadas anteriormente, y vectores que contienen las secuencias de ADN codificantes de las proteínas quiméricas y huéspedes recombinantes de los mismos, tal como se reivindica en el presente documento.

La invención también proporciona el uso de las proteínas quiméricas en la preparación de medicamentos que bloquean la actividad de VEGF e inhiben la angiogénesis, y composiciones farmacéuticas que contienen las proteínas quiméricas y vehículos médicos apropiados, así como aplicaciones terapéuticas de la composición médica, tal como se reivindica en el presente documento.

Los puntos clave de la invención son diseñar y construir una serie de proteínas quiméricas con diferentes fragmentos de FLT-1 o KDR, que contienen Fc de inmunoglobulina humana (en la figura 1 se muestra el método de construcción preferido), y entonces seleccionar la proteína quimérica con alta afinidad para VEGF usando ensayos incluyendo el ensayo de unión a VEGF, y finalmente obtener el inhibidor de VEGF apropiado. La construcción de la proteína quimérica se basa preferiblemente en las tecnologías de clonación molecular convencionales. Podría encontrarse la metodología experimental detallada en manuales de laboratorio tales como Molecular Cloning, la 2ª o la 3ª edición (Joseph Sambrook).

Las proteínas quiméricas que pueden prepararse a través de tecnología de ADN recombinante para contener diferentes fragmentos de los receptores de VEGF, FLT-1 y KDR, incluyen los siguientes grupos:

a. Que consiste en el 1<sup>er</sup> dominio de tipo Ig de KDR, el 2º dominio de tipo Ig de FLT-1 y el 3<sup>er</sup> dominio de tipo Ig de KDR, designado como KDRd1-FLTd2-KDRd3;

b. Que consiste en el 2º dominio de tipo Ig de FLT-1 y los dominios 3º y 4º de tipo Ig de KDR, designado como FLTd2-KDRd3,4;

c. Que consiste en el 2º dominio de tipo Ig de FLT-1, el 3<sup>er</sup> dominio de tipo Ig de KDR y el 4º dominio de tipo Ig de FLT-1, designado como FLTd2-KDRd3-FLTd4;

d. Que consiste en el 2º dominio de tipo Ig de FLT-1 y los dominios 3º, 4º y 5º de tipo Ig de KDR, designado como FLTd2-KDRd3,4,5;

e. Que consiste en el 2º dominio de tipo Ig de FLT-1, el 3<sup>er</sup> dominio de tipo Ig de KDR y los dominios 4º y 5º de tipo Ig de FLT-1, designado como FLTd2-KDRd3-FLTd4,5.

La secuencia de aminoácidos de FLTd2 se muestra como SEQ ID NO.1. La secuencia de aminoácidos de FLTd4 se muestra como SEQ ID NO.2. La secuencia de aminoácidos de KDRd1 se muestra como SEQ ID NO.3. La secuencia de aminoácidos de KDRd3 se muestra como SEQ ID NO.4. La secuencia de aminoácidos de KDRd4 se muestra como SEQ ID NO.5.

Tal como se usa en el presente documento, FLT se refiere a la secuencia de FLT-1, KDR se refiere a la secuencia de KDR; *d<sub>i</sub>* se refiere al dominio de tipo Ig de orden *i* en FLT-1 o KDR.

Las proteínas quiméricas contienen ventajosamente Fc de inmunoglobulina humana, e incluyen los siguientes grupos:

FP2' designada como KDRd1-FLTd2-KDRd3-Fc;

FP3' designada como FLTd2-KDRd3,4-Fc;

FP4' designada como FLTd2-KDRd3-FLTd4-Fc;

FP5' designada como FLTd2-KDRd3,4,5-Fc;

FP6' designada como FLTd2-KDRd3-FLTd4,5-Fc.

5 Tal como se usa en el presente documento, Fc se refiere al fragmento Fc de inmunoglobulina humana derivado de FC de inmunoglobulina humana tal como IgG, IgM e IgA, o las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La región Fc puede ser la secuencia de Fc de longitud completa o un fragmento de la secuencia de Fc de CH2, CH3, o la región bisagra.

10 Tal como se muestra en la figura 1, la proteína quimérica conocida en la técnica anterior (designada como FP1') consiste en el 2º dominio de tipo Ig de FLT-1 (FLTd2), el 3º dominio de tipo Ig de KDR (KDRd3) y el Fc de inmunoglobulina humana. La proteína quimérica FP2' proporcionada en la invención tiene una secuencia de aminoácidos añadida del 1º dominio de tipo Ig de KDR (KDRd1) en FP1', que aumenta los sitios de unión para VEGF y potencia la afinidad para VEGF. Las proteínas quiméricas FP3' y FP4' tienen secuencias añadidas del 4º dominio de tipo Ig de KDR (KDRd4) o el 4º dominio de tipo Ig de FLT-1 (FLTd4) basado en FP1', respectivamente. FP5' y FP6' tienen añadido los dominios 4º y 5º de tipo Ig de KDR (KDRd4,5) y los dominios 4º y 5º de tipo Ig de FLT-1 (FLT1-d4,5) basado en FP1', respectivamente. Estas secuencias añadidas pudieron ayudar a la dimerización de las proteínas quiméricas, plegando estructuras tridimensionales favorables para la unión a VEGF, y potenciando la afinidad para VEGF.

15 Por tanto, en un primer aspecto la invención proporciona una proteína quimérica tal como se reivindica en la reivindicación 1.

Más preferiblemente, la presente invención proporciona una proteína quimérica FP3 con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO.7.

20 Las proteínas quiméricas descritas en la invención pueden obtenerse a través de tecnologías de ADN recombinante convencionales. En primer lugar, podrían obtenerse las secuencias codificantes de ADN recombinante de las proteínas quiméricas mencionadas anteriormente, estando disponibles las secuencias de ADN codificantes de FLT-1 y KDR en GenBank, NCBI (National Center for Biotechnology Information). En segundo lugar, se clonan las secuencias codificantes de ADN de las proteínas quiméricas mencionadas anteriormente en vectores tras la síntesis por PCR. Los vectores del presente documento podrían ser plásmidos, virus o fragmentos de ADN usados comúnmente en biología molecular. Se inserta la secuencia señal secretora en el extremo terminal de la secuencia de ADN de los péptidos quiméricos mencionados anteriormente para garantizar la secreción fuera de las células. La secuencia de vector incluye una región promotora que permite la transcripción génica, señales de iniciación y terminación para la traducción de proteínas y una secuencia de poliA. El vector contiene un gen resistente a antibióticos para la propagación en bacterias. Además, el vector contiene un gen de selección de célula eucariota para la selección de líneas celulares transfectadas estables.

30 Debido a que no hay ningún límite absoluto de las secuencias de aminoácidos de todos los dominios de tipo Ig en FLT-1 y KDR, la longitud de secuencia de estos dominios podría tener variaciones. Por tanto, las secuencias de las proteínas quiméricas descritas en la invención podrían tener variaciones similares.

35 Tras la construcción de plásmidos de las proteínas quiméricas mencionadas anteriormente, pudieron usarse los plásmidos para transfectar células huésped para expresar las proteínas quiméricas. Existen muchos sistemas de expresión para estas proteínas quiméricas, incluyendo (pero sin limitarse a) células de mamífero, células de bacterias, levadura e insectos. Entre ellas, las células de insectos y de mamífero son células eucariotas, mientras que las células de bacterias y levadura son células procariontas. Las proteínas expresadas a partir de células de mamífero están glicosiladas. Puesto que las proteínas quiméricas de la invención contienen sitios de glicosilación, las células de mamífero son las mejores células para expresarlas. Existen muchos tipos de células de mamífero adecuadas para las producciones de proteínas a gran escala, tales como células 293, células CHO, células SP20, células NS0, células COS, células BHK, células PerC6, y etc. También podrían usarse muchos otros tipos de células para expresar y producir estas proteínas, y están dentro del alcance de la invención. Podrían transfectarse plásmidos que codifican para las proteínas quiméricas mencionadas anteriormente en las células. Los métodos de transfección incluyen, pero no se limitan a, electroporación, transfección mediada por liposomas, precipitación con calcio, y etc.

40 También podrían usarse sistemas de expresión distintos de las células de mamífero para expresar estas proteínas quiméricas, tales como células de bacterias, levadura, insectos, y etc. Deben considerarse todos como dentro del alcance de la invención. Estos sistemas de expresión tienen un mayor rendimiento de producción de proteínas en comparación con el de las células de mamífero. Sin embargo, producen proteínas sin glicosilación o con cadenas de hidratos de carbono glicosiladas diferentes de las de las células de mamífero.

45 Tras la expresión de las proteínas quiméricas, pudieron medirse las concentraciones de proteínas quiméricas en los medios de cultivo celular mediante ELISA u otros ensayos. Puesto que las proteínas quiméricas de la invención contienen la región Fc de inmunoglobulina, pudieron purificarse usando cromatografía de afinidad con proteína A.

55 Después de que se obtuvieron diversas proteínas quiméricas a partir de los medios de cultivo de las células huésped recombinantes, se sometieron a ensayo en experimentos de unión a VEGF para comparar sus afinidades para

5 VEGF. Se sometieron a ensayo adicionalmente sus actividades de inhibición de VEGF en un experimento de proliferación inducida por VEGF de células endoteliales vasculares humanas. Los resultados experimentales han mostrado que todas las proteínas quiméricas construidas según la presente invención pueden unirse a VEGF con altas afinidades (figura 2), en comparación con el FP1' de la técnica anterior. Además, pudieron bloquear de manera eficaz la activación por VEGF de las células endoteliales vasculares e inhibir el crecimiento de las células endoteliales. Experimentos adicionales han mostrado que FP3 tiene la mejor actividad de bloqueo sobre VEGF y son las proteínas quiméricas que bloquean VEGF más eficaces de la invención.

10 Por tanto, las proteínas quiméricas construidas en la invención tienen actividades de bloqueo supremas sobre VEGF, y todas las actividades biológicas de antiangiogénesis, por tanto pueden usarse para tratar la angiogénesis o enfermedades relacionadas con VEGF, incluyendo pero sin limitarse a diversos tumores, retinopatías diabéticas, artritis, anemia, hiperplasia del endometrio, etc.

15 Con el fin de corroborar adicionalmente el efecto antiangiogénico de las proteínas quiméricas *in vivo*, también se prepararon algunos experimentos de modelos con animales. Los resultados de estos experimentos han mostrado que en el modelo de ratón atímico BALB/C con melanoma B16F10 y el modelo de ratón con xenoinjerto de tumor de próstata PC-3 humano, las proteínas quiméricas de la invención han sido mucho mejores que FP1' de la técnica anterior, e inhibieron de manera eficaz el crecimiento tumoral y prolongaron la vida del animal. Por tanto, las proteínas quiméricas de la invención tienen altas actividades anticancerígenas.

20 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína quimérica de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden formularse en cualquier forma farmacéutica según las metodologías de formulación convencionales, preferiblemente en una forma farmacéutica para inyección, y más preferiblemente en un formato liofilizado.

#### Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra las estructuras de cinco proteínas quiméricas y FP1 de la técnica anterior. Se construyen con diferentes fragmentos de FLT-1, KDR y la región Fc de inmunoglobulina usando tecnologías de ingeniería genética.

25 La figura 2 presenta los resultados de la unión a VEGF de las cinco proteínas quiméricas, en comparación con la de FP1 de la técnica anterior, en los que las lecturas de DO se refieren a las señales de unión de las proteínas quiméricas a VEGF. Los resultados han mostrado que las cinco proteínas quiméricas se unieron a VEGF con afinidades mucho mayores que FP1, entre ellas, FP3 tiene la mayor afinidad.

30 La figura 3 muestra que las proteínas quiméricas pudieron inhibir de manera eficaz el crecimiento de células endoteliales vasculares humanas *in vitro*, en comparación con FP1.

La figura 4 muestra que la proteína quimérica FP3 pudo inhibir de manera eficaz el crecimiento tumoral de melanoma B16F10 en ratones.

La figura 5 muestra que la proteína quimérica FP3 pudo inhibir de manera eficaz el crecimiento de tumor de próstata PC-3 humano en ratones.

35 La figura 6 compara las actividades contra el crecimiento tumoral de la proteína quimérica FP3 de la invención con la de FP1 de la técnica anterior en ratones.

#### Realizaciones específicas

40 Los siguientes ejemplos proporcionan una descripción detallada de la construcción, metodología experimental y aplicación de las proteínas quiméricas descritas en la invención. Pero estos ejemplos no deben interpretarse como limitativos del alcance de protección de la invención.

Realización 1: Clonación de las secuencias de ADN que codifican para las proteínas quiméricas y construcción de los vectores recombinantes

45 Aparte de la secuencia de ADN que codifica para Fc de inmunoglobulina, las secuencias de ADN codificantes de las diversas proteínas quiméricas de la invención proceden de ADNc de FLT-1 y KDR. Puesto que FLT-1 y KDR se expresan principalmente en células endoteliales vasculares, se extrajo el ARN total de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) usando un kit de purificación de ARN (QIAGEN); entonces se sintetizaron los ADNc a partir del ARN usando transcriptasa inversa AMV (Promega); entonces se amplificaron por PCR los diversos fragmentos FLT-1 y KDR con diferentes cebadores; finalmente se fusionaron las secuencias de FLT-1, KDR y Fc de inmunoglobulina humana (Fc de IgG1) juntas por PCR para construir secuencias de ADN recombinante que codificaban para diversas proteínas quiméricas. En la figura 1 se muestran las estructuras de las seis proteínas quiméricas (incluyendo FP1 de la técnica anterior).

Ejemplo 1 Construcción de secuencia codificante de FP3 y vector recombinante

Se cultivaron células HUVEC (Clonetics) con medios EGM-2 (Clonetics) en frascos T-175. Se recogieron  $1 \times 10^7$  células y se sometieron a extracción del ARN total usando el kit de purificación de ARN de Qiagen, y entonces se sintetizó ADNc usando el kit de ADNc de Invitrogen. Se almacenó el producto de ADNc a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización. A continuación se usaron cebadores específicos para amplificar por PCR diversos dominios de FLT-1 y KDR del ADNc de HUVEC.

Se amplificó por PCR el Fc de IgG 1 humano usando los siguientes cebadores específicos a partir de ADNc de ganglios linfáticos (BD Clontech).

Cebadores:

FLT-1 d2 directo: 5'-cctttcgtagagatgtacagtga-3'

FLT-1d2 inverso: 5'-tatgattgtattggtttgtccat-3'

KDR d3-4 directo: 5'-gatgtggttctgagtcctctca-3'

KDR d3-4 inverso: 5'-cgggtggacatacacaaccaga-3'

Fc de IgG1 humano directo: 5'-gacaaaactcacatgcccact-3'

Fc de IgG1 humano inverso: 5'-tcatttaccggagacaggagag-3'

Se amplificaron por PCR los dominios de tipo Ig y el fragmento Fc de IgG1 humano en condiciones de desnaturalización a  $95^\circ\text{C}$  durante 30 segundos, hibridación a  $56^\circ\text{C}$  durante 45 segundos, extensión a  $72^\circ\text{C}$  durante 2 minutos, y 30 ciclos. Entonces se clonaron los productos de PCR en el plásmido pCR2.1 (Invitrogen) usando el kit de clonación TA. Tras la transformación en *E. coli* (JM109), se recogieron las colonias blancas y se cultivaron durante la noche en medio LB. Se prepararon los plásmidos de ADN usando el kit de Qiagen y se sometieron a digestión enzimática y secuenciación de ADN.

Se fusionaron los ADNc de FLT-1, KDR y Fc de IgG juntos mediante PCR de fusión (*sewing*) usando cebadores que contenían el sitio EcoRI. Tras la digestión con EcoRI, se purificó el fragmento de ADN con el kit de purificación de Qiagen y se clonó en el plásmido pcDNA3.1. Tras transformarse en *E. coli* (JM109), se recogieron las colonias positivas y se cultivaron durante la noche en medio LB. Se extrajeron los plásmidos de ADN con el kit de purificación de Qiagen y entonces se sometieron a digestión enzimática y secuenciación de ADN. Se muestra la secuencia codificante de ADN de FP3 obtenida como SEQ ID NO.6. Se usaron los plásmidos confirmados para transfectar células 293 o células CHO para obtener líneas celulares estables que expresan FP3. Se muestra la secuencia de aminoácidos de FP3 como SEQ ID NO.7.

Ejemplo 2 Construcción del gen FP1 y vector recombinante

Se construyó FP1 de manera similar a como en el ejemplo 1. La única diferencia fue que se construyó el ADN recombinante seleccionado como diana fusionando juntos el 2º dominio de tipo Ig de FLT-1, el 3º dominio de tipo Ig de KDR y el mismo Fc de IgG1 humano que en el ejemplo 1.

Ejemplo 3 Construcción del gen FP2 y vector recombinante

Se construyó FP2 de manera similar a como en el ejemplo 1. La única diferencia fue que se construyó el ADN recombinante seleccionado como diana fusionando juntos el 1º dominio de tipo Ig de KDR, el 2º dominio de tipo Ig de FLT-1, el 3º dominio de tipo Ig de KDR y el mismo Fc de IgG1 humano que en el ejemplo 1.

Ejemplo 4 Construcción del gen FP4 y vector recombinante

Se construyó FP4 de manera similar a como en el ejemplo 1. La única diferencia fue que se construyó el ADN recombinante seleccionado como diana fusionando juntos el 2º dominio de tipo Ig de FLT-1, el 3º dominio de tipo Ig de KDR, el 4º dominio de tipo Ig de FLT-1 y el mismo Fc de IgG1 humano que en el ejemplo 1.

Ejemplo 5 Construcción del gen FP5 y vector recombinante

Se construyó FP5 de manera similar a como en el ejemplo 1. La única diferencia fue que se construyó el ADN recombinante seleccionado como diana fusionando juntos el 2º dominio de tipo Ig de FLT-1, los dominios 3º-5º de tipo Ig de KDR y el mismo Fc de IgG1 humano que en el ejemplo 1.

Ejemplo 6 Construcción del gen FP6 y vector recombinante

Se construyó FP6 de manera similar a como en el ejemplo 1. La única diferencia fue que se construyó el ADN recombinante seleccionado como diana fusionando junto el 2º dominio de tipo Ig de FLT-1, el 3º dominio de tipo Ig de KDR, los dominios 4º-5º de tipo de FLT-1 y el mismo Fc de IgG1 humano que en el ejemplo 1.

## Realización 2: Expresión de las proteínas quiméricas en células

Ejemplo 7 Expresión de las proteínas quiméricas FP3

Tras la construcción de los plásmidos recombinantes mencionados anteriormente, se obtuvieron ADN de plásmido de alta calidad usando el kit de plásmidos de Qiagen, y entonces se transflectaron en células 293 (ATCC) usando el kit de transfección FUGEN6 (Roche). Se usaron dos métodos diferentes para expresar las proteínas quiméricas dependiendo de la cantidad de proteínas necesaria.

El primer método era un método de transfección transitoria. Se produjo una pequeña cantidad de las proteínas quiméricas usando este método. En primer lugar, se cultivaron células 293 en medio DMEM con FBS al 10% en placas de cultivo tisular. A una confluencia celular del 60-80%, se añadió la mezcla de ADN de plásmido y reactivo FUGEN6 al cultivo. Se cambiaron los medios de cultivo por DMEM libre de suero al día siguiente y se continuó cultivando las células durante 3 días más antes de que se recogieran los medios. Estos medios contenían las proteínas quiméricas expresadas, y se sometió a ensayo la concentración de las proteínas quiméricas mediante ELISA.

El segundo método era un método de transfección estable. Se estableció una línea celular estable para producir una gran cantidad de las proteínas quiméricas. Las células huésped eran de nuevo células 293 (ATCC). La etapa de transfectar el plásmido recombinante era la misma que la de la transfección transitoria descrita anteriormente. Sin embargo, al 2º día, se cultivaron las células en DMEM con neomicina y se clonaron mediante dilución limitada. Tras aproximadamente 21 días, se recogieron los clones resistentes a neomicina y se cultivaron a mayor escala. Finalmente, se expresaron las proteínas quiméricas en matraces con agitación. Se sometió a ensayo la concentración de proteínas quiméricas mediante ELISA.

Se purificó FP3 a partir de los medios cultivados usando ensayos que incluyeron cromatografía de afinidad y filtración en gel, etc. El peso molecular de FP3 era de 140 KD.

Ejemplo 8 Expresión de otras proteínas quiméricas

Se obtuvieron las proteínas quiméricas FP1, FP2, FP4, FP5 y FP6 según los métodos del ejemplo 7.

## Realización 3: Experimento de unión de las proteínas quiméricas a VEGF

Se determinaron las afinidades de las proteínas quiméricas para VEGF mediante el ensayo de unión a VEGF en la presente invención. En primer lugar, se recubrieron con proteínas de VEGF recombinantes (Chemicom) una placa de ELISA de 96 pocillos, y entonces se bloquearon los sitios de unión a proteínas no específicos de la placa usando una disolución de leche al 5%. En segundo lugar, se añadieron diferentes concentraciones de diversas proteínas quiméricas en cada pocillo, y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Tras el lavado, se añadió anticuerpo de conejo de anti-Ig humana-HRP (Sigma) en cada pocillo, y finalmente se añadieron sustratos enzimáticos colorimétricos a la placa. Se registraron las lecturas de DO de absorción con el uso de un lector de placas de ELISA. Un mayor valor de DO indicó una afinidad de unión más fuerte de las proteínas quiméricas a VEGF.

Tal como se muestra en figura 2, las cinco proteínas quiméricas construidas y expresadas en las realizaciones de la presente invención tuvieron capacidad de unión a VEGF, y tuvieron mejores afinidades que FP1 de la técnica anterior. La unión era detectable a bajas concentraciones de 1 µg/ml: Preferiblemente, FP3 tuvo la mejor afinidad y era el mejor inhibidor de VEGF. Su concentración de unión mitad de la máxima era aproximadamente 5 veces menor que la de FP1. FP5 tuvo una afinidad algo menor para VEGF que la de FP3. Este resultado sugiere que el 4º dominio de tipo Ig de KDR podría aumentar sustancialmente la actividad de bloqueo de la proteína quimérica para VEGF. Sin embargo, añadiendo más cantidad de los dominios de KDR tales como el 5º dominio de tipo Ig no pudo potenciar adicionalmente el efecto inhibitor sobre VEGF. Las otras tres proteínas quiméricas presentaron afinidades menores en comparación con FP3 y FP5, pero afinidades mayores que FP1.

Realización 4: Las proteínas quiméricas inhibieron de manera eficaz la proliferación de células endoteliales vasculares humanas *in vitro*

Esta realización preferida de la invención es para probar que las proteínas quiméricas podían bloquear de manera eficaz el crecimiento inducido por VEGF de células endoteliales vasculares. En el experimento, se sembraron células HUVEC (Clonetics) en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos en medios EBM con FBS al 2% y 15 ng/ml de VEGF. Se añadieron diferentes cantidades del sobrenadante de células 293 que contenía las proteínas quiméricas a la placa. Se usaron medios de células 293 no transflectadas que no contenían proteínas quiméricas como control negativo. Se cultivaron todas las células HUVEC a 37°C durante 3 días antes de que se determinasen las densidades celulares mediante el recuento celular.

El experimento de proliferación de HUVEC ha mostrado que las cinco proteínas quiméricas pudieron inhibir la proliferación de células endoteliales vasculares de manera más eficaz que FP1 de la técnica anterior (figura 3). Puesto que la proliferación de células HUVEC en el experimento se indujo mediante la activación por VEGF, se sugiere por tanto que las cinco proteínas quiméricas pudieron inhibir la activación del receptor de VEGF, y todas

ellas tenían actividades antiangiogénicas. Entre las cuales, FP3 tuvo el mejor efecto de inhibición sobre el crecimiento de células HUVEC con CI50 de aproximadamente 3 ng/ml. La CI50 de FP1 de la técnica anterior era de aproximadamente 12 ng/ml, y las CI50 de FP2, FP4, FP5 y PF6 eran todas de aproximadamente 5-8 ng/ml.

Realización 5: Los polipéptidos quiméricos inhibieron el crecimiento tumoral en ratones

5 Ejemplo 9 Preparación de formulación para inyección que contiene las proteínas quiméricas

Se preparó la formulación para inyección según cualquier metodología convencional, para formulaciones para inyección usando 24 mg/ml de FP3, 5 mM de PB, 100 mM de NaCl y sacarosa al 20%.

Ejemplo 10 Las proteínas quiméricas inhibieron de manera eficaz el crecimiento de células de melanoma B16F10 en ratones

10 Como inhibidores de VEGF, una aplicación de las proteínas quiméricas es en terapia anticancerígena. Debido a su efecto de bloqueo altamente eficaz sobre VEGF, se eligió FP3 para realizar experimentos antitumorales en modelos con animales.

15 El modelo con animales era murino con células de melanoma B16F10 que es una clase de células tumorales de crecimiento rápido. En el experimento, en primer lugar se inyectaron por vía subcutánea  $1 \times 10^5$  células B16F10 en 0,05 ml, en el lomo de ratones atímicos BALB/C. Entonces se inyectaron por vía intraperitoneal 400 µg de la proteína quimérica purificada a cada ratón (peso promedio de los ratones 22 g), dos veces a la semana. Se inyectó la misma cantidad del Fc de inmunoglobulina humano purificado en ratones control negativo. Se mostraron las curvas de crecimiento tumoral en la figura 4, indicando que la proteína quimérica FP3 inhibió de manera eficaz el crecimiento de las células de melanoma ( $P < 0,01$ ).

20 Ejemplo 11 Las proteínas quiméricas inhibieron de manera eficaz el crecimiento de células PC-3 de cáncer de próstata xenoinjertadas en ratones

25 El modelo de xenoinjerto de células tumorales humanas que se hacen crecer en ratones atímicos es uno de los modelos con animales, que es el más similar a los tumores humanos. Los ratones atímicos carecen de rechazo inmunitario, por tanto pudieron hacerse crecer muchas células tumorales humanas en ratones atímicos y formar tumores. Se sometió a prueba proteína quimérica FP3 para inhibir el crecimiento de células PC-3 de tumor de próstata humano (ATCC) en ratones atímicos BALB/C. En este modelo, en primer lugar se inyectaron por vía subcutánea  $1 \times 10^5$  células PC-3 en 0,05 ml, en el lomo de los ratones. Entonces se inyectaron por vía intraperitoneal 400 µg de la proteína quimérica purificada a cada ratón, dos veces a la semana. Se inyectó la misma cantidad del Fc de inmunoglobulina humano purificado en ratones control negativo. Se mostraron los resultados experimentales en la figura 5. En los ratones control, el tumor creció más de  $1000 \text{ mm}^3$  45 días tras la implantación. Sin embargo, en los ratones a los que se les administraron las proteínas quiméricas, FP3 ha inhibido casi completamente el crecimiento tumoral ( $P < 0,01$ ), demostrando un efecto antitumoral terapéutico significativo.

30 Realización 6: Comparación del estudio de las proteínas quiméricas FP3 y FP1 de la técnica anterior en la inhibición del crecimiento tumoral en ratones

35 Con el fin de demostrar adicionalmente la actividad anticancerígena suprema de FP3, se compararon los efectos de FP1 y FP3 en un experimento de crecimiento tumoral. Se eligieron 10 ratones atímicos BALB/C sanos y a cada uno se le inyectó por vía subcutánea en el lomo  $1 \times 10^5$  células C6 de glioblastoma de rata en 0,05 ml. Entonces se inyectaron por vía intraperitoneal 2,5 mg/kg de PF1 o PF3 purificadas dos veces a la semana, respectivamente, hasta 31 días. Se inyectó la misma cantidad del Fc de inmunoglobulina humano purificado en ratones control negativo. Se muestran los resultados experimentales en la figura 6. Tanto FP1 como FP3 tuvieron un efecto terapéutico significativo sobre el tumor. En el día 35, los volúmenes tumorales de los ratones a los que se les administraron FP1 y FP3 eran de 1167,3 y 557,6, respectivamente, mientras que el volumen tumoral de los ratones control tratados con Fc ya había alcanzado 1312,3 en el día 24. Por tanto, FP3 tuvo un efecto más significativo ( $P < 0,05$ ) que FP1 de la técnica anterior.

45 En conjunto, las proteínas quiméricas tuvieron una alta afinidad para VEGF, pudieron inhibir la proliferación de células endoteliales vasculares *in vitro*, e inhibieron de manera eficaz el crecimiento tumoral *in vivo*. Puesto que la angiogénesis es crítica en todo el crecimiento tumoral, puede usarse la proteína quimérica de la invención en aplicaciones terapéuticas contra muchos tumores.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Chengdu Kanghong Biotechnologies Co. Ltd  
 <120> Proteína quimérica inhibidora de la angiogénesis y el uso  
 5 <130> 489.48.93527  
  
 <140> 05755524.2  
 <141> 2005-06-08  
  
 10 <150> CN20041044965.7 <151> 08-06-2004  
  
 <160> 13  
  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 15  
 <210> 1  
 <211> 93  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 20  
 <400> 1  
  
 Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile  
                   20                   25                   30  
 Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly  
                   35                   40                   45  
 Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala  
                   50                   55                   60  
 Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly  
 65                   70                   75                   80  
 His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr  
                   85                   90  
  
 <210> 2  
 <211> 96  
 25 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Phe Ile Thr Val Lys His Arg Lys Gln Gln Val Leu Glu Thr Val Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Lys Arg Ser Tyr Arg Leu Ser Met Lys Val Lys Ala Phe Pro Ser  
 20 25 30  
 Pro Glu Val Val Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu Lys Ser  
 35 40 45  
 Ala Arg Tyr Leu Thr Arg Gly Tyr Ser Leu Ile Ile Lys Asp Val Thr  
 50 55 60  
 Glu Glu Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Lys Gln Ser  
 65 70 75 80  
 Asn Val Phe Lys Asn Leu Thr Ala Thr Leu Ile Val Asn Val Lys Pro  
 85 90 95

<210> 3

5 <211> 86

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Pro Arg Leu Ser Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr  
 Thr Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp  
 20 25 30  
 Pro Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys  
 35 40 45  
 Ser Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly  
 50 55 60  
 Asn Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala  
 65 70 75 80  
 Ser Val Ile Tyr Val Tyr  
 85

10

<210> 4

<211> 102

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys  
 1 5 10 15  
 Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp  
 20 25 30  
 Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val  
 35 40 45  
 Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu  
 50 55 60  
 Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe  
 85 90 95  
 Val Arg Val His Glu Lys  
 100

<210> 5

5 <211> 92

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val  
 1 5 10 15  
 Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro  
 20 25 30  
 Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr  
 35 40 45  
 Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp  
 50 55 60  
 Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys  
 65 70 75 80  
 Gln Ser His Val Val Ser Leu Val Val Tyr Val Pro  
 85 90

10

<210> 6

ES 2 381 014 T3

<211> 1656

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> mat\_péptido desde 1 a 1656

<400> 6

```

atggtcagct actgggacac cggggtcctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgcttctc      60
acaggatcta gttccggagg tagaccttc gtagagatgt acagtgaaat ccccgaaatt      120
atacacatga ctgaaggaag ggagctcgtc attccctgcc gggttacgtc acctaacatc      180
actgttactt taaaaaagtt tccaettgac actttgatcc ctgatggaaa acgcataatc      240
tgggacagta gaaagggctt catcatatca aatgcaacgt acaaagaaat agggcttctg      300
acctgtgaag caacagtcaa tgggcatttg tataagacia actatctcac acatcgacia      360
accaatacaa tcatagatgt ggttctgagt ccgtctcatg gaattgaact atctgttggg      420
gaaaagcttg tcttaaattg tacagcaaga actgaactaa atgtggggat tgacttcaac      480
tgggaatacc cttcttcgaa gcatcagcat aagaaacttg taaaccgaga cctaaaaacc      540

cagtctggga gtgagatgaa gaaatTTTTg agcaccttaa ctatagatgg tgtaaccceg      600
agtgaccaag gattgtacac ctgtgcagca tccagtgggc tgatgaccia gaagaacagc      660
acatttgtca ggggtccatga aaacctttct gttgcttttg gaagtggcat ggaatctctg      720
gtggaagcca cgggtggggga gcgtgtcaga atccctgcga agtaccttgg ttaccaccc      780
ccagaaataa aatggtataa aaatggaata ccccttgagt ccaatcacac aattaaagcg      840
gggcatgtac tgacgattat ggaagtgagt gaaagagaca caggaaatta cactgtcatc      900
cttaccaatc ccatttcaaa ggagaagcag agccatgtgg tctctctggt tgtgtatgtc      960
ccaccgggcc cgggcgacia aactcacaca tgcccactgt gcccagcacc tgaactcctg      1020
gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg      1080
accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc      1140
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagcccg      1200
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat      1260
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc      1320
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg      1380
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgectag tcaaaggctt ctatcccagc      1440
gacatgcccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacia ggccacgcct      1500
cccgctctgg actccgacgg ctccttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc      1560
agggtgcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac      1620
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa      1656

```

10

<210> 7

<211> 552

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> CADENA desde (1) hasta (552)

<400> 7

Met	Val	Ser	Tyr	Trp	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Leu	Ser
1				5					10					15	
Cys	Leu	Leu	Leu	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Pro	Phe	Val	Glu
			20					25					30		
Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Ile	Ile	His	Met	Thr	Glu	Gly	Arg	Glu
		35					40					45			
Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	Val	Thr	Leu
	50					55					60				
Lys	Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	Ile	Ile
65					70					75				80	
Trp	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe	Ile	Ile	Ser	Asn	Ala	Thr	Tyr	Lys	Glu
				85					90					95	
Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	His	Leu	Tyr	Lys

ES 2 381 014 T3

			100					105				110			
Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	His	Arg	Gln	Thr	Asn	Thr	Ile	Ile	Asp	Val	Val
			115					120				125			
Leu	Ser	Pro	Ser	His	Gly	Ile	Glu	Leu	Ser	Val	Gly	Glu	Lys	Leu	Val
			130				135				140				
Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Asn	Val	Gly	Ile	Asp	Phe	Asn
145					150					155					160
Trp	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Lys	His	Gln	His	Lys	Lys	Leu	Val	Asn	Arg
					165					170					175
Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	Lys	Lys	Phe	Leu	Ser	Thr
			180					185					190		
Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp	Gln	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys
			195				200					205			
Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Arg
			210				215					220			
Val	His	Glu	Lys	Pro	Phe	Val	Ala	Phe	Gly	Ser	Gly	Met	Glu	Ser	Leu
225					230					235					240
Val	Glu	Ala	Thr	Val	Gly	Glu	Arg	Val	Arg	leu	Pro	Ala	Lys	Tyr	Leu
					245				250						255
Gly	Tyr	Pro	Pro	Pro	Glu	Ile	Lys	Trp	Tyr	Lys	Asn	Gly	Ile	Pro	Leu
			260					265					270		
Glu	Ser	Asn	His	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	His	Val	Leu	Thr	Ile	Met	Glu
		275					280						285		
Val	Ser	Glu	Arg	Asp	Thr	Gly	Asn	Tyr	Thr	Val	Ile	Leu	Thr	Asn	Pro
		290				295					300				
Ile	Ser	Lys	Glu	Lys	Gln	Ser	His	Val	Val	Ser	Leu	Val	Val	Tyr	Val
305					310					315					320
Pro	Pro	Gly	Pro	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Leu	Cys	Pro	Ala
					325				330						335
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
			340					345						350	
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
		355					360						365		
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
		370				375					380				
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
385					390					395					400
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
					405				410						415
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
			420					425					430		
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
		435					440						445		
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr
		450					455						460		

ES 2 381 014 T3

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 465 470 475 480  
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 485 490 495  
 Lys Ala Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 500 505 510  
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 515 520 525  
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 530 535 540  
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 545 550

<210> 8

<211> 23

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido

10 <400>

ccttcgtag agatgtacag tga 23

<210> 9

15 <211> 23

<212> DNA

20 <213> Artificial

<220>

25 <223> oligonucleótido

<400> 9

tatgattgta ttggttgc cat 23

30

<210> 10

<211>23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> oligonucleótido

<400> 10

gatgtgggtc tgagtccgtc tca 23

10 <210> 11

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> oligonucleótido

<400>11

cgggtgggaca tacacaacca ga 22

20

<210>12

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 12

30 gacaaaactc acacatgccc act 23

<210> 13

<211> 24

<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223>oligonucleótido

<400>13

tcatttacc ggagacaggg agag 24

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína quimérica que comprende diferentes fragmentos de los receptores de VEGF, FLT-1 y KDR, caracterizada porque la proteína quimérica consiste en el 2º dominio de tipo Ig de FLT-1, los dominios 3º y 4º de tipo Ig de KDR y Fc de inmunoglobulina humana, designándose la proteína quimérica como FLTd2-KDRd3,4-Fc.
- 5 2. La proteína quimérica según la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos es como se muestra en SEQ ID NO: 7.
3. ADN recombinante que codifica para la proteína quimérica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
4. El ADN recombinante según la reivindicación 3 que codifica para la proteína quimérica según la reivindicación 2, en donde la secuencia de ADN es como se muestra en SEQ ID NO: 6.
- 10 5. Un vector que comprende las secuencias de ADN recombinante según las reivindicaciones 3 ó 4, donde el vector es seleccionado de un plásmido, un virus o un fragmento de ADN.
6. Un huésped recombinante que contiene el vector recombinante según la reivindicación 5, en donde las células huésped son células eucariotas o células procariotas.
- 15 7. Una composición farmacéutica la cual comprende una proteína quimérica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Una composición farmacéutica según la reivindicación 7, en la que la composición farmacéutica es una disolución inyectable.
9. Una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 7 o la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis incluyendo tumor, retinopatías diabéticas, artritis, anemia o hiperplasia del endometrio.
- 20 10. El uso de una proteína quimérica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento antiangiogénico.
11. El uso según la reivindicación 10 en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis incluyendo tumor, retinopatías diabéticas, artritis, anemia o hiperplasia del endometrio.
- 25 12. La proteína quimérica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento antiangiogénico.
13. La proteína quimérica según la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis incluyendo tumor, retinopatías diabéticas, artritis, anemia o hiperplasia del endometrio.

30

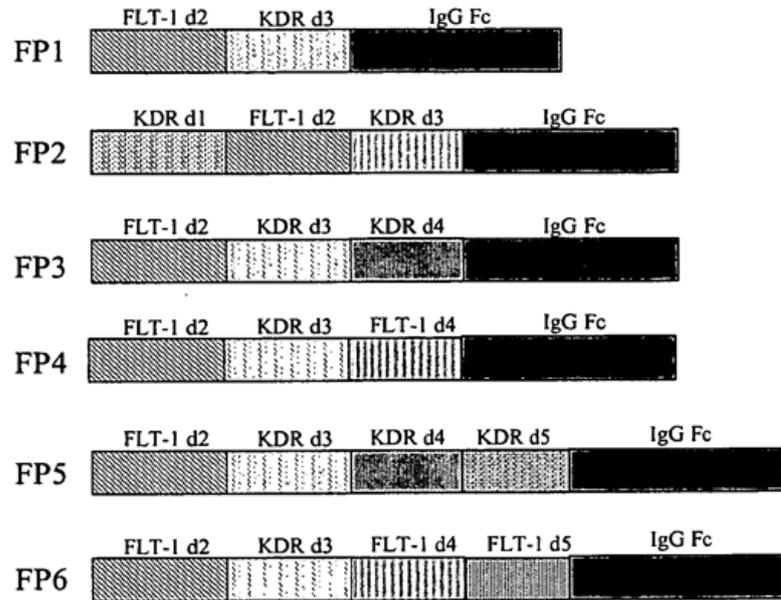


Figura 1

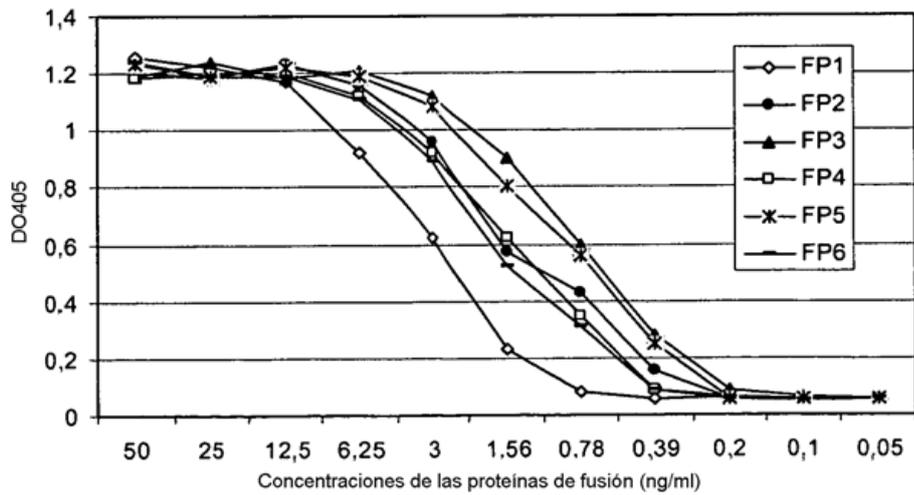


Figura 2

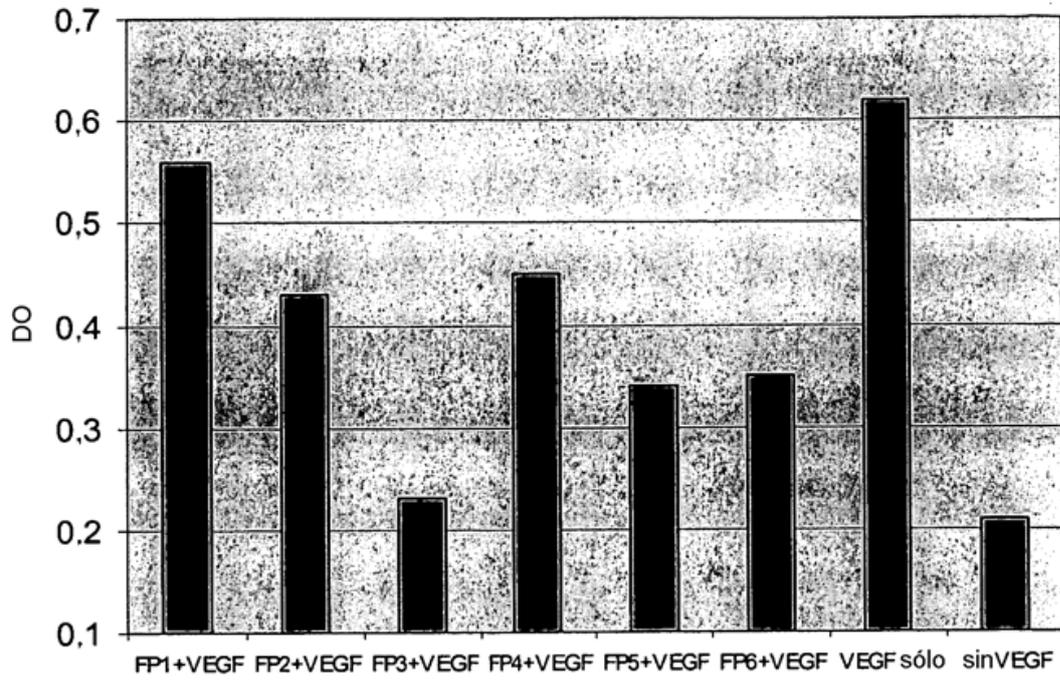


Figura 3

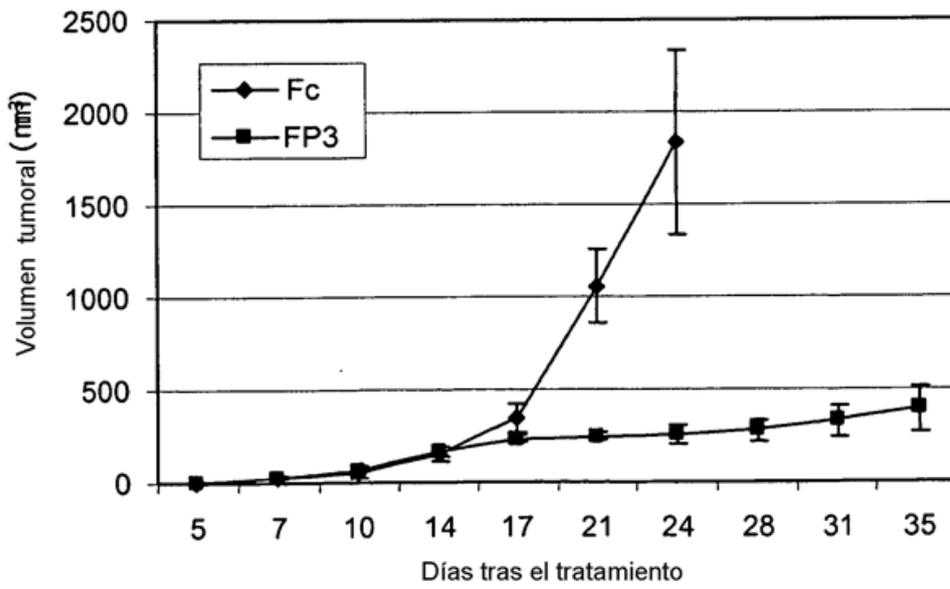


Figura 4

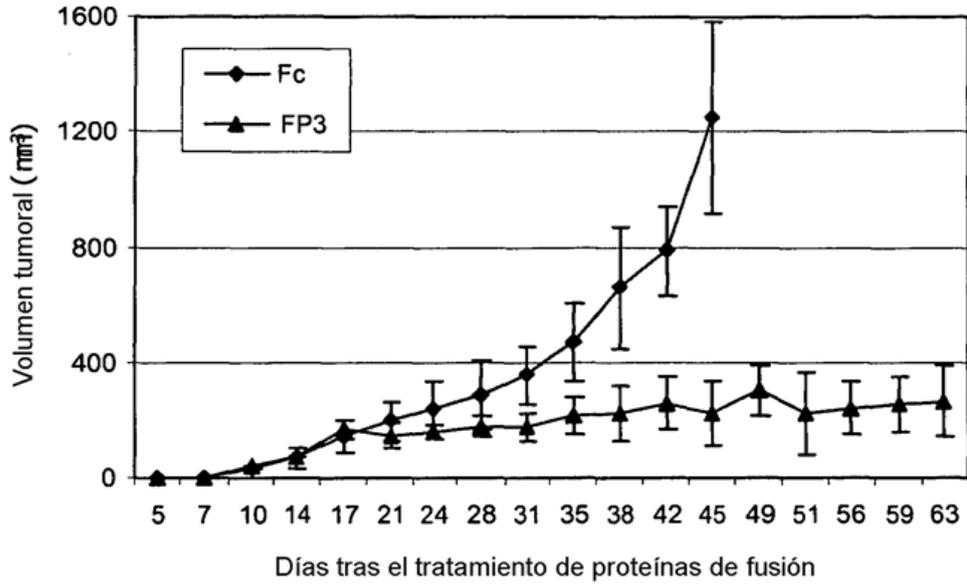


Figura 5

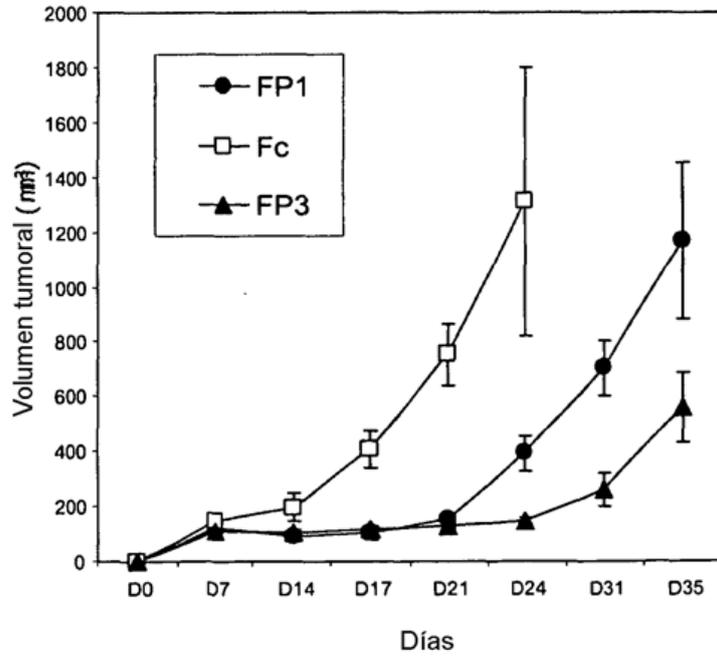


Figura 6