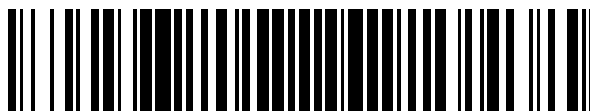


19



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).

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 resumen de la invención**

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.

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 %.

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.

**Descripción detallada de la invención****Descripción general**

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**

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-traduccionamente. En una realización específica, 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.

- 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.

- 25 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 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 50 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 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 N°: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.

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

```

aagcttgggc tgcaggctga tcgactctag aggatogato cccgggagag ctccaattcg 60
caaccaccat ggtcagctac tgggacaccg gggctcctgt gtgcgcgctg ctccagctgtc 120
tgcttctcac aggatctagt tccggaggta gacctttcgt agagatgtac agtgaaatcc 180
ccgaaattat acacatgact gaaggaaggg agctcgtcat tccctgccgg gttacgtcac 240
ctaaccatcac tgttacttta aaaaagtttc cacttgacac tttgatccct gatggaaaac 300
gcataatctg ggacagtaga aagggcttca tcatatcaaa tgcaacgtac aaagaaatag 360
ggcttctgac ctgtgaagca acagtcaatg ggcatttgta taagacaaac tatctcacac 420
atcgacaaac caatacaatc atagatgtgg ttctgagtcg gtctcatgga attgaactat 480
ctgttgagga aaagcttggt ttaaattgta cagcaagaac tgaactaaat gtggggattg 540
acttcaactg ggaataccct tcttcgaagc atcagcataa gaaacttgta aaccgagacc 600
taaaaaccca gtctgggagt gagatgaaga aatttttgag cactttaact atagatgggtg 660
taaccgggag tgaccaagga ttgtacacct gtgcagcatc cagtgggctg atgaccaaga 720
agaacagcac atttgtcagg gtccatgaaa agggcccggg cgacaaaact cacacatgcc 780
caccgtgccc agcacctgaa ctccctgggg gaccgtcagt ctccctcttc ccccaaaac 840
ccaaggacac cctcatgac tcccggaacc ctgaggtcac atgcgtgggtg gtggacgtga 900
gccacgaaga cctgagggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg 960
ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtgggtc agcgtctca 1020
ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag 1080
ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac 1140
aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct 1200
gcctgggtcaa aggttcttat cccagcgaca tcgcgtgga gtgggagagc aatgggcagc 1260
cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct 1320
atagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg 1380
tgatgcatga ggtcttgca aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta 1440
aatgagcggc cgc 1453

```

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

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 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 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

```

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

5

<220>  
<223> Sintético

<400> 3

10

```

atggtcagct actgggacac cggggctcctg ctgtgcgcgc tgctoagctg tctgcttctc 60
acaggatcta gttccggaag tgataccggg agacctttcg tagagatgta cagtgaaatc 120
cccgaaatta tacacatgac tgaaggaagg gagctcgtca ttccctgccg gggtacgtca 180
cctaacaatca ctgttacttt aaaaaagttt ccacttgaca ctttgatccc tgatggaaaa 240
cgcataatct gggacagtag aaagggcttc atcatatcaa atgcaacgta caaagaaata 300
gggcttctga cctgtgaagc aacagtcaat gggcatttgt ataagacaaa ctatctcaca 360
catcgacaaa ccaatacaat catagatgtg gttctgagtc cgtctcatgg aattgaaacta 420
tctgttggag aaaagcttgt cttaaattgt acagcaagaa ctgaactaaa tgtggggatt 480
gacttcaact gggaataccc ttcttcgaag catcagcata agaaacttgt aaaccgagac 540
ctaaaaaccc agtctgggag tgagatgaag aaatttttga gcaccttaac tatagatggg 600
gtaaccgga gtgaccaagg attgtacacc tgtgcagcat ccagtgggct gatgaccaag 660
aagaacagca catttgtcag ggtccatgaa aaggacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 720
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctctc tcccccaaaa acccaaggac 780
accctcatga tctccggac cctgagggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa 840
gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 900
aagccgctgg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 960
caccaggact ggctgaatgg caaggagtag aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 1020
gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1080
accctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1140
aaaggtctct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa 1200
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctc ctacagcaag 1260
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaaacgtc tctcatgctc cgtgatgcat 1320
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga 1377

```

<210> 4  
<211> 458  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15

<220>  
<223> Sintético

20

<400> 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

```



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					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									

**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 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, 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.