

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 224**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/515 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2012 PCT/US2012/051412**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013 WO13028541**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2012 E 12826108 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2744508**

54 Título: **Proteína de unión a VEGF para el bloqueo de la angiogénesis**

30 Prioridad:

19.08.2011 US 201161525278 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.04.2018

73 Titular/es:

**CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION (33.3%)
55 Shattuck Street
Boston, MA 02115, US;
PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE (33.3%) y
THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CARTER, BOB;
LEE, JENG-SHIN;
BULLAIN, SZOFIA S. y
MULLIGAN, RICHARD C.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 664 224 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 unión a VEGF para el bloqueo de la angiogénesis

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con la angiogénesis.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El factor de crecimiento endotélico vascular (VEGF) es un inductor mitogénico y angiogénico específico de las células endoteliales que media su efecto a través de al menos dos tirosina cinasas receptoras que se unen con alta afinidad, Flt-1 y KDR, que son expresadas solamente en la superficie de células endoteliales vasculares. Flt-1 es necesaria para la morfogénesis de las células endoteliales, mientras que KDR está implicada principalmente con la mitogénesis. Estudios de desactivación génica de genes han mostrado que tanto Flt-1 como KDR son esenciales para el desarrollo normal del sistema vascular de los mamíferos, a pesar de sus diferentes papeles respectivos en la proliferación y diferenciación de células endoteliales. Ambas tirosina cinasas receptoras Flt-1 y KDR tienen siete dominios similares a inmunoglobulinas (similares a Ig), que forman las regiones de unión a ligandos extracelulares de los receptores, un dominio transmembránico, y un dominio de tirosina cinasa catalítico intracelular.

15 VEGF desempeña un papel crítico durante la angiogénesis embrionaria normal, y también en el desarrollo patológico de nuevos vasos sanguíneos en un número de enfermedades que incluyen cáncer y en angiogénesis aberrante, tal como hemangiomas. Los tumores sólidos usan vasos sanguíneos para obtener oxígeno y nutrientes y eliminar materiales de desecho. Además, estos tumores producen factores estrómicos que inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos para apoyar el crecimiento continuado de los tumores. Por lo tanto, un enfoque antiangiogénico representa una opción terapéutica atractiva y factible contra el cáncer, por ejemplo inhibiendo la ruta de señalización de VEGF.

Una estrategia para bloquear la ruta de señalización de VEGF es secuestrar poco a poco VEGF sérico circulante usando proteínas que se unen a VEGF. Las proteínas que se unen a VEGF sirven como receptores señuelo que trabajan para reducir la cantidad de ligando de VEGF circulante. Las proteínas que se unen a VEGF incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanizados, receptores de VEGF solubles, o moléculas trampa de VEGF quiméricas. Se han descrito trampas de VEGF quiméricas que contienen de dos a siete de los dominios extracelulares similares a Ig en diversas combinaciones (Holash J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002, 99:11393-98; Davis-Smyth T. et. al. EMBO 1996, 15:4919-4927; US 6.100.071; US 7.087.411); estas trampas de VEGF no son óptimamente eficaces debido a que varían en sus tamaños moleculares, afinidad de unión a VEGF, actividad antitumoral, y farmacocinética *in vivo*. El documento US2010331250 (A1) describe proteínas de fusión contra la angiogénesis. Estas trampas de VEGF se administran actualmente de forma sistémica, y se requieren múltiples administraciones a fin de mantener un suministro sostenido para que las trampas de VEGF sean terapéuticamente eficaces. Se ha intentado un enfoque de terapia génica para el suministro sostenido de trampas de VEGF usando adenovirus, pero el método ha estado obstaculizado por problemas de toxicidad tisular y baja expresión del transgén.

SUMARIO

La invención se refiere a una proteína quimérica de unión a VEGF que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

Se describe que una proteína quimérica que comprende un único dominio similar a inmunoglobulina (similar a Ig) derivado de la tirosina cinasa receptora del factor de crecimiento endotelial vascular Flt-1 y la región constante del fragmento cristizable (Fc) de una inmunoglobulina tiene una potente actividad antitumoral en modelos de múltiples tumores. Tal proteína quimérica de unión a VEGF inhibe eficazmente el crecimiento tumoral *in vivo*. La proteína quimérica que se une a VEGF se puede suministrar eficazmente vía inyección intramuscular de virus adenoasociado que expresa la proteína.

45 En un aspecto, se proporciona una proteína quimérica que se une a VEGF, que comprende una primera porción y una segunda porción. La primera porción puede consistir, por ejemplo, en los aminoácidos 129-231 de la tirosina cinasa receptora flt-1 (número de acceso Genbank: BC039007, SEQ ID NO: 1), mientras que la segunda porción comprende una región Fc de inmunoglobulina G1 (por ejemplo, aminoácidos 247-473 del número de acceso Genbank BC092518, o los aminoácidos 243-469 de SEQ ID NO: 2).

50 Se describe que la proteína quimérica que se une a VEGF puede comprender además un péptido señal, que incluye, pero no se limita a, el péptido señal de la tirosina cinasa receptora flt-1 (SEQ ID NO:5).

Se describe que la región Fc de la inmunoglobulina G1 portada por el polipéptido quimérico puede ser una región Fc humana de la inmunoglobulina G1. Por ejemplo, la región Fc de la inmunoglobulina G1 puede comprender o consistir en los aminoácidos 247-473 de IgG1 (número de acceso Genbank: BC092518). En otro ejemplo, la región Fc de la inmunoglobulina G1 puede comprender o consistir en los aminoácidos 243-469 de SEQ ID NO: 2.

Se describe que la región Fc puede comprender un derivado inmunogénico reducido de una región Fc de la inmunoglobulina G1.

Se proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína quimérica que se une a VEGF del primer aspecto, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 Se proporciona un polinucleótido aislado que codifica una proteína quimérica de unión a VEGF del primer aspecto. El polinucleótido puede estar en forma de un vector recombinante que comprende el polinucleótido que codifica una proteína quimérica de unión a VEGF del primer aspecto. El vector recombinante puede ser un vector de expresión que es, por ejemplo, compatible con un sistema de expresión de proteína que usa células hospedantes que incluyen células de mamífero, células de insecto, células de levadura, células bacterianas y células vegetales. Se proporciona una célula hospedante que comprende tal vector de expresión recombinante. El vector puede ser un vector vírico, incluyendo, pero sin limitarse a, un vector de virus adenoasociado (AAV), o un vector lentivírico.

- 10 En otro aspecto, se proporcionan composiciones para el uso en métodos para tratar una enfermedad o trastorno angiogénico, comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que lo necesite un vector que comprende un polinucleótido aislado que codifica una proteína quimérica de unión a VEGF del primer aspecto, o administrar una composición farmacéutica que comprende una proteína quimérica de unión a VEGF del primer aspecto y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 15 Se proporcionan composiciones para el uso en métodos para tratar una enfermedad o trastorno angiogénico, comprendiendo los métodos administrar a un sujeto que lo necesite una composición farmacéutica que comprende una proteína quimérica de unión a VEGF, en la que la proteína quimérica de unión a VEGF comprende un dominio 2 similar a inmunoglobulina de un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular y una región Fc de inmunoglobulina G1 o un derivado inmunogénico reducido de tal región Fc. También se proporcionan métodos para usar una proteína quimérica de unión a VEGF que comprende un dominio 2 similar a inmunoglobulina de un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular y una región Fc de inmunoglobulina G1, o un derivado inmunogénico reducido de tal región Fc, en la fabricación para tratar una enfermedad o trastorno angiogénico en un sujeto. También se proporcionan proteínas quiméricas de unión a VEGF que comprenden un dominio 2 similar a inmunoglobulina de un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular y una región Fc de inmunoglobulina G1, o un derivado inmunogénico reducido de tal región Fc, para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno angiogénico en un sujeto.

- 20 En otro aspecto, se proporcionan métodos para producir una proteína quimérica de unión a VEGF del primer aspecto, comprendiendo los métodos introducir un vector recombinante que codifica tal proteína quimérica de unión a VEGF en una célula hospedante aislada, hacer crecer o mantener la célula en condiciones que permitan la producción de la proteína quimérica, y recuperar la proteína quimérica así producida.

- 25 Se proporcionan composiciones para uso en un método de tratamiento del cáncer, en el que dicho cáncer se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en glioma, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, hemangioma y astrocitoma.

30 Se proporcionan composiciones para el uso en métodos para tratar degeneración macular relacionada con la edad, degeneración macular húmeda, y retinopatía diabética.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 40 Figura 1. Construcción de una proteína modificada VEGF-Trap para aplicaciones de terapia génica. Vegf-Trap 1 (VT1) se construyó como se describe por Holash et al. (1). Vegf-Trap 3 (VT3) se construyó de forma similar uniendo el segundo dominio similar a Ig de Flt-1 a Fc-hulgG₁. El constructo final codifica la secuencia señal del receptor 1 de VEGF (aminoácidos 1-26 de número de acceso Genbank BC039007) (SEQ. ID.No.1), el segundo dominio similar a Ig (aminoácidos 129-231 de número de acceso Genbank BC039007) (SEQ. ID.No.1) fusionado directamente a hulG1 (aminoácidos 247-473 de número de acceso Genbank BC092518).

- 45 Figura 2. Desglicosilación de VEGF-Trap 1 y VEGF-Trap 3 usando las enzimas PNGasa F, α -2(3,6,8,9)neuraminidasa y O-glicosidasa. SDS-PAGE (gel al 12%) seguido con tinción de Coomassie. Línea 1 y 4 Marcador de Peso Molecular de Glicoproteína CandyCane (Molecular Probes). Línea 2 VEGF-Trap 3. Línea 3 VEGF-Trap 3 después de desglicosilación. Línea 5 VEGF-Trap 1. Línea 6 VEGF-Trap 1 después de desglicosilación.

- 50 Figura 3. Concentraciones de VEGF-Trap 1 o VEGF-Trap 3 tras la infección de células 1.7E6 293T en cultivo. Las células se expusieron a AAV que codifica VEGF-Trap 1 o VEGF-Trap 3 en la multiplicidad de infección indicada.

- 55 Figura 4. Análisis de afinidad de unión de proteínas de unión a VEGF. De forma breve, se incubó una concentración fija de VEGF₁₆₅ humano (10 pM) toda la noche a temperatura ambiente con concentraciones variables (0,05 pM a 1000 pM) de proteínas que se unen a VEGF. 20 horas más tarde, la concentración de

VEGF₁₆₅ no unido se midió mediante ELISA. Las curvas de unión se ajustaron usando el software Prizm.

5 Figura 5. Análisis farmacocinético *in vivo* tras la inyección subcutánea de 100 µg de VEGF-Trap-1 o VEGF-Trap-3 en ratones Balb/C. Los ratones se sangraron a 1, 4, 6, 24, 48, 72, 120 horas después de la inyección. Los niveles de diversas proteínas que se unen a VEGF se midieron mediante ELISA usando como patrón proteínas purificadas VEGF-Trap.

10 Figura 6. Concentración plasmática de proteínas que se unen a VEGF tras la inyección de AAV. Ratones Nu/Nu se inyectaron intramuscularmente con vectores de AAV recombinantes que codifican VT1 o VT3. Los ratones se sangraron en los días 4, 7, 8, 10, 13, 15, 21, 23, 32, 66, 82, 93, 124 después de la inyección. La concentración plasmática de VT1 y VT3 se midió mediante ELISA usando VEGF₁₆₅ humano para la unión a VEGF-Trap, y anticuerpo contra IgG₁-Fc humana para detectar las proteínas capturadas.

15 Figura 7. Tratamiento de LLC con la proteína VEGF-Trap3. Se implantaron subcutáneamente células LLC en el dorso de ratones C57B1/J6 (n = 8). Los ratones se trataron sistémicamente con 0,025 mg, 0,1 mg o 0,5 mg de inyecciones s.c. de VT3 dos veces a la semana. Los ratones del control se trataron con PBS. El volumen tumoral se midió cada 2 a 4 días. Se indica T/C. VT1 no fue detectable hasta el día 23.

Figura 8. Tinción con CD31 de tumores de LLC tratados con tres niveles diferentes de dosificación de VEGF-Trap 3, en comparación con controles tratados con PBS. Se observa una reducción dependiente de la dosis en el número de vasos al incrementar los niveles de VEGF-Trap 3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

20 Como se usa aquí, la expresión “proteína quimérica de unión a VEGF” se refiere a una proteína que comprende una primera porción, consistiendo la primera porción en secciones de los dominios similares a Ig de la tirosina cinasa receptora Flt-1, y comprendiendo una segunda porción en una región Fc de la inmunoglobulina G1 o un derivado inmunogénico reducido de una región Fc de la inmunoglobulina G1. Las expresiones “proteína quimérica de unión a VEGF”, “proteína de unión a VEGF” y proteína “VEGF Trap” se usan aquí de forma intercambiable. Una proteína quimérica de unión a VEGF de este tipo se puede unir específicamente a VEGF según se mide en un ensayo como se describe aquí.

30 Como se usa aquí, la expresión “quimérica” describe que está compuesta de partes de proteína o ADN diferente de diferentes orígenes. Por ejemplo, una proteína quimérica de unión a VEGF está compuesta del dominio 2 similar a Ig de la proteína Flt-1, y la región Fc de una proteína inmunoglobulínica. De forma similar, un polinucleótido quimérico está compuesto de un fragmento de ADN que codifica el dominio 2 similar a Ig de la proteína Flt-1 y un fragmento de ADN que codifica la región Fc de una proteína inmunoglobulínica.

Como se usa aquí, la expresión “región Fc” se refiere a la región de fragmento cristalizante (región Fc) de un anticuerpo que contribuye a los dominios constantes de una inmunoglobulina.

35 Como se usa aquí, la expresión “derivado inmunogénico reducido de una región Fc” se refiere a una región Fc que contiene ciertas mutaciones de punto que hacen que la región Fc sea menos propensa a activar y provocar una respuesta inmune a la región Fc alterada al reducir la capacidad para unirse con el receptor de FcRγ1 en las células B y T. Un “derivado inmunogénico reducido de una región Fc” dispara menos del 70% de la respuesta del sistema inmune de una región Fc de tipo salvaje, y preferiblemente menos de 50%, 40%, 20%, 10% o menos con respecto a Fc de tipo salvaje.

40 El término “vector”, como se usa aquí, se refiere a un constructo de ácido nucleico diseñado para el suministro a una célula hospedante, o la transferencia entre diferentes células hospedantes. Como se usa aquí, un vector puede ser vírico o no vírico.

45 Como se usa aquí, la expresión “vector de expresión” se refiere a un vector que tiene la capacidad para incorporar y expresar fragmentos de ADN heterólogo en una célula. Un vector de expresión puede comprender elementos adicionales; por ejemplo, el vector de expresión puede tener dos sistemas de replicación, permitiéndole así que se mantengan dos organismos, por ejemplo en células humanas para la expresión y en un hospedante procarionota para la clonación y amplificación.

50 Como se usa aquí, la expresión “vector vírico” se refiere a un constructo de vector de ácido nucleico que incluye al menos un elemento de origen vírico y tiene la capacidad de ser empaquetado en una partícula de vector vírico. El vector vírico puede contener la secuencia codificante para una proteína de unión a VEGF en lugar de los genes víricos no esenciales. El vector y/o la partícula se pueden utilizar con el fin de transferir ADN, ARN u otros ácidos nucleicos a las células, ya sea *in vitro* o *in vivo*. En la técnica se conocen numerosas formas de vectores víricos.

La expresión “incompetente para la replicación”, como se usa aquí, significa que el vector vírico ya no puede replicar y empaquetar sus genomas. Por ejemplo, cuando las células de un sujeto se infectan con viriones de virus

adenoasociado recombinante (rAAV) incompetentes para la replicación, el gen heterólogo (también conocido como transgén) es expresado en las células del paciente, pero el rAAV es defectuoso en la replicación (por ejemplo, carece de genes accesorios que codifican proteínas esenciales del empaquetamiento del virus) y no se pueden formar en las células del paciente partículas víricas.

- 5 El término "gen" o "secuencia codificante" significa la secuencia de ácido nucleico que es transcrita (ADN) y traducida (ARNm) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se enlaza operablemente a secuencias reguladoras apropiadas. El gen puede incluir o no regiones que preceden y que siguen a la región codificante, por ejemplo no traducidas de 5' (5'UTR) o secuencias "líder", y 3' UTR o secuencias "trailer", así como secuencias intervinientes (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).
- 10 El término "recombinante", como se usa aquí con referencia a moléculas de ácido nucleico, se refiere a una combinación de moléculas de ácido nucleico que se unen juntas usando tecnología de ADN recombinante en una molécula de ácido nucleico progenie. Como se usa aquí con referencia a los virus, células y organismos, los términos "recombinante", "transformado", y "transgénico", se refieren a un virus, célula u organismo hospedante en el que se ha introducido una molécula de ácido nucleico heteróloga. La molécula de ácido nucleico se puede integrar de forma estable en el genoma del hospedante, o la molécula de ácido nucleico también puede estar presente como una molécula extracromosómica. Tal molécula extracromosómica puede ser autorreplicante. Se entiende que los virus, células y organismos recombinantes engloban no solo el producto final de un proceso de transformación, sino también su progenie recombinante. Un hospedante "no transformado", "no transgénico" o "no recombinante" se refiere a un virus, célula u organismo de tipo salvaje que no contiene la molécula de ácido nucleico heteróloga.
- 15
- 20 El término "angiogénesis", como se usa aquí, se refiere a la aparición de vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes, caracterizado por la proliferación de células endoteliales y la proliferación y migración de células que forman tubos. La angiogénesis puede ser accionada por ciertas condiciones patológicas, tales como el crecimiento de tumores sólidos y metástasis.
- Como se usa aquí, la expresión "enfermedad o trastorno angiogénico" se refiere a enfermedades o trastornos que son el resultado directo de la proliferación aberrante de vasos sanguíneos (por ejemplo, retinopatía diabética). La expresión también se refiere a una enfermedad o trastorno cuya progresión patológica depende de un suministro sanguíneo bueno y, de este modo, de la proliferación de vasos sanguíneos. La expresión "enfermedad o trastorno relacionado con la angiogénesis" y "enfermedad o trastorno angiogénico" se usan aquí de forma intercambiable.
- 25
- Como se usa aquí, el término "variante" se refiere a la proteína quimérica de unión a VEGF con uno o más cambios de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del polipéptido que retiene tanto actividad de unión a VEGF como actividad antiangiogénica. De este modo, la secuencia polipeptídica de un polipéptido quimérico variante de unión a VEGF varía de la de, por ejemplo, un constructo de SEQ. ID. No. 3.
- 30

Proteína quimérica de unión a VEGF

- 35 Las proteínas quiméricas de unión a VEGF como se describen aquí comprenden dos porciones: la primera porción consiste en los aminoácidos 129-231 de la tirosina cinasa receptora Flt-1 (número de acceso Genbank BC039007) (SEQ ID NO:1), y una segunda porción que comprende una región Fc de inmunoglobulina G1 humana. La segunda porción que comprende la región Fc puede incluir los aminoácidos 247-473 de IgG1 (número de acceso Genbank BC092518) o los aminoácidos 243-469 de SEQ ID NO: 2.

- 40 La secuencia de aminoácidos de una de tales proteínas quiméricas de unión a VEGF, también denominada aquí como VEGF-Trap 3 o VT3, es:

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNI
 TVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQNT
 IIDDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ. ID. NO. 3).

- 45 Las regiones extracelulares de las tirosina cinasas receptoras de VEGF Flt-1 y KDR son responsables de la unión al ligando VEGF. La región extracelular tiene siete dominios similares a inmunoglobulina (similares a Ig). La función de unión al ligando reside en los tres primeros dominios (Davis-Smyth T. et. al., 1996, J EMBO 15: 4919-4927; Barleon et. al., 1997, J. Biol. Chem. 272:10382-88; Cunningham et. al., 1997, Biochem. Biophys. Res. Comm. 231: 596-599; Wiesmann C. et. al., 1997, Cell 91:695-704). De estos siete dominios similares a Ig, se ha mostrado que el dominio 2 similar a Ig es esencial para la unión al ligando VEGF, aunque el dominio 2 similar a Ig (aminoácidos 134-226) solo no fue suficiente para la unión a VEGF *in vitro* (Davis-Smyth T. et. al., 1996, J EMBO 15: 4919-4927). Como se describe aquí, sorprendentemente, una región del dominio 2 similar a Ig de Flt-1 (aminoácidos 129-231) es esencial

y suficiente para la unión al ligando de VEGF *in vitro*. Este dominio 2 similar a Ig funciona eficazmente suprimiendo el crecimiento tumoral *in vivo*. Puesto que las dos tirosina cinasas receptoras de alta afinidad, Flt-1 y KDR, comparten un grado elevado de similitud e identidad de secuencia, los dominios 2 similares a Ig de Flt-1 y de KDR son intercambiables. Se describe una proteína quimérica de unión a VEGF que comprende el dominio 2 similar a Ig de KDR (aminoácidos 122-286 de KDR, número de acceso Genbank: NM002253, SEQ. ID. No. 6).

En un aspecto, una proteína quimérica de unión a VEGF comprende una primera porción, consistiendo la primera porción en los aminoácidos 129-231 de la tirosina cinasa receptora Flt-1 (SEQ ID No.: 1), y una segunda porción que comprende una región Fc de la inmunoglobulina G1, o un derivado inmunogénico reducido de una región Fc de la inmunoglobulina G1. La porción Fc de una inmunoglobulina tiene una semivida plasmática larga (Capon, et. al., 1989, Nature 337: 525-531). La fusión del dominio 2 similar a Ig único, ya sea de Flt-1 o de KDR, a la porción Fc de una inmunoglobulina servirá para mejorar *in vivo* la semivida plasmática y la farmacocinética del dominio 2 de IgG de unión a VEGF.

Se ha mostrado previamente que las proteínas quiméricas de Fc provocan una respuesta inflamatoria con el uso a largo plazo o a dosis elevadas, y especialmente cuando la quimera de Fc se usa terapéuticamente y la región Fc deriva de una fuente heteróloga diferente del receptor animal de la proteína quimérica de Fc. En un aspecto, la región Fc de inmunoglobulina usada en la proteína quimérica de unión a VEGF es un derivado inmunogénico reducido de una región Fc de IgG, y deriva de un ser humano. La actividad inmunogénica reducida resulta de una afinidad reducida por los receptores de Fc en las células B y T. Las regiones Fc del subtipo 4 de la inmunoglobulina G (IgG4) e IgG2 tienen una afinidad 10 veces menor y ninguna afinidad, respectivamente, por el receptor FcR γ 1. En un aspecto, la región Fc de IgG 4 e IgG2 se usa en la construcción de la proteína quimérica de unión a VEGF. En otro aspecto, la región Fc tiene ciertas mutaciones de punto que reducen además su afinidad por el receptor FcR γ 1, o que potencian la semivida sérica de la molécula de fusión de Fc. Por ejemplo, una mutación de serina a prolina en el resto 241 (numeración de kabat) en IgG4 da como resultado una semivida sérica incrementada de IgG4 (Angal S., et al., 1993, Mol. Immunol. 30:105-108). Una sustitución de leucina por glutamato en el resto 248 (numeración de kabat) en IgG2b disminuye la afinidad por el receptor FcR γ 1 (Canfield y Morrison, J Exp Med. 1991 Jun 1; 173(6):1483-91).

En otro aspecto, la proteína quimérica de unión a VEGF tiene mutaciones de punto de aminoácidos y/o sustituciones en el dominio 2 similar a Ig que potencian la afinidad de unión de la proteína quimérica de unión a VEGF por el ligando homodimérico de VEGF. Los ejemplos de tales mutaciones incluyen una sustitución de Glu 201 por Asp, Leu 205 por tirosina, triptófano que sustituye a Leu 169 en la hebra β c (Wiesmann C. et. al., 1997, Cell 91:695-704), y la sustitución de Tyr-220 y Arg-224 por aminoácidos hidrófobos tales como isoleucina y fenilalanina. En un aspecto, las formas variantes de la proteína quimérica de unión a VEGF pueden tener más de una mutación. En otro aspecto, se puede llevar a cabo una mutagénesis aleatoria o sistemática para crear una biblioteca de formas variantes de la proteína de unión a VEGF para el cribado de formas variantes con una mayor unión a VEGF. Park et. al. (J. Biol. Chem. 1994, 269:25646-54) y Holash J. et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002, 99:11393-98) describen ensayos de unión *in vitro* que se pueden llevar a cabo de forma habitual para determinar si una mutación particular en el dominio 2 similar a Ig afecta a la capacidad de unión al ligando VEGF. Una mayor afinidad de unión, como se usa la expresión aquí, se refiere a una disminución de 5% o mayor en K_d con respecto a la unión de tipo salvaje a VEGF.

En un aspecto, una proteína quimérica de unión a VEGF comprende un péptido señal en el término N. Este péptido señal es una cadena peptídica corta (3-60 aminoácidos de longitud) que dirige el transporte post-traduccional de una proteína. Se describe que el péptido señal debería guiar la secuencia de ADN que codifica la proteína quimérica de unión a VEGF para la cotraducción en el retículo endoplásmico y la secreción subsiguiente de la proteína traducida. El péptido señal puede ser el péptido señal H₂N-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln (SEQ. ID. No.: 4). La proteína quimérica de unión a VEGF puede comprender un péptido señal de la tirosina cinasa receptora Flt-1 (SEQ. ID. No.: 1), aminoácidos 1-26, Met-Val-Ser-Tyr-Trp-Asp-Thr-Gly-Val-Leu-Leu-Cys-Ala-Leu-Leu-Ser-Cys-Leu-Leu-Leu-Thr-Gly-Ser-Ser-Ser-Gly-Ser (SEQ. ID. No. 5). El péptido señal puede ser el de la tirosina cinasa receptora KDR (número de acceso Genbank NM_002253) (SEQ. ID. No. 6), aminoácidos 1-26, Met-Gln-Ser-Lys-Val-Leu-Leu-Ala-Val-Ala-Leu-Trp-Leu-Cys-Val-Glu-Thr-Arg-Ala-Ala-Ser-Val-Gly-Leu-Pro-Ser (SEQ. ID. No. 7). En un ejemplo preferido, una proteína quimérica de unión a VEGF, como se describe aquí, puede tener los siguientes fragmentos proteicos dispuestos en la orientación desde el término amino al carboxilo en el polipéptido: el péptido señal (aminoácidos 1-26) seguido del dominio 2 similar a Ig (aminoácidos 129-231) de la tirosina cinasa receptora Flt-1, y que termina con la región Fc (aminoácidos 247-473) de IgG1 humana.

Síntesis de secuencia codificante de ADN quimérica aislada para una proteína quimérica de unión a VEGF

Excepto que se indique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que el que tendrían para alguien de pericia en la técnica de la presente invención. Además, excepto que se requiera de otro modo por el contexto, los términos en singular incluirán plurales, y los términos plurales deberán incluir el singular.

El proceso de manipular mediante ingeniería genética la proteína quimérica, la secuencia de ADN codificante, los vectores de expresión, los vectores víricos, y la purificación de la expresión, se puede llevar a cabo mediante

técnicas convencionales de biología molecular recombinante y de bioquímica de proteínas, como las descritas en Maniatis et al. (Molecular Cloning - A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor, 1982) and DNA Cloning Vols I, II, and III (D. Glover ed., IRL Press Ltd.), Sambrook et al., (1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA), Current Protocols in Molecular Biology (CPMB) (Fred M. Ausubel et al. ed., John Wiley and Sons, Inc.) y Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, et al., ed., John Wiley and Sons, Inc.).

El término "aislado" se refiere a material, tal como un ácido nucleico o una proteína, que está: (1) sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interaccionan con el material como se encuentra en su entorno de origen natural, o (2) si el material está en su entorno natural, el material ha sido alterado mediante intervención humana deliberada hasta una composición, y/o ha sido colocado en un locus en la célula distinto del locus natural para el material.

Para generar una secuencia de ADN quimérica aislada que codifique la proteína quimérica de unión a VEGF, se pueden usar técnicas convencionales de clonación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Una secuencia de ADN quimérica se clona en un vector de clonación de fines generales tal como los vectores pUC 19, pBR322, pBluescript (Stratagene Inc.) o pCR TOPO® de Invitrogen Inc. El vector recombinante resultante que porta la secuencia de ADN quimérica aislada que codifica una proteína quimérica de unión a VEGF se puede usar entonces para manipulaciones de biología molecular adicionales, tales como mutagénesis dirigida al sitio, para mejorar la unión a VEGF y/o para reducir las propiedades inmunogénicas de la proteína quimérica, o se puede subclonar en vectores de expresión de proteínas o en vectores víricos para la síntesis de proteínas en una variedad de sistemas de expresión de proteínas usando células hospedantes seleccionadas del grupo que consiste en estirpes de células de mamíferos, estirpes de células de insectos, células de levaduras, de bacterias y vegetales.

Se describe aquí un polinucleótido aislado que codifica una proteína quimérica de unión a VEGF que comprende una primera porción, consistiendo la primera porción en los aminoácidos 129-231 de la tirosina cinasa receptora Flt-1 (SEQ ID No.: 1), y una segunda porción que comprende una región Fc de inmunoglobulina G1 o un derivado inmunogénico reducido de una región Fc de inmunoglobulina G1. El único ADN aislado que codifica la proteína quimérica de unión a VEGF está constituido de tres fragmentos de ADN distintos, codificando cada fragmento una parte individual de la proteína quimérica: el péptido señal, el dominio 2 similar a Ig de Flt-1, y la región Fc de una IgG. Se pueden usar tres pares de cebadores oligonucleotídicos de PCR específicos para amplificar mediante PCR los tres fragmentos de ADN distintos que corresponden a los aminoácidos 1-26 y 129-231 de la tirosina cinasa receptora Flt-1 (número de acceso Genbank BC039007) (SEQ ID No.: 1), y los aminoácidos 247-473 de IgG1 humana (número de acceso Genbank BC092518). Cada cebador de PCR debería tener al menos 15 nucleótidos que solapan con sus moldes correspondientes en la región a amplificar. La polimerasa usada en la amplificación por PCR debería tener una alta fidelidad, tal como la polimerasa *PfuUltra*™ de Stratagene, para reducir errores de secuencia durante el proceso de amplificación mediante PCR. Por facilidad para ligar juntos los tres fragmentos de PCR distintos e insertarlos entonces en un vector de clonación, los cebadores de PCR deberían tener también sitios de digestión mediante enzimas de restricción distintos y únicos en sus extremos de flaqueo que no se hibridan al molde de ADN durante la amplificación mediante PCR. La elección de los sitios de digestión mediante restricción para cada par de cebadores específicos debería de ser tal que el marco de lectura abierto de la secuencia de ADN quimérica esté en el marco y codificará la proteína quimérica de unión a VEGF predicha desde el comienzo hasta el final sin codones de parada. Al mismo tiempo, los sitios de digestión mediante restricción elegidos no deberían encontrarse en las secuencias codificantes de ADN que corresponden a los aminoácidos 1-26 y 129-231 de la tirosina cinasa receptora Flt-1 (SEQ. ID. No.:1), y los aminoácidos 247-473 de IgG1 humana (número de acceso Genbank BC092518). Se pueden usar técnicas convencionales de digestión mediante restricción y de ligación para insertar la secuencia codificante de ADN quimérica en un vector de clonación. Como alternativa, el ADN quimérico se puede ligar en un vector usando el método de clonación TOPO® en vectores de TA asistidos por topoisomerasas de Invitrogen, tales como pCR®-TOPO, pCR®-Blunt II-TOPO, pENTR/D-TOPO®, y pENTR/SD/D-TOPO®. Tanto pENTR/D-TOPO® como pENTR/SD/D-TOPO® son vectores de entrada TOPO direccionales que permiten la clonación de la secuencia de ADN de VEGF quimérica en la orientación 5' → 3' en un vector de expresión Gateway®. La clonación direccional en la orientación 5' → 3' facilita la inserción unidireccional de la secuencia de ADN de VEGF quimérica en un vector de expresión de proteína, de manera que el promotor está en dirección 5' del codón de inicio de 5' ATG de la secuencia de ADN de VEGF quimérica, permitiendo la expresión de la proteína conducida por el promotor. El vector recombinante que porta la secuencia de ADN de VEGF quimérica se puede transfectar en y propagar en *E. coli* de clonación general, tal como las células XL1Blue, SURE (Stratagene) y TOP-10 (Invitrogen).

Se proporciona un polinucleótido aislado que codifica una proteína quimérica de unión a VEGF. Un ejemplo de tal polinucleótido aislado es:

5'- Atggtgagctactgggacactgggggtgctgctgtgtgccctgctgagctgcctgctgctgactggcagcagctctggctctgacactggcagg
 ccctttgtggagatgactctgagatccctgagatcatccacatgactgagggcagggagctggtgatccctgcagagtgaccgcccaca
 tcactgtgacctgaagaagttccccctggacacctgatccctgatggcaagaggatcatctgggacagcaggaagggttcatcatcagcaa
 tggccactacaaggagattggcctgctgacctgtgaggccactgtgaatggccacctgtacaagaccaactacctgacccacaggaagacaa
 caccatcatcgatgacaaaactcacatgcccaccgtgccagcactgaactcctggggggaccgtcagcttctcttcccccaaaaccc
 aaggacacctcatgatctcccggacctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggicaagttcaactggtac
 tgggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagcccggggagagcagtagacaacagcagctaccgtgtggtcagcgtcctaccgtcc
 tgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctccagccccatcgagaaaaccatctccaaagcc
 aaaggcgagccccgagagccacaggtgtaccctgccccatcccggtgatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggta
 aagccttctatcccagcagatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctgactcc
 gacggctccttctctctacgaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcctgtagcatgaggtct
 gcacaaccactacagcagaagcctctccctgtctccggtaaatga-3' (SEQ. ID. No. 8).

Se puede usar la mutagénesis específica dirigida al sitio de la secuencia de ADN de VEGF quimérica en un vector para crear mutaciones y sustituciones específicas de aminoácidos en la porción Fc para reducir adicionalmente las propiedades inmunogénicas de la proteína quimérica eventual de unión a VEGF. Del mismo modo, se puede llevar a cabo la mutagénesis dirigida al sitio en el dominio 2 similar a Ig para mejorar la afinidad de unión a VEGF de la proteína quimérica de unión a VEGF. Los ejemplos de mutaciones de aminoácidos son la mutación de serina por prolina y una sustitución de leucina por glutamato en la región Fc. La mutagénesis dirigida al sitio se puede llevar a cabo usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio de QuikChange® de Stratagene, según las instrucciones del fabricante, o cualesquiera métodos conocidos en la técnica.

Vectores de expresión y sistemas de expresión para la expresión de proteína quimérica de unión a VEGF

Se proporcionan vectores de expresión que portan un polinucleótido que codifica una proteína quimérica de unión a VEGF para la expresión y purificación de la proteína quimérica recombinante de unión a VEGF producida a partir de un sistema de expresión de proteína usando células hospedantes seleccionadas, por ejemplo, de células de mamífero, de insecto, de levadura, bacterianas, o vegetales.

El vector recombinante que expresa una proteína quimérica de unión a VEGF puede ser un vector vírico. El vector vírico puede ser cualquier vector vírico conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos derivados de adenovirus, virus adenoasociado (AAV), retrovirus, y lentivirus. Los virus recombinantes proporcionan un sistema versátil para estudios de expresión génica y aplicaciones terapéuticas.

Se proporciona una célula hospedante que comprende un vector de expresión que expresa la proteína quimérica de unión a VEGF. La célula hospedante de expresión puede derivar de cualquiera de un número de fuentes, por ejemplo bacterias, tales como *E. coli*, levaduras, mamíferos, insectos, y células vegetales tales como *chymadomonas*. La proteína quimérica recombinante de unión a VEGF se puede producir a partir de vectores de expresión adecuados para sistemas de expresión libres de células. A partir del vector de clonación, la secuencia quimérica de ADN de VEGF se puede subclonar en un vector de expresión recombinante que es apropiado para la expresión de la proteína quimérica de unión a VEGF en células de mamífero, de insecto, de levadura, bacterianas, o vegetales, o un sistema de expresión libre de células tal como el sistema de expresión de reticulocitos de conejo. La subclonación se puede lograr mediante clonación por PCR, digestión mediante restricción seguido de ligación, o reacción de recombinación tal como aquellas de la recombinación específica del sitio a base del fago lambda que usa las mezclas de enzimas Gateway® LR y BP Clonase™. La subclonación debería ser unidireccional, de tal manera que el codón de inicio de 5' ATG de la secuencia quimérica de ADN de VEGF esté en dirección 3' del promotor en el vector de expresión. Como alternativa, cuando la secuencia quimérica de ADN de VEGF se clona en pENTR/D-TOPO®, pENTR/SD/D-TOPO® (vectores de entrada direccional), o cualquiera de los vectores de Invitrogen Gateway® Technology pENTR (entrada), la secuencia quimérica de ADN de VEGF se puede transferir a los diversos vectores de expresión Gateway® (destino) para la expresión proteica en células de mamífero, *E. coli*, insectos y levadura, respectivamente, en una única reacción de recombinación. Algunos de los vectores de destino Gateway® se diseñan para las construcciones de baculovirus, adenovirus, virus adenoasociado (AAV), retrovirus, y lentivirus, que, al infectar a sus células hospedantes respectivas, permiten la expresión heteróloga de la proteína quimérica de unión a VEGF en las células hospedantes. La tecnología Gateway® usa recombinación específica del sitio a base del fago lambda, en lugar de endonucleasa de restricción y ligasa para insertar un gen de interés en un vector de expresión. Las secuencias de recombinación de ADN (*attL*, *attR*, *attB*, y *attP*) y las mezclas enzimáticas LR y BP Clonase™ que median las reacciones de recombinación de lambda son la base de la tecnología Gateway®. La transferencia de un gen a un vector de destino se logra en solamente dos etapas: Etapa 1: Clonación de la secuencia de ADN quimérica en un vector de entrada tal como pENTR/D-TOPO®. Etapa 2: Mezclamiento del clon de entrada que contiene la secuencia de ADN quimérica *in vitro* con el vector de expresión Gateway® apropiado

(vector de destino) y la mezcla enzimática Gateway® LR Clonase™. Estos son vectores de expresión Gateway® para la expresión proteica en *E. coli*, células de insecto, células de mamífero, y levadura. La recombinación específica del sitio entre los sitios *att* (*attR* x *attL* y *attB* x *attP*) genera un vector de expresión y un subproducto. El vector de expresión contiene la secuencia de ADN quimérica recombinada en la cadena principal del vector de destino. Tras la transformación y selección en *E. coli*, el vector de expresión está listo para ser usado para la expresión en el hospedante apropiado.

El vector de expresión debería tener los elementos reguladores en dirección 5' de 5' y en dirección 3' de 3' necesarios tales como secuencias promotoras, la caja TATA de reconocimiento y unión al ribosoma, y la secuencia de terminación de la transcripción de 3' UTR AAUAAA para la transcripción y traducción génicas eficientes en su célula hospedante respectiva. El vector de expresión puede tener una secuencia adicional, tal como 6X-histidina, V5, tiorredoxina, glutationa-S-transferasa, c-Myc, VSV-G, HSV, FLAG, péptido de unión a maltosa, péptido de unión a metal, HA y señales de "secreción" (melitina de miel de abeja, factor α , *PHO*, Bip), que se incorporan en la proteína quimérica recombinante de unión a VEGF expresada. Además, puede haber sitios de digestión mediante enzimas incorporados después de estas secuencias, para facilitar su eliminación enzimática después de que ya no se necesitan. Estas secuencias adicionales son útiles para la detección de la expresión de la proteína quimérica de unión a VEGF, para la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad, para la solubilidad mejorada de la proteína recombinante en el citoplasma del hospedante, y/o para segregar la proteína quimérica recombinante de unión a VEGF expresada hacia fuera al medio de cultivo, en el periplasma de las bacterias procariontas, o el esferoplasto de las células de levadura. La expresión de la proteína quimérica recombinante de unión a VEGF puede ser constitutiva en las células hospedantes, o se puede inducir, por ejemplo, con sulfato de cobre, azúcares tales como galactosa, metanol, metilamina, tiamina, tetraciclina, infección con baculovirus, e (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) IPTG, un análogo sintético estable de lactosa.

Los ejemplos de vectores de expresión y de células hospedantes son los vectores pET (Novagen), los vectores pGEX (Amersham Pharmacia), y los vectores pMAL (New England labs. Inc.) para la expresión proteica en célula hospedante de *E. coli*, tal como BL21, BL21(DE3) y AD494(DE3)pLysS, Rosetta (DE3), y Origami(DE3) (Novagen); los vectores pcDNA3.1 (Invitrogen) y pCneo (Promega) a base del promotor fuerte de CMV, para la expresión en estirpes de células de mamífero tales como CHO, COS, HEK-293, Jurkat, y MCF-7; vectores adenoviricos incompetentes para la replicación pAdeno X, pAd5F35, pLP-Adeno-X-CMV (Clontech), pAd/CMV/VS-DEST, vector pAd-DEST (Invitrogen) para la transferencia génica mediada por adenovirus y la expresión en células de mamífero; los vectores retroviricos pLNCX2, pLXSN, y pLAPSN para uso con el sistema Retro-X™ de Clontech para la transferencia génica y expresión mediada por retrovirus en células de mamífero; pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™, y pLenti6.2/V5-GW/lacZ (Invitrogen) para transferencia génica y expresión mediada por lentivirus en células de mamífero; vectores de expresión de virus adenoasociado, tales como el vector pAAV-MCS, pAAV-IRES-hrGFP, y pAAV-RC (Stratagene) para transferencia génica y expresión mediada por virus adenoasociado en células de mamífero; el baculovirus BACpak6 (Clontech) y pFastBac™ HT (Invitrogen) para la expresión en estirpes de células de insecto *Spodopera frugiperda* 9 (*Sf9*) y *Sf11*; pMT/BiP/V5-His (Invitrogen) para la expresión en células de *Drosophila* Schneider S2; vectores de expresión en *Pichia* pPICZ α , pPICZ, pFLD α y pFLD (Invitrogen) para la expresión en *Pichia pastoris*, y vectores pMET α y pMET para la expresión en *P. methanolicus*; los vectores pYES2/GS y pYD1 (Invitrogen) para la expresión en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los avances recientes en la expresión a gran escala de proteínas heterólogas en *Chlamydomonas reinhardtii* se describen por Griesbeck C. et. al. 2006 Mol. Biotechnol. 34:213-33 y Fuhrmann M. 2004, Methods Mol Med. 94:191-5. Se insertan secuencias codificantes heterólogas extrañas en el genoma del núcleo, cloroplasto y mitocondria mediante recombinación homóloga. El vector de expresión en cloroplastos p64, que porta el marcador seleccionable de cloroplastos más versátil aminoglicosido adenil transferasa (*aadA*), que confiere resistencia a espectinomicina o estreptomycin, se puede usar para expresar proteína extraña en el cloroplasto. Para introducir el vector en las algas se usa un método de pistola génica biolístico. Al entrar en los cloroplastos, el ADN extraño se libera de las partículas de la pistola génica y se integra en el genoma del cloroplasto a través de recombinación homóloga.

He TC. et. al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:2509-2514, 1998 presentan un sistema simplificado para generar adenovirus recombinantes. El gen de interés se clona en primer lugar en un vector de barajado, por ejemplo pAdTrack-CMV. El plásmido resultante se linealiza dirigiéndolo con la endonucleasa de restricción *Pme* I, y subsiguientemente se cotransforma en células BJ5183 de *E. coli* con un plásmido de cadena principal adenovirico, por ejemplo pAdEasy-1 del Sistema de Vector Adenovirico AdEasy™ de Stratagene. Los vectores adenoviricos recombinantes se seleccionan para la resistencia a kanamicina, y la recombinación se confirma mediante análisis de endonucleasa de restricción. Finalmente, el plásmido recombinante linealizado se transfecta en estirpes celulares de empaquetamiento de adenovirus, por ejemplo las células HEK 293 (células de riñón embrionario humano transformadas mediante E1) o 911 (células retinianas embrionarias humanas transformadas mediante E1) (Human Gene Therapy 7:215-222, 1996). Los adenovirus recombinantes se generan en las células HEK 293.

Se proporciona un lentivirus recombinante para el suministro y expresión de la proteína quimérica de unión a VEGF en células de mamífero que se dividen y que no se dividen. El lentivirus a base de HIV-1 puede transducir de forma eficaz un intervalo más amplio de hospedantes que los sistemas retroviricos a base del virus de la leucemia de Moloney (MoMLV). La preparación de lentivirus recombinante se puede lograr usando los vectores pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ o pLenti, junto con los sistemas de expresión lentivirica ViraPower™ de Invitrogen.

Se proporciona un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV) para la expresión de una proteína quimérica de unión a VEGF. El vector de rAAV que codifica una proteína quimérica de unión a VEGF se puede administrar para ralentizar, inhibir o prevenir el crecimiento de cáncer y tumores tales como glioma. Usando los vectores de rAAV, se pueden suministrar genes en un amplio intervalo de células hospedantes, incluyendo muchas estirpes celulares o tejidos humanos y no humanos diferentes. Debido a que AAV no es patógeno y no provoca una respuesta inmune, una multitud de estudios preclínicos han dado a conocer perfiles de seguridad excelentes. Los rAAV son capaces de transducir un amplio intervalo de tipos celulares, y la transducción no depende de la división activa de la célula hospedante. En el sobrenadante se obtienen fácilmente títulos elevados, $> 10^8$ partículas víricas/ml, y 10^{11} - 10^{12} partículas víricas/ml con la concentración posterior. El transgén se integra en el genoma hospedante de manera que la expresión es a largo plazo y estable.

El uso de serotipos de AAV alternativos distintos de AAV-2 (Davidson et al (2000), PNAS 97(7):3428-32; Passini et al (2003), J. Virol 77(12):7034-40) ha demostrado diferentes tropismos celulares y mayores capacidades de transducción. Con respecto a los cánceres cerebrales, el desarrollo de nuevas técnicas de inyección en el cerebro, específicamente el suministro mejorado por convección (CED; Bobo et al (1994), PNAS 91(6):2076-80; Nguyen et al (2001), Neuroreport 12(9):1961-4), ha mejorado significativamente la capacidad para transducir grandes áreas del cerebro con un vector de AAV.

La preparación a gran escala de vectores de AAV se obtiene mediante una cotransfección de tres plásmidos de una estirpe celular de empaquetamiento: el vector de AAV que porta la secuencia codificante de ADN quimérica, el vector de AAV RC que contiene los genes *rep* y *cap* del AAV, y el plásmido auxiliar de adenovirus pDF6, en placas de 50 x 150 mm de células 293 subconfluentes. Las células se cosechan tres días tras la transfección, y los virus son liberados mediante tres ciclos de congelación-descongelación o mediante tratamiento con ultrasonidos.

Los vectores de AAV se purifican entonces mediante dos métodos diferentes, dependiendo del serotipo del vector. El vector de AAV2 se purifica mediante un método de purificación en columna de flujo por gravedad de una sola etapa basado en su afinidad por heparina (Auricchio, A., et. al., 2001, Human Gene therapy 12:71-6; Summerford, C. y R. Samulski, 1998, J. Virol. 72:1438-45; Summerford, C. y R. Samulski, 1999, Nat. Med. 5: 587-88). Los vectores de AAV2/1 y AAV2/5 se purifican actualmente mediante tres gradientes de CsCl secuenciales.

Expresión y purificación

Se proporciona un método para producir proteína quimérica de unión a VEGF, que comprende introducir el vector recombinante que expresó la proteína quimérica de unión a VEGF en una célula hospedante aislada, hacer crecer la célula en condiciones que permitan la producción de la proteína quimérica, y recuperar la proteína quimérica de unión a VEGF así producida. Los métodos descritos aquí proporcionan la expresión y purificación de la proteína quimérica de unión a VEGF en diversos sistemas de expresión a base de células, tal como la producción de proteína en células bacterianas, de mamífero, de insecto, de levadura, y de *chymadomonas*. La expresión proteica puede ser constitutiva, o inducible con inductores tales como sulfato de cobre, azúcares tales como galactosa, metanol, metilamina, tiamina, tetraciclina, o IPTG. Después de que la proteína es expresada en las células hospedantes, las células hospedantes se lisan para liberar la proteína expresada para la purificación. Los métodos para lisar las diversas células hospedantes se presentan en "Sample Preparation-Tools for Protein Research" EMD Bioscience y en Current Protocols in Protein Sciences (CPPS). El método de purificación preferido es la cromatografía de afinidad, tal como cromatografía de afinidad de ion-metal usando resinas de afinidad de níquel, cobalto o cinc para la proteína quimérica de unión a VEGF etiquetada con histidina. Los métodos para purificar proteínas recombinantes etiquetadas con histidina se describen por Clontech usando su resina de cobalto Talon®, y por Novagen en su manual del sistema pET 10ª edición. Otra estrategia preferida de purificación es mediante cromatografía de inmunofinidad, por ejemplo se puede usar una resina conjugada con anticuerpo anti-myc para purificar por afinidad la proteína quimérica de unión a VEGF etiquetada con myc. La digestión enzimática con serina proteasas, tales como trombina y enterocinasa, escinde y libera la proteína quimérica de unión a VEGF de la etiqueta de histidina o de myc, liberando la proteína quimérica de unión a VEGF de la resina de afinidad a la vez que las etiquetas de histidina y las etiquetas de myc quedan adheridas a la resina de afinidad.

Además de los sistemas de expresión a base de células, también se contemplan sistemas de expresión libres de células. Los sistemas de expresión libres de células ofrecen varias ventajas con respecto a los métodos de expresión a base de células tradicionales, incluyendo la modificación fácil de las condiciones de reacción para favorecer el plegamiento proteico, la menor sensibilidad a la toxicidad del producto, y la idoneidad para estrategias de alto rendimiento, tal como el cribado de expresión rápido o una producción de proteína en gran cantidad debido a menores volúmenes de reacción y tiempo de procesamiento. El sistema de expresión libre de células puede usar ADN plasmídico o lineal. Además, las mejoras en la eficiencia de la traducción han dado como resultado rendimientos que exceden el miligramo de proteína por mililitro de mezcla de reacción.

Para producir una proteína quimérica de unión a VEGF se puede usar un sistema continuo de traducción libre de células. Un sistema continuo de traducción libre de células, capaz de producir proteínas con alto rendimiento, es descrito por Spirin AS. et. al., Science 242:1162 (1988). El método usa un diseño de flujo continuo del amortiguador de la alimentación, que contiene aminoácidos, trifosfato de adenosina (ATP), y trifosfato de guanosina (GTP), a través de la mezcla de reacción, y la eliminación continua del producto polipeptídico traducido. El sistema usa lisado

de *E. coli* para proporcionar el amortiguador de alimentación continuo libre de células. Este sistema de flujo continuo es compatible con vectores de expresión tanto procariotas como eucariotas. Chang G. et al., Science 310:1950-3 (2005) describen la producción libre de células a gran escala de la proteína integral de membrana, transportador de múltiples fármacos EmrE.

- 5 Otros sistemas de expresión libres de células comercialmente disponibles incluyen los sistemas de expresión libres de células Expressway™ (Invitrogen), que utilizan un sistema in vitro a base de *E. coli* para reacciones acopladas eficientes de transcripción y traducción para producir hasta cantidades de miligramos de proteína recombinante activa en un formato de reacción en tubo; el Sistema de Traducción Rápida (RTS) (Roche Applied Science), que también usa un sistema in vitro a base de *E. coli*; y los Sistemas de Lisados de Reticulocitos Acoplados TNT (Promega), que usa un sistema in vitro a base de reticulocitos de conejo.

Usos terapéuticos y formulación

- 15 Se describe un método para tratar una enfermedad o trastorno angiogénico, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un vector que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico que se une a VEGF, en el que el polipéptido quimérico de unión a VEGF comprende un dominio 2 similar a Ig de un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular y una región Fc de inmunoglobulina G1 o un derivado inmunogénico reducido de una región Fc de inmunoglobulina G1. Como alternativa, se puede administrar una composición farmacéutica que comprende una proteína quimérica que se une a VEGF y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, el mencionado sujeto que necesita tratamiento puede ser un mamífero, tal como un perro o un gato, preferiblemente un ser humano.

- 20 Se describe un método para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la angiogénesis, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una composición farmacéutica que comprende una proteína quimérica, en la que el polipéptido quimérico comprende un dominio 2 similar a inmunoglobulina de un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular y una región Fc de inmunoglobulina G1 o un derivado inmunogénico reducido de una región Fc de inmunoglobulina G1. Los métodos descritos aquí se pueden usar en combinación con otras opciones de tratamiento disponibles para enfermedades o trastornos relacionados con la angiogénesis.

Como se usa aquí, angiogénesis se refiere a la aparición de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes, caracterizado por la proliferación y migración de células endoteliales disparada por ciertas condiciones patológicas, tal como el crecimiento de tumores sólidos y metástasis.

- 30 Como se usa aquí, la expresión “enfermedad o trastorno relacionado con la angiogénesis” se refiere a enfermedades o trastornos que dependen de un suministro rico de sangre y una proliferación de vasos sanguíneos para la progresión patológica de la enfermedad (por ejemplo, tumores metastásicos), o enfermedades o trastornos que son el resultado directo de la proliferación aberrante de vasos sanguíneos (por ejemplo retinopatía diabética y hemangiomas). Los ejemplos incluyen proliferación vascular anormal, formación de ascitis, psoriasis, degeneración macular relacionada con la edad, hiperplasia tiroidea, preclamsia, artritis reumatoide y osteoartritis, enfermedad de Alzheimer, obesidad, efusión pleural, aterosclerosis, endometriosis, retinopatías diabéticas/de otro tipo, neovascularizaciones oculares tales como glaucoma neovascular y neovascularización corneal.

- 40 La enfermedad o trastorno relacionado con la angiogénesis se puede seleccionar, por ejemplo, de un grupo que consiste en cáncer, formación de ascitis, psoriasis, degeneración macular relacionada con la edad, hiperplasia tiroidea, preeclampsia, artritis reumatoide y osteoartritis, enfermedad de Alzheimer, obesidad, efusión pleural, aterosclerosis, endometriosis, retinopatías diabéticas/de otro tipo, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, hemangiomas, y neovascularización corneal. En una realización, la degeneración macular relacionada con la edad es degeneración macular húmeda.

- 45 La enfermedad o trastorno relacionado con la angiogénesis puede ser cáncer, en el que las células cancerosas neoplásicas que se dividen rápidamente requieren un suministro eficiente de sangre para mantener el crecimiento continuo del tumor. Como se usa aquí, cáncer se refiere a cualesquiera de los diversos neoplasmas malignos caracterizados por la proliferación de células anaplásicas que tienden a invadir el tejido circundante y metastatizarse a nuevos sitios del cuerpo, y también se refiere a la condición patológica caracterizada por tales crecimientos neoplásicos malignos. Los vasos sanguíneos proporcionan conductos para la metástasis y difusión a cualquier parte en el cuerpo. Al llegar al sitio metastásico, las células cancerosas trabajan entonces estableciendo una nueva red de suministro sanguíneo. La administración de un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico que se une a VEGF, o una composición farmacéutica que comprende una proteína quimérica que se une a VEGF y un vehículo farmacéuticamente aceptable, puede inhibir la angiogénesis. Al inhibir la angiogénesis en el sitio de tumor primario y en el sitio de tumor secundario, las composiciones pueden servir para prevenir y limitar la progresión de la enfermedad.

- 55 La eficacia de un polipéptido quimérico dado de unión a VEGF como se describe aquí se puede evaluar *in vitro* o *in vivo*, o de ambas maneras, como se describe, por ejemplo, en los Ejemplos proporcionados aquí más abajo. Para evitar dudas, también se pueden usar otros ensayos aceptados habitualmente en el campo. Por ejemplo, se puede usar el ensayo de “CAM”. El ensayo de membrana corioalantoica de pollito (CAM) se usa frecuentemente para

evaluar los efectos de los factores que regulan la angiogénesis, debido a que es relativamente fácil y proporciona resultados relativamente rápidos. Un polipéptido quimérico de unión a VEGF útil en los métodos y composiciones descritos aquí disminuirá el número de microvasos en el ensayo de CAM modificado descrito por Iruela-Arispe et al., 1999, *Circulation* 100: 1423-1431, con respecto a controles sin el polipéptido quimérico añadido o expresado. El método se basa en el crecimiento vertical de nuevos vasos capilares en un pelete de gel de colágeno colocado en la CAM. En el ensayo como se describe por Iruela-Arispe et al., el gel de colágeno está suplementado con VEGF (250 ng/gel) en presencia o ausencia de proteínas/péptidos de ensayo. El grado del efecto antiangiogénico se mide usando FITC-dextrano (50 µg/ml) (Sigma) inyectado en la circulación de la CAM. El grado de intensidad de la fluorescencia iguala a las variaciones en la densidad capilar; la linealidad de esta correlación se puede observar con un intervalo de capilares entre 5 y 540. Se pueden realizar análisis morfométricos, por ejemplo mediante adquisición de imágenes con una cámara CCD. Las imágenes se analizan entonces importándolas en un paquete de análisis, por ejemplo NHImage 1.59, y las medidas de la intensidad de la fluorescencia se obtienen como píxeles positivos. Cada punto de dato se compara con sus propios controles positivos y negativos presentes en la misma CAM, y se interpretan como un porcentaje de inhibición, considerando que el control positivo es 100% (VEGF solo) y el control negativo (vehículo solo) es 0%. La evaluación estadística de los datos se lleva a cabo para comprobar si los grupos difieren significativamente del azar, por ejemplo mediante análisis de contingencia con corrección de Yates.

En la técnica se conocen ensayos de angiogénesis adicionales, y se pueden usar para evaluar polipéptidos quiméricos de unión a VEGF para uso en los métodos y composiciones descritos aquí. Estos incluyen, por ejemplo, el ensayo de microbolsillo corneal, el ensayo del saco de mejilla de hámster, el ensayo de Matrigel y sus modificaciones, y ensayos de cocultivo. Donovan et al. describen una comparación de tres ensayos in vitro diferentes desarrollados para evaluar reguladores de la angiogénesis en un trasfondo humano (Donovan et al., 2001, *Angiogenesis* 4: 113-121. De forma breve, los ensayos examinados incluyen: 1) un ensayo de Matrigel básico en el que se siembran en placas células endoteliales humanas de baja pasada (células endoteliales de la vena umbilical humanas, HUVEC) en pocillos revestidos con Matrigel (Becton Dickinson, Cedex, Francia) con o sin regulador o reguladores de la angiogénesis; 2) un ensayo de Matrigel similar que usa Matrigel con "factor de crecimiento reducido" o GFR; y 3) un ensayo de cocultivo en el que se cocultivan fibroblastos humanos primarios y HUVEC con o sin regulador o reguladores de la angiogénesis adicionales – los fibroblastos producen matriz extracelular y otros factores que apoyan la diferenciación de HUVEC y la formación de túbulos. En el documento de Donovan et al., el ensayo de cocultivo proporcionó redes de microvasos que se parecieron muchísimo a las redes de microvasos in vivo. Sin embargo, el ensayo de Matrigel básico y el ensayo de Matrigel GFR también pueden ser usados por alguien de pericia en la técnica para evaluar si un polipéptido quimérico de unión a VEGF dado es un inhibidor de la angiogénesis necesario para los métodos y composiciones descritos aquí. Finalmente, Chemicon (Millipore) comercializa un kit de ensayo de angiogénesis in vitro. El Kit de Ensayo de Angiogénesis In Vitro en Gel de Fibrina tiene el Número de Catálogo de Chemicon ECM630. Un polipéptido quimérico de unión a VEGF como se describe aquí es considerado útil en un método o composición para el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con la angiogénesis como se describe aquí si reduce la angiogénesis en uno cualquiera de estos ensayos en 10% o más con respecto a un ensayo de control llevado a cabo sin el polipéptido quimérico de unión a VEGF. Un polipéptido quimérico de unión a VEGF como se describe aquí reduce preferiblemente la angiogénesis en uno o más de estos ensayos en al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o más, hasta e incluyendo 100% de inhibición.

Como alternativa, la inhibición de la angiogénesis se puede medir funcionalmente aguas abajo, como reducción o cese del crecimiento tumoral o del tamaño tumoral. Por ejemplo, si hay un crecimiento cero de la masa tumoral, o al menos una reducción del 5% en el tamaño de la masa tumoral, hay una inhibición de la angiogénesis mediante una composición o método como se describe aquí.

Una diana candidata es cualquier tumor sólido que requiera un suministro eficiente de sangre para mantener el crecimiento. Por ejemplo, los candidatos para los métodos de tratamiento descritos aquí incluyen carcinomas y sarcomas encontrados en el ano, vejiga, conducto biliar, hueso, cerebro, mama, cuello uterino, colon/recto, endometrio, esófago, ojo, vesícula biliar, cabeza y cuello, hígado, riñón, laringe, pulmón, mediastino (pecho), boca, ovarios, páncreas, pene, próstata, piel, intestino delgado, estómago, médula espinal, coxis, testículos, tiroide y útero. Los tipos de carcinomas incluyen papiloma/carcinoma, coriocarcinoma, tumor del seno endodérmico, teratoma, adenoma/adenocarcinoma, melanoma, fibroma, lipoma, leiomioma, rabdomioma, mesotelioma, angioma, osteoma, condroma, glioma, linfoma/leucemia, carcinoma de células escamosas, carcinoma microcítico, carcinomas no diferenciados de células grandes, carcinoma de células basales, y carcinoma no diferenciado senonasal. Los tipos de sarcomas incluyen sarcoma de tejidos blandos tal como sarcoma de la parte blanda alveolar, angiosarcoma, dermatofibrosarcoma, tumor desmoide, tumor de células redondas pequeñas dermoplásico, condrosarcoma extraesquelético, osteosarcoma extraesquelético, fibrosarcoma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, linfosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, neurofibrosarcoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial, y tumor de Askin, sarcoma Ewing (tumor neuroectodérmico primitivo), hemangioendotelioma maligno, schwannoma maligno, osteosarcoma, y condrosarcoma. La acumulación y crecimiento anormales de vasos sanguíneos en la piel u órganos internos en forma de hemangiomas también se pueden tratar según los métodos descritos aquí.

Las composiciones se pueden usar para prevenir el crecimiento deslumbrante de vasos sanguíneos asociados con

enfermedades diabéticas del ojo, a saber, retinopatía diabética. Los métodos descritos aquí se diseñan para antagonizar el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), una sustancia producida de forma natural en el cuerpo que promueve la formación de vasos sanguíneos. Liberado por la retina (tejido sensible a la luz en la parte posterior del ojo) cuando los vasos sanguíneos normales son dañados por coágulos de sangre minúsculos debido a diabetes, el VEGF activa su receptor, iniciando una reacción en cadena que culmina en el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Sin embargo, los vasos sanguíneos de repuesto son defectuosos; tienen fuga, sangran y estimulan el tejido cicatricial que se desprende de la retina, dando como resultado una pérdida severa de la visión. Tal crecimiento es la marca distintiva de la retinopatía diabética, la causa principal de la ceguera entre personas jóvenes en países desarrollados.

Las composiciones se pueden usar en el tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad, puesto que se sabe que VEGF también contribuye al crecimiento anormal de vasos sanguíneos a partir de la capa coroidea del ojo en la retina, similar a lo que ocurre durante la forma húmeda o neovascular de la degeneración macular relacionada con la edad. La degeneración macular, denominada a menudo AMD o ARMD (degeneración macular relacionada con la edad), es la causa principal de la pérdida de visión y ceguera en los americanos con edades de 65 y mayores. Crecen nuevos vasos sanguíneos (neovascularización) debajo de la retina, y pierden sangre y fluido. Esta fuga provoca un daño permanente a células retinianas sensibles a la luz, que mueren y crean puntos ciegos en la visión central o la mácula.

La enfermedad o trastorno relacionado con la angiogénesis puede ser artritis reumatoide. La artritis reumatoide (RA) se caracteriza por hinchamiento del tejido sinovial, ingreso de leucocitos y angiogénesis, o crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Se piensa que la enfermedad se produce como una respuesta inmunológica a un antígeno aún no identificado. La expansión del revestimiento sinovial de las articulaciones en la artritis reumatoide (RA), y la subsiguiente invasión por el paño de cartílago subyacente y hueso, necesita un incremento en el suministro vascular al sinovio, para hacer frente al requisito cada vez mayor de oxígeno y nutrientes. Se reconoce ahora que la angiogénesis es un suceso clave en la formación y mantenimiento del paño en RA (Paleolog, E. M., 2002, *Arthritis Res.* 4 (Supl. 3):S81-S90). Incluso en RA temprana, algunas de las observaciones histológicas más tempranas son vasos sanguíneos. Un infiltrado mononuclear caracteriza el tejido sinovial junto con una vasculatura exuberante. La angiogénesis es esencial para la formación del paño inflamatorio, y sin angiogénesis, no podría ocurrir el ingreso de leucocitos (Koch, A. E., 2000, *Ann. Rheum. Dis.*; 59 (Supl. 1):i65-i71). La interrupción de la formación de nuevos vasos sanguíneos no solo evitaría el suministro de nutrientes al sitio inflamatorio, sino que también reduciría el hinchamiento de la articulación debido a la actividad adicional de VEGF, un potente factor proangiogénico en RA, como un factor de permeabilidad vascular.

La enfermedad o trastorno relacionado con la angiogénesis puede ser enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer (AD) es la causa más común de demencia a nivel mundial. AD se caracteriza por una deposición amiloidea cerebral excesiva, que conduce a la degeneración de neuronas y eventualmente a la demencia. La causa exacta de la AD es todavía desconocida. Se ha mostrado por estudios epidemiológicos que el uso a largo plazo de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, estatinas, bloqueadores del receptor de histamina H2, o bloqueadores de los canales de calcio, todos los cuales son fármacos cardiovasculares con efectos antiangiogénicos, parece prevenir la enfermedad de Alzheimer y/o influir en el resultado de los pacientes con AD. Por lo tanto, se ha especulado que, en AD, la angiogénesis en la vasculatura cerebral puede desempeñar un papel importante. En la enfermedad de Alzheimer, el endotelio cerebral segrega el sustrato precursor para la placa de beta-amiloide y un péptido neurotóxico que mata selectivamente a las neuronas corticales. Además, la deposición amiloidea en la vasculatura conduce a la apoptosis de células endoteliales y a la activación de células endoteliales, que conduce a la neovascularización. La formación de vasos se podría bloquear mediante el antagonista de VEGF SU 4312, así como mediante estatinas, indicando que las estrategias antiangiogénicas basadas en la inhibición de VEGF pueden interferir con la activación de células endoteliales en AD (Schultheiss C., et al., 2006, *Angiogenesis*. 9(2):59-65; Grammas P., et al., 1999, *Am. J. Path.*, 154(2):337-42) y se pueden usar para prevenir y/o tratar AD.

La enfermedad o trastorno relacionado con la angiogénesis puede ser obesidad. Se ha mostrado que el inhibidor de la angiogénesis TNP-470 fue capaz de evitar obesidad inducida por la dieta y genética en ratones (Ebba Bråkenhielm et al., *Circulation Research*, 2004; 94:1579). TNP-470 redujo la vascularidad en el tejido adiposo, inhibiendo de ese modo la velocidad de crecimiento del tejido adiposo y el desarrollo de la obesidad. De este modo, la inhibición de la angiogénesis puede ser terapéutica para la obesidad.

La enfermedad o trastorno relacionado con la angiogénesis puede ser endometriosis. Se propone la angiogénesis endometrial excesiva como un mecanismo importante en la patogénesis de la endometriosis (Healy, DL., et al., 1998, *Human Reproduction Update*, 4:736-740). El endometrio de pacientes con endometriosis muestra proliferación aumentada de células endoteliales. Además, hay una expresión elevada de la molécula de adhesión celular integrina $\nu\beta 3$ en más vasos sanguíneos en el endometrio de mujeres con endometriosis cuando se compara con mujeres normales. Las estrategias que inhiben la angiogénesis se pueden usar para tratar la endometriosis.

Se proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína quimérica de unión a VEGF y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector de expresión que porta una secuencia de ADN quimérica que codifica la proteína quimérica de unión a VEGF y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se proporciona una composición farmacéutica que comprende las

células víricas hospedantes (vectores) que alojan la secuencia de ADN quimérica que codifica la proteína quimérica de unión a VEGF y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Como se usa aquí, la expresión "composición farmacéutica" se refiere al agente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable de sustancias químicas y compuestos usados habitualmente en la industria farmacéutica. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" excluye medio de cultivo tisular.

10 Para enfermedades o trastornos angiogénicos que son accesibles externamente sobre la piel, tales como hemangiomas dérmicos y lesiones de cáncer de piel (melanoma), se pueden aplicar preferiblemente de forma tópica virus de terapia génica, vectores de expresión o proteína quimérica de unión a VEGF al hemangioma o sitio de lesión cancerosa en una cantidad terapéuticamente eficaz en mezcla con vehículos farmacéuticos, en forma de composiciones farmacéuticas tópicas. El virus de terapia génica puede estar en forma de adenovirus, virus adenoasociado, o lentivirus. Tales composiciones incluyen disoluciones, suspensiones, lociones, geles, cremas, ungüentos, emulsiones, parches para la piel, etc. Todas estas formas de dosificación, junto con los métodos para su preparación, son bien conocidos en la técnica farmacéutica y cosmética. HARRY'S COSMETICOLOGY (Chemical Publishing, 7ª ed. 1982); REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Co., 18ª ed. 1990).
15 Típicamente, tales formulaciones tópicas contienen el ingrediente activo en un intervalo de concentración de 0,1 a 100 mg/ml, en mezcla con vehículos adecuados. Un vehículo adecuado no promoverá una respuesta inmune a los péptidos quiméricos descritos aquí. Para los virus de terapia génica, la dosificación oscila de $10^{(6)}$ a $10^{(14)}$ partículas por aplicación. Otros ingredientes deseables para uso en tales preparaciones incluyen conservantes, codisolventes, agentes que provocan viscosidad, portadores, etc. El propio portador, o un componente disuelto en el portador, puede tener propiedades paliativas o terapéuticas por sí mismo, incluyendo propiedades hidratantes, limpiadoras, o antiinflamatorias/contra el picor. Los potenciadores de la penetración pueden ser, por ejemplo, agentes tensioactivos; ciertos disolventes orgánicos, tales como dimetilsulfóxido y otros sulfóxidos, dimetilacetamida y pirrolidona; ciertas amidas de aminas heterocíclicas, glicoles (por ejemplo propilenglicol); carbonato de propileno; ácido oleico; alquilaminas y derivados; diversos agentes tensioactivos catiónicos, aniónicos, no iónicos y anfóteros; y similares.
20
25

30 La administración tópica de una cantidad farmacológicamente eficaz puede utilizar sistemas de suministro transdérmicos bien conocidos en la técnica. Un ejemplo es un parche dérmico. Como alternativa, se puede usar el método de suministro mediante pistola génica biolística. La pistola génica es un dispositivo para inyectar células con información genética, diseñada originalmente para la transformación de plantas. La carga es una partícula elemental de un metal pesado revestido con ADN plasmídico. Esta técnica se denomina a menudo simplemente como biolística. Otro instrumento que usa tecnología biolística es el sistema de suministro de partículas PDS-1000/He. La proteína quimérica de unión a VEGF, el vector de expresión y/o el virus de terapia génica se pueden revestir sobre partículas de oro pequeñas, y estas partículas revestidas son "disparadas" en tejidos biológicos tales como hemangiomas y melanoma, a alta presión. Un ejemplo del método a base de la pistola génica se describe para la vacunación de ganado a base de ADN por Loehr B. I. et. al. J. Virol. 2000, 74:6077-86.
35

40 Las composiciones descritas aquí se pueden administrar directamente mediante inyección. Si los tumores sólidos y hemangiomas son accesibles mediante inyección, la proteína quimérica de unión a VEGF, el vector de expresión y/o el vector vírico se pueden administrar mediante inyección directamente en la masa tumoral como una formulación farmacéutica. La formulación preferida es también disolución salina estéril o disolución de Ringer lactada. La disolución de Ringer lactada es una disolución que es isotónica con la sangre, y está destinada para la administración intravenosa.

45 En el tratamiento y prevención de retinopatía diabética y degeneración macular húmeda, la proteína descrita aquí, que es mucho más pequeña que otra proteína de unión a VEGF en el mercado y en ensayos clínicos, se puede aplicar al ojo mediante inyección como una formulación farmacéutica. La inyección introduce directamente la proteína quimérica de unión a VEGF en el humor vítreo. Las composiciones se pueden formular como una disolución de gotas oculares para la aplicación directa en los ojos.

50 Además de la terapia tópica, las composiciones descritas aquí también se pueden administrar sistémicamente en una formulación farmacéutica. Las rutas sistémicas incluyen, pero no se limitan a, oral, parenteral, inhalación nasal, intratraqueal, intratecal, intracraneal, e intrarrectal. La formulación farmacéutica es preferiblemente una disolución salina estéril o disolución de Ringer lactada. Para aplicaciones terapéuticas, las preparaciones descritas aquí se administran a un mamífero, preferiblemente un ser humano, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable, incluyendo aquellas que se pueden administrar a un ser humano intravenosamente como un bolo o mediante infusión continua a lo largo de un período de tiempo, mediante las rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarterial, intrasinoval, intratecal, oral, tópica, o inhalación. Se describe la inyección intramuscular de vectores víricos de AAV que codifican una proteína quimérica de VEGF y/o sus formas variantes. Las composiciones descritas aquí también se administran de forma adecuada mediante las rutas intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, para ejercer efectos locales así como sistémicos. Se espera que la ruta intraperitoneal sea particularmente útil, por ejemplo en el tratamiento de tumores ováricos. Para estos usos, se pueden requerir preferentemente preparaciones farmacéuticas convencionales adicionales tales como comprimidos, gránulos, polvos, cápsulas, y pulverizaciones. En tales formulaciones, también se pueden requerir aditivos convencionales adicionales, tales como agentes ligantes, agentes hidratantes, propelentes, lubricantes, y
55
60

estabilizantes. Las composiciones terapéuticas descritas aquí se pueden formular en una formulación de liposoma catiónico, tal como las descritas para el tratamiento mediante terapia génica intratraqueal de cáncer de pulmón temprano (Zou Y. et. al., *Cancer Gene Ther.* mayo 2000; 7(5):683-96). Las formulaciones liposómicas son especialmente adecuadas para uso en aerosol en pacientes con cáncer de pulmón. El ADN y/o virus vector se puede atrapar en "partículas de plásmido-lípido estabilizadas" (SPLP) que contienen el lípido fusogénico dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), niveles bajos (5-10% en moles) de lípido catiónico, y se pueden estabilizar mediante un revestimiento de polietilenglicol (PEG) (Zhang Y. P. et. al. *Gene Ther.* 1999, 6:1438-47). Otras técnicas para formular vectores de expresión y virus como sustancias terapéuticas se encuentran en "DNA-Pharmaceuticals: Formulation and Delivery in Gene Therapy, DNA Vaccination and Immunotherapy" por Martin Schleef (Editor) diciembre 2005, Wiley Publisher, y "Plasmids for Therapy and Vaccination" por Martin Schleef (Editor) mayo 2001. La dosificación para vectores víricos puede ser $10^{(6)}$ a $1 \times 10^{(14)}$ partículas de vector vírico por aplicación por paciente.

La vía de administración, forma de dosificación, y la cantidad eficaz varían según la potencia de las proteínas quiméricas receptoras de VEGF, los vectores de expresión y los vectores víricos, sus características fisicoquímicas, y según la localización del tratamiento. La selección de la dosis apropiada está dentro de la pericia de un médico de pericia normal. Las formulaciones tópicas se pueden administrar hasta cuatro veces al día.

Las formas de dosificación pueden incluir vehículos farmacéuticamente aceptables que son inherentemente no tóxicos y no terapéuticos. Los ejemplos de tales vehículos incluyen intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tal como seroalbúmina humana, sustancias amortiguadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas de gliceraldehídos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales, o electrolitos tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, y polietilenglicol. Los vehículos para las formas tópicas o a base de gel de la proteína quimérica incluyen polisacáridos tales como carboximetilcelulosa sódica o metilcelulosa, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, polímeros de bloques de polioxitileno-polioxipropileno, polietilenglicol, y alcoholes de cera de madera. Para todas las administraciones, se usan adecuadamente formas de depósito convencionales. Tales formas incluyen, por ejemplo, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, vendas, formas de inhalación, pulverizaciones nasales, comprimidos sublinguales, y preparaciones de liberación sostenida. Para ejemplos de composiciones de liberación sostenida, véanse la patente U.S. n° 3.773.919, el documento EP 58.481A, la patente U.S. n° 3.887.699, el documento EP 158.277A, la patente canadiense n° 1176565, U. Sidman et al., *Biopolymers* 22:547 (1983) y R. Langer et al., *Chem. Tech.* 12:98 (1982). La proteína quimérica se formulará habitualmente en tales vehículos a una concentración de alrededor de 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, y el vector vírico debería de estar en el intervalo de $10^{(6)}$ a $1 \times 10^{(14)}$ partículas de vector vírico por aplicación por paciente.

Se pueden añadir otros ingredientes a las formulaciones farmacéuticas, incluyendo antioxidantes, por ejemplo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de diez restos), por ejemplo poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico, o arginina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono, incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; y alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol.

La formulación farmacéutica a usar para administración terapéutica puede ser estéril. La esterilidad se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles (por ejemplo, membranas de 0,2 micrómetros). La proteína quimérica del receptor de VEGF normalmente se almacenará en forma liofilizada o como una disolución acuosa si es muy estable a la desnaturalización térmica y oxidativa. El pH de las preparaciones de la proteína quimérica del receptor de VEGF será típicamente alrededor de 6 a 8, aunque en ciertos casos también pueden ser apropiados valores mayores o menores de pH.

Para la prevención o tratamiento de enfermedad o trastorno angiogénico, la dosis apropiada de la proteína quimérica del receptor de VEGF y/o de los vectores víricos dependerá del tipo de enfermedad o trastorno a tratar, de la gravedad y curso de la enfermedad, si las proteínas quiméricas del receptor de VEGF se administran con fines preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la historia clínica del paciente, y de la respuesta a la proteína quimérica del receptor de VEGF y/o a los vectores víricos, y de la discreción del médico que atiende. La proteína quimérica del receptor de VEGF y/o los vectores víricos se administran adecuadamente al paciente de una sola vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Para los fines aquí, la "cantidad terapéuticamente eficaz" de una proteína quimérica del receptor de VEGF o de un vector vírico es una cantidad que es eficaz para prevenir, disminuir el empeoramiento de, aliviar, o curar la condición tratada, en particular aquella cantidad que es suficiente para reducir o inhibir la proliferación de endotelio vascular *in vivo*.

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo, que no se debería de interpretar como limitante.

La terminología usada aquí es con el fin de describir solamente realizaciones particulares, y no está destinada a limitar el alcance de la presente invención, que se define solamente mediante las reivindicaciones.

Además de en los ejemplos operativos, o donde se indique de otro modo, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción usados aquí se deben entender como modificados en todos los casos por la expresión “alrededor de”. La expresión “alrededor de”, cuando se usa en relación con los porcentajes, puede significar $\pm 1\%$.

- 5 Todas las patentes y otras publicaciones identificadas se proporcionan solamente por su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. A este respecto, no se debería de considerar como una admisión que los inventores no están autorizados para anteceder tal descripción en virtud de una razón previa o por cualquier otra razón. Todas las declaraciones en cuanto a la fecha o representación en cuanto a los contenidos de estos documentos se basa en la información disponible a los solicitantes, y no constituye ninguna admisión en cuanto a la
10 corrección de las fechas o contenidos de estos documentos.

EJEMPLO

Se ha mostrado que las proteínas que se unen a VEGF, en forma de mAb's, dominios extracelulares del receptor de VEGF soluble, o constructos heterólogos derivados de subdominios de receptores de VEGF (denominados como VEGF-Traps), exhiben efectos antitumorales potentes en estudios preclínicos (1, 2) y clínicos (3). Los estudios hasta
15 la fecha han utilizado en gran medida el suministro proteico sistémico directo de estas proteínas. Debido al requisito del suministro sostenido de agentes antiangiogénicos para mantener un efecto antitumoral, existe interés en investigar el uso de enfoques a base de terapia génica para suministrar proteínas que se unen a VEGF a fin de lograr el suministro sistémico sostenido de proteína. En un informe previo, (2) se observó que los adenovirus suministrados sistémicamente podrían segregar un nivel elevado de dominios extracelulares del receptor de VEGF soluble y controlar el crecimiento de varios xenoinjertos de tumores humanos diferentes *in vivo*. Este sistema a base
20 de adenovirus es menos favorable para el uso clínico secundario con respecto a aspectos de la reducción, mediada inmunitariamente, en la expresión del transgén, y potencial para la toxicidad específica del órgano (por ejemplo, hígado) tras el suministro sistémico del virus. Debido a estas limitaciones, se exploró la estrategia de suministrar estas proteínas usando vectores más clínicamente aceptables suministrados vía inyección intramuscular.

25 Para este fin, se diseñó y expresó una proteína que se une a VEGF cargada de forma neutra VEGF-trap 3 (VT3), más apropiada para la capacidad de empaquetamiento más pequeña de virus adenoasociados, así como aquellas con propiedades de carga mejorada en comparación con la VEGF-Trap descrita por Holash et al. (1) Esta modificación implicó eliminar uno de dos dominios que se unen a VEGF de Ig básicos en las proteínas VEGF-Trap1 (VT1) parentales. Se encontró que esta trampa modificada retuvo una afinidad de unión similar a VEGF en
30 comparación con VT1. La VEGF-Trap3 (VT3) modificada produjo niveles significativamente mayores de proteína sérica cuando se suministra vía un vector de AAV usando una técnica de suministro intramuscular directo. Las características únicas de esta Trampa la hacen particularmente adecuada para los enfoques de terapia génica para estrategias terapéuticas antiangiogénicas anti-VEGF.

Materiales y métodos.

35 Proteínas que se unen a VEGF

VEGF-Trap 1 (VT1) purificada se obtuvo como un regalo de Regeneron Pharmaceuticals. La quimera de Flt-1/Fc humana recombinante (R&D System 321-FL), la quimera de KDR/Fc humana recombinante (R&D System 357-KD) y Fc de IgG₁ humana recombinante (R&D System 110-HG) se adquirieron de R&D Systems.

Manipulación de vectores de AAV que codifican VEGF-Trap1 y VEGF-Trap3

40 A fin de construir un vector de AAV que codifica VEGF-Trap 1 (VT1), se usó una PCR de fusión de oligos que codifican el transgén para crear un constructo de VEGF-Trap de longitud completa que codifica la secuencia señal de VEGF-receptor 1 (aminoácidos 1-26 de Número de Acceso Genbank: BC039007, SEQ. ID. No.: 1) fusionada directamente al segundo dominio de Ig (aminoácidos 129-231 de Número de Acceso Genbank: BC039007, SEQ. ID. No.: 1) fusionado directamente al tercer dominio de Ig de VEGF-Receptor 2 (aminoácidos 226 - 327 de Número de
45 Acceso Genbank: AF035121, SEQ. ID. No.: 9) fusionado directamente a la hulgG1 (aminoácidos 247-473 de Número de Acceso Genbank: BC092518), como se describe por Holash et al. (Holash et al., 2002).

Vegf-Trap 3 (VT3) se construyó de forma similar uniendo el segundo dominio de Ig de Flt-1 a Fc-hulgG₁. El constructo final codifica la secuencia señal de VEGF-receptor 1 (aminoácidos 1-26 de Número de Acceso Genbank: BC039007, SEQ. ID. No.: 1), el segundo dominio de Ig (aminoácidos 129-231 de Número de Acceso Genbank: BC039007, SEQ. ID. No.: 1) fusionado a la hulgG1 (aminoácidos 247-473 de Número de Acceso Genbank: BC092518). Los constructos finales que codifican tanto a VT1 como a VT3 se secuenciaron en las hebras tanto
50 sentido como antisentido para confirmar la secuencia y orientación correctas.

La producción de los vectores de AAV recombinantes que codifican VEGF-Trap1 y VEGF-Trap 3 se llevó a cabo mediante transfección triple como se describió previamente (4). De forma breve, los plásmidos del vector pAAV-VEGF-Trap se cotransfectaron con el plásmido auxiliar de AAV pLT-RC02 (Jeng-Shin Lee y Richard Mulligan, sin publicar) y el miniplásmido auxiliar de adenovirus pHGTI-Adeno1 (John Gray y Richard Mulligan, sin publicar) en células 293. 48 horas después de la transfección, las células se cosecharon y se lisaron. Después del tratamiento
55

con benzonasa y de la eliminación del desecho celular mediante centrifugación a baja velocidad, las partículas de AAV recombinante se purificaron mediante gradiente de densidad de yodixanol. La fracción de yodixanol del 40% que contiene partículas de rAAV se recuperó, se dializó extensamente frente a PBS, y se tituló mediante hibridación de transferencia de punto usando como sonda el promotor de CMV.

- 5 pLT-RC02 codifica proteínas Rep híbridas a partir de serotipos 1 y 2 de AAV, y proteínas Cap a partir del serotipo 1. Cuando se usa en el sistema de producción de transfección triple, el plásmido pLT-RC02 empaqueta partículas de AAV en un nivel comparable con respecto al obtenido con el plásmido de expresión de Rep/Cap del serotipo 2 de AAV. Pero las partículas del vector resultantes transdujeron músculos esqueléticos a una eficiencia significativamente mayor que los vectores normales del serotipo 2 (Jeng-Shin Lee y Richard Mulligan, sin publicar),
10 como se da a conocer previamente para los vectores del serotipo 1 de AAV.

Purificación de proteína de VEGF-Trap 3.

- La producción estable de VEGF-Trap 1 y VEGF-Trap 3 en células 293T se logró mediante infección con lentivirus que codifican las proteínas VEGF-Trap respectivas. La producción estable de las VEGF-Traps se confirmó mediante ELISA. Subsiguientemente se reunió el medio acondicionado, Medio de Eagle Modificado de Dulbecco libre de suero
15 (Gibco 11965-092), a partir de células infectadas, y se sometió a cromatografía de afinidad de Proteína A.

- Se prepararon columnas de NProtein A Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences 17-5280-04) según las instrucciones del fabricante. A fin de asegurar la concentración iónica apropiada, el medio acondicionado libre de suero se suplementó con 3,3 M de NaCl antes de aplicarlo a la columna. Las muestras se cargaron toda la noche a 4°C, después la columna se lavó con 5 volúmenes de lecho de 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl y 0,1% de Tween-
20 pH 8,0. Las proteínas VEGF-Trap se eluyeron con 1-3 volúmenes de lecho de 0,1 M de citrato pH 3, y se neutralizaron con 2 M de Tris pH 8,5. Los eluatos se dializaron frente a disolución salina amortiguada con fosfato (PBS) (Gibco) en casetes de diálisis de 10.000 MWCO (Pierce 66380) a 4°C, toda la noche. Finalmente, las muestras se concentraron mediante dispositivos de filtro de centrifugadora de unión ultrabaja Amicon (Millipore UFC901008), y la pureza se evaluó mediante SDS PAGE y tinción de Coomassie.

- 25 Caracterización de proteínas – glicosilación y análisis de transferencia Western

- Muestras de proteína purificada se sometieron a SDS PAGE (12% gel, Life Gels, NH21-012) a 100V durante 45 minutos, y después el gel se transfirió a un sistema de electrotransferencia húmeda a una corriente constante de 35 mA durante 2 horas. Después de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa soportada (Bio-Rad 162-0095) se bloqueó con 10% de leche desnatada seca en PBS-0,1% de Tween-20 a temperatura ambiente durante 1 hora. La membrana se sondó con anticuerpo primario anti-Flt-1 (R&D System AF321 o Imclone) y con anticuerpo secundario anti-IgG de cabra conjugado con HRP, o con anticuerpo primario conjugado con HRP frente a IgG-Fc humana (Sigma A0170) diluida en PBS-0,1% de Tween-20. Las transferencias se desarrollaron usando sustrato de HRP ECL-Plus (Amersham Biosciences RPN2132) y película de quimioluminiscencia Kodak Biomax (Kodak 178 8207).

- A fin de eliminar todos los hidratos de carbono enlazados mediante N y O, las muestras de proteínas se desnaturalizaron a 100°C durante 5 minutos, y después se incubaron con las enzimas PNGasa F, α -2(3,6,8,9)neuraminidasa, O-glicosidasa, β (1-4)-galactosidasa y β -N-acetilglucosaminidasa (Sigma, E-DEGLY), toda la noche a 37°C. El grado de glicosilación se evaluó mediante SDS-PAGE de las muestras de proteína desglicosiladas y no desglicosiladas. Tras la electroforesis, el gel se tiñó con Coomassie (Gradipore, Gradiflash SG-010) durante 5 h a temperatura ambiente, después se destiñó con ácido acético al 6% a temperatura ambiente durante 20 horas.

Medida de la afinidad de unión

- Las afinidades de unión de Vegf-Trap 3, VEGF-Trap 1 recombinante (un regalo de Regeneron pharmaceuticals), quimera de Flt-1/Fc humana recombinante (R&D System 321-FL), quimera de KDR/Fc humana recombinante (R&D System 357-KD) e IgG₁ Fc humana recombinante (R&D System 110-HG) se midieron mediante ELISA (R&D System DVE00) como se describió previamente por Holash et al. (1).

Detección de VEGF-Trap sérica – ELISA de VEGF-Trap

- Se revistieron placas Immulon-4 HBX con 25 ng/pocillo de Vegf165 humana (R&D System 293 VE) toda la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con 3% de leche desnatada seca en PBS-0,1% de Tween-20 a temperatura ambiente durante 1 hora.

- 50 Los patrones y las muestras de suero se diluyeron en disolución de PBS-10% de suero de ratón-0,1% de Tween-20, se aplicaron a la placa y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron cinco veces con PBS-0,1% de Tween-20. El anticuerpo de detección conjugado con HRP, diluido (1:5000), contra IgG-Fc humana (Sigma A0170) se añadió a los pocillos. Después de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron con PBS-0,1% de Tween-20. La O.D. se leyó a 405 nm en 10 min. de adición del sustrato de HRP (KPL 50-66-06).

Análisis farmacocinético – inyección de BALB/c con proteína

Se inyectó a ratones BALB/c y C57B1/6 (20-25 g) con 100 ug/animal de Vegf-Trap 3 o VEGF-Trap 1 s.c. Los ratones se sangraron a 1, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas después de la inyección. Los niveles de Vegf-Trap3 y VEGF-Trap 1 se midieron mediante ELISA.

5 Suministro de AAV

Los ratones se obtuvieron de Jackson Labs (Bar Harbor, ME) y se mantuvieron en una instalación para animales libre de patógenos en el Harvard Institute of Medicine, Boston, MA. Los estudios con los animales fueron aprobados por el Standing Committee on Animals de la Escuela de Medicina de Harvard.

Estudios de crecimiento tumoral

10 Los estudios con los animales se llevaron a cabo en la instalación para animales en el Childrens Hospital, Boston, MA, según las directrices federales, locales e institucionales. Se usaron ratones C57B16/J machos inmunocompetentes (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) de 7-9 semanas. Las células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) (American Type Culture Collection, Rockville, MD) se hicieron crecer y se mantuvieron como se describió previamente (5). Se inyectó s.c. una suspensión de 5×10^6 células tumorales en 0,1 ml de DMEM en el dorso de
15 ratones en la línea media proximal.

Los ratones se pesaron, y los tumores se midieron cada 3 a 5 días en dos diámetros con un calibrador de dial. Los volúmenes se determinaron usando la fórmula $a^2 \times b \times 0,52$, en la que a es el diámetro más corto y b es el diámetro más largo. Cuando el volumen tumoral medio alcanzó aproximadamente 100 mm^3 , los ratones se distribuyeron al azar en siete grupos de tratamiento (n = 4). Las proteínas VEGF-Trap y el control de placebo se administraron dos veces a la semana subcutáneamente. Al terminar el experimento, los ratones se eutanasiaron mediante asfixia con CO_2 . Los tumores se fijaron en formalina amortiguada al 10% (Fisher Scientific) toda la noche a 4°C , y después se procesaron para la inmunohistoquímica como se describió previamente (6).
20

Resultados

Se ligaron dos casetes de expresión diferentes a los vectores de AAV para crear AAV-VT1 que codifica VEGF-Trap 1 (Holash et al, 2002) y AAV-VEGF-Trap 3 como se muestra en la Figura 1. Células 293T que expresan estos constructos produjeron proteínas purificadas a partir de medio acondicionado de células 293 del tamaño predicho (VT1-48,7 kDa, VT3-37,4 kDa) cuando se analizaron en condiciones desglucosilantes (Figura 2-línea 3-VT3, línea 6-VT1). Además, se produjeron niveles similares de proteína cuando las células 293T se infectaron con el virus AAV, como se evaluó mediante Elisa. Como se muestra en la Figura 3, hubo una elevación similar dependiente de la dosis en la concentración tanto de VEGF-Trap 1 como de VEGF-Trap 3 al incrementar la multiplicidad de infección. Las concentraciones medias medidas de estas dos proteínas estaban dentro de 20% entre sí, y esto no fue estadísticamente diferente.
25
30

Un ensayo de afinidad de unión (Figura 4) reveló que tanto VT1 como VT3 tuvieron una afinidad de unión superior por VEGF en comparación con los dominios extracelulares de longitud completa VEGF-Receptor 1 y Receptor 2. La afinidad de unión de VT1 se estimó en 1,8 pM, y la de VT3 en 7,3 pM. La fusión de Ig del dominio extracelular VEGF-R1 demostró una afinidad de unión de 25,9 pM, y el dominio extracelular VEGF-R2, 92,3 pM.
35

Tras la deposición subcutánea de 100 μg de proteína purificada en los flancos de ratones atímicos, se logró una concentración sérica pico ligeramente mayor de VEGF-Trap 1 (Figura 5) 27,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ frente a 14 $\mu\text{g}/\text{ml}$), aunque ambas proteínas todavía estaban presentes en el suero a las 120 horas después de la infección. Este hallazgo contrastaba notablemente con los niveles de proteína detectados tras el suministro génico a base de AAV en el músculo esquelético, en el que observamos que VEGF-Trap 3 tuvo un perfil farmacocinético notablemente mejorado en comparación con VEGF-Trap 1. Para este experimento, se inyectaron intramuscularmente a los ratones con partículas de AAV E11 1,25 (VT3)-1,85 (VT1), en un volumen total de 50 μl . Las medidas de ELISA en suero en serie revelaron que mientras la proteína AAV VT3 se pudo detectar a aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante >120 días. La proteína AAV VT1 estaba presente en el suero a <0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante todo (120 días) el análisis (Figura 6). Estos datos mostraron que el suministro de proteína VT3 mediado por AAV da como resultado una expresión sostenida y a largo plazo de VT3 *in vivo*, y que es significativamente más eficaz que el suministro de VT1 mediado por AAV.
40
45

Se determinó el nivel de VEGF-Trap 3 requerido para inhibir el crecimiento tumoral. Esto se llevó a cabo usando el modelo de tumor de carcinoma pulmonar de Lewis subcutáneo sensible a la angiogénesis. A los animales se les inyectó en el flanco con células 5E5. 7 días más tarde, se llevó a cabo un tratamiento bisemanal con VEGF-Trap 3. Como se observa en la Figura 7, hay una inhibición del crecimiento tumoral de LLC dependiente de la dosis, mientras que los animales que reciben una cantidad tan baja como 1 mg/kg/dosis mostraron una inhibición del crecimiento comparable a los ratones tratados con PBS, y la mejor inhibición del crecimiento se observó con una dosificación bisemanal de 4 mg/kg. También se midieron los niveles séricos de VEGF-Trap 3 en dos puntos durante el estudio. En el Día 6, 72 horas después de la segunda dosis del tratamiento, los niveles promedio de VEGF-Trap 3 fueron 3,6, 10,1, y 62 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para los regímenes de dosificación de 1, 2 y 4 mg/kg, respectivamente. En el día 14, 96
50
55

horas después de la 4ª dosis, los niveles de VEGF-Trap fueron 0,7, 5,9 y 30,2 µg/ml para los regímenes de dosificación de 1, 2 y 4 mg/kg, respectivamente.

El suministro de proteínas antiangiogénicas a base de genes ofrece ventajas teóricas con respecto a las administraciones proteicas repetidas de tales proteínas. Se requiere un nivel continuo y persistente de inhibición de la angiogénesis para optimizar la eficacia de esta terapia. De las diversas modalidades de suministro génico actualmente disponibles, la transducción a base de AAV de músculo esquelético es considerada una modalidad relativamente segura, y los ensayos clínicos que usan esta modalidad están en marcha (4). Sin embargo, tras el suministro génico, una variedad de factores puede influir en el perfil farmacocinético de la proteína suministrada. La proteína VEGF-Trap original se diseñó para eliminar motivos cargados positivamente en comparación con los dominios extracelulares de longitud completa del receptor de VEGF, y de ese modo reducir interacciones con proteoglicanos cargados negativamente en la matriz extracelular tras la deposición subcutánea. En los esfuerzos iniciales para desarrollar vectores de terapia génica capaces de suministrar un nivel sérico suficientemente elevado de actividad antiangiogénica mediante el uso de la VEGF-Trap 1, se encontró (Figura 6) que los niveles de VEGF-Trap 1 segregados por vectores de AAV tras la inyección IM fueron muy bajos. La VEGF-Trap 1 se modificó eliminando el 3^{er} dominio de Ig de la VEGF-Receptor 2, uno de los dos motivos que se unen a VEGF presentes en VEGF-Trap 1. Esta modificación redujo además el tamaño y carga de la proteína. Tras la transducción a base de AAV del músculo esquelético, los niveles de VEGF-Trap 3 logrados fueron 2 logs mayores que aquellos que se podrían lograr a partir de un vector que expresa VEGF-Trap 1.

REFERENCIAS

1. Holash, J., Davis, S., Papadopoulos, N., Croll, S. D., Ho, L., Russell, M., Boland, P., Leidich, R., Hylton, D., Burova, E., Ioffe, E., Huang, T., Radziejewski, C., Bailey, K., Fandl, J. P., Daly, T., Wiegand, S. J., Yancopoulos, G. D., y Rudge, J. S. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 11393-11398, 2002.
2. Kuo, C. J., Farnebo, F., Yu, E. Y., Christofferson, R., Swearingen, R. A., Carter, R., von Recum, H. A., Yuan, J., Kamihara, J., Flynn, E., D'Amato, R., Folkman, J., y Mulligan, R. C. Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 4605-4610, 2001.
3. Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., y Kabbinavar, F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 350: 2335-2342, 2004.
4. Flotte, T. R., Brantly, M. L., Spencer, L. T., Byrne, B. J., Spencer, C. T., Baker, D. J., y Humphries, M. Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus alpha 1-antitrypsin (rAAV2-CB-hAAT) gene vector to AAT-deficient adults. *Human Gene Therapy*, 15: 93-128, 2004.
5. Kisker, O., Becker, C. M., Prox, D., Fannon, M., D'Amato, R., Flynn, E., Fogler, W. E., Sim, B. K., Allred, E. N., Pirie-Shepherd, S. R., y Folkman, J. Continuous administration of endostatin by intraperitoneally implanted osmotic pump improves the efficacy and potency of therapy in a mouse xenograft tumor model. *Cancer Research*, 61: 7669-7674, 2001.
6. Tjin Tham Sjin, R. M., Satchi-Fainaro, R., Birsner, A. E., Ramanujam, V. M., Folkman, J., y Javaherian, K. A 27-amino-acid synthetic peptide corresponding to the NH2-terminal zinc-binding domain of endostatin is responsible for its antitumor activity. *Cancer Research*, 65: 3656-3663, 2005.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Carter, Bob

Lee, Jeng-Shin

45 Bullain, Szofia S.

Mulligan, Richard C.

<120> PROTEÍNA DE UNIÓN A VEGF PARA EL BLOQUEO DE ANGIOGENESIS

<130> 36443-011WO1

<150> US 61/525,278

50 <151> 2011-08-19

<160> 8

ES 2 664 224 T3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 687

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
1 5 10 15

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Lys Leu Lys Asp Pro
20 25 30

Glu Leu Ser Leu Lys Gly Thr Gln His Ile Met Gln Ala Gly Gln Thr
35 40 45

Leu His Leu Gln Cys Arg Gly Glu Ala Ala His Lys Trp Ser Leu Pro
50 55 60

Glu Met Val Ser Lys Glu Ser Glu Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Ala
65 70 75 80

Cys Gly Arg Asn Gly Lys Gln Phe Cys Ser Thr Leu Thr Leu Asn Thr
85 90 95

Ala Gln Ala Asn His Thr Gly Phe Tyr Ser Cys Lys Tyr Leu Ala Val
100 105 110

Pro Thr Ser Lys Lys Lys Glu Thr Glu Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile
115 120 125

Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
130 135 140

Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
145 150 155 160

ES 2 664 224 T3

Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
 165 170 175

Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
 180 185 190

Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
 195 200 205

Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
 210 215 220

Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val
 225 230 235 240

Lys Leu Leu Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr
 245 250 255

Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys
 260 265 270

Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Arg Ile Asp Gln Ser Asn Ser His
 275 280 285

Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn Lys
 290 295 300

Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys
 305 310 315 320

Ser Val Asn Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Phe Ile Thr Val
 325 330 335

Lys His Arg Lys Gln Gln Val Leu Glu Thr Val Ala Gly Lys Arg Ser
 340 345 350

Tyr Arg Leu Ser Met Lys Val Lys Ala Phe Pro Ser Pro Glu Val Val
 355 360 365

Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu Lys Ser Ala Arg Tyr Leu
 370 375 380

Thr Arg Gly Tyr Ser Leu Ile Ile Lys Asp Val Thr Glu Glu Asp Ala
 385 390 395 400

Gly Asn Tyr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Lys Gln Ser Asn Val Phe Lys

ES 2 664 224 T3

<211> 469

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Leu Ile Ser Trp Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Arg Gly Gly Tyr Ser Thr Ala Gly Phe Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190

5

ES 2 664 224 T3

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 3

ES 2 664 224 T3

<211> 356

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> VEGF-Trap 3

<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 Ser Ser Gly Ser Asp Thr Gly Arg Pro
20 25 30

Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu
35 40 45

Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr
50 55 60

Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys
65 70 75 80

Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
85 90 95

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

Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile
115 120 125

Asp Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
130 135 140

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
145 150 155 160

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
165 170 175

ES 2 664 224 T3

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 180 185 190

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 195 200 205

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 210 215 220

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 225 230 235 240

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 245 250 255

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 260 265 270

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 275 280 285

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 290 295 300

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 305 310 315 320

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 325 330 335

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 340 345 350

Ser Pro Gly Lys
 355

<210> 4

<211> 29

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido señal

<400> 4

Met Met Ser Phe Val Ser Leu Leu Leu Val Gly Ile Leu Phe Trp Ala
 1 5 10 15

Thr Glu Ala Glu Gln Leu Thr Lys Cys Glu Val Phe Gln

10

20

25

<210> 5

ES 2 664 224 T3

<211> 27

<212> PRT

<213> Péptido señal

<400> 5

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
1 5 10 15

5 Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser
20 25

<210> 6

<211> 1356

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 6

Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu
1 5 10 15

Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro
20 25 30

Arg Leu Ser Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr
35 40 45

Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro
50 55 60

Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser
65 70 75 80

Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn
85 90 95

Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser
100 105 110

Val Ile Tyr Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser
115 120 125

Val Ser Asp Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys
130 135 140

Thr Val Val Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser
145 150 155 160

ES 2 664 224 T3

Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg
 165 170 175
 Ile Ser Trp Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile
 180 185 190
 Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser
 195 200 205
 Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr
 210 215 220
 Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
 225 230 235 240
 Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
 245 250 255
 Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
 260 265 270
 Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
 275 280 285
 Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
 290 295 300
 Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
 305 310 315 320
 Phe Val Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met
 325 330 335
 Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala
 340 345 350
 Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly
 355 360 365
 Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr
 370 375 380
 Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu
 385 390 395 400
 Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val

ES 2 664 224 T3

Arg Gln Leu Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn
660 665 670

Leu Glu Asn Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys
675 680 685

Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn
690 695 700

Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg
705 710 715 720

Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr
725 730 735

Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe
740 745 750

Ile Ile Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu Ile Ile Ile Leu
755 760 765

Val Gly Thr Ala Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu Leu Val Ile
770 775 780

Ile Leu Arg Thr Val Lys Arg Ala Asn Gly Gly Glu Leu Lys Thr Gly
785 790 795 800

Tyr Leu Ser Ile Val Met Asp Pro Asp Glu Leu Pro Leu Asp Glu His
805 810 815

Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp Ala Ser Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp
820 825 830

Arg Leu Lys Leu Gly Lys Pro Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Gln Val
835 840 845

Ile Glu Ala Asp Ala Phe Gly Ile Asp Lys Thr Ala Thr Cys Arg Thr
850 855 860

Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr His Ser Glu His Arg
865 870 875 880

Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly His His Leu
885 890 895

Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gly Gly Pro Leu
900 905 910

ES 2 664 224 T3

Met Val Ile Val Glu Phe Cys Lys Phe Gly Asn Leu Ser Thr Tyr Leu
 915 920 925

Arg Ser Lys Arg Asn Glu Phe Val Pro Tyr Lys Thr Lys Gly Ala Arg
 930 935 940

Phe Arg Gln Gly Lys Asp Tyr Val Gly Ala Ile Pro Val Asp Leu Lys
 945 950 955 960

Arg Arg Leu Asp Ser Ile Thr Ser Ser Gln Ser Ser Ala Ser Ser Gly
 965 970 975

Phe Val Glu Glu Lys Ser Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Ala Pro
 980 985 990

Glu Asp Leu Tyr Lys Asp Phe Leu Thr Leu Glu His Leu Ile Cys Tyr
 995 1000 1005

Ser Phe Gln Val Ala Lys Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys
 1010 1015 1020

Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu
 1025 1030 1035

Lys Asn Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile
 1040 1045 1050

Tyr Lys Asp Pro Asp Tyr Val Arg Lys Gly Asp Ala Arg Leu Pro
 1055 1060 1065

Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Thr Ile Phe Asp Arg Val Tyr Thr
 1070 1075 1080

Ile Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile
 1085 1090 1095

Phe Ser Leu Gly Ala Ser Pro Tyr Pro Gly Val Lys Ile Asp Glu
 1100 1105 1110

Glu Phe Cys Arg Arg Leu Lys Glu Gly Thr Arg Met Arg Ala Pro
 1115 1120 1125

Asp Tyr Thr Thr Pro Glu Met Tyr Gln Thr Met Leu Asp Cys Trp
 1130 1135 1140

His Gly Glu Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Ser Glu Leu Val Glu
 1145 1150 1155

ES 2 664 224 T3

His Leu Gly Asn Leu Leu Gln Ala Asn Ala Gln Gln Asp Gly Lys
 1160 1165 1170

Asp Tyr Ile Val Leu Pro Ile Ser Glu Thr Leu Ser Met Glu Glu
 1175 1180 1185

Asp Ser Gly Leu Ser Leu Pro Thr Ser Pro Val Ser Cys Met Glu
 1190 1195 1200

Glu Glu Glu Val Cys Asp Pro Lys Phe His Tyr Asp Asn Thr Ala
 1205 1210 1215

Gly Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Asn Ser Lys Arg Lys Ser Arg Pro
 1220 1225 1230

Val Ser Val Lys Thr Phe Glu Asp Ile Pro Leu Glu Glu Pro Glu
 1235 1240 1245

Val Lys Val Ile Pro Asp Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val
 1250 1255 1260

Leu Ala Ser Glu Glu Leu Lys Thr Leu Glu Asp Arg Thr Lys Leu
 1265 1270 1275

Ser Pro Ser Phe Gly Gly Met Val Pro Ser Lys Ser Arg Glu Ser
 1280 1285 1290

Val Ala Ser Glu Gly Ser Asn Gln Thr Ser Gly Tyr Gln Ser Gly
 1295 1300 1305

Tyr His Ser Asp Asp Thr Asp Thr Thr Val Tyr Ser Ser Glu Glu
 1310 1315 1320

Ala Glu Leu Leu Lys Leu Ile Glu Ile Gly Val Gln Thr Gly Ser
 1325 1330 1335

Thr Ala Gln Ile Leu Gln Pro Asp Ser Gly Thr Thr Leu Ser Ser
 1340 1345 1350

Pro Pro Val
 1355

<210> 7

<211> 26

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido señal

<400> 7

ES 2 664 224 T3

Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu
 1 5 10 15

Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser
 20 25

<210> 8

<211> 1071

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína quimérica de unión a VEGF

<400> 8

```

atggtgagct actgggacac tggggtgctg ctgtgtgccc tgctgagctg cctgctgctg      60
actggcagca gctctggctc tgacactggc aggccctttg tggagatgta ctctgagatc      120
cctgagatca tccacatgac tgagggcagg gagctgtgta tcccctgcag agtgaccagc      180
cccaacatca ctgtgaccct gaagaagttc cccctggaca ccctgatccc tgatggcaag      240
aggatcatct gggacagcag gaagggcttc atcatcagca atgccaccta caaggagatt      300
ggcctgctga cctgtgaggc cactgtgaat ggccacctgt acaagaccaa ctacctgacc      360
cacaggcaga ccaacacccat catcgatgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca      420
cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc      480
atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtgtgg acgtgagcca cgaagaccct      540
gaggtaaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgcaa gacaaaagccg      600
cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag      660
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct ccagcccc      720
atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg cagccccgag agccacaggt gtacaccctg      780
ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc      840
ttctatocca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac      900
aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcctctacag caagctcacc      960
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct     1020
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tcctgtctc cgggtaaata a                1071
  
```

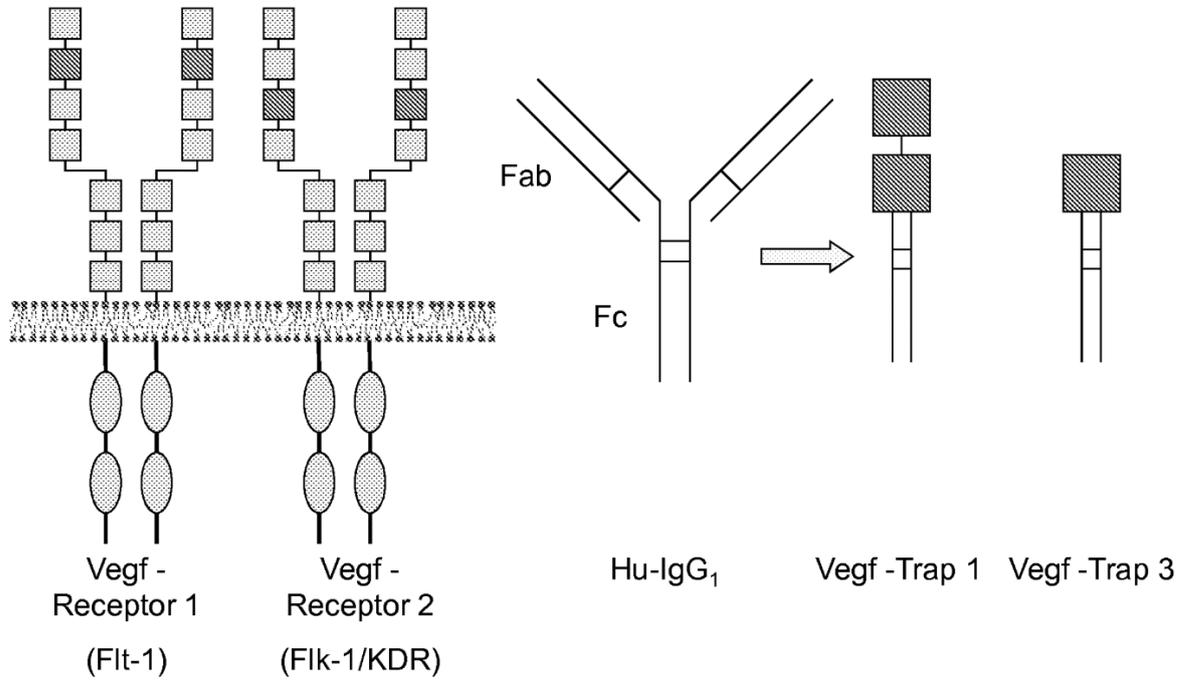
10

REIVINDICACIONES

1. Una proteína quimérica de unión a VEGF, que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
2. La proteína quimérica de unión a VEGF de la reivindicación 1, en la que la proteína de unión a VEGF consiste en SEQ ID NO: 3.
- 5 3. Una composición farmacéutica que comprende la proteína quimérica de unión a VEGF de la reivindicación 1 o 2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. Un polinucleótido aislado que codifica la proteína quimérica de unión a VEGF de la reivindicación 1 o 2.
5. Un vector recombinante, que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4.
- 10 6. El vector recombinante de la reivindicación 5, en el que el vector recombinante es un vector de expresión que es compatible con un sistema de expresión de proteína que usa células hospedantes seleccionadas del grupo que consiste en: células de mamífero, células de insecto, células de levadura, células bacterianas, y células vegetales.
7. El vector recombinante de la reivindicación 6, en el que el vector de expresión es un vector de expresión que es compatible con un sistema de expresión proteínica que usa células hospedantes de mamífero.
8. Una célula hospedante, que comprende el vector de expresión de la reivindicación 6 o 7.
- 15 9. El vector recombinante de la reivindicación 6 o 7, en el que el vector de expresión es un vector vírico.
10. El vector recombinante de la reivindicación 6 o 7, en el que el vector de expresión es un vector de virus adenoasociado (AAV) o un vector de lentivirus.
11. El vector recombinante de la reivindicación 10, en el que el vector de expresión es un vector de virus adenoasociado (AAV).
- 20 12. Una composición farmacéutica que comprende un vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 9, 10, u 11, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Un vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 9, 10, u 11, para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno angiogénico.
- 25 14. Una proteína quimérica de unión a VEGF de la reivindicación 1 o 2, para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno angiogénico.
15. Un método para producir una proteína quimérica de unión a VEGF, comprendiendo el método introducir un vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 9, 10, u 11 en una célula hospedante aislada, hacer crecer la célula en condiciones que permitan la producción de la proteína quimérica de unión a VEGF, y recuperar la proteína quimérica de unión a VEGF así producida.

30

Figura 1. Estructura de Vegf-Trap 1 y de Vegf-Trap 3



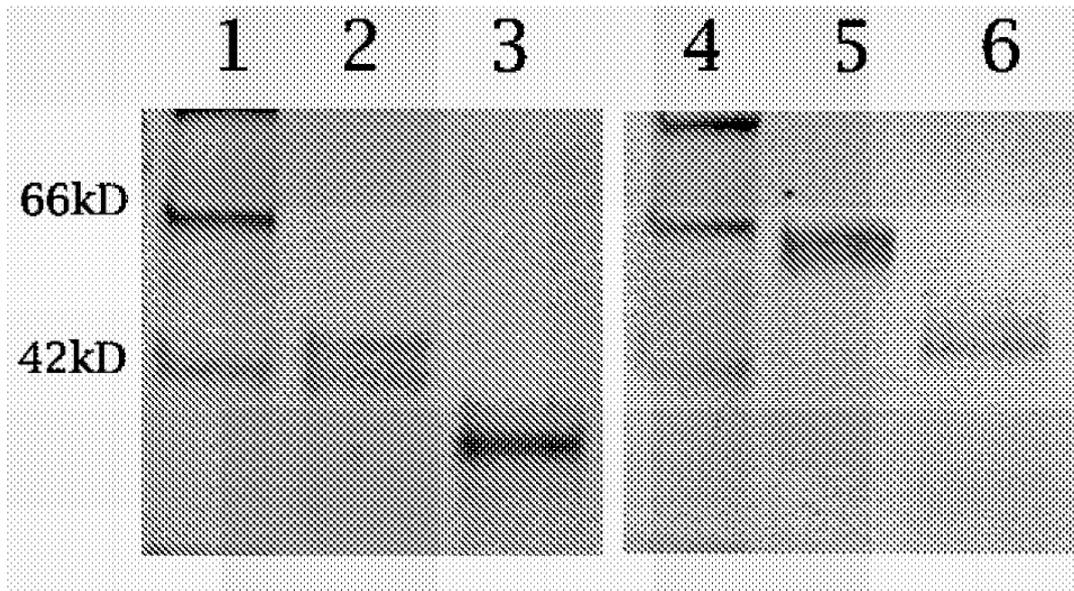


Figura 2

Concentración de medio acondicionado de VEGF-T raps tras la infección con virus AAV a 10^3 , 10^4 , y 10^5 MOI

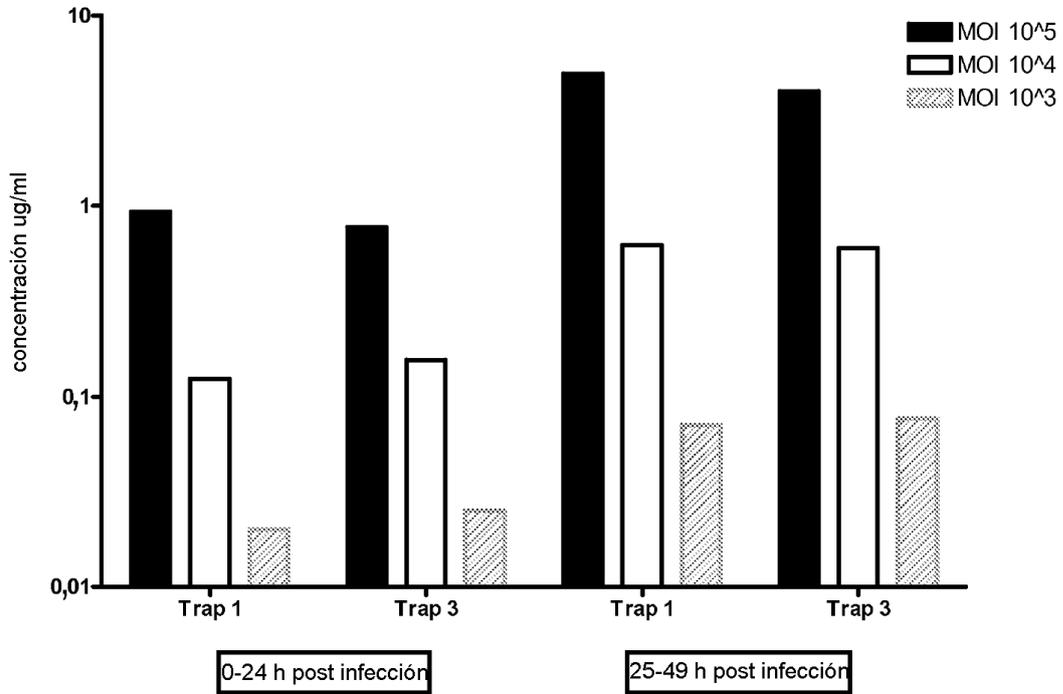


Figura 3

Curvas ajustadas para la unión a VEGF para diversas VEGF-Traps, Flk-Ig, Kdr-Ig e IgG

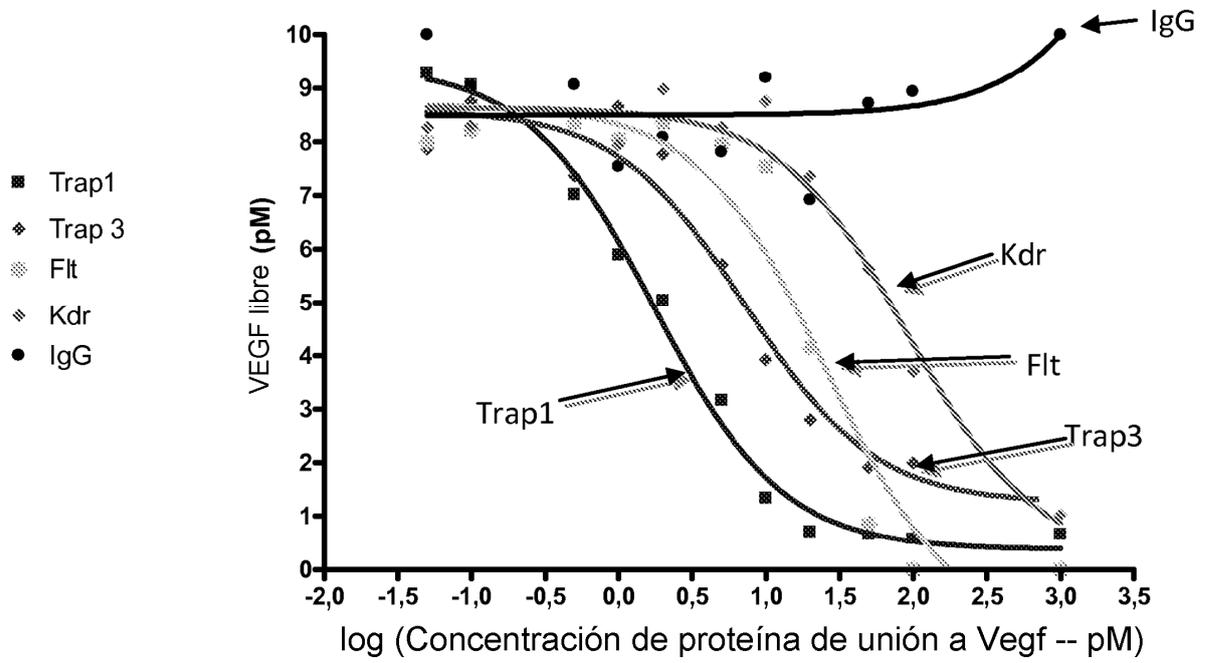


Figura 4

Concentraciones séricas in vivo tras la inyección de 100 ug de proteína VT1 o VT3

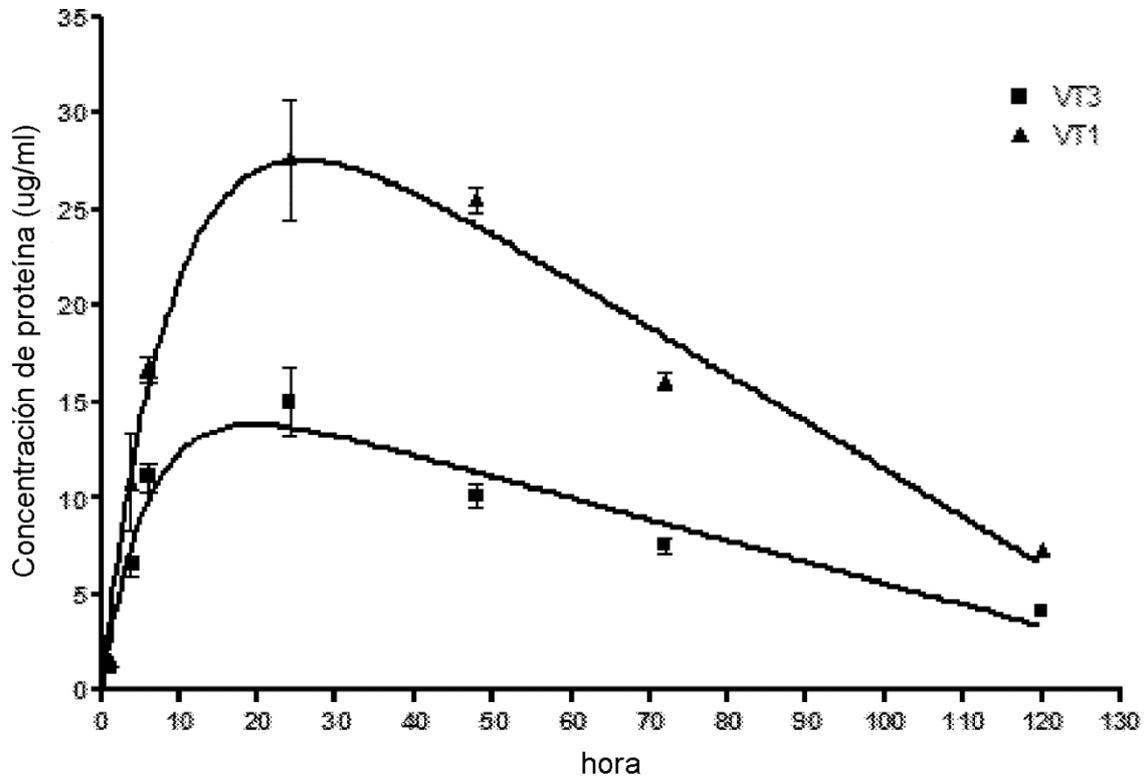


Figura 5

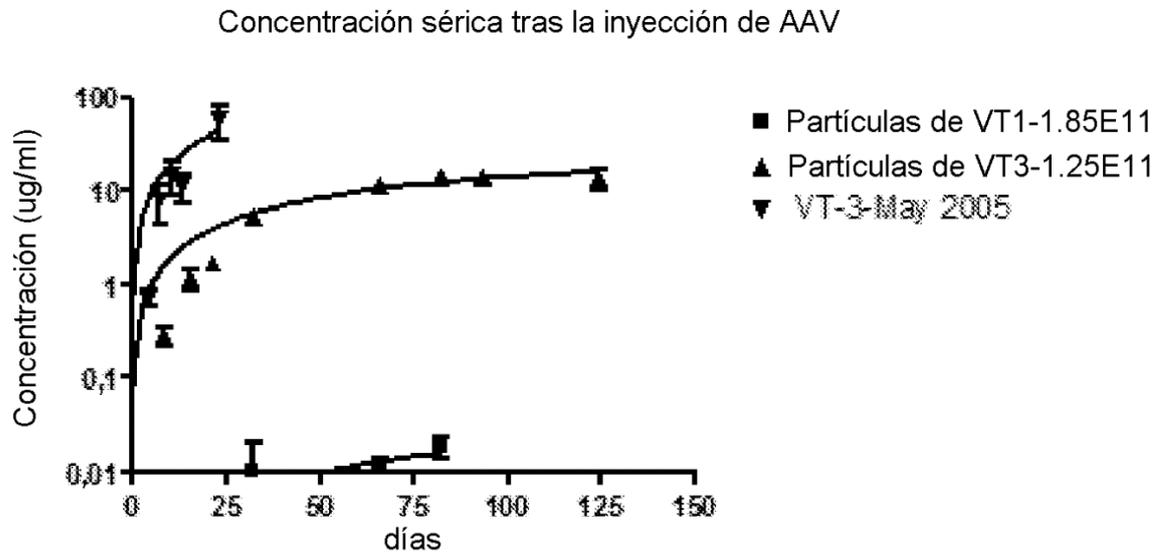


Figura 6

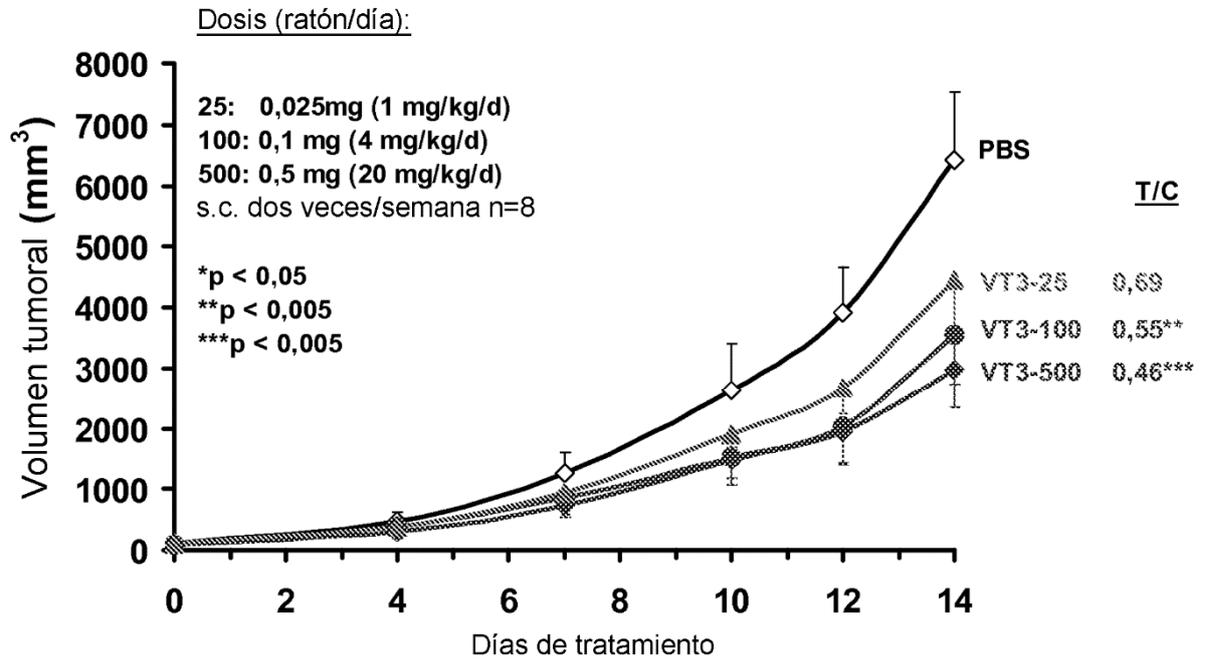


Figura 7

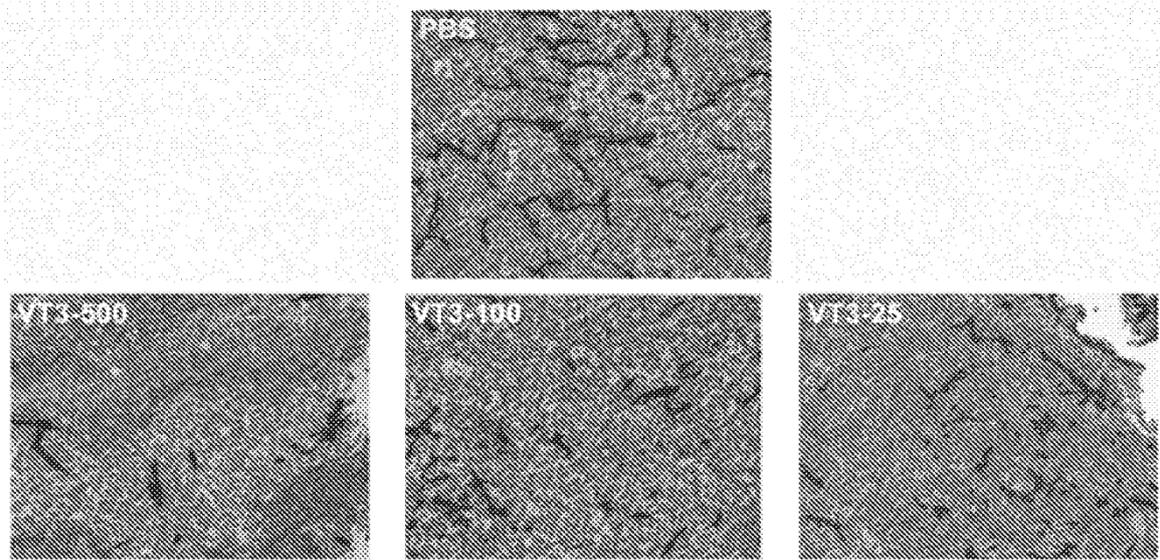


Figura 8