(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 652 508**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/71 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2011** **PCT/US2011/046802**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2012** **WO12019128**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2011** **E 11745870 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017** **EP 2601214**

(54) Título: **Composiciones de antagonistas de VEGF y sus usos**

(30) Prioridad:

06.08.2010 US 371546 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.02.2018

(73) Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.0%)
500 Kendall Street
Cambridge MA 02142, US

(72) Inventor/es:

STEFANO, JAMES;
PAN, CLARK;
QIU, HUAWEI;
O'CALLAGHAN, MICHAEL y
MATTHEWS, GLORIA

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 652 508 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

Composiciones de antagonistas de VEGF y sus usos

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos 61/371,546, presentada el 6 de agosto de 2010.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La divulgación se refiere a composiciones y métodos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Específicamente, la divulgación se refiere a dominios de unión de VEGF oligomerizados para proporcionar antagonismo de VEGF, y de ese modo tratar enfermedades asociadas a los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

VEGF es un potente factor potenciador de la permeabilidad angiogénica y vascular. El VEGF puede contribuir al dolor de osteoartritis ("OA") y cambios estructurales del cartílago y el hueso: 1) potenciando la inflamación sinovial, la efusión y la angiogénesis, 2) fomentando la invasión de los vasos sanguíneos al cartílago, 3) contribuyendo al edema de la médula ósea, 4) fomentando la re-iniciación local de la formación ósea endocondral, resultando en la duplicación de la línea de flujo, la esclerosis ósea, la hipertrofia de los condrocitos y el adelgazamiento del cartílago. Por lo tanto, es probable que el bloqueo de la señalización de VEGF sea beneficioso para aliviar el dolor de OA y/o para proteger la estructura de la articulación. Se sabe que VEGF está regulado al alza en modelos humanos y animales de OA y puede restaurarse a niveles normales *in vivo* por tratamiento intra-articular con un agente analgésico conocido. Hallazgos recientes también indicaron que la señalización de VEGF/KDR puede estar regulada al alza en OA, y el cartílago y la sinovia se encuentran entre las fuentes de sobre-expresión de VEGF en condiciones patológicas. Además, se demostró que el aumento de la expresión de VEGF al sobre-expresar su regulador aguas arriba alfa del factor inducible por hipoxia (Hif1a) en cultivos de células sinoviales y condrocitos humanos da como resultado un aumento sustancial en la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2), que puede ser una indicación de un estímulo doloroso. En modelos animales de OA se identificó una correlación significativa ($r = 0,437$, $p = 0,008$) entre los niveles de VEGF del líquido sinovial y la prostaglandina E2 (PGE2), un agente sensibilizante neuronal generado por ciclooxigenasas, incluida COX-2, que se ha utilizado como un marcador de dolor en las articulaciones. Además, el bloqueo de VEGF en modelos animales de OA resulta en una inflamación sinovial e hiperplasia disminuida, dos factores correlacionados con el dolor de OA en seres humanos. Serán necesarias semividas más largas de inhibidores basados en proteínas para hacer de esto una estrategia terapéutica viable. Se han intentado múltiples esfuerzos de formulación de liberación sostenida, pero todos dieron como resultado una marcada inestabilidad proteica en ubicaciones específicas en la secuencia de la proteína.

Por consiguiente, existe la necesidad de composiciones mejoradas de antagonistas de VEGF con el fin de mejorar su estabilidad, semividas y otras características beneficiosas.

El documento US 2007/224178 A1 se refiere a una proteína de fusión multimérica de un dominio de tipo Ig de Flt-1. El documento WO 2010/019263 A2 se refiere a construcciones de FLT soluble para tratar cánceres.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

En base a la presente divulgación, un primer aspecto de la presente invención proporciona un oligómero antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que comprende: una pluralidad de monómeros enlazados operativamente uno con otro, en donde cada uno de los monómeros comprende el segundo dominio de unión a VEGF (D2) de tirosina quinasa-1 similar a FMS (FLT-1), y en donde la pluralidad de monómeros están enlazados uno con otro a través de un polietilenglicol (PEG).

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para producir el oligómero de la invención, que comprende: cultivar una célula huésped, recuperar uno o más monómeros de dicha célula huésped y enlazar dichos monómeros.

Aún un aspecto adicional de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del oligómero de la invención.

Otro aspecto de la invención proporciona la composición farmacéutica de la invención para uso en terapia.

Otro aspecto más de la invención proporciona el oligómero antagonista de VEGF de la invención para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con la unión de VEGF a su receptor.

Aspectos y realizaciones adicionales de la invención se establecen en las reivindicaciones adjuntas.

La divulgación proporciona un oligómero antagonista de VEGF que tiene una pluralidad de monómeros, teniendo cada uno de los monómeros el segundo dominio de unión a VEGF (D2) de tirosina quinasa-1 similar a FMS (FLT-1). El oligómero exhibe una mayor estabilidad y una semivida más larga en relación con FLT-1. Además, el oligómero potencia la afinidad de la unión de VEGF y, por lo tanto, antagoniza la unión de VEGF a FLT-1. En algunos casos, los monómeros en el oligómero están operativamente enlazados uno con otro en un polietilenglicol (PEG) multi-brazos.

Adicionalmente, la divulgación proporciona métodos para producir el oligómero antagonista de VEGF. En algunos casos, los oligómeros se producen por oxidación de cobre.

La divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del oligómero antagonista de VEGF.

La divulgación proporciona, además, kits que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del oligómero antagonista de VEGF.

La divulgación proporciona, además, métodos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con, o de otro modo provocado por la interacción entre VEGF y su receptor, en un sujeto, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz del oligómero antagonista de VEGF.

Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de los siguientes ejemplos de descripción detallada y de las figuras. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan a modo de ilustración solamente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El expediente de la patente o la solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujo(s) a color se pueden obtener de la Oficina previa solicitud y pago de la tasa necesaria.

La Figura 1 ilustra un concepto de oligomerizar el dominio VEGFR D2 en un PEG multi-brazos para obtener una unión de VEGF de alta afinidad.

La Figura 2 muestra (a) una construcción de expresión; y (b) un ácido nucleico así como secuencias de aminoácidos de la construcción.

La Figura 3 muestra (a) una SDS-PAGE del dominio D2; (b) la proteína D2-Cys unida a VEGF inmovilizado en una superficie Biacore (5 µg/ml de proteína en HBS-EP); y (c) un borrón de transferencia Western utilizando el anticuerpo (Ab) de HPC4 que muestra, además de D2 que no ha reaccionado, la presencia de un solo producto de mayor PM, lo que indica que la proteína se puede monoPEGilar con PEGs de diversos tamaños.

Figura 4: (a) la SDS PAGE mostró la presencia de un producto de ~60 kDa (PM aparente) que migraba cerca del producto obtenido con un PEG lineal de 20 kDa así como bandas débiles que tenían movilidades consistentes con múltiples D2 en cada uno de los PEG de 4 brazos; y (b) el sensograma normalizado fuera del chip VEGF de bajo nivel.

Figura 5: Se encontró que el dominio D2 con la etiqueta HPC4 y la cisteína C-terminal forman espontáneamente un dímero enlazado a disulfuro como un producto secundario en reacciones de PEGilación. Cuando se purifica con SEC a partir de reacciones o medio acondicionado (Figuras 5a y b), el dímero se unía a VEGF165 con afinidad similar o mayor que sFLT01 por Biacore (Figura 5c y d).

Figura 6: Un panel de reactivos se sometió a ensayo en cuanto a la capacidad de dimerizar D2 obtenido de la expresión transitoria. En síntesis, la proteína (en PBS) se trató con TCEP 2 mM, se cambió el tampón por PBS y se hicieron reaccionar 0,5 eq de reactivos de disulfuro de piridilo o $CuCl_2$ 5 mM (Figura 6a) durante 1 h a 25°C. La SDS PAGE de los productos se muestra en la Figura 6b. TCEP redujo de manera efectiva el disulfuro de dímero, proporcionando D2 monomérico que se procesaba como un doblete a ~ 20 kDa.

La Figura 7muestra los resultados del ensayo de unión de VEGF *in vitro*.

Figura 8: Se muestra PAGE SDS reductora teñida con plata (4-12% Bis-Tris/MES) de 50 ng de proteína (con intensificación in silico) en la Figura 8a. El control sFLT01 mostró cantidades crecientes de un producto de ~35 kDa así como un agregado de alto PM de ~ 115 kDa. Por el contrario, el dímero D2 mostró sólo la acumulación de un producto difuso de PM ~40kDa de tinción muy débil, que era más claramente visible cuando el producto de incubación de 19 días (200 ng) se volvió a aplicar en un gel reductor de Bis-Tris al 12% (Figura 8b).

Figura 9 a y b: dímeros D2 enlazados a PEG enlazados mediante enlazadores de 0,6, 2 o 5 kDa y purificados por SEC ("D2 BM(PEG)3 PkB", "D2 2k Pk A", "D2 5K Pk A", respectivamente) tienen una afinidad de unión a VEGF165 comparable a sFLT01 mientras que los dímeros unidos a disulfuro ("producto eluido de D2 HPC4 Pk B", D2 Pk B ") muestran una unión ligeramente más débil (estos no se oxidaron con cobre).

La Figura 10 muestra la prueba de estabilidad de dímeros D2.

La Figura 11 muestra la estabilidad del dímero D2 con respecto a sFLT01 a temperaturas elevadas: (a) sFLT1; (b) dímero D2; y (c) dímero sFLT1 + D2.

Figura 12: Ensayo de unión de VEGF que muestra que el dímero retuvo al menos el 50% de actividad después de 56 días. El valor de CE50 para sFLT01 era equiparable a los obtenidos previamente, pero el dímero D2 muestra típicamente una CE50 2 veces mayor (8-10 pM).

La Figura 13 muestra la acumulación de productos de escisión de ~30kDa y ~10kDa y tres agregados de PM más alto en la preparación sFLT01, mientras que D2 mostró una pequeña cantidad de producto de escisión de ~10kDa y una cantidad modesta de una banda de agregado de PM más alto que discurre cerca de la movilidad esperada para dímero no reducido (Figura 13, panel izquierdo).

La Figura 14 muestra el efecto de la incubación sobre la actividad (1/CE50) con respecto al tiempo cero.

La Figura 15 muestra el ensayo de VEGF para (a) sFLT1 y (b) dímero D2. Después de sólo 14 días, hubo una diferencia significativa en la actividad entre el dímero D2 y sFLT01, habiendo perdido sFLT01 ~30% de actividad, mientras que el dímero D2 <10%. Después de 28 días, la velocidad de disminución se ralentizó tanto para sFLT01 como para D2, produciendo una actividad global similar para ambos después de 56 días. Después de 94 días, la actividad de D2 pareció aumentar, probablemente debido a la concentración de evaporación de la muestra.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La divulgación, que incluye la invención, se refiere a composiciones y métodos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con o provocado de otro modo por la interacción entre el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor (*p. ej.,* FLT-1). Específicamente, la divulgación, incluyendo la invención, se refiere a dominios de unión de VEGF oligomerizados para proporcionar antagonismo de VEGF, y de ese modo tratar enfermedades asociadas a los mismos.

En un caso, se proporciona en esta memoria un oligómero antagonista de VEGF que comprende una pluralidad de monómeros enlazados operativamente uno con otro, en donde cada uno de los monómeros comprende el segundo dominio de unión a VEGF (D2) de FLT-1.

En otro caso, se proporciona en esta memoria un método para producir un oligómero antagonista de VEGF, comprendiendo el método: cultivar una célula huésped; recuperar una pluralidad de monómeros de dicha célula huésped, en donde cada uno de los monómeros comprende el segundo dominio de unión a VEGF (D2) de FLT-1; y enlazar dicha pluralidad de monómeros.

Aún en otro caso, se proporciona en esta memoria una composición farmacéutica que comprende: una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligómero antagonista de VEGF, comprendiendo dicho oligómero: una pluralidad de monómeros enlazados operativamente uno con otro, en donde cada uno de los monómeros comprende el segundo dominio de unión a VEGF (D2) de FLT-1.

En un caso adicional, se proporciona en esta memoria un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado o de otro modo provocado por la interacción entre VEGF y su receptor en un sujeto, comprendiendo el método: administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligómero antagonista de VEGF, comprendiendo dicho oligómero una pluralidad de monómeros enlazados operativamente uno con otro, en donde cada uno de los monómeros comprende el segundo dominio de unión a VEGF (D2) de FLT-1.

VEGF es un impulsor clave de los trastornos patológicos de la angiogénesis y la permeabilidad vascular, y recientemente se ha visto implicado en la perpetuación de determinadas afecciones de dolor crónico. Inhibidores solubles basados en receptores, administrados como genes o proteínas, pueden ser eficaces para mejorar algunos

de los efectos patológicos de la sobre-expresión de VEGF crónica, pero las formas proteicas de estos receptores solubles sufren terapéuticamente a partir de semividas relativamente cortas. Preparaciones de liberación sostenida de estos inhibidores serían deseables para la intervención terapéutica a largo plazo en afecciones crónicas, pero el mantenimiento de la estabilidad de la proteína utilizando construcciones de fusión de receptor soluble/inmunoglobulina de tamaño completo es un desafío. Los autores de la invención de la presente solicitud encontraron, de forma sorprendente e inesperada, que una forma oligomerizada del segundo dominio de unión a VEGF (D2) de tirosina quinasa-1 similar a FMS (FLT-1) (*p. ej.,* una forma dimerizada de D2) es adecuada para proporcionar un antagonismo de VEGF sostenido para tratar el dolor crónico y trastornos de permeabilidad/angiogénesis vascular, al tiempo que ofrece estabilidad proteica en condiciones de liberación sostenida. El oligómero exhibe una mayor estabilidad y una semivida más larga en relación con FLT-1. Específicamente, el oligómero exhibe bioactividad equiparable a construcciones de receptor soluble sFlt de tamaño completo, y es estable en condiciones de estabilidad acelerada durante al menos 3 meses. Además, el oligómero potencia la afinidad de la unión de VEGF, y con ello antagoniza el efecto de unión a VEGF a FLT-1.

En un caso de la divulgación, que incluye una realización de la invención, el segundo dominio de unión a VEGF (D2) comprende la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 1. En otro caso, el segundo dominio de unión a VEGF (D2) comprende un homólogo, una variante o un fragmento funcional de SEQ ID NO: 1. En otro caso, el segundo dominio de unión a VEGF (D2) comprende una secuencia de aminoácidos que es aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 1. En otro caso, el segundo dominio de unión a VEGF (D2) comprende un fragmento de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. El fragmento puede comprender una o más regiones funcionales. Cada posibilidad representa un caso separado de la presente divulgación.

En un caso de la divulgación, que incluye en una realización de la invención, el segundo dominio de unión a VEGF (D2) es codificado por la secuencia de ácidos nucleicos recogida en SEQ ID NO: 2. En otro caso, el segundo dominio de unión a VEGF (D2) la secuencia de ácido nucleico comprende un homólogo, una variante o un fragmento funcional de SEQ ID NO: 2. En otro caso, el segundo dominio de unión a VEGF (D2) es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que es aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a SEQ ID NO: 2. En otro caso, el segundo dominio de unión a VEGF (D2) es codificado por un fragmento de una secuencia de ácidos nucleicos recogida en SEQ ID NO: 2. El fragmento puede comprender una o más regiones funcionales. Cada posibilidad representa un caso separado de la presente divulgación.

Los dominios utilizados pueden consistir en el segundo dominio de unión a VEGF (D2) completo de FLT-1 o pueden consistir en mutantes o fragmentos de los mismos que mantienen la capacidad de inhibir la actividad del complejo agonístico VEGF/FLT-1.

La FLT-1 es una proteína bien conocida. Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de FLT-1 son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, los números de identificación de GenBank AAC16449 y AF063657 contienen secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de FLT-1, respectivamente.

Un monómero de la divulgación puede incluir la secuencia del segundo dominio de unión a VEGF (D2), una secuencia señal, una secuencia de enlazador u otras secuencias relacionadas con la expresión y purificación de monómeros. En un ejemplo, un monómero de la divulgación puede incluir la secuencia del vector de expresión que se muestra en la Figura 2A.

Un oligómero de la divulgación puede incluir una pluralidad de monómeros. El oligómero puede incluir cualquier número de monómeros, dependiendo de la necesidad. En un caso, que incluye una realización, el oligómero es un dímero. En otro caso, que incluye otra realización, el oligómero es un trímero. Aún en otro caso, que incluye otra realización, el oligómero es un tetrámero. Otras formas de oligómeros también están abarcadas dentro del alcance de la divulgación.

Los monómeros en el oligómero pueden estar operativamente enlazados uno con otro a través de cualquier método de enlace conocido. Por ejemplo, dos o más monómeros pueden estar operativamente enlazados a través de un enlace covalente sencillo, un enlazador peptídico flexible, un puente disulfuro o un polímero tal como polietilenglicol (PEG). Enlazadores de péptidos pueden ser enteramente artificiales (p. ej., que comprenden de 2 a 20 residuos aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en glicina, serina, asparagina, treonina y alanina) o adoptados a partir de proteínas que se producen de forma natural. La formación del puente disulfuro se puede lograr, p. ej., mediante expresión recombinante, en donde la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el monómero contiene uno o más codones que codifican cisteína. El enlace a través de polietilenglicoles (PEG) se puede lograr por reacción de monómeros que tienen cisteínas libres con PEGs multifuncionales tales como PEGs bis-maleimida lineales. Alternativamente, el enlace se puede realizar a través de los glucanos en el monómero D2 después de su oxidación en forma de aldehído y utilizando PEGs multifuncionales que contienen grupos reactivos con aldehído.

En algunos casos, al menos uno de los monómeros está PEGilado o modificado químicamente a otra forma. La PEGilación de las moléculas se puede llevar a cabo, p. ej., de acuerdo con los métodos descritos en Youngster et al., Curr Pharm Des (2002), 8:2139; Grace et al., J Interferon Cytokine Res (2001), 21:1103; Pepinsky et al., J Pharmacol Exp Ther (2001), 297:1059; Pettit et al., J Biol Chem (1997), 272: 2312; Goodson et al. Biotechnology NY (1990), 8:343; Katre; J Immunol (1990), 144:209, Behrens et al documento US2006/0198819 A1, Klausen et al documento US2005/0113565 A1.

Cualquier tipo de polietilenglicol es adecuado para la presente divulgación, que incluye la presente invención, con la condición de que el oligómero PEG-polipéptido sea capaz todavía de antagonizar o neutralizar la interacción entre VEGF y FLT-1 que puede ensayarse de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

Preferiblemente, el polietilenglicol del dímero polipeptídico de la presente divulgación, que incluye la presente invención, es PEG 1000, 2000, 3000, 5000, 10000, 15000, 20000 o 40000, siendo particularmente preferido PEG 20000 o 40000.

En un ejemplo, el oligómero es un tetrámero que comprende cuatro dominios FLT-1 D2 en un PEG multi-brazos, tal como se muestra en la Figura 1, para obtener una alta afinidad de unión a VEGF, al tiempo que se proporcionan propiedades de PK potenciadas mediante el uso del PEG enlazado.

El oligómero de la presente divulgación, que incluye la presente invención, se produce preferiblemente de forma recombinante mediante el uso de un polinucleótido que codifica un monómero del oligómero y vectores, preferiblemente vectores de expresión que contienen dichos polinucleótidos. Para la producción de los oligómeros de la divulgación, que incluye la invención, los polinucleótidos se obtienen a partir de clones existentes, es decir, codifican preferiblemente el polipéptido que se produce de forma natural o una parte del mismo. Polipéptidos codificados por cualquier polinucleótido que se hibrida con el complemento del ADN o ARN nativo en condiciones altamente rigurosas o rigurosas moderadas (para las definiciones, véase Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.) siempre que ese polipéptido conserve la actividad biológica de la secuencia nativa, también son útiles para producir los oligómeros de la presente divulgación, que incluye la presente invención.

Los vectores recombinantes pueden construirse de acuerdo con métodos bien conocidos por la persona experta en la técnica; véase, p. ej., Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. Se puede utilizar una diversidad de sistemas de vector/huésped de expresión para contener y expresar secuencias que codifican los oligómeros de la presente divulgación, que incluyen los oligómeros de la presente invención.

Vectores a modo de ejemplo incluyen plásmidos, fagémidos, cósmidos, virus y ácidos nucleicos de fagos u otras moléculas de ácido nucleico que son capaces de replicarse en un huésped procariota o eucariota. Los vectores contienen típicamente un marcador para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de huéspedes transformados tal como conferir resistencia a antibióticos tales como ampicilina o neomicina.

El vector puede ser un vector de expresión, en donde el ácido nucleico que codifica el anticuerpo está operativamente enlazado a una secuencia de control de la expresión. Vectores de expresión típicos contienen terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de las moléculas de ácido nucleico de la divulgación, que incluye la invención. Los vectores también pueden contener casetes de expresión genética que contienen una secuencia de terminador independiente, secuencias que permiten la replicación del vector tanto en eucariotas como en procariotas, *es decir,* vectores lanzadera y marcadores de selección tanto para sistemas procariotas como eucariotas.

Promotores adecuados incluyen promotores constitutivos y promotores inducibles. Las secuencias de control de expresión/promotores representativos incluyen el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *tac*, el sistema *trc*, las regiones principales de operador y promotor del fago lambda, la región de control de la proteína de cubierta *fd* , los promotores glucolíticos de levadura, *p. ej.,* el promotor para 3-fosfoglicerato quinasa, los promotores de la fosfatasa ácida de levadura, *p. ej., Pho5,* los promotores de los factores de apareamiento alfa de la levadura, promotores derivados del citomegalovirus humano, promotor de metalotionina, promotor del virus del tumor mamario murino, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de polihedrina y promotores derivados del polioma, adenovirus, retrovirus y virus de simio, *p. ej.,* los promotores tempranos y tardíos de SV40.

La divulgación, que incluye la invención, también incluye huéspedes no humanos tales como células u organismos que contienen una molécula de ácido nucleico o un vector de la divulgación, que incluye la invención. Por "huésped" se entiende un organismo unicelular o multicelular no humano o una "célula huésped", que se refiere a una célula o población de células en la que se introduce una molécula de ácido nucleico o vector de la divulgación, que incluye la invención. "Una población de células huéspedes" se refiere a un grupo de células cultivadas en el que se puede

introducir y expresar una molécula o vector de ácido nucleico de la presente divulgación, que incluye la presente invención.

Un huésped de la presente divulgación, que incluye la presente invención, puede ser procariótico o eucariótico. Huéspedes procariotas adecuados incluyen, por ejemplo, *E. coli,* tales como *E. coli SG-936, E. coli HB* 101, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* X2282, *E. coli* DHI y *E. coli* MRC1, *Pseudomonas, Bacillus,* tales como *Bacillus subtilis* y *Streptomyces.* Células eucariotas adecuadas incluyen levaduras y otros hongos, células de insectos, células vegetales, células humanas y animales, que incluyen células de mamífero tales como líneas de hibridoma, células COS, células NSO y células CHO.

La divulgación también incluye métodos para producir un oligómero antagonista de VEGF, comprendiendo el método: cultivar una célula huésped; y recuperar una pluralidad de monómeros de dicha célula huésped, en donde cada uno de los monómeros comprende el segundo dominio de unión a VEGF (D2) de tirosina quinasa-1 similar a FMS (FLT-1).

Dependiendo del sistema de expresión y del huésped seleccionado, las moléculas monoméricas se producen cultivando células huéspedes transformadas por un vector de expresión descrito anteriormente, con lo cual se expresa la proteína. La proteína expresada se aisló después de las células huéspedes y se purificó. Si el sistema de expresión secreta la proteína en el medio de crecimiento, el producto puede purificarse directamente de los medios. Si no se secreta, se puede aislar de los lisados celulares. La selección de las condiciones de crecimiento apropiadas y los métodos de recuperación están dentro de los conocimientos de la técnica. Por ejemplo, una vez expresado, el producto puede aislarse y purificarse por cualquier número de técnicas, bien conocidas en la técnica. Una proteína (p. ej., monómero) de la presente divulgación, obtenida como se ha descrito anteriormente, puede aislarse del interior o exterior (p. ej., medio) de las células o huéspedes, y purificarse como una proteína homogénea sustancialmente pura. El método para el aislamiento y la purificación de proteínas no está limitado a método específico alguno. De hecho, se puede utilizar cualquier método estándar. Por ejemplo, cromatografía en columna, filtración, ultrafiltración, precipitación salina, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, electroforesis en punto isoeléctrico, diálisis y recristalización pueden seleccionarse y combinarse apropiadamente para aislar y purificar la proteína.

Para la cromatografía, por ejemplo, pueden utilizarse cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de adsorción y similares (comp. Daniel R. Marshak et al. (1996) Strategies for Protein Purification and Characterization: A laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Estas cromatografías pueden realizarse por cromatografía líquida tal como HPLC y FPLC. Por lo tanto, la presente divulgación, que incluye la presente invención, proporciona proteínas altamente purificadas producidas mediante los métodos anteriores.

La divulgación, que incluye la invención, también proporciona una composición farmacéutica que comprende el oligómero, ácido nucleico, vector o célula huésped de esta divulgación, que incluye la invención, y uno o más soportes farmacéuticamente aceptables. "Soportes farmacéuticamente aceptables" incluyen cualquier excipiente que no sea tóxico para la célula o mamífero que se exponga a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. La composición farmacéutica puede incluir uno o agentes terapéuticos adicionales.

Soportes farmacéuticamente aceptables incluyen disolventes, medios de dispersión, tampones, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes humectantes, conservantes, insecticidas, agentes quelantes, antioxidantes, agentes isotónicos y agentes que retrasan la absorción.

Soportes farmacéuticamente aceptables incluyen agua; solución salina; solución salina tamponada con fosfato; dextrosa; glicerol; alcoholes tales como etanol e isopropanol; fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; EDTA; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS; agentes isotónicos tales como azúcares, polialcoholes tales como manitol y sorbitol, y cloruro de sodio; así como sus combinaciones. Agentes antibacterianos y antifúngicos incluyen parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación, que incluyen la invención, pueden formularse de una diversidad de formas, que incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semi-sólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (*p. ej.,* soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. En algunos casos, que incluyen en algunas realizaciones, las composiciones están en forma de soluciones inyectables o infundibles. La composición está en una forma adecuada para la administración oral, intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, parenteral, transmucosal, transdérmica o tópica. La composición se puede formular como una composición de liberación inmediata, controlada, extendida o retardada.

Preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los soportes acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y medios tamponados. En la divulgación objeto, que incluye la invención objeto, vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan, tampón fosfato 0,01-0,1 M y preferiblemente 0,05 M de o solución salina al 0,8%. Otros vehículos parenterales comunes incluyen soluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijos. Vehículos intravenosos incluyen re-abastecedores de fluidos y nutrientes, re-abastecedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares.

Más particularmente, composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una facilidad de inyección. Debería ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y preferiblemente se conservará frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El soporte puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (*p. ej.,* glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Formulaciones adecuadas para uso en los métodos terapéuticos descritos en esta memoria se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., 16ª ed. (1980).

En algunos casos, que incluyen en algunas realizaciones, la composición incluye agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede realizarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando la molécula, sola o en combinación con otros agentes activos, en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en esta memoria, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, un método de preparación es el secado en vacío y la liofilización, que proporciona un polvo de un ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada filtrada del mismo. Los preparativos para las inyecciones son procesados, introducidos en recipientes tales como ampollas, bolsas, frascos, jeringas o viales, y son sellados en condiciones asépticas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones pueden envasarse y venderse en forma de un kit tal como los descritos en la Publicación de Solicitud de EE.UU. Nº 2002/0102208 A1. Dichos artículos de fabricación tendrán preferiblemente etiquetas o prospectos que indiquen que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece o está predispuesto a trastornos autoinmunes o neoplásicos.

Dosis efectivas de las composiciones de la presente divulgación, que incluyen la presente invención, para el tratamiento de afecciones o enfermedades tal como se describe en esta memoria varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano o un animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano, pero también pueden ser tratados mamíferos no humanos que incluyen mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento se pueden valorar utilizando métodos rutinarios conocidos por los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y la eficacia.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva". Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula puede variar de acuerdo con factores tales como el estado patológico, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de la molécula de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos contrarrestan cualquier efecto tóxico o perjudicial de la molécula.

La divulgación proporciona, además, métodos para tratar una enfermedad o afección, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligómero antagonista de VEGF.

En un caso, se proporciona en esta memoria un método para tratar una enfermedad o trastorno provocado por, o asociado de otro modo, con la unión de VEGF a su receptor (*p. ej.*, FLT-1) en un sujeto, comprendiendo el método:

administrar a dicho sujeto cantidad terapéuticamente efectiva de un oligómero antagonista de VEGF, comprendiendo dicho oligómero una pluralidad de monómeros enlazados operativamente entre sí, en donde cada uno de los monómeros comprende el segundo dominio de unión a VEGF (D2) de FLT-1.

Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren al tratamiento terapéutico, que incluye medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio fisiológico indeseado asociado con una enfermedad o afección. Resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a alivio de los síntomas, disminución del grado de una enfermedad o afección, estabilización de una enfermedad o afección (*es decir,* en los casos en los que la enfermedad o afección no empeora), retraso o ralentización de la progresión de una enfermedad o afección, mejoría o paliación de la enfermedad o afección, y remisión (parcial o total) de la enfermedad o afección, ya sea detectable o indetectable. El "tratamiento" también puede significar la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la enfermedad o afección, así como aquellos que son propensos a tener la enfermedad o afección o aquellos en los que se debe prevenir la enfermedad o afección.

Ejemplos de enfermedades o trastornos provocados por, o asociados de otra forma con la unión de VEGF a su receptor, incluyen, pero no se limitan a un dolor crónico, una angiogénesis patológica, un cáncer, una angiogénesis miocárdica y un trastorno de permeabilidad vascular.

El oligómero antagonista de VEGF puede administrarse solo, o en combinación con uno o más agentes o tratamientos terapéuticamente eficaces. El otro agente terapéuticamente eficaz se puede conjugar al oligómero antagonista de VEGF, incorporar en la misma composición que el oligómero antagonista de VEGF, o se puede administrar como una composición separada. El otro agente o tratamiento terapéutico se puede administrar antes, durante y/o después de la administración del oligómero antagonista de VEGF.

La administración del oligómero antagonista de VEGF con otros agentes y/o tratamientos puede producirse simultáneamente, o por separado, por la misma o diferente vía, en el mismo o diferente momento. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (*p. ej.,* una respuesta terapéutica o profiláctica).

En un ejemplo, se puede administrar un solo bolo. En otro ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo. Aún en otro ejemplo, una dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. La forma de unidad de dosificación, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para tratar sujetos mamíferos. Cada una de las unidades puede contener una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir un efecto terapéutico deseado. En algunos casos, incluyendo algunas realizaciones, las formas de dosificación unitaria de la divulgación, que incluyen la invención, están dictaminadas y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico o profiláctico particular que se desea alcanzar.

La composición de la divulgación, que incluye la invención, puede administrarse solo una vez o puede administrarse múltiples veces. Para dosificaciones múltiples, la composición puede administrarse, por ejemplo, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, dos veces a la semana, semanalmente, una vez cada dos semanas o mensualmente.

Debe tenerse en cuenta que los valores de dosificación pueden variar según el tipo y la gravedad de la afección que se haya de aliviar. Debe entenderse, además, que para cualquier sujeto particular, regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación establecidos en esta memoria son solo a modo de ejemplo y no están destinados a limitar el alcance o la práctica de la composición.

"Administración" a un sujeto no se limita a sistema de administración particular alguno y puede incluir, sin limitación, parenteral (que incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramedular, intraarticular, intramuscular o intraperitoneal), rectal, tópica, transdérmica u oral (por ejemplo, en cápsulas, suspensiones o comprimidos). La administración a un huésped puede tener lugar en una única dosis o en administraciones repetidas, y en cualquiera de una diversidad de formas de sal fisiológicamente aceptables, y/o con un soporte y/o aditivo farmacéutico aceptable como parte de una composición farmacéutica (descrita anteriormente). Una vez más, formas de sal fisiológicamente aceptables y técnicas estándares de formulación farmacéutica son bien conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.).

La composición de la divulgación (p. ej., oligómero antagonista de VEGF), que incluye una composición de la invención, se puede administrar por vía parenteral (p. ej., intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). Además, la composición de la divulgación, que incluye la invención, puede administrarse por infusión o inyección

intravenosa. La composición de la divulgación, que incluye la invención, puede administrarse por inyección intramuscular o subcutánea. En algunos casos, que incluyen algunas realizaciones, la composición de la divulgación, que incluye la invención, puede administrarse por vía oral. Tal como se utiliza en esta memoria, una "composición" se refiere a cualquier composición que contiene una cantidad farmacéuticamente eficaz de un oligómero antagonista de VEGF.

Los métodos de tratamiento descritos en esta memoria pueden utilizarse para tratar a cualquier mamífero adecuado, incluyendo primates, tales como monos y seres humanos, caballos, vacas, gatos, perros, conejos y roedores tales como ratas y ratones. En un caso, o una realización, el mamífero a tratar es ser humano.

Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención. Sin embargo, no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del amplio alcance de la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

FORMA OLIGOMERIZADA DEL DOMINIO DE UNIÓN A VEGF DE FLT-1

Para superar problemas de estabilidad, la divulgación, que incluye la invención, es una forma oligomerizada, que incluye una forma dimerizada de D2, el dominio de unión a VEGF de tirosina quinasa-1 similar a fms (Flt-1) para proporcionar antagonismo de VEGF para tratar el dolor crónico y trastornos de permeabilidad/angiogénesis vascular. Esta construcción supera los problemas de estabilidad de proteínas inherentes a los procedimientos de formulación de liberación sostenida y permite un uso eficaz como un agente terapéutico estable y eficaz para los trastornos crónicos, cuyas manifestaciones fisiopatológicas son impulsadas principalmente por VEGF.

Se desea una mayor potencia, una PK más prolongada o una mejor orientación/biodistribución para la diferenciación del producto en el campo del antagonista de VEGF saturado. Un enfoque potencialmente útil sería oligomerizar el dominio VEGFR D2 en un PEG multi-brazos para obtener una unión a VEGF de alta afinidad, al tiempo que proporciona propiedades de PK mejoradas mediante el uso del PEG enlazado. El PM del dominio D2 es solo 12.3 kDa. El concepto se ilustra en la Figura 1.

Los nucleótidos con la secuencia de Kozak y la secuencia del péptido señal se sintetizaron y se introdujeron por clonación Gateway en el vector pCEP4(-E+1)DEST y se transfectaron en células HEK293-EBNA para la expresión. La proteína se purificó sobre una columna de afinidad HPC4 Ab y se caracterizó por SDS-PAGE, unión a VEGF de Biacore y por PEGilación.

Mediante análisis Western, tal como se muestra en la Figura 3, el producto parecía ser predominantemente una sola banda (Figura 3c). Ocasionalmente, apareció una banda de PM más alto tras la manipulación de la muestra, posiblemente debida a la oxidación (Figura 3a). La proteína D2-Cys se unía a VEGF inmovilizado sobre una superficie Biacore (Figura 3b, 5 µg/ml de proteína en HBS-EP). La afinidad es menor que sFLT01 (D2-9Gly-Fc), debido principalmente a una velocidad de desaceleración más lenta que la esperada por la falta de afinidad en la forma monomérica. Para someter a ensayo la presencia de una cisteína reactiva, la muestra D2-Cys se trató brevemente con perlas de TCEP y luego se hizo reaccionar con PEG de maleimida (PEG 100 µM, 2 horas a temperatura ambiente). La transferencia Western utilizando HPC4 Ab mostró, además de D2 que no había reaccionado, la presencia de un solo producto de PM mayor, lo que indica que la proteína se puede monoPEGilar con diversos tamaños de PEGs, presumiblemente a través de la Cys libre en su extremo C. Para determinar si el dominio D2 podría formar estructuras oligoméricas en un PEG de maleimida de 20 kDa de 4 brazos, se trataron 23 ug de la construcción D2-Cys purificado en tampón de elución de columna HPC4 con TCEP inmovilizado, se dejó oxidar al aire durante 30' y luego se hizo reaccionar a razón de 0,33 mol de PEG por cada mol de D2 durante la noche a 25°C. La SDS PAGE mostró la presencia de un producto de ~ 60kDa (PM aparente) que migraba cerca del producto obtenido con un PEG lineal de 20 kDa, así como bandas débiles que tenían movilidades consistentes con D2 múltiple en cada PEG de 4 brazos (Figura 4a). En un segundo experimento, la reducción inicial y el acoplamiento se realizaron en una muestra primero concentrada por ultrafiltración de Amicon. Esto mostró el consumo de casi todos los D2-cys con cantidades aproximadamente equimolares de productos que migran a ~ 60 kDa y ~80 kDa, presumiblemente D2-PEG y $(D2)_2$-PEG (panel central inferior - se muestran las asignaciones provisionales de cada especie). El análisis Biacore se realizó a continuación en los productos de reacción en bruto. El sensograma normalizado para un chip de VEGF inmovilizado de bajo nivel se muestra en la Figura 4b. Estos datos muestran la presencia de un componente de mayor afinidad en los productos de reacción de PEGilación en comparación con D2.

EJEMPLO 2

DIMERIZACIÓN DEL DOMINIO DE UNIÓN A VEGF DE FLT-1

Se analizó un panel de reactivos para determinar la capacidad de dimerizar D2 obtenido de la expresión transitoria. En síntesis, la proteína (en PBS) se trató con TCEP 2 mM, se cambió el tampón por PBS y se hicieron reaccionar 0,5 eq de reactivos de disulfuro de piridilo o $CuCl_2$ 5mM (Figura 6a) durante 1 hora a 25°C. La SDS PAGE de los productos se muestra más adelante (Figura 6b). La TCEP redujo de manera efectiva el disulfuro de dímero, proporcionando D2 monomérico que se procesó como un doblete a ~ 20 kDa. El producto reducido se desaló y se hizo reaccionar con un panel de reactivos de dimerización potenciales (Figura 6). Ninguno de los reactivos de disulfuro de piridilo era eficaz en la regeneración del dímero, pero $CuCl_2$ produjo oxidación cuantitativa a dímero después de 1 h. Un experimento de titulación con cantidades decrecientes de cobre en Tris 20 mM pH 7,4 mostró que 100 uM de $CuCl_2$ eran suficientes.

Dimer se preparó utilizando 100 uM de $CuCl_2$ y los productos se ensayaron en cuanto a la actividad de unión a VEGF mediante ELISA de VEGF competitivo. Los resultados del ELISA se muestran en la Figura 7. El monómero D2 reducido en TCEP mostró una CE50 ~ 35 veces mayor que sFLT01, mientras que el dímero oxidado con Cu mostró una CE50 2,2 veces mayor que sFLT01. Este valor era similar al obtenido para los dímeros obtenidos sin oxidación de cobre (Figura 5). Esta molécula carece de la región bisagra y el dominio Fc de sFLT01 y representa una entidad mínima de unión a VEGF de alta afinidad. Su bajo PM puede proporcionar ventajas en la administración localizada, que incluye una mayor difusión a través del tejido, una eliminación sistémica más rápida, reduciendo así los posibles efectos secundarios del antagonismo de VEGF, y una mayor estabilidad tras la formulación en depósitos de liberación lenta.

También se encontró que el dominio D2 con la etiqueta HPC4 y cisteína C-terminal forman espontáneamente dímeros enlazados a disulfuro después de una reducción parcial. Estos dímeros, purificados por SEC a partir de reacciones de PEGilación o medio acondicionado (Figuras 5a y b), se unían a VEGF165 con una afinidad similar o mayor a VEGF que sFLT01 por Biacore (Figura 5c y d).

Se prepararon dímeros en los que dos dominios D2 de sFLT se acoplaron mediante enlazadores de PEG por reacción del monómero parcialmente reducido con PEGs homo-bifuncionales. Los productos fueron aislados por SEC (Figura 5) y se analizó la afinidad de unión a VEGF utilizando un ELISA competitivo (Figura 9). Se determinó la unión a VEGF165 de tres construcciones de dominio D2 purificados por SEC que incluyen dímeros preparados con enlazadores de 0,6, 2 y 5 kDa y también los conjugados de PEG de 4 brazos de 10 y 20 kDa tal como se describe en el Ejemplo 1. El ensayo se realizó uniéndose a VEGF recombinante 10 pM (R&D Systems) en solución salina tamponada con fosfato. Las concentraciones de muestra oscilaron entre 0.0763 y 156 pM. Después de la unión, la concentración de VEGF libre se determinó mediante un ELISA específico para VEGF (R&D Systems). Tal como se muestra en la Figura 9, dímeros de D2 enlazados a PEG, enlazados por enlazadores de 0,6, 2 o 5 kDa y purificados por SEC ("D2 BM(PEG)3 PkB", "D2 2k Pk A", "D2 5k Pk A", respectivamente) mostraron una afinidad de unión a VEGF165 equiparable a sFLT01, mientras que dímeros enlazados a disulfuro ("D2 eluato HPC4 Pk B", "D2 Pk B") mostraron una unión ligeramente más débil. Tetrámeros de D2 de cuatro brazos enlazados con PEGs de 4 brazos de 10 kDa o 20 kDa ("D2 10K Pk A", "D2 20K Pk A") mostraron también una unión equivalente a sFLT01. Monómero D2 purificado directamente a partir del medio ("D2 eluato HPC4 Pk C") no tenía una unión detectable a VEGF165. Las SDS PAGE demostraron que la proteína en esta muestra estaba intacta. Monómeros D2 reducidos aislados de reacciones de PEGilación ("D2 Pk C 4/13", "D2 Pk C 4/24", "D2 5K Pk C") o D2 (mezcla de monómero y dímero) que había sido recientemente tratada con TCEP y desalada ("D2 Pk C TCEP trt") mostró <3% de la afinidad de unión de sFLT01. Estos resultados eran equiparables a los datos de Biacore (Figura 5), excepto por los conjugados de PEG de 4 brazos, que mostraron una afinidad mayor que sFLT01 mediante Biacore que mediante ELISA de VEGF. Biacore también mostró una unión débil del monómero D2 del medio acondicionado (Kd ~10 nM) a concentraciones más altas que las ensayadas con el ELISA de VEGF.

EJEMPLO 3

ESTABILIDAD DEL DÍMERO

Se realizó un estudio de estabilidad para evaluar la susceptibilidad del dímero a la fragmentación a 45°C como sustituto del estrés de la formulación, ya que el patrón de fragmentación del PM visto después de incubaciones prolongadas a temperatura elevada no se puede distinguir del obtenido después de la formulación y posterior liberación de una diversidad de matrices. El dímero (0,25 mg/ml) se incubó en PBS con cóctel de inhibidores de proteasa 1X HALT con EDTA (Pierce) a 45°C y se tomaron partes alícuotas y se congelaron de forma instantánea a -80°C. sFLT01 sin modificar a la misma concentración se utilizó como control. Se muestra una SDS PAGE reductora teñida con plata (Bis-Tris al 4-12%/MES) de 50 ng de proteína (con intensificación in silico) en la Figura 8a. El control sFLT01 mostró cantidades crecientes de un producto de ~35 kDa, así como un agregado de alto PM de ~ 115 kDa. Por el contrario, el dímero D2 mostró solo la acumulación de un producto difuso de PM de ~40kDa de tinción muy débil, que era más claramente visible cuando el producto de incubación de 19 días (200 ng) se volvió a aplicar en un gel reductor de Bis-Tris al 12% (Figura 8b). El tratamiento con PNGasa F (pistas 5,6) mostró una banda principal que migraba al PM esperado del polipéptido D2 desglicosilado (12,3 kDa) y la presencia de un producto con mayor PM (~25 kDa) consistente con la banda difusa observada sin tratamiento con PNGasa F. Se esperaría que la escisión de

D2 en el mismo sitio que en sFLT01 condujera a un péptido de 21 aa de 2,5 kDa. Se detectó un péptido de PM similar (MOG35-55, 2,6 kDa, pistas 8,9) a 4 ng, equivalente a la cantidad de fragmento de péptido esperada a partir del 10% de escisión de D2. No se observó un péptido similar en la mezcla de incubación. Estos resultados muestran que el dímero D2 es más estable que sFLT01 al estrés de formulación.

Los dímeros de D2 preparados por oxidación de cobre se mostraron estables durante 19 días a 45°C utilizando SDS PAGE reductor teñido con plata. Aunque los patrones eran muy similares a lo largo del tiempo, como se observó previamente, el monómero D2 se procesó como una banda ancha de ~24 kDa, sustancialmente por encima del polipéptido con un PM de 12,3 kDa, probablemente debido a la glicosilación heterogénea. El PM de D2-Cys por MALDI resultó ser de 16.6 kDa. La amplitud de la banda puede haber oscurecido una pequeña disminución en el PM por fragmentación y el gel puede haber tenido una sensibilidad limitada para detectar los fragmentos peptídicos de bajo PM esperados de la escisión en el mismo sitio que se produce en sFLT01. PNGasa F se utilizó para desglicosilar las muestras antes de la electroforesis en gel. Muestras del mismo estudio de estabilidad extendido a 36 días se analizaron mediante SDS PAGE después del tratamiento con PNGasa F en presencia de agente reductor. Un gel de SDS PAGE teñido con plata se muestra en la Figura 10. D2 migró como un doblete aproximadamente al PM esperado (12 kDa) que no cambió durante el curso de la incubación. Sólo se observaron cantidades de material débilmente detectables a un PM ligeramente menor que el doblete D2, así como una pequeña cantidad de agregado que migraba al PM esperado para un dímero no reducido. No se observaron péptidos del PM esperado para la escisión en el sitio principal de sFLT01 (2.5 kDa). (PNGasa F apareció como una sola banda a ~37kDa).

Para determinar si las diferencias sutiles en las condiciones de reacción para el dímero sFLT01 o D2 en el estudio de estabilidad en la Figura 10, se realizó un segundo estudio. Se incubaron proteínas (0,25 mg/ml) por separado o como una mezcla conjunta en PBS + inhibidores de proteasa tal como se describió anteriormente, se extrajeron partes alícuotas y se congelaron a -80ºC. Después de 28 días, las muestras se descongelaron y se desglucosilaron exhaustivamente con PNGasa F y se analizaron mediante SDS PAGE reductora, seguido de tinción con plata (Figura 11). Esto mostró la producción del producto de degradación esperado de sFLT01 (izquierda) y la acumulación de una pequeña cantidad de agregado con el dímero D2 (centro). Cuando se incubaron juntos, el dímero D2 nuevamente mostró poca o ninguna fragmentación. Sin embargo, el producto de fragmentación sFLT01 (que migró por debajo de la PNGasa F) era claramente visible después de 7 días y aumentó en abundancia con una incubación más prolongada.

La actividad del dímero D2 después de una incubación prolongada se determinó mediante ELISA de VEGF. Se ensayó una preparación reciente de dímero frente a dímero incubado a 45°C durante 56 días. Los resultados (Figura 12) demuestran que el dímero retuvo al menos el 50% de actividad después de 56 días. Se inició un estudio de estabilidad a temperatura elevada (45°C) para evaluar si el dímero D2 continuaría mostrando una mayor resistencia a la fragmentación que sFLT01, tal como se concluyó en los estudios iniciales. La fragmentación de sFLT01 a temperatura elevada se ha utilizado como un sustituto del estrés de la formulación en partículas de liberación lenta, ya que los patrones de fragmentación son casi idénticos. Las reacciones se establecieron con 0,25 mg/ml de proteína en PBS con inhibidores de proteasa 1X (Pierce) y se tomaron muestras a intervalos y se congelaron instantáneamente a -80ºC. Después de 94 días, las muestras se descongelaron y una parte alícuota (0,5 µg) se trató con 20 ng de PNGasa F durante la noche en presencia de βME y los productos (0,2 µg) se procesaron en Tricina-SDS PAGE al 16% y se tiñeron con plata. Esto mostró una acumulación de productos de escisión de ~30kDa y ~10kDa y tres agregados de PM mayor en la preparación de sFLT01, mientras que D2 mostró una pequeña cantidad de producto de escisión de ~10kDa y una cantidad modesta de un agregado de mayor PM, discurriendo la banda cercana a la movilidad esperada para el dímero no reducido (Figura 13). La actividad de los productos se evaluó mediante ELISA de VEGF competitivo (gráficos en la Figura 15). La actividad inicial de sFLT01 en la mezcla de reacción era ~2 veces menor que la esperada, en base al control de sFLT01. El efecto de la incubación sobre la actividad (1/CE50) con relación al tiempo cero se representa en la Figura 14. Después de 14 días, hubo una diferencia significativa en la actividad entre el dímero D2 y sFLT01, habiendo perdido sFLT01 ~ 30% de actividad, mientras que el dímero D2 <10%. Después de 28 días, la tasa de disminución disminuyó tanto para sFLT01 como para D2, produciendo una actividad global similar para ambos después de 56 días. Después de 94 días, la actividad de D2 pareció aumentar, probablemente debido a la concentración de evaporación de la muestra. No obstante, los datos de hasta 56 días indican que el dímero D2 tiene una estabilidad térmica mayor que sFLT01 y, por lo tanto, es probable que muestre una mayor resistencia al estrés de la formulación en depósitos de liberación lenta.

EJEMPLO 4

ANTAGONISTA DE VEGF OLIGOMERIZADO PARA EL TRATAMIENTO DE LA OSTEOARTRITIS

Se pueden administrar a modelos animales con osteoartritis diversas dosis de la composición de oligómero antagonista de VEGF de la divulgación, que incluye la invención, en diversos intervalos de tiempo. Los modelos animales con osteoartritis son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, estos modelos animales se describen en Stevenson *et al.*, 2006, *In Vivo* Models of Inflammation, 2ª *Ed.,* Vol. I, páginas 65-82, *Publicación de Birkhauser*

Basel. Los métodos de administración también son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, métodos de administración en ratones y ratas se describen en el documento WO 2006/031689 y Matsumoto *et al.*, 2009, *Arthritis & Rheumatism*, vol. 60, páginas 1390-1405.

El VEGF puede contribuir al dolor de la osteoartritis y a los cambios estructurales del cartílago y el hueso: 1) potenciando la inflamación sinovial, derrame y angiogénesis, 2) fomentando la invasión de los vasos sanguíneos al cartílago, 3) contribuyendo al edema de la médula ósea, 4) fomentando el reinicio local de la formación de hueso endocondral, lo que resulta en duplicación de la línea de flujo, esclerosis ósea, hipertrofia de condrocitos y adelgazamiento del cartílago. Por lo tanto, el bloqueo de la señalización de VEGF es beneficioso para aliviar el dolor de la osteoartritis y/o para proteger la estructura de la articulación.

En modelos animales, el bloqueo de VEGF mediante la administración de la composición de oligómero antagonista de VEGF de la divulgación, que incluye la invención, puede dar como resultado una disminución de la inflamación sinovial y de la hiperplasia, dos factores correlacionados con el dolor de la osteoartritis en seres humanos. Los rasgos asociados con el dolor de la osteoartritis y los cambios estructurales de los cartílagos y los huesos se pueden medir en animales tratados así como en animales control. También se pueden medir semividas de la composición de oligómero antagonista de VEGF de la divulgación, que incluye la invención.

Los expertos en la técnica apreciarán que podrían realizarse cambios en las realizaciones arriba descritas sin apartarse del amplio concepto inventivo de las mismas. Se entiende, por lo tanto, que esta invención no está limitada a las realizaciones particulares divulgadas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genzyme Corporation

<120> COMPOSICIONES DE ANTAGONISTAS DE VEGF Y SUS USOS

<130> P-74193-PC

<140> PC 11/999.999
<141> 05-08-2011

<150> 61/371.546
<151> 06-08-2010

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 94
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met
1               5                   10                  15

Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn
            20                  25                  30

Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp
        35                  40                  45

Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn
    50                  55                  60

Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn
65                  70                  75                  80

Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr
                85                  90
```

<210> 2
<211> 282
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
agacctttcg tagagatgta cagtgaaatc cccgaaatta tacacatgac tgaaggaagg      60

gagctcgtca ttccctgccg ggttacgtca cctaacatca ctgttacttt aaaaaagttt     120

ccacttgaca ctttgatccc tgatggaaaa cgcataatct gggacagtag aaagggcttc     180

atcatatcaa atgcaacgta caaagaaata gggcttctga cctgtgaagc aacagtcaat     240

gggcatttgt ataagacaaa ctatctcaca catcgacaaa cc                        282
```

<210> 3
<211> 131
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

```
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 Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser
            20                  25                  30

Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile
        35                  40                  45

Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe
    50                  55                  60

Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser
65                  70                  75                  80

Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu
                85                  90                  95

Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr
            100                 105                 110

Leu Thr His Arg Gln Thr Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp
        115                 120                 125

Gly Lys Cys
    130
```

<210> 4
<211> 402
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 4

```
gccaccatgg tcagctactg ggacaccggg gtcctgctgt gcgcgctgct cagctgtctg      60

cttctcacag gatctggtag acctttcgta gagatgtaca gtgaaatccc cgaaattata     120

cacatgactg aaggaaggga gctcgtcatt ccctgccggg ttacgtcacc taacatcact     180

gttactttaa aaaagtttcc acttgacact ttgatccctg atggaaaacg cataatctgg     240

gacagtagaa agggcttcat catatcaaat gcaacgtaca aagaaatagg gcttctgacc     300

tgtgaagcaa cagtcaatgg gcatttgtat aagacaaact atctcacaca tcgacaaacc     360

gaagatcaag tggatccacg cctcatcgat ggcaaatgct ga                        402
```

REIVINDICACIONES

1. Un oligómero antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que comprende: una pluralidad de monómeros enlazados operativamente uno con otro, en donde cada uno de los monómeros comprende el segundo dominio de unión a VEGF (D2) de tirosina quinasa-1 similar a FMS (FLT-1), y en donde la pluralidad de monómeros están enlazados uno con otro a través de un polietilenglicol (PEG).

2. El oligómero de la reivindicación 1, en donde la oligomerización potencia la afinidad para la unión de VEGF con relación a FLT-1.

3. El oligómero de la reivindicación 1, en donde el oligómero antagoniza la unión de VEGF a FLT-1.

4. El oligómero de la reivindicación 1, en donde la pluralidad de monómeros están enlazados unos con otros a través de un PEG multi-brazos.

5. El oligómero de la reivindicación 4, en donde la pluralidad de monómeros tiene cisteínas libres y están enlazados unos con otros a través de PEGs bis-maleimida.

6. El oligómero de la reivindicación 1, en donde al menos uno de la pluralidad de monómeros está PEGilado.

7. El oligómero de la reivindicación 1, en donde el oligómero es un dímero, un trímero o un tetrámero.

8. El oligómero de la reivindicación 1, en donde el segundo dominio de unión a VGEF (D2) comprende una cisteína C-terminal.

9. El oligómero de la reivindicación 1, en donde cada uno de los monómeros comprende la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 1.

10. El oligómero de la reivindicación 9, en donde dicha secuencia de aminoácidos es codificada por la secuencia de ácidos nucleicos recogida en SEQ ID NO: 2.

11. Un método para producir el oligómero de la reivindicación 1, que comprende:
cultivar una célula huésped, recuperar uno o más monómeros de dicha célula huésped y enlazar dichos monómeros.

12. El método de la reivindicación 11, que comprende, además, la etapa de la reducción parcial y la oxidación con cobre de dichos monómeros.

13. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del oligómero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, para uso en terapia.

15. El oligómero antagonista del VEGF de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para uso en tratar una enfermedad o trastorno asociado con la unión de VEGF a su receptor.

16. El oligómero antagonista del VEGF para uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dicha enfermedad o trastorno se selecciona de un dolor crónico, una angiogénesis patológica, un cáncer, una angiogénesis miocárdica o un trastorno de permeabilidad vascular, o en donde dicho oligómero es para uso para aliviar el dolor de la osteoartritis y/o para proteger la estructura de las articulaciones.

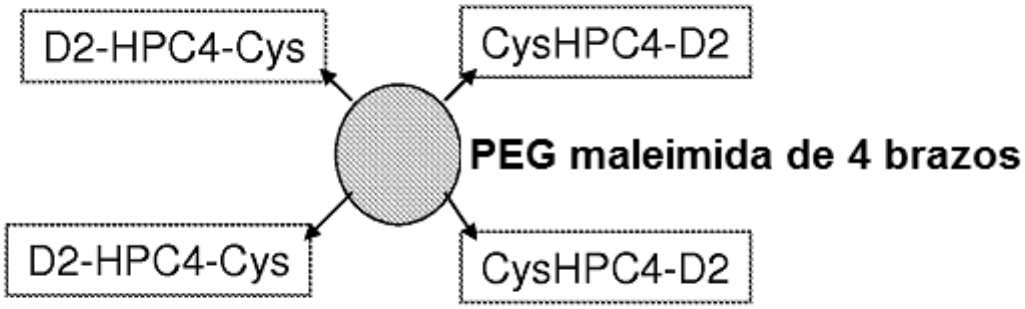
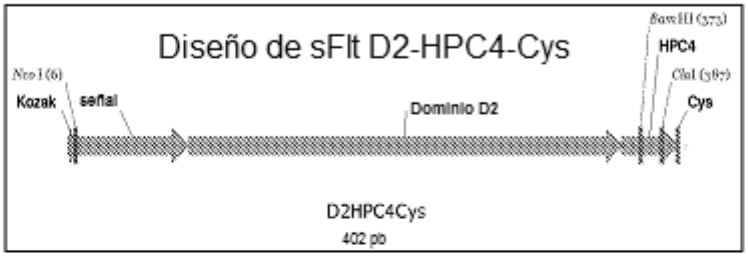

D2-HPC4-Cys
CysHPC4-D2
PEG maleimida de 4 brazos
D2-HPC4-Cys
CysHPC4-D2

FIGURA 1

A



B

gccacc*atggtcagctactgggacaccggggtcctg*
ctgtgcgcgctgctcagctgtctgcttctcacaggatct
*ggt*agacctttcgtagagatgtacagtgaaatcccg
aaattatacacatgactgaaggaagggagctcgtca
ttccctgccgggttacgtcacctaacatcactgttacttt
aaaaaagtttccacttgacactttgatccctgatggaa
aacgcataatctgggacagtagaaagggcttcatca
tatcaaatgcaacgtacaaagaaatagggcttctga
cctgtgaagcaacagtcaatgggcatttgtataagac
aaactatctcacacatcgacaaacc*gaagatcaagt*
ggatccacgcctcatcgatggcaaatgctga

402 pares de bases

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTG
*SG*RPFVEMYSEIPEIIHMTEGRE
LVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTL
IPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKE
IGLLTCEATVNGHLYKTNYLTH
RQTEDQVDPRLIDGKC*

108 aminoácidos (maduros)

FIGURA 2

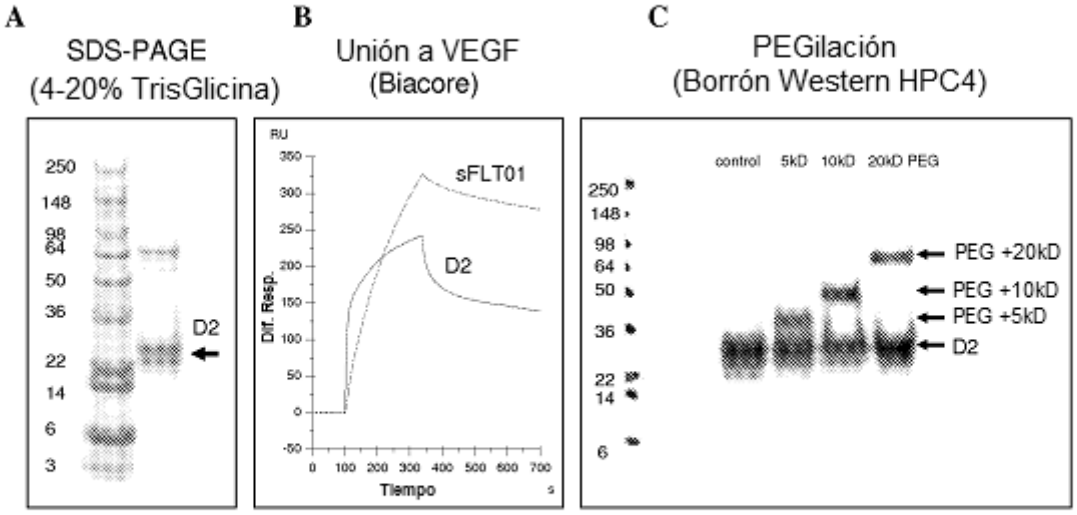

A
SDS-PAGE
(4-20% TrisGlicina)
250
148
98
64
50
36
22
14
6
3
D2
B
Unión a VEGF
(Biacore)
RU
Dif. Resp.
sFLT01
D2
Tiempo
s
C
PEGilación
(Borrón Western HPC4)
control
5kD
10kD
20kD PEG
PEG +20kD
PEG +10kD
PEG +5kD
D2

FIGURA 3

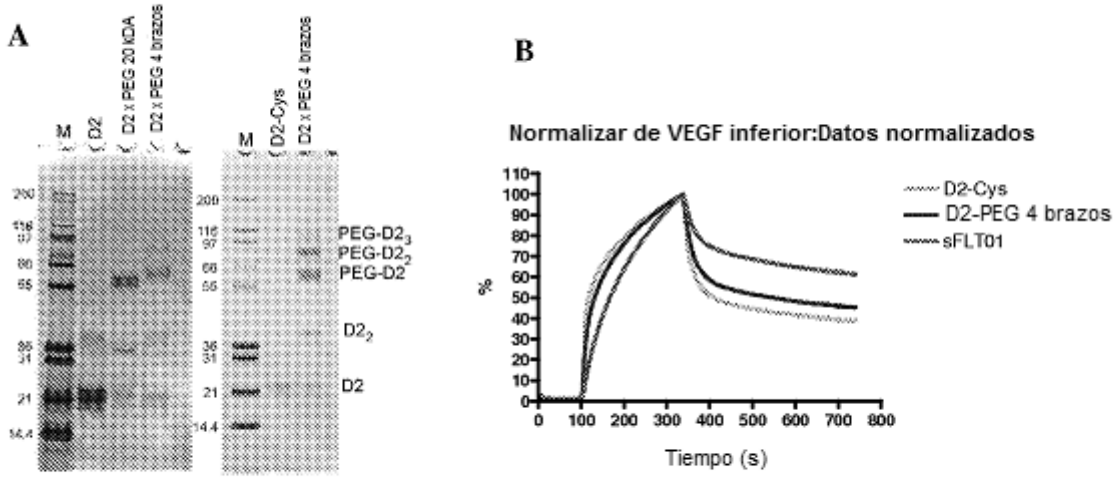
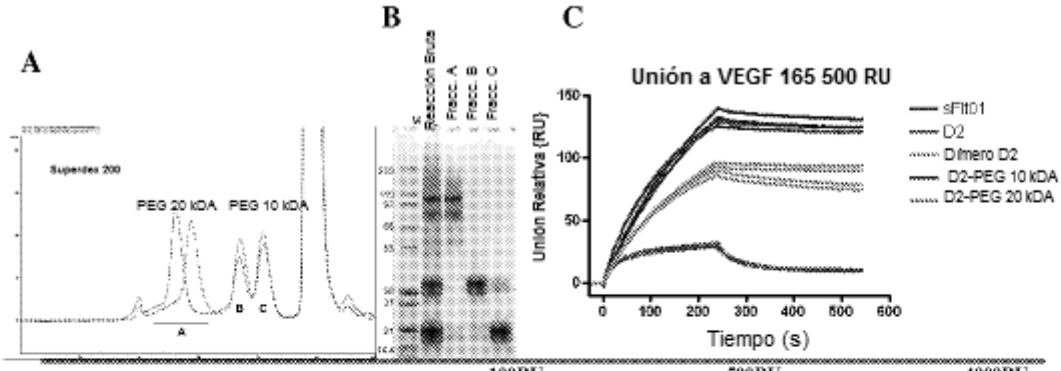

A
M
D2
D2 x PEG 20 kDA
D2 x PEG 4 brazos
M
D2-Cys
D2 x PEG 4 brazos
200
116
97
66
55
36
31
21
14.4
PEG-D2$_3$
PEG-D2$_2$
PEG-D2
D2$_2$
D2
B
Normalizar de VEGF inferior:Datos normalizados
D2-Cys
D2-PEG 4 brazos
sFLT01
%
Tiempo (s)

FIGURA 4



D

Muestra	k_a ($x10^5$ /Ms)	k_d ($x10^{-4}$ /s)	100RU VEGF K_D (nM)	k_a ($x10^5$ /Ms)	k_d ($x10^{-4}$ /s)	500RU VEGF K_D (nM)	k_a ($x10^5$ /Ms)	k_d ($x10^{-4}$ /s)	4000RU VEGF K_D (nM)
sFlt01	3.2	7.9	**2.50**	3.7	2.2	**0.61**	1.4	1.1	**0.80**
D2 fracción C (4/13)	16.6	159.0	**9.61**	8.0	92.0	**11.49**	1.0	29.1	**28.88**
dímero D2 fracción B (4/13)	7.1	12.1	**1.69**	6.9	3.7	**0.53**	0.1	1.1	**11.4**
D2-PEG 10 kDA fracción A (4/13)	8.1	6.8	**0.84**	7.9	1.1	**0.14**	2.0	0.7	**0.35**
D2-PEG 20 kDA fracción A (4/3)	6.9	10.3	**1.50**	6.3	0.7	**0.10**	2.7	0.5	**0.17**

FIGURA 5

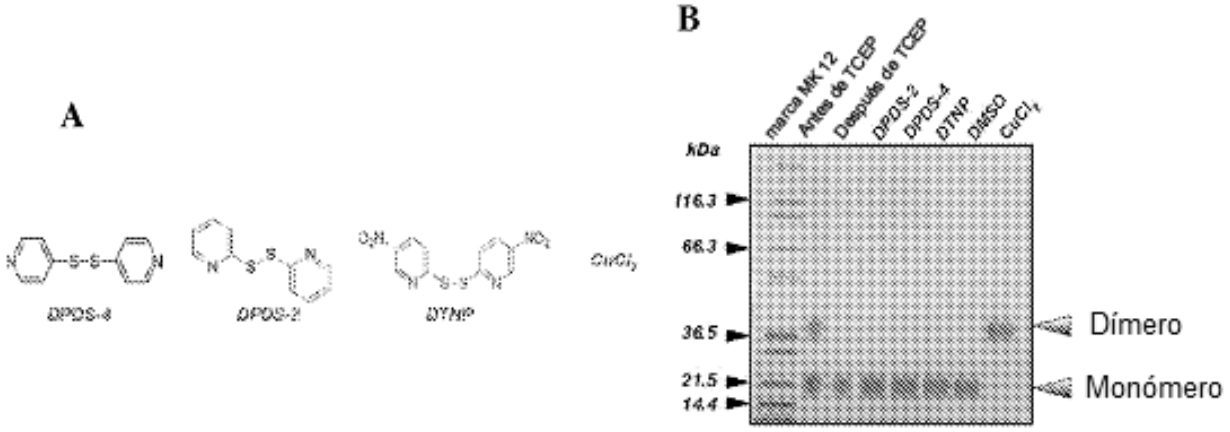
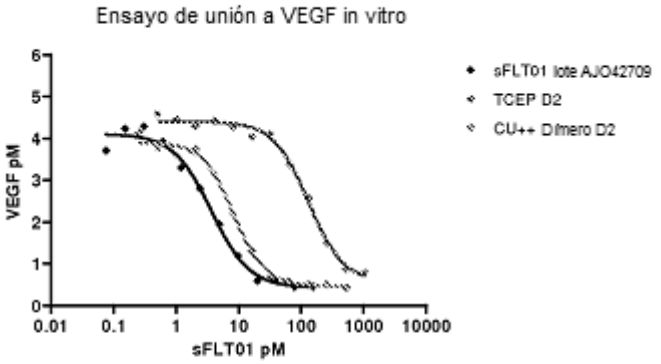

A
DPDS-4
DPDS-2
DTNP
CuCl2
B
marca MK 12
Antes de TCEP
Después de TCEP
DPDS-2
DPDS-4
DTNP
DMSO
CuCl2
kDa
116.3
66.3
36.5
21.5
14.4
Dímero
Monómero

FIGURA 6



	CE50 (nM)
sFLT01	3.7
D2 reducido en TCEP	131
Cu^{++} Dímero D2	8.3

FIGURA 7

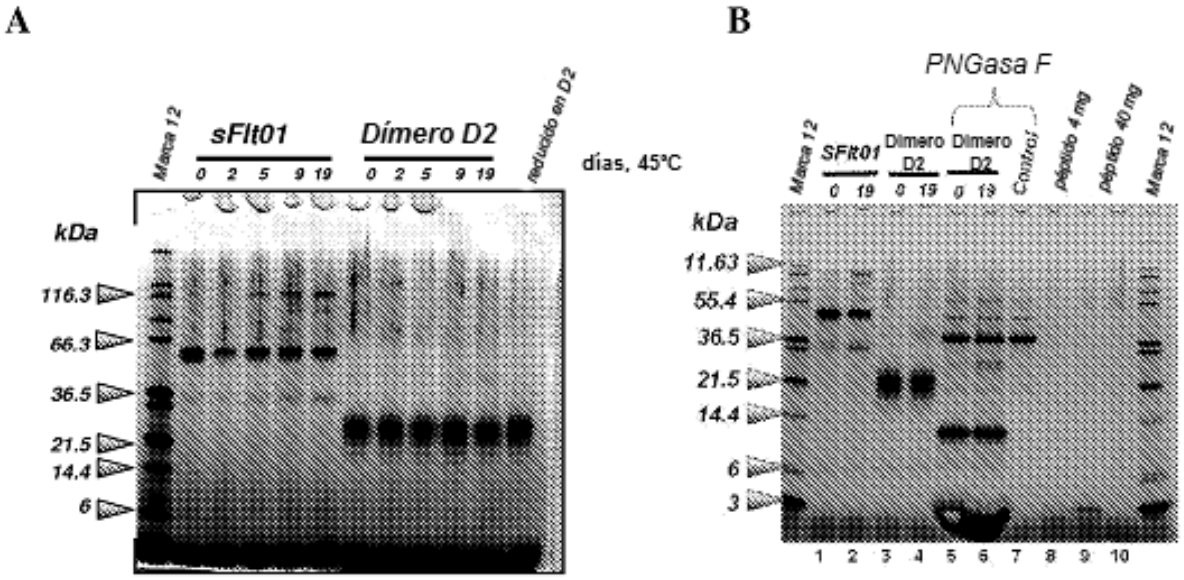
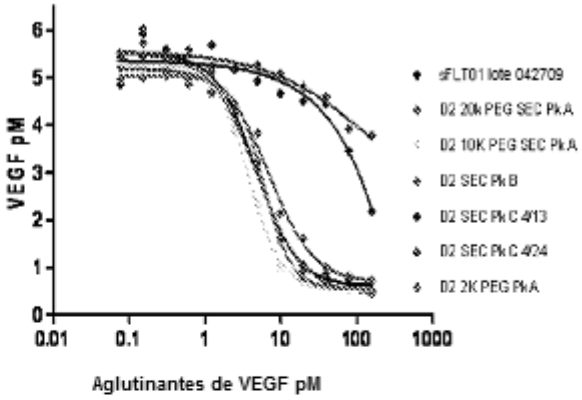

A
Marca 12
sFlt01
Dímero D2
reducido en D2
0 2 5 9 19
0 2 5 9 19
días, 45°C
kDa
116.3
66.3
36.5
21.5
14.4
6
B
PNGasa F
Marca 12
SFlt01
Dímero D2
Dímero D2
Control
péptido 4 mg
péptido 40 mg
Marca 12
0 19
0 19
0 19
kDa
11.63
55.4
36.5
21.5
14.4
6
3
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

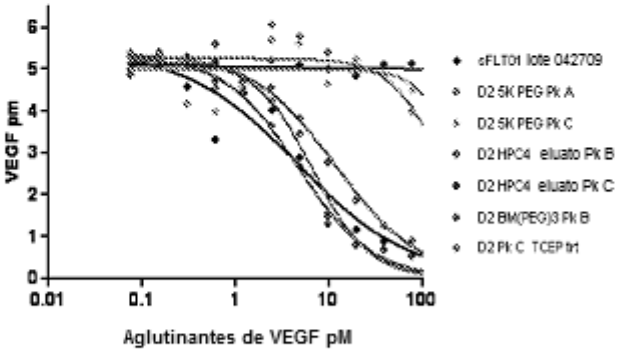
FIGURA 8

A



	CE50 pM
sFLT01	4.70
D2 20K Pk A	4.78
D2 10K Pk A	3.74
D2 Pk B	7.08
D2 Pk C 4/13	20055
D2 Pk C 4/24	151.00
D2 2k Pk A	5.79

B



	CE50 pM
sFLT01	4.72
D2 5K Pk A	6.75
D2 5K Pk C	253.60
D2 HPC4 eluato Pk B	11.86
D2 HPC4 eluato Pk C	---
D2 BM (PEG)3 Pk B	4.71
D2 Pk C TCEP trt	171.50

FIGURA 9

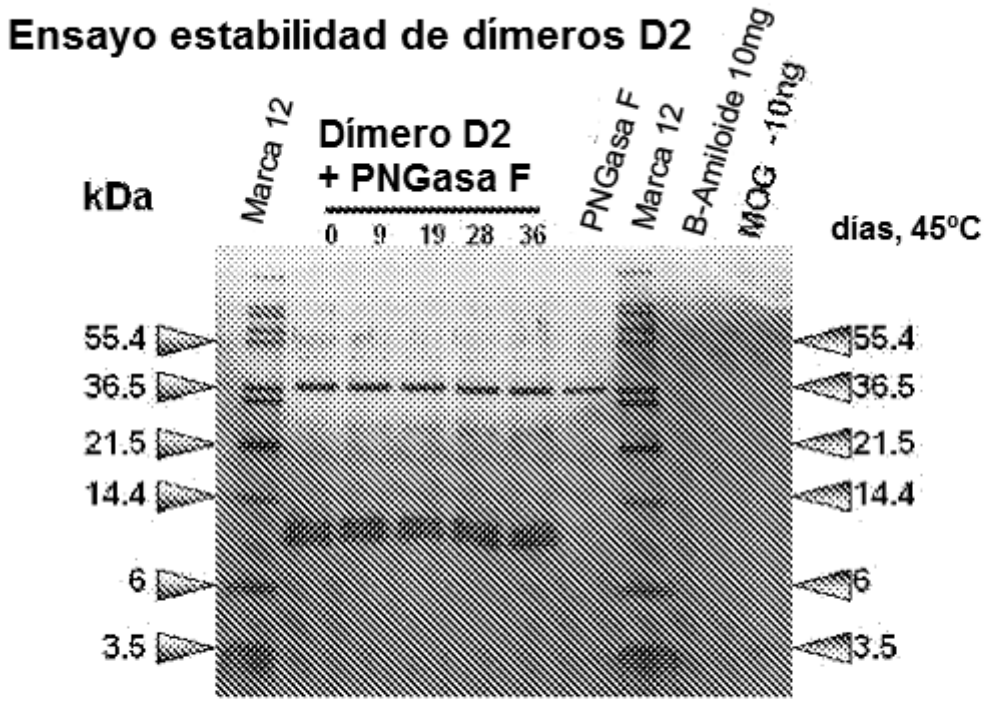
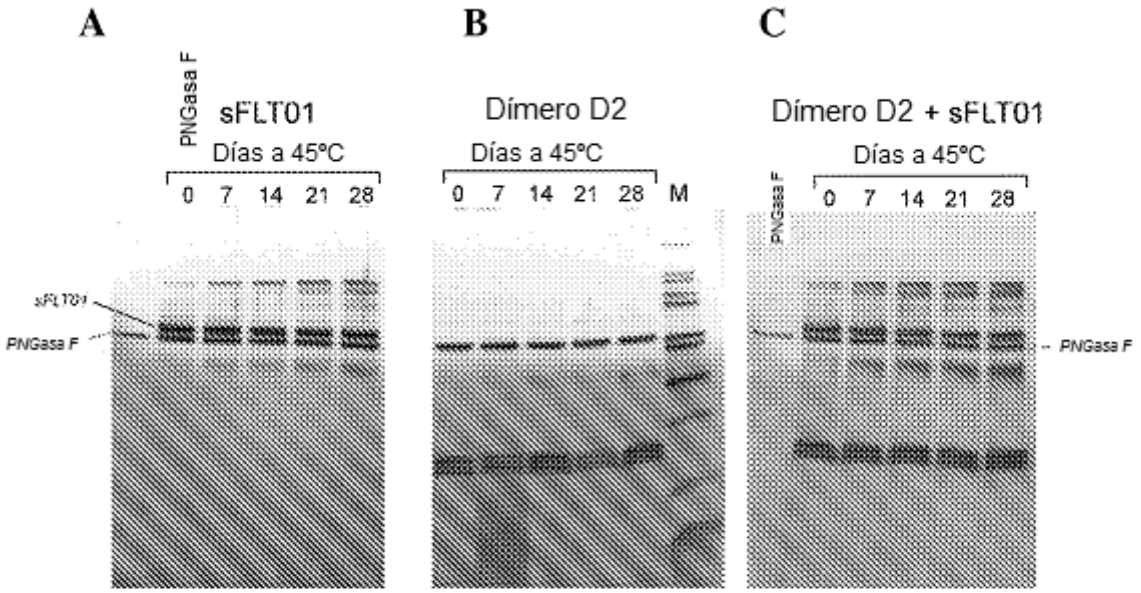
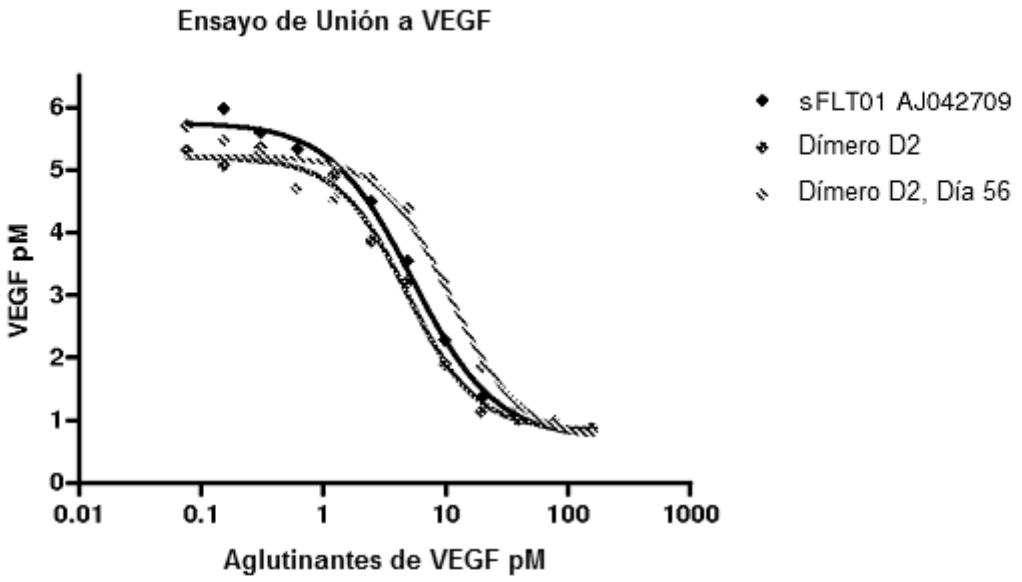

Ensayo estabilidad de dímeros D2
kDa
Marca 12
Dímero D2
+ PNGasa F
0 9 19 28 36
PNGasa F
Marca 12
B-Amiloide 10mg
MOG -10mg
días, 45ºC
55.4
36.5
21.5
14.4
6
3.5

FIGURA 10



Tricina al 15%. Reductor *Todas las muestras tratadas con PNGasa F*

FIGURA 11



	sFLT01 AJ042709	Dímero D2	Dímero D2 Día 56
CE50 (pM)	5.4	4.8	10.9

FIGURA 12

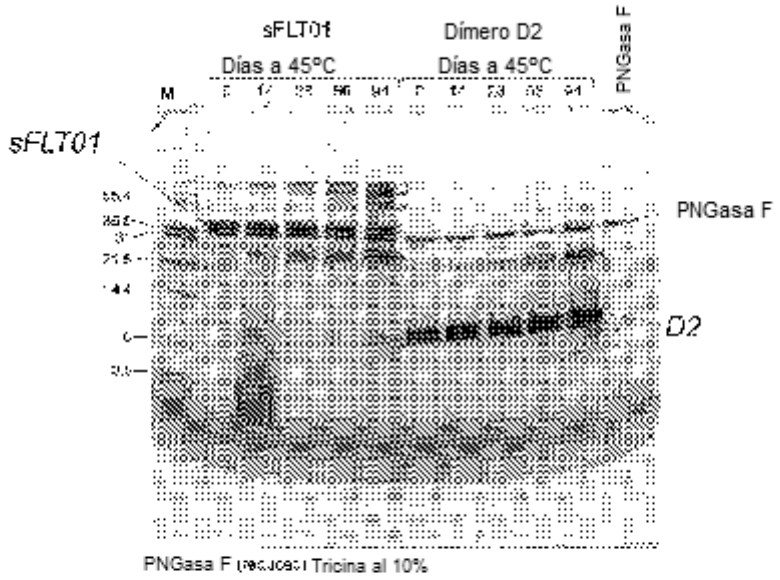

sFLT01
Días a 45°C
Dímero D2
Días a 45°C
PNGasa F
M
sFLT01
PNGasa F
D2
PNGasa F (reducci Tricina al 10%

FIGURA 13

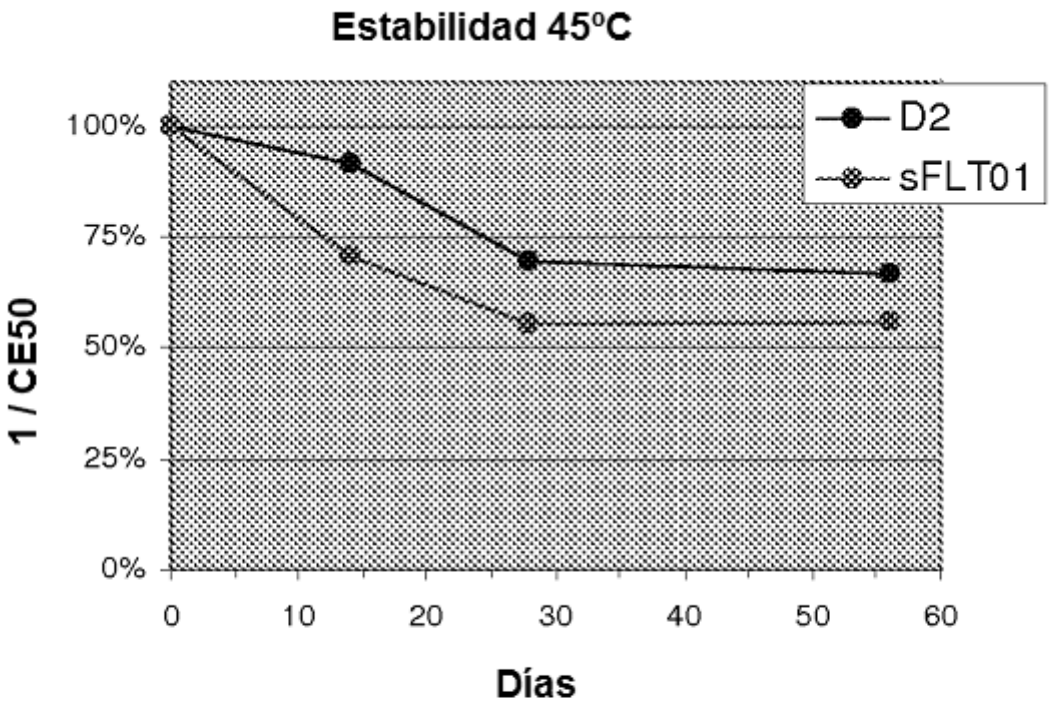

Estabilidad 45ºC
100%
75%
50%
25%
0%
1 / CE50
0
10
20
30
40
50
60
Días
D2
sFLT01

FIGURA 14

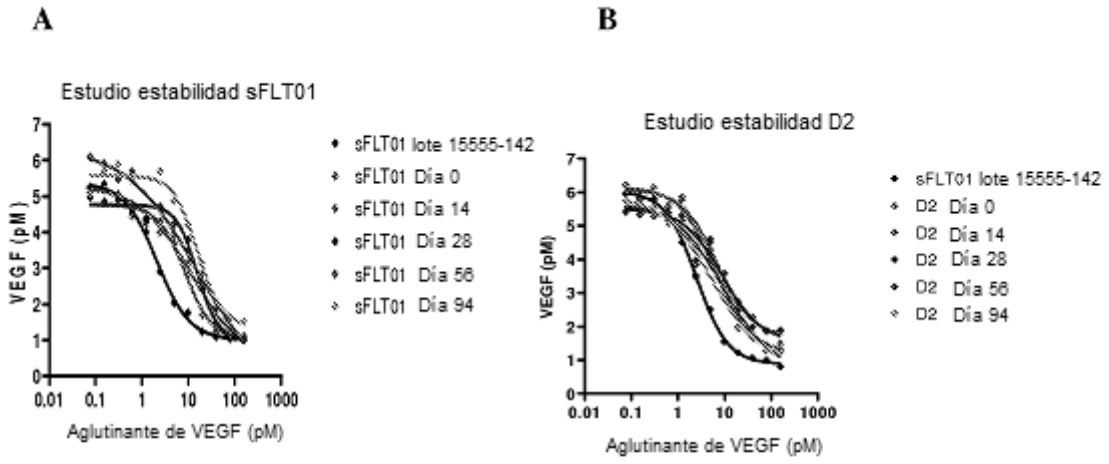

A
Estudio estabilidad sFLT01
VEGF (pM)
Aglutinante de VEGF (pM)
sFLT01 lote 15555-142
sFLT01 Día 0
sFLT01 Día 14
sFLT01 Día 28
sFLT01 Día 56
sFLT01 Día 94
B
Estudio estabilidad D2
VEGF (pM)
Aglutinante de VEGF (pM)
sFLT01 lote 15555-142
D2 Día 0
D2 Día 14
D2 Día 28
D2 Día 56
D2 Día 94

FIGURA 15