

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 161**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/78** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/79** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.08.2012 PCT/US2012/051013**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.02.2013 WO13025846**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2012 E 12824616 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2744831**

54 Título: **Proteína de fusión de transferrina-tumstatina y métodos para producir y usar la misma**

30 Prioridad:

**17.08.2011 US 201161524508 P**

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

**14.03.2018**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF  
COLORADO, A BODY CORPORATE (100.0%)  
1800 Grant Street, 8th Floor  
Denver, CO 80203, US**

72 Inventor/es:

**KOMPELLA, UDAY B.;  
SCHEINMAN, ROBERT I. y  
TYAGI, PUNEET**

74 Agente/Representante:

**CONTRERAS PÉREZ, Yahel**

ES 2 659 161 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Proteína de fusión de transferrina-tumstatina y métodos para producir y usar la misma

**5 Remisión a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/524.508, presentada el 17 de agosto de 2011.

**10 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a proteínas recombinantes que comprenden transferrina que está unida a tumstatina o a otra proteína antiangiogénica y métodos para producir y usar las mismas. La presente invención también se refiere a un sistema de expresión que capaz de expresar dichas proteínas recombinantes y métodos para producir y usar el mismo.

**Antecedentes de la invención**

La neovascularización coroidea (CNV) se refiere al crecimiento incontrolado de la vasculatura coroidea que puede dar lugar a una grave pérdida de visión en enfermedades tales como pseudoxantoma elástico, estrías angioides, histoplasmosis, coroidopatía interna intermitente y degeneración macular senil (AMD) húmeda. La AMD húmeda se produce cuando el depósito de drusas (componentes del complemento, lípidos y apolipoproteínas) causa regiones isquémicas confinadas que dan lugar a hipoxia. Se cree que la hipoxia da lugar a un aumento en la secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que activa las células endoteliales de la coroides para secretar metaloproteinasas de la matriz (MMP). Las metaloproteinasas degradan la matriz extracelular, permitiendo de ese modo la proliferación de células endoteliales y su migración hacia la retina. El efecto de las MMP finalmente provoca el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, o CNV, que puede causar desprendimiento de la retina y hemorragia y la formación de lesiones subretinianas debido a la filtración de sangre y lípidos. Una vez manifestada, la CNV es una causa principal de la pérdida de visión en la población anciana de naciones industrializadas.

El tratamiento de CNV está actualmente limitado a una fracción de la población de pacientes y se centra en restringir la función perjudicial de VEGF en la hiperpermeabilidad vascular y la formación de nuevos vasos sanguíneos. Sin embargo, el VEGF también desempeña una función clave constructiva en actividades fisiológicas tales como la curación de heridas, la supervivencia de los fotorreceptores y el mantenimiento del lecho capilar coroideo. Actualmente, Ranibizumab (Lucentis™), Aflibercept (Eylea™) y pegaptinib (Macugen™) son los dos únicos agentes terapéuticos que se han aprobado hasta la fecha para tratar CNV. Estos agentes inhiben VEGF. Se ha demostrado que Ranibizumab generalmente es más eficaz que pegaptinib en el tratamiento de CNV. Ranibizumab se une a todas las isoformas de VEGF-A e inhibe la actividad de VEGF incluyendo la permeabilidad y el crecimiento vascular. Diferente a los dos agentes terapéuticos mencionados, bevacizumab (Avastin™), el anticuerpo de longitud completa precursor de ranibizumab, también se está explorando como tratamiento experimental para CNV.

A pesar del éxito de estos tratamientos en el tratamiento de CNV, existen inconvenientes inherentes en estos tratamientos, incluyendo la ausencia de apoptosis en células endoteliales activadas y la alteración potencial de las actividades fisiológicas relacionadas con VEGF tales como la curación de heridas. Además, el uso de ranibizumab da lugar a riesgos sistémicos incluyendo una tasa aumentada de eventos tromboembólicos después de la administración intravítrea en seres humanos. El bevacizumab intravítreo también se ha asociado con ataque isquémico, elevación de la presión sanguínea, accidentes cerebrovasculares y muerte. Además, en un ensayo clínico con pacientes que padecen CNV, la tasa de respuesta a ranibizumab fue solamente ~40 % en pacientes con CNV y el aumento en la cantidad de letras fue únicamente de 7,2

Por lo tanto, existe la necesidad de una estrategia terapéutica nueva y más eficaz para tratar CNV que tenga efectos secundarios reducidos y/o mejor eficacia terapéutica.

**Sumario de la invención**

Algunos aspectos de la invención proporcionan una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina o a otra proteína antiangiogénica similar. En algunas realizaciones, la transferrina y la tumstatina están directamente unidas entre sí. En otras realizaciones más, la transferrina y la tumstatina están unidas covalentemente entre sí mediante un conector. Los conectores adecuados son bien conocidos para los expertos en la materia.

Otros aspectos de la invención proporcionan un plásmido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina como se define en la presente invención. Típicamente, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante está unida de forma funcional a una secuencia de control de la expresión.

Otros aspectos más de la invención proporcionan una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina como se define en la presente invención. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico está unida de forma funcional a una secuencia de control de la expresión.

5 Otros más de la invención proporcionan una célula hospedadora recombinante que está transfectada con y que expresa la molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina como se define en la presente invención.

10 Otros aspectos de la invención proporcionan un método para producir una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina como se define en la presente invención, comprendiendo dicho método:

15 transfectar una célula hospedadora recombinante con una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina como se define en la presente invención;  
cultivar la célula hospedadora transfectada en condiciones suficientes para producir la proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina; y  
recuperar la proteína recombinante como una proteína recombinante sustancialmente purificada.

20 En algunas realizaciones, la proteína recombinante comprende transferrina que está unida directamente a tumstatina como se define en la presente invención.

25 Otros aspectos más de la invención proporcionan una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina como se define en la presente invención para su uso en el tratamiento de una afección clínica asociada con la neovascularización coroidea (CNV).

En algunas realizaciones, la afección clínica asociada con CNV comprende pseudoxantoma elástico, estrías angioides, histoplasmosis, coroidopatía interna intermitente y degeneración macular senil (AMD) húmeda.

30 Las composiciones de la invención también pueden usarse para tratar otras enfermedades tales como, aunque sin limitación, cáncer; neovascularización asociada a cáncer; angiogénesis de la córnea; retinopatía diabética proliferativa; glaucoma neovascular; otros trastornos proliferativos neovasculares y vasculares del ojo; así como otros trastornos proliferativos neovasculares y vasculares en otras partes del organismo.

35 Las composiciones de la invención pueden administrarse usando cualquiera de los métodos conocidos para los expertos en la materia incluyendo, aunque sin limitación, intravítrea, intravenosa, supracoroidea, tópica, periocular, subcutánea, intramuscular, subretiniana, retrobulbar, intraescleral, etc.

#### 40 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un gráfico que muestra la actividad antiproliferativa de transferrina-tumstatina, bevacizumab y tumstatina.

45 La figura 2 es un gráfico que muestra la inhibición de la formación de tubos endoteliales observada en células endoteliales de la coroides con diferentes concentraciones de proteína tumstatina, transferrina-tumstatina y bevacizumab.

50 La figura 3 es un gráfico de barras que muestra la evaluación *in vivo* del tamaño de lesión de CNV en ratas BN.

La figura 4 es una representación esquemática de la construcción de expresión génica mantenida de transferrina-tumstatina.

#### **Descripción detallada de la invención**

55 Algunos aspectos de la invención proporcionan una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida (es decir, adherida) a tumstatina. La transferrina puede unirse directa o indirectamente (por ejemplo, mediante un conector) a tumstatina. Otros aspectos de la invención proporcionan una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante que  
60 comprende transferrina que está unida a tumstatina como se define en la presente invención. Otros aspectos más de la invención proporcionan células hospedadoras recombinantes que están transfectadas con y expresan la molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina como se define en la presente invención. Otros aspectos más de la invención proporcionan métodos para producir y usar una proteína recombinante que  
65 comprende transferrina que está unida a tumstatina.

La tumstatina ha demostrado ser terapéuticamente eficaz en el tratamiento de CNV. Sin limitarse a teoría alguna, se cree que la tumstatina tiene la capacidad de retrotraer la angiogénesis causando apoptosis, un atributo del que se carece en los tratamientos actuales de CNV.

5 La tumstatina es un inhibidor endógeno de la angiogénesis que se obtuvo inicialmente del dominio no colagenoso C-terminal (NC1) del colágeno IV presente en la membrana vascular. Se cree que la tumstatina desempeña una función en la inhibición de la formación de vasos sanguíneos uniéndose a integrinas  $\alpha V\beta 3$ , impidiendo la proliferación de las células endoteliales y también induciendo la apoptosis de las células endoteliales. En ausencia de cualquier afección patológica, se mantiene un equilibrio entre las moléculas angiogénicas (tales como VEGF) y las antiangiogénicas (tales como tumstatina). Durante hipoxia e isquemia, se cree que el equilibrio entre las moléculas angiogénicas y las antiangiogénicas se altera, causando de ese modo neovascularización. Los inhibidores de la angiogénesis como tumstatina son una parte inherente del mecanismo del organismo para combatir la neovascularización.

15 La tumstatina tiene muchas ventajas sobre ranibizumab y bevacizumab y se cree que es terapéuticamente mejor que estos anticuerpos. Hasta la fecha, el receptor de tumstatina, integrina  $\alpha V\beta 3$ , se encuentra únicamente en células endoteliales activadas y no en vasos normales. Por consiguiente, se cree que la tumstatina proporciona una trayectoria para abordar células endoteliales activadas, sin afectar a los procesos fisiológicos tales como la curación de heridas. La tumstatina promueve la apoptosis en células endoteliales, y se cree que la apoptosis causada por la tumstatina puede provocar la regresión de los vasos sanguíneos proliferantes y, por tanto, es ventajosa en la restauración de la visión normal. Por consiguiente, la tumstatina puede tratar de forma eficaz la neovascularización y prevenir la pérdida de visión sin ningún efecto secundario significativo relacionado con el tratamiento anti-VEGF.

25 De forma sorprendente e inesperada, los autores de la presente invención han descubierto que la eficacia terapéutica de la tumstatina en CNV puede aumentarse significativamente uniendo la tumstatina a otra proteína. En una realización particular, la tumstatina se unió a transferrina para conseguir una secreción polarizada de la proteína de fusión desde el epitelio pigmentario de la retina (células RPE). Cuando se expone a la monocapa de RPE, la proteína de fusión se secreta preferiblemente hacia el lado basolateral, en comparación con la tumstatina. Después de la transfección con el gen de transferrina-tumstatina, la proteína transferrina-tumstatina formada se secretaba más hacia la dirección basolateral en monocapas de células epiteliales polarizadas, en comparación con el producto génico tumstatina. La secreción basolateral de una proteína recombinante transferrina-tumstatina suministraba tumstatina en cercana proximidad a las células endoteliales de la coroides activadas y neovasculares, potenciando de ese modo la actividad terapéutica de la tumstatina. Sin limitarse a teoría alguna, se cree que la secreción basolateral potenciada de transferrina-tumstatina es prominente en los ojos de pacientes que padecen AMD ya que el contenido de hierro y la actividad del receptor de transferrina probablemente están elevados en los ojos de estos pacientes. Se cree que la ruta más accesible para la eliminación de hierro es mediante la vasculatura de la coroides. Esta ruta también da lugar a secreción aumentada de transferrina (y, por tanto, la proteína recombinante transferrina-tumstatina) hacia la coroides.

40 Basándose en lo anterior, los autores de la presente invención investigaron una novedosa proteína de fusión de transferrina-tumstatina (es decir, una proteína recombinante transferrina-tumstatina), así como la tumstatina para su eficacia en la inhibición de la migración, proliferación y formación de tubos de las células endoteliales de la coroides. Estas actividades se compararon con las de bevacizumab. Además, los autores de la presente invención han determinado la capacidad de la proteína recombinante de la presente invención de secretarse de una manera polarizada en un modelo de células polarizadas bien establecido (por ejemplo, células de riñón canino de Madin-Darby, es decir, MDCK).

50 Como se usa en este documento, el término "transferrina" incluye fragmentos terapéuticamente eficaces de transferrina. En algunas realizaciones, el término "transferrina" se refiere a un péptido que tiene al menos un fragmento peptídico de transferrina que puede unirse a integrinas. Como alternativa, el término "transferrina" típicamente se refiere a un péptido que tiene al menos 5 aminoácidos de la secuencia peptídica de transferrina completa. De una forma alternativa más, el término "transferrina" se refiere a un péptido que tiene al menos un 25 %, típicamente al menos un 50 %, a menudo al menos un 75 % y aún más a menudo al menos un 90 % de la secuencia peptídica de transferrina completa, siempre que el fragmento sea capaz de unirse selectivamente a las integrinas. Por consiguiente, puede usarse cualquier fragmento terapéuticamente eficaz de transferrina para la captación dirigida y la secreción de la proteína recombinante hacia las regiones neovasculares (por ejemplo, secreción hacia la coroides). En algunas realizaciones, el fragmento terapéuticamente eficaz de transferrina comprende un fragmento peptídico de transferrina que puede unirse, típicamente de forma selectiva, a las integrinas.

60 Algunos fragmentos de transferrina con actividad biológica son conocidos para los expertos en la materia. Debe apreciarse que el alcance de la invención incluye las proteínas transferrina y tumstatina de longitud completa, así como fragmentos de una o de ambas proteínas siempre que dicha proteína recombinante tenga una actividad biológica deseada. Que un fragmento particular de transferrina y/o de tumstatina tenga una actividad biológica deseada puede determinarse fácilmente por un experto en la materia usando las experimentaciones *in vitro* e *in vivo*, tales como las divulgadas en este documento. Por consiguiente, el alcance de la invención incluye cualquier proteína de fusión terapéutica (es decir, proteínas recombinantes tumstatina-transferrina) para tratar trastornos

neovasculares, donde la tumstatina y/o la transferrina pueden ser independientemente una proteína completa o un fragmento de la misma. Se cree que las proteínas recombinantes típicamente son más eficaces terapéuticamente que las proteínas precursoras. Las composiciones de la invención incluyen proteínas recombinantes o construcciones de ácido nucleico capaces de expresar las proteínas recombinantes en células relevantes.

5

Péptidos de serie I. Fragmento de transferrina

Se analizan en este documento algunos de los fragmentos representativos de transferrina que son capaces de transferir secreción basolateral y métodos para identificar y producir los mismos.

10

La secuencia proteica de transferrina, así como las secuencias de diversas proteínas secretoras se analizaron y se identificaron fragmentos de transferrina adecuados para la generación de nuevas proteínas de fusión con capacidad de secreción/transporte basolateral. El análisis de la secuencia peptídica de diversas proteínas secretadas de forma basolateral tal como interleucina 6 (Holtkamp et al., Clin Exp Immunol., 1998, 112(1), 34-43), interleucina 8 (id.) y factor A de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-A) (Sonoda et al., AGING, 2010, 2(1), 28-42) dio lugar a la identificación de una similitud sorprendente en los aminoácidos N-terminales de dichas proteínas. Se cree que proteínas que incluyen interleucina 6, interleucina 8 y el factor A de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-A) se secretan en el lado basolateral y tienen una abundancia del aminoácido leucina. Además, también hay dileucinas (es decir, "LL") presentes cerca del extremo N-terminal de estas proteínas. Basándose en estas concepciones, los autores de la presente invención han identificado los siguientes péptidos representativos en transferrina que pueden ser responsables de la secreción basolateral de transferrina-tumstatina: MRLAVGALL (SEQ ID NO: 1); MRLAVGALLVC (SEQ ID NO: 2); LLVCAVLGLCL (SEQ ID NO: 3); GALLVCAVLGLCL (SEQ ID NO: 4); LLVCAVLGLCLAV (SEQ ID NO: 5); GALLVCAVLGLCLAV (SEQ ID NO: 6); y MRLAVGALLVCLLCAVLGLCLAV (SEQ ID NO: 7). Por consiguiente, en algunas realizaciones, cualquier péptido o péptido recombinante que comprenda estos péptidos es adecuado para lograr la secreción basolateral de la transferrina-tumstatina. Estos péptidos (es decir, fragmentos de transferrina divulgados en este documento), cuando se fusionan con tumstatina o cualquier otra proteína terapéutica adecuada, provocan la secreción basolateral de la proteína terapéutica (por ejemplo, a través del epitelio pigmentario de la retina hacia la coroides).

30 Péptidos de serie II. Péptidos de transferrina con capacidad de unión a integrinas:

De forma sorprendente e inesperada, los autores de la presente invención también han descubierto que la proteína transferrina puede interactuar con el receptor de integrina  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ , además de su interacción esperada con el receptor de transferrina. Se cree que la proteína recombinante transferrina-tumstatina de la invención interactúa con el receptor de integrina  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ , que es el receptor para tumstatina, y también con el receptor de transferrina, debido a la presencia de transferrina. Usando acoplamiento *in silico* de transferrina-tumstatina al receptor de integrina  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ , los autores de la presente invención han identificado los aminoácidos dentro de la proteína transferrina que interactúan con el receptor de integrina. Los siguientes aminoácidos son algunos de los péptidos representativos que se cree que interactúan con el receptor de integrina basándose en el acoplamiento *in silico*:

40

Q(127), N(129), L(131), N(148), I(151), G(152), C(156), L(158), K(163), E(166), K(167), A(168); y C(246), T(250), R(251), D(259), E(337), I(342), L(345), T(349), E(357), K(359), L(366), E(370), W(377), C(396), I(400), N(402), E(404), A(405), D(406), L(423), V(424), P(425), E(429).

45 Basándose en estos aminoácidos de interacción, los siguientes péptidos de transferrina se diseñaron como los capaces de interactuar con los receptores de integrina: GFQNLNIGCLKEKAVA (SEQ ID NO: 8); LLCTRDEILTEKLEWCINEADLVPENY (SEQ ID NO: 9); Transferrina<sub>127-168</sub>; Transferrina<sub>125-170</sub>; Transferrina<sub>246-259</sub>; Transferrina<sub>244-261</sub>; Transferrina<sub>337-429</sub>; y Transferrina<sub>335-431</sub>. Como se usa en este documento, el término Transferrina<sub>x-y</sub> se refiere a secuencias de aminoácidos de transferrina empezando en el aminoácido "x" y terminando en el aminoácido "y".

50

Péptidos de serie III. Fragmento de transferrina con capacidad de unión al receptor de transferrina:

Algunos de los fragmentos representativos de transferrina que se descubrió que eran capaces de unirse al receptor de transferrina.

55

Se cree que los siguientes aminoácidos de transferrina interactúan con el receptor de transferrina. Transferrina<sub>161-169</sub>; H(368), R(371), L(372), D(375), E(376), S(378), V(379); PRKPLEKAV (SEQ ID NO: 10); Transferrina<sub>159-171</sub>; Transferrina<sub>368-379</sub> y Transferrina<sub>366-381</sub>. Por consiguiente, estos fragmentos de transferrina también pueden usarse en métodos de la presente invención.

60

Péptidos de serie IV. Fragmentos de tumstatina con actividad antiangiogénica y/o antitumoral

El término "tumstatina" incluye fragmentos terapéuticamente eficaces de tumstatina. En particular, el término "tumstatina" incluye partes o fragmentos del péptido de tumstatina que pueden aumentar el suministro de

65

transferrina respecto al uso de transferrina sin ningún péptido de tumstatina adicional. Por consiguiente, en algunas realizaciones el término "tumstatina" se refiere a un péptido que tiene al menos un fragmento peptídico de tumstatina que puede aumentar la eficacia terapéutica de la transferrina respecto a la transferrina sin dicho péptido. Como alternativa, el término "tumstatina" se refiere a un péptido que tiene al menos un 25 %, típicamente al menos un 50 %, a menudo al menos un 75 % y más a menudo al menos un 90 % de la secuencia completa del péptido de tumstatina. Algunos fragmentos de tumstatina con actividad biológica (por ejemplo, actividad antiangiogénica) son conocidos para los expertos en la materia. Debe apreciarse que el alcance de la invención (así como el término "tumstatina") incluye las proteínas tumstatina de longitud completa, así como fragmentos de la misma.

10 La tumstatina es un inhibidor de la angiogénesis que se une al receptor de integrina  $\alpha V\beta 3$  y suprime el crecimiento tumoral. Los estudios previos de mutagénesis por eliminación (véase, por ejemplo, Eikesdal et al., PNAS, 2008, 105(39), 15040-15045; y Thevenard et al., Int. J. Cancer, 2010, 126, 1055-1066) han identificado los siguientes fragmentos de aminoácidos de tumstatina con actividad antiangiogénica: Tumstatina<sub>74-98</sub>; Tumstatina<sub>185-203</sub>; y YNSNG (SEQ ID NO: 11).

15 Los autores de la presente invención también han diseñado péptidos novedosos basándose en la anterior secuencia peptídica por modelado de proteínas *in silico*. En una realización particular, D (ácido aspártico) se reemplazó con H (histidina) en dos puntos como se muestra a continuación:

20 TMPFLFCNVNHCNFCASRNHYSYWL (SEQ ID NO: 12)

Se cree que el remplazo de H con D provoca una interacción electrostática favorable neta entre la carga positiva de H y las otras cargas de la proteína. En algunas otras realizaciones, los restos hidrófobos alanina (A) y leucina (L) se reemplazaron con arginina (R), un aminoácido hidrófilo. Algunos de estos péptidos modificados incluyen:

25 TMPFLFCNVNDVCNFRSRNDYSYWL (SEQ ID NO: 13); TMPFLFCNVNDVCNFCASRNHYSYWR (SEQ ID NO: 14); CNYYSNSYSFWLRLSLNPER (SEQ ID NO: 15); y CNYYSNSYSFWLASRNPER (SEQ ID NO: 16).

La arginina contiene un grupo guanidinio, que es responsable de su polaridad. Se cree que el remplazo de restos hidrófobos con arginina hidrófila ayuda a mejorar la estabilidad de la proteína en virtud de los enlaces de hidrógeno adicionales formados con el disolvente. Además, se cree que la arginina, cuyo grupo guanidinio está cargado positivamente a pH 7,4, introducirá una carga en la superficie y proporcionará una posibilidad para interacciones adicionales en la superficie de la proteína. Cualquiera de las secuencias naturales anteriores o fragmentos modificados pueden usarse en la creación de proteínas de fusión no recombinantes de la invención. Por consiguiente, debe apreciarse que los términos "transferrina" y "tumstatina" incluyen aquellas modificaciones donde uno o más de los restos aminoacídicos están reemplazados con un aminoácido de tipo silvestre incluyendo aminoácidos homólogos. Un experto en la materia puede determinar fácilmente una sustitución de aminoácido adecuada habiendo leído la presente divulgación.

Como se analiza anteriormente, además de las proteínas recombinantes de longitud completa de transferrina y tumstatina, el alcance de la invención incluye proteínas recombinantes en que una o ambas proteínas de longitud completa de transferrina y/o tumstatina están reemplazadas con cualquiera de los péptidos parciales correspondientes divulgados anteriormente.

Por consiguiente, el alcance de la invención incluye proteínas recombinantes donde cualquier combinación de un péptido/proteína de los péptidos divulgados en los péptidos de serie I o III anteriores o la propia transferrina con el péptido de péptidos de la serie II o IV anteriores o la propia tumstatina (por ejemplo, un péptido de serie I fusionado con cualquier proteína o péptido terapéutico tal como tumstatina o un péptido de péptido de la serie II o IV; y péptido de la serie II fusionado con péptido de la serie I, etc.). Adicionalmente, un péptido de la serie I puede combinarse con cualquier macromolécula terapéutica nueva para una captación/transporte/secreción dirigida.

50 En los ejemplos, se describen procedimientos que se reducen de forma constructiva a la práctica en tiempo presente, y se exponen procedimientos que se han realizado en el laboratorio en tiempo pasado.

## Ejemplos

### 55 Materiales y métodos

#### Ejemplo 1

60 **Materiales:** se adquirieron filtros Transwell® (tamaño de poro de 0,4  $\mu\text{m}$ ) de Corning Inc., NY. Se adquirió seroalbúmina bovina de Sigma Aldrich (MO). Se adquirió BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced de BD Biosciences (CA). Se adquirió la escala de ADN, reactivo Lipofectamine® 2000 y tinción DAPI de Invitrogen Corporation (CA). Las enzimas de restricción usadas se adquirieron de New England Biolabs (MA). Se adquirió el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange® de Agilent Technologies (CA). El gen de transferrina, las células endoteliales de la coroides (RF/6A) y el medio celular RF/6A se adquirieron de la American Type Culture Collection,

VA. Se adquirió el kit Giga plasmídico QIAGEN® de QIAGEN Inc. (CA). Se adquirió la resina de afinidad por metales TALON® (n.º de catálogo 635502) de Clontech Laboratories, Inc. (CA). El kit de ensayo de proteínas BCA®, usado para estimar el contenido de proteínas, se adquirió de Pierce Biotechnology, Inc. (IL) (n.º catálogo 23225). Los geles ya fabricados, Ready Gel Tris-HCl® al 10 % de Bio-Rad laboratories, Inc. (CA) y la escala de proteínas preteñida EZ Run® de Fisher Scientific (PA) se usaron durante la electroforesis en gel de SDS PAGE. Se adquirió un kit de ensayo de proteínas BCA® de Thermo Fisher Scientific (IL).

Construcción de plásmidos: se prepararon cuatro construcciones diferentes para el estudio, que contenían los siguientes ADNc, concretamente (a) tumstatina; (b) tumstatina-EGFP; (c) transferrina-tumstatina (véase la figura 4 que ilustra esquemáticamente la construcción de expresión génica mantenida de transferrina-tumstatina. Una construcción similar con transferrina es útil para la expresión a largo plazo de tumstatina); y (d) transferrina-tumstatina-EGFP. Todos los cebadores se adquirieron de Integrated DNA Technologies Inc. (CA) para su uso en este experimento. El ADNc de tumstatina se amplificó por PCR usando el cebador directo (5'-CGATGGATCCGCAACCTGGACAACGAGAGGCTT-3') (SEQ ID NO: 17) y el cebador inverso reverse primer (5'-CGATCTCGAGAGTGTCTTTTCTTCATGCACACC-3') (SEQ ID NO: 18) y se ligaron en el vector PSecTag2B como un fragmento *BamHI* y *XhoI*. El EGFP se clonó en el vector PSecTag2B como un fragmento *Hind III* y *BamHI* usando el vector pEGFP (Clontech Laboratories, CA) como un molde y usando el cebador directo (5'-ATCGATAAGCTTTGTGAGCAAGGGCGAGGAGC-3') (SEQ ID NO: 19) y el cebador inverso (5'-ATCGATGGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATGC-3') (SEQ ID NO: 20).

La secuencia secretora de IgK se intercambió para transferrina digiriendo primero nuestra construcción con *NheI* más *SfiI* para eliminar la secuencia de IgK. La transferrina se amplificó usando el cebador directo (5'-AGTCGCTAGCATGAGGCTCGCCGTGGGAGCCC-3') (SEQ ID NO: 21) y el cebador inverso (5'-AGTCGCGGCCGCTGGGCCAGGTCTACGGAAAGTGCAGGCT-3') (SEQ ID NO: 22) que contenía sitios de restricción, los sitios *NheI* y *SfiI*, respectivamente, y se clonó en el vector linealizado. La transferrina se incorporó en el PsecTag2B que contenía tumstatina y pEGFP. La parte génica de IgK de PSecTag2B se eliminó durante este proceso. Se usaron los mismos cebadores directo e inverso para incorporar transferrina en un vector PsecTag2B que contenía únicamente tumstatina para generar el plásmido de transferrina-tumstatina.

Todos los plásmidos se cultivaron usando la cepa *dH5α* de bacterias *E. coli* y se amplificaron usando el kit Giga plasmídico QIAGEN®. Se preparó un gel de agarosa al 1 % en tampón TAE y se usó para estudiar las construcciones de ADNc. Se tomaron imágenes usando el sistema de imágenes GelDoc XR® (Bio-Rad laboratories, Inc.CA).

Producción y purificación de la proteína: el vector PSecTag2B usado para construir los plásmidos, como se menciona anteriormente, tiene una marca de seis histidinas que puede ayudar a la purificación de la proteína secretada en el medio. El plásmido se transfectó en células ARPE (epitelio pigmentario de la retina humana) para expresar las proteínas de fusión creadas. Las células ARPE se cultivaron hasta que se obtuvo una confluencia de un 80 %. Se realizó la transfección transitoria de las células ARPE usando el reactivo Lipofectamine® 2000. Se usó la resina de afinidad por metales TALON® para purificar la proteína marcada con histidina. El kit de ensayo de proteínas BCA® se usó para estimar el contenido de proteínas del eluido. Se generó una curva patrón de estimación de proteínas usando seroalbúmina bovina (Sigma Aldrich, MO).

Microscopia confocal de células ARPE: el plásmido de tumstatina-EGFP se estudió en células ARPE para observar el funcionamiento del gen de EGFP en las células. Las células ARPE se cultivaron hasta que obtuvo una confluencia de un 80 %. Se realizó la transfección transitoria de las células ARPE usando el reactivo Lipofectamine® 2000. Se hizo la tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, diclorhidrato) para los núcleos de las células. Las células ARPE sin transfección con el plásmido de tumstatina EGFP y únicamente tinción DAPI se usaron como control.

Para estudiar la internalización de la proteína transferrina-tumstatina-EGFP y tumstatina-EGFP, se expusieron las células endoteliales de la coroides a la proteína transferrina-tumstatina-EGFP y tumstatina-EGFP durante 24 horas. Después de 24 horas, las células se lavaron con PBS frío pH 7,4 seguido por lavado con tampón ácido frío (pH 5,0) y se fijaron usando paraformaldehído a un 4 % y se tiñeron con DAPI. Las células se observaron bajo un microscopio confocal Nikon C1 si®.

Secreción polarizada de la proteína de fusión transferrina-tumstatina-EGFP: se eligió la línea celular MDCK para el estudio de secreción polarizada de la proteína de fusión ya que es un sistema polarizado que está bien comprendido. Las células MDCK tienen rutas que suministran proteínas de membrana a la superficie apical o basolateral.

Las células MDCK se sembraron en filtros Transwell y se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) usando un medidor de resistencia EVOM® (World Percision Instruments, CA). Cuando la TEER estaba por encima de 300 Q, las células se transfectaron con el plásmido de tumstatina-EGFP o transferrina-tumstatina-EGFP como se describe anteriormente. Después de 24 horas de transfección, las células MDCK se fijaron y tiñeron usando la tinción de núcleos DAPI. Se recogió el medio tanto del lado basolateral como del lado apical por separado y se

cuantificaron las proteínas de fusión usando un kit de ensayo de proteínas BCA®.

**Ensayo de proliferación celular:** se usaron células endoteliales de la coroides (RF/6A) para estudiar el efecto de la proteína tumstatina y de la proteína transferrina-tumstatina sobre la proliferación de las células bajo el efecto de VEGF 165. Se usó un ensayo MTT para evaluar la proliferación celular.

Las células endoteliales de la coroides (RF/6A, pase n.º 9) se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de siembra de aproximadamente 20 000 células/pocillo y se dejaron adherir al pocillo durante 24 horas. Después de 24 horas, las células se incubaron con soluciones de VEGF 165 (R&D systems, MN) en una concentración de 50 ng/ml. La proliferación de las células RF/6A se indujo usando 50 ng/ml de VEGF 165. De los 96 pocillos, 3 pocillos se mantuvieron como controles, que contenían únicamente células RF/6A y 50 ng/ml de VEGF 165. Los pocillos restantes contenían bevacizumab, tumstatina o transferrina-tumstatina en concentraciones variadas.

Estas concentraciones se utilizaron para bevacizumab: 1,5 - 500 nM. Se aspiró el medio y se añadieron 200 µl de medio sin suero fresco a cada pocillo al final de las 24 horas. El reactivo de MTT (Sigma Aldrich, MO), es decir, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrasodio, (20 µl de 5 mg/ml de MTT disuelto en PBS pH 7,4) se añadió a cada pocillo y se incubó a 37 °C durante 3 horas. El medio se aspiró y se disolvieron los cristales de formazán formados en 200 µl de DMSO. Después de añadir DMSO, los cristales se disolvieron y se midió la absorbancia del color a 570 nm usando un lector de microplacas. En el siguiente experimento, se usó tumstatina o transferrina-tumstatina en lugar de bevacizumab en las siguientes concentraciones: 7,8-1000 nM. Se siguieron los mismos métodos, como se describe anteriormente. La proteína transferrina-tumstatina se usó en las concentraciones de 1,5- 500 nM (n=3 para cada concentración).

**Ensayo de formación de tubos:** se descongeló Matrigel® a 4 °C durante una noche. Se preparó una placa de 48 pocillos para el ensayo de formación de tubos extendiendo 75 µl del matrigel descongelado en el fondo de cada uno de los pocillos. La placa se mantuvo a 37 °C durante 30 minutos para polimerizar el matrigel. Las células endoteliales de la coroides se transfirieron a la placa de 48 pocillos que contenía el matrigel. Cada pocillo contenía  $6 \times 10^3$  células. Tres pocillos se mantuvieron como control sin tumstatina incorporada. Los 45 pocillos adicionales contenían la proteína tumstatina en las concentraciones descritas anteriormente para el ensayo de proliferación. La placa se mantuvo a 37 °C durante 18 horas. La formación de tubos se analizó usando un microscopio óptico. Se usaron los mismos procedimientos para realizar los experimentos de proteína transferrina-tumstatina y bevacizumab. Se utilizaron concentraciones que varían de 0,15 a 500 nM (n=3 para cada concentración).

**Ensayo de migración celular:** se realizaron ensayos de migración celular *in vitro* usando una cámara de invasión de Matrigel (tamaño de poro de 8 µm, Becton Dickinson, MA). Se añadió una suspensión de  $5 \times 10^5$  células en 0,5 ml de medio sin suero a la cámara Matrigel. Los pocillos se llenaron con 1 ml de solución de 10 ng/ml de VEGF. Las cámaras se incubaron a 37 °C durante 24 horas en una incubadora de un 95 % de aire/5 % de CO<sub>2</sub>. Las células sobre la superficie inferior de la membrana se tiñeron con tinción de hematoxilina y eosina. Las células invasoras se fotografiaron en un microscopio Nikon a aumento 40x y se contaron en cinco campos de tres membranas para cada concentración. Se usaron los mismos métodos para realizar los experimentos de proteína transferrina-tumstatina y bevacizumab. Se utilizaron concentraciones que varían de 0,15 a 500 nM (n=3 para cada concentración).

**Acoplamiento molecular:** se usó un visualizador Discovery de Accelry v2.5.1.9167 (Accelry's, Inc.CA) para estudiar el acoplamiento *in silico* de tumstatina y transferrina-tumstatina al receptor de integrina  $\alpha\beta 3$ . La estructura cristalina del dominio no colagenoso de colágeno IV (PDB n.º 1L11) se usó como referencia para desarrollar un modelo homólogo para tumstatina. La estructura cristalina de transferrina sérica humana sin hierro (PDB n.º 2HAV) se usó como referencia para desarrollar un modelo homólogo para transferrina. Las proteínas se prepararon y se realizó la minimización de energía. Se crearon proteínas de fusión de transferrina-tumstatina fusionando tumstatina al extremo C-terminal de transferrina con un enlace peptídico. Para estudios de tumstatina con de acoplamiento de integrina  $\alpha\beta 3$ , se usó un modelo de homología de tumstatina como un ligando y se acoplaron en la estructura cristalina del dominio extracelular de la integrina  $\alpha\beta 3$  (PDB n.º 1JV2). Para estudios de transferrina-tumstatina con acoplamiento de integrina  $\alpha\beta 3$ , la proteína de fusión se acopló al receptor de integrina  $\alpha\beta 3$  (PDB n.º 1JV2).

**Ensayo de apoptosis:** la apoptosis se estudió usando el sistema colorimétrico TUNEL (marcage final de mella dUTP mediado por TdT) DeadEnd (Promega Corporation, WI). Se sembraron células endoteliales de la coroides ( $1 \times 10^5$  células/pocillo) sobre cubreobjetos en una placa de 12 pocillos y se dejó que se adhieran durante 24 horas. Después de 24 horas, las células se expusieron a diferentes concentraciones de proteína bevacizumab (1, 10 y 100 nM), tumstatina (100, 250 y 500 nM) y transferrina-tumstatina (1, 10 y 100 nM). Después de 24 horas de exposición a proteína las células entonces se lavaron, se fijaron con paraformaldehído a un 4 % y se permeabilizaron usando solución de Triton® X-100 a un 0,2 % en tampón fosfato pH 7,4. Las células se tiñeron adicionalmente según el protocolo convencional proporcionado junto con el sistema de ensayo colorimétrico TUNEL DeadEnd™. Las células se estudiaron bajo un microscopio óptico a un aumento 40x.

**Inducción de CNV en ratas pardas y preparaciones para microscopio de coroides:** se adquirieron ratas pardas macho adultas (15-180 g) de Harlan Sprague Dawley Inc. (Indianapolis, IN, EE. UU.). Las ratas se anestesiaron usando una

- inyección intraperitoneal de mezcla de 40-80 mg/ml de quetamina y 10-12 mg/kg de xilazina. La inducción de quemaduras por láser se realizó de la siguiente manera. Se dilataron las pupilas para administración tópica de solución de tropicamida a un 1 %. Se visualizó el fondo después de colocar un cubreobjetos sobre el ojo e instalación de solución de promelosa a un 2,5 %. Ocho manchas por láser (100 mm, 150 mW, 100 ms) concéntricas con el nervio óptico se situaron en el ojo derecho de cada rata usando un láser de diodos de 532 nm (Oculight Glx; Iridex Inc., Mountain View, CA, EE. UU.) y una lámpara de hendidura (lámpara de hendidura Zeiss 30SL; Carl Zeiss Meditec Inc., Dublin, CA, EE. UU.). El ojo izquierdo se usó como control para cada animal. Se confirmó la rotura de la membrana de Bruch por el criterio de valoración de "formación de burbuja". Las ratas que mostraban hemorragia intraocular tras la administración del láser se excluyeron del estudio. Se permitió que se desarrollaran lesiones CNV durante 14 días después de la inducción de las quemaduras por láser. Al final de los 14 días, a las ratas se les administró uno de los siguientes tratamientos de forma intravítrea, (a) PBS pH 7,4, (b) bevacizumab, (c) proteína tumstatina y (d) proteína transferrina-tumstatina. Las ratas se sacrificaron al final de los 14 días de tratamiento y se enuclearon los ojos.
- 15 Para el la preparación para microscopio de coroides, las ratas se anestesiaron usando una inyección intraperitoneal de mezcla de 80 mg/kg de quetamina y 10 mg/kg de xilazina. Las ratas se infundieron con 10 ml de PBS (pH 7,4) seguido por infusión con 10 ml de paraformaldehído a un 4 %. Finalmente, se infundieron 4 ml de solución de 50 mg/ml de isotiocianato de fluoresceína (FITC)-dextrano ( $2 \times 10^6$  Da). Los ojos entonces se enuclearon y se prepararon las preparaciones para microscopio. Se tomaron imágenes de las preparaciones para microscopio con un microscopio confocal Nikon EZ-CI usando longitudes de onda de excitación de 488 y 568 nm. Las áreas de CNV se obtuvieron usando el software ImageJ.

#### Resultados

- 25 Construcción de plásmidos: se tomó una imagen del gel de agarosa al 1 % (no mostrada) del plásmido de tumstatina, tumstatina-EGFP, transferrina-tumstatina-EGFP y transferrina-tumstatina, que eran de 5813, 6521, 8550 y 7842 pares de bases, respectivamente. Se procesó una escala de 1 Kb como marcador de tamaño. También se tomó una imagen de la electroforesis en gel con SDS de la proteína tumstatina (28 kDa) y transferrina-tumstatina-EGFP (135 kDa) (no mostrada). También se tomó un electroferograma para el resultado de la secuenciación de pares de bases para tumstatina después de su inserción en PSecTag2B. la secuenciación se hizo usando electroforesis capilar (Applied Biosystems, CA). Se estudió la expresión del gen de tumstatina-EGFP en células ARPE y se tomaron imágenes (no mostradas). También se tomaron imágenes de microscopía confocal (100x) de células ARPE que expresan la proteína tumstatina-EGFP (no mostradas). La tinción DAPI se realizó para teñir los núcleos celulares. Las células ARPE sin transfección con tumstatina-EGFP se usaron como controles para 35 contrarrestar cualquier fluorescencia de fondo.

Se determinó la internalización de la proteína transferrina-tumstatina-EGFP. Se observó una intensa señal de EGFP en células RF/6A tras la exposición a la proteína transferrina-tumstatina-EGFP. Se esperaba que se eliminara cualquier proteína sorbe la superficie celular por lavados con tampón ácido. Esto se hizo hasta el pKa de los fosfolípidos lipídicos que constituían la membrana celular. El pKa más bajo de los grupos fosfato es  $\sim 2$ , que indica que los grupos fosfato están en un estado no cargado de  $H_3PO_4$  o tienen una carga negativa única ( $H_2PO_4^-$ ) a pH 2. A pH mayor de  $\sim 2$ , aumenta la probabilidad de tener dos cargas negativas ( $HPO_4^{2-}$ ). Por lo tanto, se supuso que la señal de EGFP se debía a la proteína internalizada únicamente. La exposición de las células RF/6A a la proteína tumstatina-EGFP no produjo internalización observable.

#### 45 Secreción polarizada de la proteína de fusión transferrina-tumstatina-EGFP:

Se usaron células MDCK para estudiar la secreción basolateral de la proteína transferrina-tumstatina-EGFP. Las imágenes tomadas de este experimento mostraron que la proteína transferrina-tumstatina-EGFP se secretaba en el lado basolateral de las células. Cuando se examinó el lado basolateral bajo un microscopio confocal, no eran visibles los límites de las células. Esto puede ser el resultado de la naturaleza porosa de los filtros transwell que no permiten que se refleje la luz de nuevo al microscopio y también puede obstaculizar la trayectoria de la luz a las células. Esta puede ser una posible razón para la ausencia de visibilidad de células desde el lado basolateral del filtro. Aunque las células no eran visibles desde el lado basolateral, se puede observar claramente la tinción DAPI y la señal de EGFP 55 procedentes de la proteína secretada en el lado basolateral. Las células pueden observarse claramente cuando se estudiaba el lado apical del filtro bajo un microscopio confocal. Se observó secreción de la proteína en la superficie basolateral de las células. Dicho acontecimiento puede explicarse de al menos dos maneras. La proteína puede unirse a los receptores sobre la superficie celular o la proteína puede incrustarse en el filtro (para la proteína secretada de forma basolateral). Una cuantificación de la proteína secretada en el medio basolateral y apical 60 confirmó adicionalmente la ruta secretora de la proteína transferrina-tumstatina-EGFP.

Se purificó la proteína transferrina-tumstatina-EGFP recogida del medio apical y basolateral. Se determinó el contenido de proteína en el medio apical y basolateral. El medio apical contenía un 23,17 % y el lado basolateral contenía un 76,83 % de la proteína transferrina-tumstatina-EGFP. La proteína total secretada en ambos medios se consideró de un 100 %. Se purificó la proteína tumstatina-EGFP (control) del medio apical y basolateral recogido

después de completarse el estudio de células MDCK polarizadas. El medio apical contenía un 68,84 % y el lado basolateral contenía un 31,16 % de la proteína tumstatina-EGFP. Estos datos muestran que tener una proteína de fusión de transferrina-tumstatina puede aumentar significativamente la secreción basolateral de la proteína de fusión. En ausencia de transferrina, la tumstatina se secretaba más en el lado apical (68,84 %) en comparación con  
5 únicamente un 23,17 % que se secreta de forma apical en presencia de transferrina en la proteína de fusión.

Ensayo de proliferación celular: la proliferación celular inducida por VEGF- 165 se inhibió por la presencia de la proteína tumstatina y transferrina-tumstatina. La figura 1 muestra la proliferación celular bajo el efecto de las proteínas tumstatina, transferrina-tumstatina y bevacizumab. Se usó el ensayo MTT para juzgar la actividad  
10 antiproliferativa de tumstatina (●), transferrina-tumstatina (Δ) y bevacizumab (■) sobre la proliferación de las células endoteliales de la coroides estimuladas por VEGF (50 ng/ml). Se midió la absorbancia después de tratamiento con el reactivo de MTT usando un espectrofotómetro UV-Vis. Los datos se expresan como la media ± D.T. para n=3. Como muestra el gráfico, la proteína transferrina-tumstatina era muy eficaz en reducir la proliferación celular en comparación con la tumstatina en solitario. Se encontró que la  $CI_{50}$  de la proteína transferrina-tumstatina era de 5,97  
15 nM. Se encontró que era de 185,7 nM para la proteína tumstatina en solitario. También se ensayó bevacizumab para la inhibición de la proliferación celular y se encontró que su eficacia estaba en una  $CI_{50}$  de 7,78 nM.

La proteína transferrina-tumstatina era más eficaz en inhibir la proliferación celular que bevacizumab. La transferrina-tumstatina también era capaz de inhibir una mayor cantidad de células, por encima de la  $CI_{50}$  de la  
20 proteína, en comparación con bevacizumab. A una concentración de 15,6 nM, la inhibición de transferrina-tumstatina era de casi un 84 % mientras que la inhibición de bevacizumab era de ~63 %.

Ensayo de formación de tubos: se tomaron imágenes representativas (no mostradas) de la formación de tubos en diferentes concentraciones de tumstatina, transferrina-tumstatina y bevacizumab. Se observó que la formación de  
25 tubos disminuía con el aumento en la concentración de la proteína tumstatina y transferrina-tumstatina. Ambas proteínas tumstatina y transferrina-tumstatina eran capaces de inhibir la formación de tubos, mientras que no se observó inhibición apreciable de formación de tubos bajo el efecto de bevacizumab. En el ensayo de formación de tubos realizado usando la proteína de fusión de transferrina-tumstatina, se observó una prevención sustancialmente completa de formación de tubos a la concentración de 125 nM. La figura 2 muestra un gráfico de ajuste sigmoide de  
30 las tres proteínas ensayadas. Se evaluó la formación de tubos después de 18 horas. Los datos se expresan como la media ± D.T. para n=3.

Ensayo de invasión: el ensayo de invasión imita la membrana basal *in vivo* y las células tienden a migrar hacia un quimioatrayente tal como VEGF. Las imágenes mostraron la disminución en la cantidad de células invasoras bajo el  
35 efecto de la proteína tumstatina y transferrina-tumstatina. Se observó una disminución significativa en la cantidad de células que invaden la membrana de la cámara de invasión Matrigel según se aumentaba la concentración de la proteína tumstatina en el medio. También se tomaron imágenes (no mostradas) de células que invaden la membrana bajo el efecto de tumstatina y transferrina-tumstatina. Se usó VEGF (10 ng/ml) como quimioatrayente y demostró una invasión considerable de la membrana en ausencia de proteína tumstatina o transferrina-tumstatina.  
40 Sin embargo, se redujo el efecto de VEGF en la inducción de la membrana en presencia de cualquiera de las dos proteínas, aunque estaba presente VEGF. Esto indica la eficacia de la proteína tumstatina y transferrina-tumstatina en la reducción de la migración y la invasión celular incluso en presencia de estimulantes tales como VEGF.

La invasión se redujo significativamente por la proteína transferrina-tumstatina en comparación con la proteína  
45 tumstatina únicamente. El efecto de la proteína transferrina-tumstatina fue significativamente diferente de la tumstatina a las concentraciones de 15 y 125 nM ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, la diferencia no fue sustancialmente significativa a concentraciones mayores de 250 y 500 nM. Esto indica que se saturó la tendencia invasora (las células ya no son invasivas ni se ven atraídas hacia VEGF) y la invasión adicional no se vio afectada a concentraciones mayores. Este efecto es diferente al observado en la proliferación celular y en la formación de tubos  
50 estudiadas usando las dos proteínas. El bevacizumab mostró valores de  $CI_{50}$  inferiores de 8,0 nM en comparación con 12,14 nM para transferrina-tumstatina e indica una función importante de VEGF en la invasión celular.

Acoplamiento molecular: se prepararon modelos moleculares *in silico* para tumstatina y transferrina-tumstatina acopladas al receptor de integrina  $\alpha V\beta 3$ . Los valores de energía de las dos diferentes proteínas acopladas indicaron  
55 que el acoplamiento de transferrina-tumstatina (energía de interacción de -130,43 kcal/mol) es más favorable energéticamente que el acoplamiento de tumstatina (energía de interacción de -113,28 kcal/mol) en solitario.

Ensayo de apoptosis: se tomaron imágenes representativas (no mostradas) de células que muestran apoptosis bajo el efecto de tumstatina, transferrina-tumstatina y bevacizumab. La proteína tumstatina y transferrina-tumstatina  
60 inducían apoptosis en células endoteliales de la coroides a las tres concentraciones ensayadas (100, 250 y 500 nM y 1, 10 y 100 nM, respectivamente).

No se indujo apoptosis significativa por bevacizumab (concentraciones de 1, 10 y 100 nM) y fue similar a la observada en PBS de control.

Inducción de CNV en ratas pardas y preparaciones para microscopio de coroides:

Se descubrió que la transferrina-tumstatina era más eficaz en la reducción del área de lesión CNV inducida por láser en comparación con bevacizumab y tumstatina (figura 3). El tamaño de la lesión CNV se cuantificó al final de 14 días de tratamiento en preparaciones para microscopio de coroides. Se muestra una comparación cuantitativa del tamaño de lesión CNV en la figura 3 (\* indica  $p < 0,05$  en comparación con tratamiento con tumstatina. † indica  $p < 0,05$  en comparación con bevacizumab. Los datos se expresan como la media  $\pm$  D.T. para  $n=42-48$  lesiones en cada grupo). Las ratas tratadas con transferrina-tumstatina tenían un tamaño de lesión significativamente inferior en comparación con ratas tratadas con bevacizumab y tumstatina.

10

## Análisis

Algunos aspectos de la invención proporcionan una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina. Las proteínas recombinantes (en particular, proteína recombinante (por ejemplo, de fusión) transferrina-tumstatina) de la invención tienen unión potenciada a integrina  $\alpha V\beta 3$  y proliferación, migración y formación de tubos de células endoteliales inhibidas con una actividad 21, 25 y 31 veces mayor, respectivamente, respecto a tumstatina en solitario. Además, la transferrina-tumstatina demostró ser más eficaz en la inhibición de la proliferación de células endoteliales de la coroides y la formación de tubos en comparación con bevacizumab. Además, la proteína recombinante transferrina-tumstatina demostró una eficacia superior para inhibir CNV *in vivo* en comparación con transferrina en solitario. Otros aspectos de la invención proporcionan un sistema de expresión plasmídico que es capaz de producir una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina (es decir, proteína de fusión transferrina-tumstatina) como se define en la presente invención. En algunas realizaciones, el sistema de expresión plasmídico de la invención permite la secreción preferente de la proteína hacia el lado basolateral de monocapas de células confluyentes.

25

Los experimentos demostraron que la proteína recombinante de transferrina-tumstatina inhibía la proliferación de células endoteliales ( $CI_{50}$  de 5,97 nM) con una potencia 31 veces y 1,3 veces mayor que la tumstatina ( $CI_{50}$  de 185,7 nM) y bevacizumab ( $CI_{50}$  de 7,78 nM), respectivamente. Sin limitarse a teoría alguna, se cree que la eficacia 31 veces mayor de la transferrina-tumstatina sobre la tumstatina y la actividad 1,3 veces mejor sobre bevacizumab es el resultado de dos posibles mecanismos. En primer lugar, se cree que la transferrina mejoraba la eficacia de unión de la tumstatina al receptor de integrina  $\alpha V\beta 3$ . Usando modelado *in silico*, los autores de la presente invención han determinado que la transferrina tiene interacciones de unión con la integrina  $\alpha V\beta 3$ . El modelado *in silico* también demostró que la proteína de fusión mostraba una mejor energía de interacción que la tumstatina en solitario (-130,43 kcal/mol frente a -113,28 kcal/mol). El segundo mecanismo posible de la actividad mejorada de la proteína recombinante transferrina-tumstatina se cree que es la internalización de la proteína de fusión. Se observó que la transferrina-tumstatina se internaliza por las células endoteliales de la coroides. Esta internalización no era evidente para tumstatina.

30

35

Es posible que la transferrina-tumstatina también pueda estar actuando mediante una ruta que se activa únicamente después de la internalización. Otras proteínas antiangiogénicas endógenas tales como endostatina y angioestatina han demostrado formar complejos con proteínas que contienen RGD tales como fibronectina y vitronectina. La formación de complejos es esencial para la actividad de estas proteínas antiangiogénicas y se descubrió que estas proteínas son inactivas en ratones que carecen de fibronectina o vitronectina. La fibronectina se secreta por las células endoteliales en una cantidad significativa ( $\sim 3,0$  mg/ $10^5$  células/día), y una vez internalizada, la acumulación de proteínas que contienen RGD tal como fibronectina en el citoplasma de la célula induce apoptosis. Por tanto, es posible que la fusión de la transferrina a tumstatina aumente el contenido citoplasmático de proteínas que contienen RGD tales como fibronectina, causando de ese modo la apoptosis de las células. Esto posiblemente no es importante para la tumstatina ya que no mostró ningún signo de internalización en los experimentos. Para la tumstatina, se cree que su unión a la integrina  $\alpha V\beta 3$  es el mecanismo principal de acción.

50

De nuevo, sin limitarse a teoría alguna, se cree que la proteína recombinante de transferrina-tumstatina inhibe la proliferación celular inhibiendo la síntesis de proteínas e induciendo la apoptosis, similar a la tumstatina en solitario. Los autores de la presente invención han observado una mayor actividad antiapoptótica para la proteína recombinante transferrina-tumstatina que para tumstatina en solitario. Bevacizumab no ejercía ninguna actividad apoptótica observable en células endoteliales de la coroides. Se ha informado previamente para bevacizumab de ausencia de actividad apoptótica en células endoteliales de la córnea, células del ganglio retiniano y cultivos de retina-RPE-coroides.

55

Los experimentos demostraron que la proteína recombinante de transferrina-tumstatina inhibía la formación de tubos en células endoteliales de la coroides con una eficacia 25 veces mayor que la tumstatina en solitario. Se cree que la internalización de la proteína recombinante de transferrina-tumstatina da lugar a la formación de complejos de transferrina-tumstatina y fibronectina que puede unirse a otras células endoteliales activadas más fuertemente y evitar la formación de tubos. Bevacizumab no mostró ninguna inhibición apreciable de formación de tubos en células endoteliales de la coroides. En general se cree que la formación de tubos se produce bajo el efecto de colágeno IV, VIII, XV, XVIII y laminina 8 y 10, que están presentes en la membrana basal. Estos componentes tienden a promover

65

la estabilidad, la adhesión y la migración de las células endoteliales. Los factores de crecimiento tales como VEGF también están presentes en la matriz de membrana basal. Sin embargo, el VEGF no parece desempeñar una función importante en la formación de tubos, ya que la formación de tubos se produce con una alta eficacia incluso en presencia de bevacizumab, que se sabe actúa neutralizando VEGF en la matriz extracelular.

5 Se cree que, durante la angiogénesis, después de la degradación de la membrana basal, las células endoteliales migran a una matriz de tipo membrana basal provisional. Se sabe que VEGF desempeña una función importante en la migración de las células endoteliales, y los autores de la presente invención han estudiado este proceso usando un ensayo de migración celular en cámara de Boyden. Uno de los fines de este ensayo fue evaluar el impacto de  
10 VEGF sobre la invasión de la membrana basal por células endoteliales que van más allá para formar vasos sanguíneos. La migración celular bajo el efecto de 10 ng/ml de VEGF fue significativamente inferior cuando se usaba proteína recombinante transferrina-tumstatina que cuando se usaba tumstatina en solitario. Se ha demostrado que la tumstatina inhibe la fosforilación de la cinasa de adhesión focal (FAK). La ausencia de activación de FAK finalmente da lugar a la inhibición de la migración celular. se cree que la proteína recombinante transferrina-tumstatina ejerce  
15 efectos similares, aunque a un mayor grado.

Otra ventaja principal de fusionar la transferrina a tumstatina es la secreción basolateral preferente de la proteína de fusión. Casi un 75 % de la proteína recombinante transferrina-tumstatina se secretaba hacia el lado basolateral de la célula en comparación con únicamente ~35 % de la proteína tumstatina en solitario. Esto proporciona una proteína  
20 recombinante transferrina-tumstatina con la capacidad de abordar las células endoteliales de la coroides en proliferación después del suministro de fármaco intravítreo. Después del suministro intravítreo de agentes terapéuticos, las células RPE actúan como barrera para el movimiento adicional de los agentes terapéuticos debido a la naturaleza de las uniones ocluyentes de estas células. La transferrina-tumstatina es ventajosa sobre la tumstatina o bevacizumab en virtud de su naturaleza de secreción basolateral. La transferrina-tumstatina  
25 administrada de forma intravítrea sitúa la tumstatina hacia las células endoteliales de la coroides y en cercana proximidad al sitio de la enfermedad.

Los estudios *in vivo* indicaron la eficacia superior de la transferrina-tumstatina en la inhibición de la neovascularización coroidea. El tamaño de la lesión en ojos de ratas BN tratadas con transferrina-tumstatina fue  
30 significativamente inferior en comparación con ratas tratadas con bevacizumab o tumstatina.

Estos resultados indican que la transferrina-tumstatina es un agente terapéutico mejor que bevacizumab, porque entre otras cosas (a) la transferrina-tumstatina es un mejor inhibidor de la proliferación celular que bevacizumab, (b) la transferrina-tumstatina induce la apoptosis celular en células endoteliales de la coroides, que está ausente con  
35 bevacizumab, (c) la transferrina-tumstatina inhibe la formación de tubos, mientras que bevacizumab es ineficaz en la inhibición de la formación de tubos. En comparación con la tumstatina en solitario, la transferrina-tumstatina ejerce una potencia de  $\geq 20$  veces en todos los ensayos *in vitro* usados para evaluar la neovascularización. De forma más significativa, la transferrina-tumstatina fue más eficaz *in vivo* en la reducción de CNV inducida por láser en comparación con bevacizumab y tumstatina.

40 Ejemplo 2

Producción y purificación de proteína Tf-T: el vector PSecTag2B usado para construir los plásmidos tiene una marca de seis histidinas que ayuda en la purificación de la proteína secretada en el medio. Se cultivaron células  
45 ARPE (pase n.º 24) en una placa de 12 hasta una confluencia de un 80 %. El plásmido de Tf-T (transferrina-tumstatina) amplificado (clonado en el vector PSecTag2B) se diluyó en medio DMEM/F12 y se mezcló con reactivo lipofectamine. El complejo de plásmido y lipofectamine se añadió a cada pocillo que contenía células y medio. El complejo se mezcló suavemente por balanceo de los pocillos de detrás hacia delante. Las células se incubaron a 37 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 24 horas. Al final de las 24 horas, se recogió el medio y se purificó.  
50 Se usó resina de afinidad por metales TALON® para purificar la proteína de fusión. El medio recogido de las células se mezcló con la resina y se incubó durante minutos a temperatura ambiente con agitación suave. La proteína unida a la resina se eluyó usando una solución acuosa de fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 300 mM e imidazol 150 mM a pH 7,0. Después, se retiró el imidazol de la solución de proteína por diálisis (usando una bolsa de diálisis de 2000 PCPM) frente a un tampón similar sin imidazol. Se usó el kit de ensayo de proteínas BCA® para estimar el  
55 contenido de proteínas. Se purificaron tres lotes diferentes como se describe y se evaluaron para la reproducibilidad usando electroforesis en gel con SDS PAGE), espectroscopia de fluorescencia y dicroísmo circular.

Para la electroforesis en gel, se mezclaron 5 µg de proteína con colorante de carga 4x y se hirvieron durante 5 minutos. Las muestras se ejecutaron en un gel de SDS-PAGE con gradiente de un 4-20 % (Bio-Rad, Hercules, CA).  
60 Se usó dicroísmo circular (CD) en la región del espectro UV lejano (190-250 nm) para estudiar la estructura secundaria de Tf-T y tumstatina. Los espectros CD se obtuvieron en un espectropolarímetro modelo 62 DS de AVIV (AVIV Biomedical, Inc., NJ). La solución de proteínas se transfirió a una celda de cuarzo de 1 mm de longitud de trayectoria y se situó en un portaceldas termostático. Los datos se recogieron a intervalos de 0,25 nm utilizando un ancho de banda de 2 nm. Se preparó una solución 100 nM de tumstatina y Tf-T en tampón fosfato 5 mM pH 7,4. La  
65 espectroscopia de fluorescencia se realizó excitando la proteína a 280 nm. El espectro de emisión se recogió de

longitudes de onda de 300-400 nm. El experimento se realizó en un lector de microplacas Spectramax M5 (Molecular Devices, LLC).

5 Caracterización de la proteína tumstatina y Tf-T: la caracterización de Tf-T se realizó usando electroforesis en gel con SDS (PAGE), cromatografía de exclusión por tamaño, dicroísmo circular y dispersión de luz dinámica. Para la electroforesis en gel, se mezclaron 5 µg de proteína con colorante de carga 4x y se hirieron durante 5 minutos. Las muestras se ejecutaron en gel de SDS-PAGE con gradiente de un 4-20 % (Bio-Rad, Hercules, CA). La SEC se realizó usando una columna Agilent SEC-3 (D.I. 7,8 mm y 300 mm de longitud). El caudal de las muestras inyectadas fue de 2 ml/minuto. El volumen de muestra inyectado fue de 25 µl. La fase móvil usada para SEC fue  
10 solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4.

Se usó CD en la región espectral de UV lejano para estudiar la estructura secundaria de Tf-T y tumstatina. Los espectros CD se obtuvieron en un espectropolarímetro modelo 62 DS de AVIV (AVIV Biomedical, Inc., NJ). La solución de proteína se transfirió a una celda de cuarzo de 1 mm de longitud de trayectoria y se situó en un  
15 portaceldas termostático. Los datos se recogieron a intervalos de 0,25 nm utilizando un ancho de banda de 2 nm. Se usó Malvern Nanosizer para evaluar el tamaño de partículas de una solución de 1 mg/ml de tumstatina y Tf-T.

Secreción de tumstatina y la proteína de fusión Tf-T: para el estudio de secreción de proteínas, se eligió una monocapa de células RPE para evaluar el patrón de secreción de Tf-T. Inicialmente, las células se caracterizaron  
20 para su resistencia eléctrica, la formación de uniones ocluyentes y el patrón de tinción nuclear. Las células RPE se sembraron en filtros transwell y se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) usando un medidor de resistencia EVOM® (World Precision Instruments, CA). Cuando la TEER fue > 200 Ω.cm<sup>2</sup>, también se confirmó la formación de uniones ocluyentes por tinción ZO-1. Los filtros con las células que tenían una TEER > 200 Ω.cm<sup>2</sup> se fijaron durante 30 minutos a temperatura ambiente por la adición de formalina a un 10 % (0,5 ml en el lado apical y  
25 1,5 ml en lado basolateral). Las células se permeabilizaron adicionalmente añadiendo triton X 100 a un 0,1 % que contenía suero de cabra a un 5 % (0,5 ml en el lado apical) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió anticuerpo ZO1 primario (0,5 ml en el lado apical), diluido a diluciones 1:100, a las células y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario marcado con FITC (0,5 ml en el lado apical), diluido a diluciones 1:100, se añadió a las células y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se  
30 incubaron con 3 µg/ml de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) durante 5 minutos para teñir los núcleos. Los filtros se cortaron con una cuchilla afilada y se transfirieron a un portaobjetos de vidrio, se fijaron añadiendo medio de montaje SuperMount (BioGenex, CA) y se visualizaron en un microscopio confocal.

Para evaluar el patrón de secreción, las células se incubaron con 200 µg de tumstatina o proteína Tf-T en el lado  
35 apical. Después de 24 horas de transfección, se recogió el medio tanto del lado basolateral como del lado apical por separado y se purificó usando resina de afinidad por metales TALON. Se cuantificaron las proteínas tumstatina y Tf-T usando un kit de ensayo de proteínas BCA®.

Estabilidad de la proteína Tf-T: la proteína Tf-T se evaluó para su estabilidad en (a) tampones de pH 4,0 y 8,0, (b)  
40 tampón tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y fosfato citrato a pH 7,0, y (c) fuerzas iónicas que varían de 10 mM a 250 mM de cloruro de sodio a pH 7,0. Las soluciones de proteínas se expusieron a las condiciones mencionadas durante 48 horas y se evaluó la estabilidad usando dicroísmo circular y espectroscopia de fluorescencia. Se usó SDS PAGE además de dicroísmo circular y espectroscopia de fluorescencia para evaluar la estabilidad del pH.

45 Estudios de eficacia en un momento precoz en ratas pardas con CNV inducida:

Se adquirieron ratas pardas (BN) macho adultas (150-180 g) de Harlan Sprague Dawley Inc. (Indianapolis, IN, EE.  
UU.). las ratas se anestesiaron usando una inyección intraperitoneal de mezcla de 40-80 mg/ml de quetamina y 10-  
50 12 mg/kg de xilazina. La inducción de quemaduras por láser se realizó como se describe en el ejemplo 1. Se permitió que las lesiones CNV se desarrollara durante 7 días después de la inducción de las quemaduras por láser. Al final de los 7 días, a las ratas se les administró uno de los siguientes tratamientos por vía intravítrea, (a) PBS pH 7,4, (b) bevacizumab o (c) proteína Tf-T. el desarrollo de lesiones CNV antes y después del tratamiento se controló usando angiografía con fluoresceína. Para la angiografía con fluoresceína, las ratas se anestesiaron, se dilataron las pupilas por administración tópica de solución de tropicamida a un 1 % y se administraron 200 µl de fluoresceína de  
55 sodio a un 1 % a las ratas a través de la vena de la cola. Inmediatamente se controló la filtración de las lesiones usando una cámara del fondo Genesis Df (Kowa Optimed Inc, CA). Las áreas de CNV se obtuvieron usando el software ImageJ.

Resultados

60 Producción y purificación de la proteína Tf-T: se obtuvieron bandas individuales de proteína Tf-T de 100 kDa en los tres lotes de Tf-T preparados y ensayados. La Tf-T producida por el método descrito tuvo espectros de fluorescencia y dicroísmo circular similares.

65

Caracterización de la proteína tumstatina y Tf-T: una única banda a 100 kDa y 28 kDa en SDS PAGE y un pico en SEC demostraron la pureza de Tf-T y de tumstatina. El tamaño de partícula para Tf-T 8,0 nm con un índice de polidispersidad (PDI) de 0,414. El tamaño de partícula de tumstatina fue 3,9 nm con un PDI de 0,359. La exploración CD de los espectros de dicroísmo circular de Tf-T indicó que Tf-T tiene una mayoría de láminas  $\beta$  y giros (~60 %) junto con la presencia de hélices- $\alpha$  también (~32 %). La estructura de la tumstatina también es rica en laminas  $\beta$  y giros (~50 %). Sin embargo, la tumstatina tiene menos hélices- $\alpha$  (~16 %) y tiene más de una estructura enrollada de forma aleatoria (~40 %). Por lo tanto, los espectros de dicroísmo circular son diferentes para ambas proteínas.

Secreción de la proteína de fusión Tf-T: las células RPE formaban uniones ocluyentes cuando se cultivaban en un filtro transwell durante 4 semanas. La formación de uniones ocluyentes también se confirmó por la tinción de la proteína ZO-1. Las células RPE mostraron un claro patrón de tinción para ZO-1 y esbozaban la forma poligonal uniforme de las células RPE dentro de la monocapa. Después de la exposición apical de las proteínas, las células RPE secretaron 126,8  $\mu\text{g/ml}$  de proteína Tf-T al lado basolateral. Por el contrario, se secretaron únicamente 12,3  $\mu\text{g/ml}$  de tumstatina hacia el lado basolateral.

Estabilidad de la proteína Tft: se descubrió que Tf-T era más estable a pH 7,0. El SDS PAGE demostró que la intensidad de bandas disminuye a pH 4-6 en comparación con la Tf-T de control, lo que indica degradación de la proteína. Además, la fluorescencia y el dicroísmo circular indicaron una disminución en la señal a todos los valores de pH excepto a pH 7,0. Como se encontró que la proteína era más estable a pH 7,0, se realizaron estudios de estabilidad adicionales (fuerza iónica y tampón) a pH 7,0.

Se obtuvieron los espectros de fluorescencia y dicroísmo circular de Tf-T expuesta a NaCl 10 mM a 250 mM en tampón fosfato citrato y TRIS. La Tf-T no mostró efectos de cambios de fuerza iónica en presencia de tampón fosfato citrato. Sin embargo, se redujo la señal de Tf-T en presencia de NaCl 250 mM y tampón TRIS. Por tanto, el tampón fosfato citrato es más adecuado para la proteína.

Estudios de eficacia en un momento precoz en ratas pardas con CNV inducida:

Cuando se inició el tratamiento en un momento precoz (7 días después de la inducción de CNV) las ratas tratadas con Tf-T obtuvieron un tamaño de lesión inferior en comparación con las ratas tratadas con bevacizumab. Esto indica que Tf-T es eficaz como tratamiento preventivo para la neovascularización coroidea.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Regents of the University of Colorado, a body corporate Kompella, Uday B  
Scheinman, Robert I  
Tyagi, Puneet

<120> Proteína de fusión de transferrina-tumstatina y métodos para producir y usar la misma

<130> CU-006910PC

<150> US 61/524.508

<151> 17-08-2011

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fragmento de transferrina

<400> 1

Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu  
1 5

60

<210> 2

<211> 11

ES 2 659 161 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Fragmento de transferrina  
 <400> 2

Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys  
 1 5 10

10 <210> 3  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Fragmento de transferrina  
 <400> 3

Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu Cys Leu  
 1 5 10

25 <210> 4  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Fragmento de transferrina  
 <400> 4

Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu Cys Leu  
 1 5 10

35 <210> 5  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Fragmento de transferrina  
 <400> 5

Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu Cys Leu Ala Val  
 1 5 10

45 <210> 6  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Fragmento de transferrina  
 <400> 6

ES 2 659 161 T3

Gly Ala Leu Leu Val Cys Ala Val Leu Gly Leu Cys Leu Ala Val  
 1 5 10 15

5 <210> 7  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Fragmento de transferrina  
 <400> 7

Met Arg Leu Ala Val Gly Ala Leu Leu Val Cys Leu Leu Val Cys Ala  
 1 5 10 15

Val Leu Gly Leu Cys Leu Ala Val  
 20

15 <210> 8  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Fragmento de transferrina  
 <400> 8

Gly Phe Gln Asn Leu Asn Ile Gly Cys Leu Lys Glu Lys Ala Val Ala  
 1 5 10 15

25 <210> 9  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Parte de transferrina  
 35 <400> 9

Leu Leu Cys Thr Arg Asp Glu Ile Leu Thr Glu Lys Leu Glu Trp Cys  
 1 5 10 15

Ile Asn Glu Ala Asp Leu Val Pro Glu Asn Tyr  
 20 25

40 <210> 10  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Parte de transferrina  
 <400> 10

ES 2 659 161 T3

Pro Arg Lys Pro Leu Glu Lys Ala Val  
1 5

5 <210> 11  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Parte de transferrina  
<400> 11

Tyr Ser Asn Ser Gly  
1 5

15 <210> 12  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Péptido artificial  
<400> 12

Thr Met Pro Phe Leu Phe Cys Asn Val Asn His Val Cys Asn Phe Ala  
1 5 10 15

25 Ser Arg Asn His Tyr Ser Tyr Trp Leu  
20 25

30 <210> 13  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Péptido artificial  
<400> 13

Thr Met Pro Phe Leu Phe Cys Asn Val Asn Asp Val Cys Asn Phe Arg  
1 5 10 15

Ser Arg Asn Asp Tyr Ser Tyr Trp Leu  
20 25

40 <210> 14  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Péptido artificial  
<400> 14

ES 2 659 161 T3

Thr Met Pro Phe Leu Phe Cys Asn Val Asn Asp Val Cys Asn Phe Ala  
 1 5 10 15

Ser Arg Asn Asp Tyr Ser Tyr Trp Arg  
 20 25

5 <210> 15  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido artificial  
 <400> 15

Cys Asn Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Ser Phe Trp Leu Arg Ser Leu Asn  
 1 5 10 15

Pro Glu Arg

15 <210> 16  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido artificial  
 <400> 16

Cys Asn Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Ser Phe Trp Leu Ala Ser Arg Asn  
 1 5 10 15

Pro Glu Arg

25 <210> 17  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido artificial

35 <400> 17  
 cgatggatcc gcaacctgga caacgagagg ctt 33

40 <210> 18  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido artificial

45 <400> 18  
 cgatctcgag agtgtctttt cttcatgcac acc 33

# ES 2 659 161 T3

5  
<210> 19  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido artificial

10  
<400> 19  
atcgataagc ttgtgagca agggcgagga gc 32

15  
<210> 20  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido artificial

20  
<400> 20  
atcgatggat ccctgtaca gctogtccat gc 32

25  
<210> 21  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido artificial

30  
<400> 21  
agtcgctagc atgaggctcg ccgtgggagc cc 32

35  
<210> 22  
<211> 41  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido artificial

40  
<400> 22  
agtcgcgcc ggctgggcca ggtctacgga aagtcaggc t 41

45

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina.
- 5 2. La proteína recombinante de la reivindicación 1, en la que la transferrina y la tumstatina están unidas directamente entre sí.
3. La proteína recombinante de la reivindicación 1, en la que la transferrina y la tumstatina están unidas covalentemente entre sí a través de un conector.
- 10 4. Un plásmido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina de acuerdo con la reivindicación 1.
5. El plásmido de la reivindicación 4, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína recombinante está unida operativamente a una secuencia de control de la expresión.
- 15 6. Una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina de acuerdo con la reivindicación 1.
- 20 7. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 6, en la que la secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a una secuencia de control de la expresión.
8. Una célula hospedadora recombinante que está transfectada y expresa la molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina de acuerdo con la reivindicación 6.
- 25 9. Un procedimiento para producir una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo dicho procedimiento:
  - 30 transfectar una célula hospedadora recombinante con una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina de acuerdo con la reivindicación 6;
  - cultivar la célula hospedadora transfectada en condiciones suficientes para producir la proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina; y
  - 35 recuperar la proteína recombinante como una proteína recombinante sustancialmente purificada.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la proteína recombinante comprende transferrina que está unida directamente a tumstatina de acuerdo con la reivindicación 2.
- 40 11. Una proteína recombinante que comprende transferrina que está unida a tumstatina como se define en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una afección clínica asociada con neovascularización coroidea (CNV).
12. La proteína recombinante como se define en la reivindicación 1 para su uso como se define en la reivindicación 45 11, en la que la afección clínica asociada con CNV comprende pseudoxantoma elástico, estrías angioides, histoplasmosis, corioidopatía interna intermitente o degeneración macular senil húmeda.

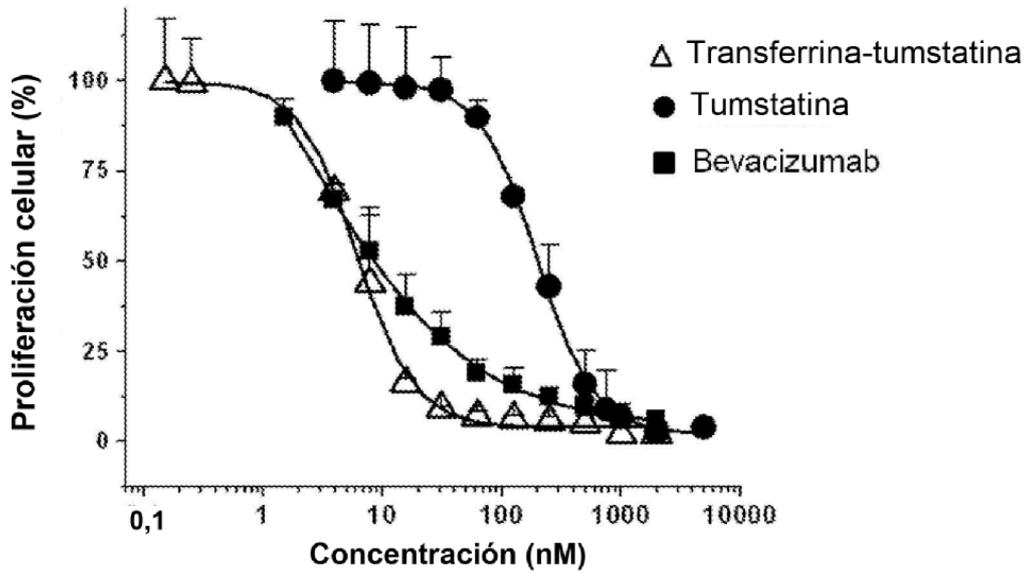


FIGURA 1

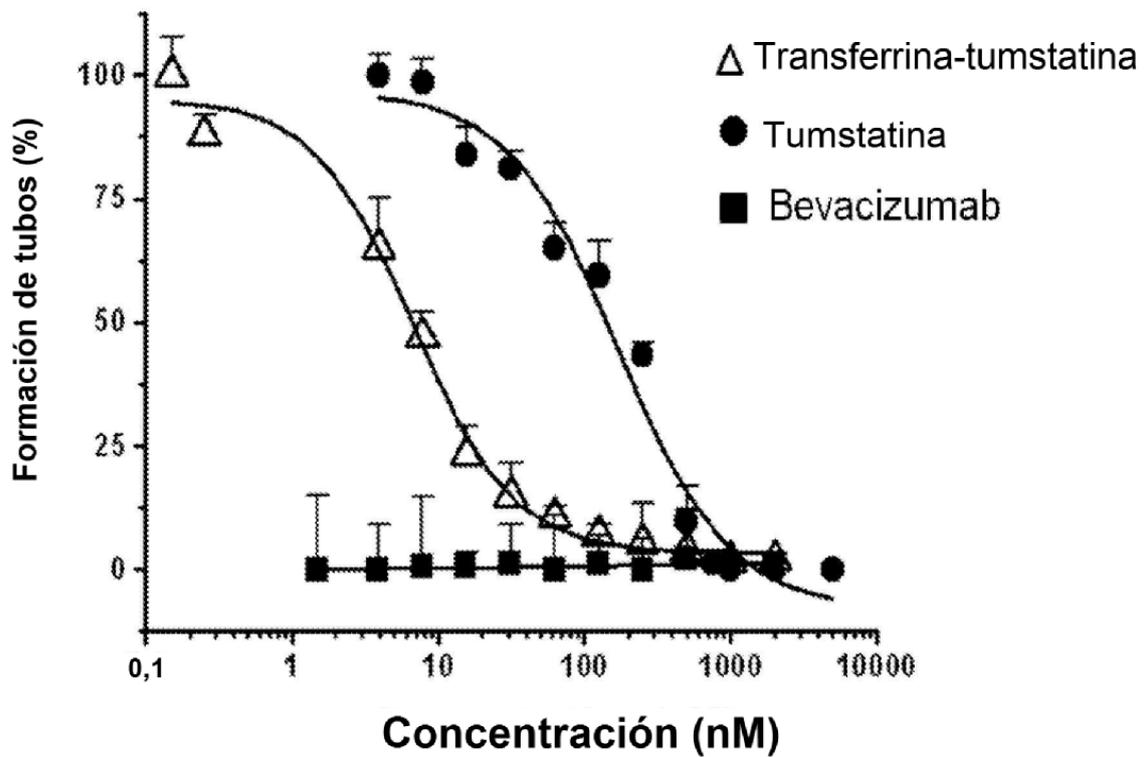


FIGURA 2

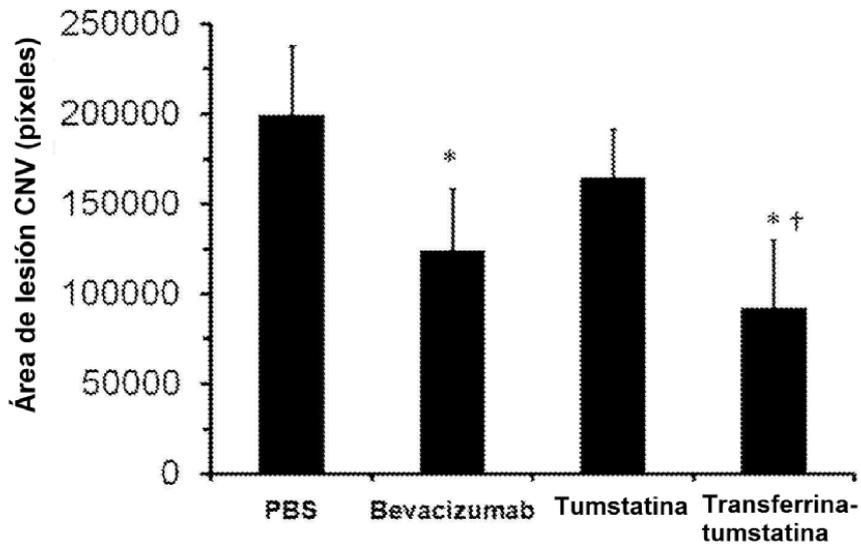


FIGURA 3

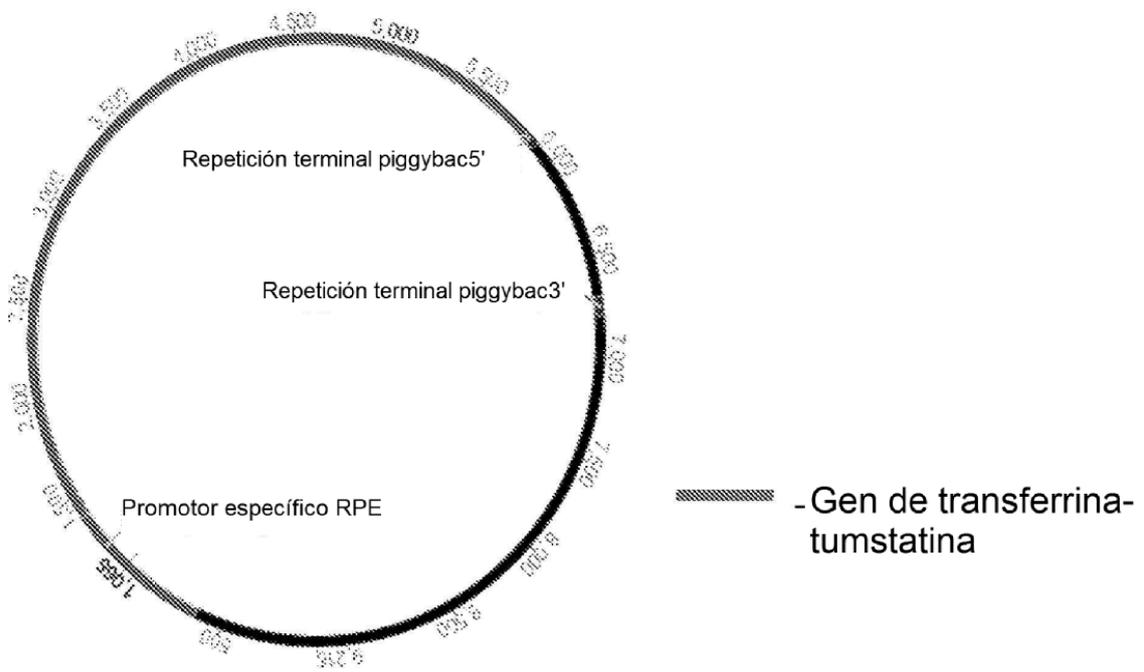


FIGURA 4

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- US 61524508 A [0001]
- US 61524508 B [0093]

**Literatura diferente de patentes citada en la descripción**

- **HOLTKAMP et al.** *Clin Exp Immunol.*, 1998, vol. 112 (1), 34-43 [0027]
- **SONODA et al.** *AGING*, 2010, vol. 2 (1), 28-42 [0027]
- **EIKESDAL et al.** *PNAS*, 2008, vol. 105 (39), 15040-15045 [0033]
- **THEVENARD et al.** *Int. J. Cancer*, 2010, vol. 126, 1055-1066 [0033]