

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 548 238**

(51) Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 47/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2006 E 06748594 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 1861116**

(54) Título: **Formulaciones antagonistas de VEGF**

(30) Prioridad:

**25.03.2005 US 665125 P**

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

**15.10.2015**

(73) Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.**

**(100.0%)**

**777 Old Saw Mill River Road  
Tarrytown, NY 10591, US**

(72) Inventor/es:

**DIX, DANIEL;  
FRYE, KELLY y  
KAUTZ, SUSAN**

(74) Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 548 238 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

Formulaciones antagonistas de VEGF

**5 Campo de la invención**

La presente invención se dirige a formulaciones farmacéuticas que comprenden agentes capaces de inhibir al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La invención incluye formulaciones farmacéuticas que tienen estabilidad aumentada.

**10 Estado de la técnica relacionada**

La expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es prácticamente ubicua en cáncer humano, en consistencia con su papel como un mediador clave de la neoangiogénesis tumoral. El bloqueo de la función de VEGF, mediante la unión a la molécula o su receptor VEGFR-2, inhibe el crecimiento de las células tumorales implantadas en múltiples modelos de xenotrasplantes (véase, por ejemplo, Gerber *et al.* (2000) Cancer Res. 60:6253-6258). Se ha descrito una proteína de fusión antagonista soluble específica de VEGF, denominada una "Trampa de VEGF" (Kim *et al.* (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99: 11399-404; Holash *et al.* (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:11393-8).

**20** Los siguientes documentos también se refieren a:

- El documento WO 2005/000895 que se refiere a las Trampas de VEGF y a los usos terapéuticos de las mismas;
- Fraser *et al* (2005) J. Clin. Endocrinol. & Metabolism, 90(2): 1114-1122 que concierne a inyecciones simples de una trampa de factor de crecimiento endotelial vascular que bloquea la ovulación;
- El documento US 2005/032699 que concierne a una composición de un antagonista de VEGF y un agente anti-proliferativo;
- El documento WO 02/060489 que concierne a un método para usar una variante del receptor de VEGF para tratar la psoriasis y para potenciar la curación de heridas; y
- El documento US 2005/276808 que concierne a un método de administración y de uso de los inhibidores de VEGF para el tratamiento del cáncer.

**Breve sumario de la invención**

**35** En el presente documento se proporcionan formulaciones estables de una proteína de fusión específica antagonista de VEGF. Las formulaciones farmacéuticamente aceptables de la invención comprenden la "trampa" antagonista de VEGF con un transportador farmacéuticamente aceptable.

**40** La invención proporciona una formulación líquida de una proteína de fusión antagonista específica de VEGF, que comprende histidina 10 mM, NaCl 50 mM, sacarosa al 5-20 % y 50-100 mg/ml de una proteína de fusión que tiene un componente del receptor que consiste en un dominio similar a inmunoglobulina (Ig) 2 de un primer receptor de VEGF y un dominio de Ig 3 de un segundo receptor de VEGF, y un componente de multimerización, a un pH de 6,0-6,5, en el que el primer receptor de VEGF es Flt1 y el segundo receptor de VEGF es Flk1 o Flt4, que además comprende polisorbato 20 al 0,1 % o PEG 3350 al 3 %.

**45** En una realización, la proteína de fusión tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°:4.

La proteína de fusión puede comprender los aminoácidos de 62-457 de SEC ID: N°4 y está glucosilada en los restos de Asn 62, 94, 149, 222 y 308.

**50 Descripción detallada de la Invención**

**Descripción general**

**55** El manejo seguro y la administración de las formulaciones que comprenden proteínas representan retos significativos para los formuladores farmacéuticos. Las proteínas poseen propiedades químicas y físicas únicas que presentan problemas de estabilidad: existe una variedad de rutas de degradación para las proteínas, implicando tanto la inestabilidad química como la física. La inestabilidad química incluye la desaminación, agregación, el recorte de la estructura peptídica y la oxidación de los restos de metionina. La inestabilidad física abarca muchos fenómenos, incluyendo, por ejemplo, la agregación.

**Antagonistas del VEGF**

**65** Un antagonista de VEGF es un compuesto que puede bloquear o inhibir la acción biológica del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), e incluye proteínas de fusión capaces de atrapar a VEGF. En una realización preferente, el antagonista de VEGF usado en la formulación de la invención es la proteína de fusión de SEC ID N°:4. El

antagonista de VEGF puede expresarse en una línea celular de mamíferos tal como una célula CHO y puede modificarse post-traduccionalmente. En una realización específica, la proteína de fusión comprende los aminoácidos de 27-457 de SEC ID Nº:4 y está glucosilada en los restos de Asn 62, 94, 149, 222 y 308.

- 5 El antagonista de VEGF puede prepararse por cualquier método conocido en la materia o que será conocido.  
 El antagonista de VEGF está preferentemente sustancialmente libre de proteínas contaminantes en el momento en  
 el que se usa para preparar la formulación farmacéuticamente aceptable. Por "sustancialmente libre de proteínas  
 contaminantes" se entiende, preferentemente, que al menos el 90 % del peso de la preparación proteína de fusión  
 antagonista específica de VEGF usada para realizar una formulación es una proteína de fusión antagonista de  
 VEGF, más preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 99 %. La proteína de fusión está  
 preferentemente sustancialmente libre de agregados. "Sustancialmente libre de agregados" significa que al menos el  
 90 % del peso de la proteína de fusión no está presente en un agregado en el momento en el que la proteína de  
 fusión se usa para preparar la formulación farmacéuticamente eficaz. La proteína de fusión puede contener  
 cantidades bajas o traza de compuestos como resultado del proceso de purificación, por ejemplo, cantidades bajas o  
 traza de citrato y/o polisorbato.

#### **Formulaciones líquidas estables**

- 20 La invención proporciona una formulación líquida estable farmacéuticamente aceptable tal como se define anteriormente.

Se determina la estabilidad de una serie de modos en momentos especificados, incluyendo la determinación del pH, la inspección visual del color y la apariencia, la determinación del contenido de proteína total por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, espectroscopia UV, SDS-PAGE, HPLC de exclusión molecular, bioensayo de la 25 determinación de la actividad, isoelectroenfoque y cuantificación de isoaspartato. En un ejemplo de bioensayo útil para determinar la actividad del antagonista de la actividad de VEGF, se usa una línea celular BAF/3 VEGFR1/EPOR para determinar la unión a VEGF165.

- 30 Pueden almacenarse las formulaciones en un ambiente privado de oxígeno. Los ambientes privados de oxígeno pueden generarse mediante el almacenamiento de las formulaciones con un gas inerte tal como por ejemplo, argón, nitrógeno o helio.

#### **Ejemplos**

35 **Ejemplo 1. Estabilidad de una Formulación Líquida de una Trampa de VEGF a 50 mg/ml**

Una formulación líquida que contiene fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, polisorbato 20 al 0,1 %, sacarosa al 20 % y 40 50 mg/ml de trampa de VEGF (SEC ID Nº:4), pH 6,25, se almacenó a 5 °C y se ensayaron las muestras a los 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses. Se determinó la estabilidad mediante SE-HPLC. Los resultados, mostrados en la Tabla 1, muestran que el 98,6 % y el 98,3 % de la proteína de la trampa de VEGF permanecía intacta (no degradada) a los 12 y 24 meses, respectivamente. La turbidez se midió a una DO<sub>405</sub> nm, y el porcentaje de proteína recuperada por HPLC de exclusión molecular.

**Tabla 1. Estabilidad de la Proteína de la Trampa de VEGF a 50 mg/ml Cuando se Almacena a 5 °C  
 (VGFT-SS065)**

Meses	Apariencia Visual	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF recuperada	% de Trampa de VEGF con Configuración Nativa
0	Pasada	0,00	6,2	100	99,0
3	Pasada	0,00	6,2	102	98,8
6	Pasada	0,01	6,2	103	98,7
9	Pasada	0,01	6,3	102	98,2
12	Pasada	0,01	6,3	106	98,6
18	Pasada	0,00	6,3	103	98,4
24	Pasada	0,00	6,2	93	98,3

Una formulación líquida que contenía fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, PEG 3350 al 3 %, sacarosa al 20 % y 50 mg/ml de trampa de VEGF (SEC ID Nº:4), pH 6,25, se almacenó a 5 °C y se ensayaron las muestras a los 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses. En la Tabla 2 se muestran los resultados de estabilidad.

**Tabla 2. Estabilidad de la Proteína de la Trampa de VEGF a 50 mg/ml Cuando se Almacena a 5 °C  
(VGFT-SS065)**

Meses	Apariencia Visual	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF recuperada	% de Trampa de VEGF con Configuración Nativa
0	Pasada	0,00	6,2	100	99,0
3	Pasada	0,00	6,2	100	98,8
6	Pasada	0,01	6,3	103	98,5
9	Pasada	0,00	6,3	103	98,3
12	Pasada	0,01	6,3	110	98,3
18	Pasada	0,00	6,3	113	98,0
24	Pasada	0,01	6,2	90	97,8

**Ejemplo 2. Estabilidad de una Formulación Líquida de una Trampa de VEGF a 75 mg/ml**

Una formulación líquida que contenía fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, Polisorbato 20 al 0,1 %, sacarosa al 20 %, y 75 mg/ml de trampa de VEGF (SEC ID N°:4), pH 6,25, se almacenó a 5 °C y se ensayaron las muestras a los 0, 1, 2,3, 3, 9, 12 y 15 meses. En la Tabla 3 se muestran los resultados de estabilidad.

**Tabla 3. Estabilidad de la Proteína de la Trampa de VEGF a 75 mg/ml Cuando se Almacena 5 °C  
(VGFT-SS101)**

Meses	Apariencia Visual	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF recuperada	% de Trampa de VEGF con Configuración Nativa
0	Pasada	0,00	6,2	100	97,1
1	Pasada	0,00	6,2	96	97,0
2,3	Pasada	0,00	6,2	98	96,7
3	Pasada	0,00	6,2	97	96,1
9	Pasada	-0,01	6,0	101	96,0
12	Pasada	0,00	6,3	110	94,5
15	Pasada	0,00	6,3	92	95,6

Una formulación líquida que contenía fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, PEG 3350 al 3%, sacarosa al 20 % y 75 mg/ml de trampa de VEGF (SEC ID N°:4), pH 6,25, se almacenó a 5 °C y se ensayaron las muestras a los 0, 1, 2,3, 3, 9, 12 y 15 meses. En la Tabla 4 se muestran los resultados de estabilidad.

**Tabla 4. Estabilidad de la Proteína de la Trampa de VEGF a 75 mg/ml Cuando se Almacena a 5 °C  
(VGFT-SS101)**

Meses	Apariencia Visual	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF recuperada	% de Trampa de VEGF con Configuración Nativa
0	Pasada	0,00	6,2	100	96,8
1	Pasada	0,00	6,2	99	96,7
2,3	Pasada	0,00	6,2	97	96,3
3	Pasada	0,00	6,2	89	95,6
9	Pasada	-0,01	6,2	98	95,4
12	Pasada	-0,01	6,3	112	94,1
15	Pasada	0,00	6,3	98	94,8

**Ejemplo 3. Estabilidad de una Formulación Líquida de una Trampa de VEGF a 100 mg/ml**

Una formulación líquida que contenía fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, Polisorbato 20 al 0,1 %, sacarosa al 20 %, y 100 mg/ml de trampa de VEGF (SEC ID N°:4), pH 6,25, se almacenó a 5 °C y se ensayaron las muestras a los 0, 1, 2,3, 3, 9, 12 y 15 meses. En la Tabla 5 se muestran los resultados de estabilidad.

**Tabla 5. Estabilidad de la Proteína de la Trampa de VEGF a 100 mg/ml Almacenada a 5 °C (VGFT-SS101)**

Meses	Apariencia Visual	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF recuperada	% de Trampa de VEGF con Configuración Nativa
0	Pasada	0,00	6,3	100	96,7
1	Pasada	0,00	6,2	92	96,6
2,3	Pasada	0,00	6,2	92	96,2
6	Pasada	0,00	6,2	99	95,5
9	Pasada	-0,01	6,2	92	95,5
12	Pasada	-0,01	6,2	110	93,9
15	Pasada	0,00	6,3	108	94,8

Una formulación líquida que contenía fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, PEG 3350 al 3 %, sacarosa al 20 % y 100 mg/ml de trampa de VEGF (SEC ID N°:4), pH 6,25, se almacenó a 5 °C y se ensayaron las muestras a los 0, 1, 2,3, 3, 9, 12 y 15 meses. En la Tabla 6 se muestran los resultados de estabilidad.

**Tabla 6. Estabilidad de la Proteína de la Trampa de VEGF a 100 mg/ml Almacenada a 5 °C (VGFT-SS101)**

Meses	Apariencia Visual	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF recuperada	% de Trampa de VEGF con Configuración Nativa
0	Pasada	0,00	6,3	100	96,5
1	Pasada	0,01	6,2	94	96,2
2,3	Pasada	0,01	6,2	93	95,7
6	Pasada	0,01	6,2	102	94,6
9	Pasada	0,00	6,2	95	94,6
12	Pasada	0,00	6,3	96	92,8
15	Pasada	0,01	6,3	102	93,9

**Ejemplo 4. Formulación de Trampa Estable de VEGF**

La formulación de la invención comprende histidina 10 mM, NaCl 50 mM, sacarosa al 5-20 %, 50-100 mg/ml de trampa de VEGF, y uno de polisorbato al 0,1 % o PEG 3350 al 3 %. Una ventaja de esta formulación líquida es que esta proporciona una concentración más alta de trampa de VEGF sin la necesidad de fabricar un producto liofilizado.

Por lo tanto, esta formulación proporciona facilidad para la administración subcutánea, por ejemplo, permitiendo el suministro de una jeringuilla rellena con anterioridad de líquido a una concentración más alta que la administrada por infusión IV. Así mismo, esta formulación podría usarse ventajosamente para proporcionar volúmenes de infusión más bajos y tiempos de infusión más cortos. La cantidad de degradación determinada por SE-HPLC después de la incubación a 5 °C durante hasta 15 o 25 meses se resume en la Tabla 7.

25

**Tabla 7. Estabilidad de Formulación Líquida con 50-100 mg/ml de Trampa de VEGF (VGFT-SS101)**

Incubación (meses)	Trampa de VEGF (mg/ml)	% de Polisorbato 20	% de PEG 3350	% de Degradación
24	50	0,1	-	0,7
24	50	-	3	1,3
15	75	0,1	-	1,5
15	75	-	3	2,0
15	100	0,1	-	1,9

Incubación (meses)	Trampa de VEGF (mg/ml)	% de Polisorbato 20	% de PEG 3350	% de Degradación
15	100	-	3	2,6

## LISTADO DE SECUENCIAS

- 5           <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
- 10          <120> Formulaciones antagonistas de VEGF
- 15          <130> 4030A-WO
- 20          <140> A asignar  
               <141> 22-03-2006
- 25          <150> 60/665,125  
               <151> 25-03-2005
- 30          <160> 4
- 35          <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 40          <210> 1  
               <211> 1453  
               <212> ADN  
               <213> Secuencia Artificial
- 45          <220>  
               <223> Sintético
- 50          <400> 1
- ```

aagcttgggc tgcagggtcga tcgactctag aggatcgatc cccggggcgag ctcgaattcg 60
caaccaccaat ggtcagctac tgggacaccg gggtcctgtct gtgcgcgcgtc ctcagctgtc 120
tgcttcac aggtatctgt tccggaggta gaccttttgtt agagatgtac agtggaaatcc 180
ccgaaaattat acacatgact gaaggaaggg agctcgatcat tccctgccgg gttacgtcac 240
ctaacatcac tgtaacttta aaaaagtttc cacttgacac ttgtatccct gatggaaaac 300
gcataatctg ggacagttaga aagggtttca tcataatcaaa tgcAACgtac aaagaaaatag 360
ggcttcgtac ctgtgaagca acagtcaatg ggcattttgtta taagacaac tatctcacac 420
atcgacaaac caatacaatc atagatgtgg ttctgagtcgtt gtctcatggaa attgaactat 480
ctgttggaga aaagcttgtc ttaaattgtta cagcaagaac tgaactaaat gtggggattt 540
acttcaactg ggaataccct ttttgcggatc atcagcataa gaaacttgcgtt aaccggagacc 600
taaaaaaccca gtctgggagt gagatgaaga aatttttgatc cacccttaact atagatggtg 660
taacccggag tgaccaagga ttgtacacct gtgcagtcgtt cagtgggtt atgaccaaga 720
agaacacgac atttgcagg gtccatgaaa agggcccccggg cgacaaaaact cacacatgcc 780
caccgtgccc agcacctgaa ctccctggggg gaccgtcgtt cttcccttcc cccccaaaaac 840
ccaaggacac cctcatgtac tcccgaccc ctgggtcgtt atgcgtgggtt gtggacgtga 900
gccacgaaga ccctgggtt aagttcaact ggtacgttggaa cggcgtggag gtgcataatg 960
ccaagacaaa gccgcggggag gaggcgttaca acagcacgtt ccgtgtgggtt agcgtcctca 1020
ccgtcctgtca ccaggactgg ctgttatggca agggttacaa gtgcacgggtt tccaacaaag 1080
ccctcccgac ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagcccc cgagaaccac 1140
aggtgtacac cctgccccca tcccggttggat agctgaccaaa gaaccagggtt agcctgaccc 1200
gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tccgggttggaa gtggggagagc aatgggcagc 1260
cgggagaacaa ctacaagacc acggctcccg tgctggactc cgacgggttcc ttcttctct 1320
atagcaagct caccgtggac aagagcagggtt ggcagcagggtt gaacgttcc tcatgttccg 1380
tgatgcgttgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggtt 1440
aatgagcgcc cgc 1453

```
- 30          <210> 2  
               <211> 458  
               <212> PRT
- 35          <213> Secuencia Artificial

## ES 2 548 238 T3

<220>  
<223> Sintético

&lt;400&gt; 2

5

|                                                 |                             |
|-------------------------------------------------|-----------------------------|
| 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 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             |
| 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 Gly Pro Gly Asp Lys Thr His     | Thr Cys Pro Pro Cys         |
| 225                                             | 230 235 240                 |
| Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val     | Phe Leu Phe Pro Pro         |
| 245                                             | 250 255                     |
| Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro | Glu Val Thr Cys             |
| 260                                             | 265 270                     |
| Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val | Lys Phe Asn Trp             |
| 275                                             | 280 285                     |
| Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys     | Thr Lys Pro Arg Glu         |
| 290                                             | 295 300                     |
| Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser     | Val Leu Thr Val Leu         |
| 305                                             | 310 315 320                 |
| His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys     | Cys Lys Val Ser Asn         |
| 325                                             | 330 335                     |
| Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile     | Ser Lys Ala Lys Gly         |
| 340                                             | 345 350                     |
| Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro     | Pro Ser Arg Asp Glu         |
| 355                                             | 360 365                     |
| Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu     | Val Lys Gly Phe Tyr         |
| 370                                             | 375 380                     |
| Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn     | Gly Gln Pro Glu Asn         |
| 385                                             | 390 395 400                 |
| Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser     | Asp Gly Ser Phe Phe         |
| 405                                             | 410 415                     |
| Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg     | Trp Gln Gln Gly Asn         |
| 420                                             | 425 430                     |
| Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu     | His Asn His Tyr Thr         |
| 435                                             | 440 445                     |
| Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys         |                             |
| 450                                             | 455                         |

## ES 2 548 238 T3

<210> 3  
<211> 1377  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

5

<220>  
<223> Sintético

10 &lt;400&gt; 3

atggtcagct actgggacac cggggtcctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgcttctc 60  
acaggatcta gttccggaaag tgcataccgt agaccttcg tagagatgtc cagtgaatc 120  
cccgaaaatta tacacatgac tgaaggaagg gagctcgtca ttccctgccc ggttaactca 180  
cctaacatca ctgttacttt aaaaaagttt ccacttgaca ctttgatccc tgatggaaaa 240  
cgataaatct gggacagtag aaagggttc atcatatcaa atgcaacgtc caaagaaata 300  
gggcttctga cctgtgaagc aacagtcaat gggcatttgt ataagacaaa ctatctcaca 360  
catcgacaaa ccaatacaat catagatgtg gttctgagtc cgtctcatgg aattgaacta 420  
tctgttggag aaaagcttgt cttaaatttgt acagcaagaa ctgaactaaa tgtggggatt 480  
gacttcaact gggaaataccc ttcttcgaag catcagcata agaaacttgt aaaccgagac 540  
ctaaaaaaccg agtctggag ttagatgtc aaatttttga gcaccccttaac tatagatgg 600  
gtAACCCGGA gtgaccaagg attgtacacc tgcgcgcgtccatgg 660  
aagaacagca catttgcag ggtccatgaa aaggacaaa ctcacacatg cccacccgtc 720  
ccagcacctg aactccctggg gggacccgtca gtcttcctct tcccccccaaa acccaaggac 780  
accctcatga tctccggac ccctgggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa 840  
gacccctgagg tcaagttcaa ctggtaacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 900  
aagccgcggg aggagcagta caacagcagc taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 960  
caccaggact ggctgaatgg caaggagtagc aagtgcacagg tctccaacaa agccctccca 1020  
gccccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acagggtgtac 1080  
accctggccc catccggga ttagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc 1140  
aaagggttct atcccagcga catgcgttg gagtgggaga gcaatggca gccggagaac 1200  
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag 1260  
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat 1320  
gaggctctgc acaaccacta caegcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga 1377

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 458

15 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sintético

20 &lt;400&gt; 4

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| 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 | Ser | Asp | Thr | Gly | Arg | Pro |     |     |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 20  | 25  | 30  |     |    |
| Phe | Val | Glu | Met | Tyr | Ser | Glu | Ile | Pro | Glu | Ile | Ile | His | Met | Thr | Glu |     |     |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 35  | 40  | 45  |    |
| Gly | Arg | Glu | Leu | Val | Ile | Pro | Cys | Arg | Val | Thr | Ser | Pro | Asn | Ile | Thr |     |     |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 50  | 55  | 60  |    |
| Val | Thr | Leu | Lys | Lys | Phe | Pro | Leu | Asp | Thr | Leu | Ile | Pro | Asp | Gly | Lys |     |     |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 65  | 70  | 75  | 80 |
| Arg | Ile | Ile | Trp | Asp | Ser | Arg | Lys | Gly | Phe | Ile | Ile | Ser | Asn | Ala | Thr |     |     |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 85  | 90  | 95  |    |
| Tyr | Lys | Glu | Ile | Gly | Leu | Leu | Thr | Cys | Glu | Ala | Thr | Val | Asn | Gly | His |     |     |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 100 | 105 | 110 |    |
| Leu | Tyr | Lys | Thr | Asn | Tyr | Leu | Thr | His | Arg | Gln | Thr | Asn | Thr | Ile | Ile |     |     |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 115 | 120 | 125 |    |
| Asp | Val | Val | Leu | Ser | Pro | Ser | His | Gly | Ile | Glu | Leu | Ser | Val | Gly | Glu |     |     |    |

## ES 2 548 238 T3

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

**REIVINDICACIONES**

- 5      1. Una formulación líquida de un antagonista de VEGF, que comprende histidina 10 mM, NaCl 50 mM, sacarosa al 5-20 %, y 50-100 mg/ml de una proteína de fusión que tiene un componente del receptor que consiste en un dominio similar a la immunoglobulina (Ig) 2 de un primer receptor de VEGF y un dominio de Ig 3 de un segundo receptor de VEGF, y un componente de multimerización, a un pH de 6,0-6,5, donde el primer receptor de VEGF es Flt1 y el segundo receptor de VEGF es Flk1 o Flt4, que además comprende polisorbato 20 al 0,1 % o PEG 3350 al 3 %.
- 10     2. La formulación líquida de la reivindicación 1, donde la proteína de fusión tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°:4.
3. La formulación líquida de la reivindicación 1 o 2, donde la proteína de fusión comprende los aminoácidos de 27-457 de SEC ID N°:4 y está glucosilada en los restos de Asn 62, 94, 149, 222 y 308.