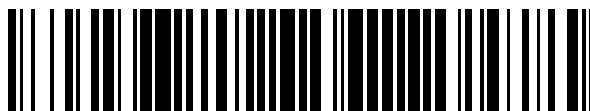


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 527**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2017** **E 17167657 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018** **EP 3239172**

54 Título: **Proteína de fusión para unión a VEGF**

30 Prioridad:

**26.04.2016 KR 20160051152**

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

**14.11.2018**

73 Titular/es:

**KOREA PRIME PHARM CO., LTD. (100.0%)  
211, Jungang-ro Dong-gu  
Gwangju 61473, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, DAEIK y  
SEO, INRA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 689 527 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Proteína de fusión para unión a VEGF

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una proteína de fusión del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) que se usa en la preparación de un agente para el tratamiento de cánceres o enfermedades oculares. La proteína de fusión de la presente invención es un anticuerpo biespecífico multivalente, en el que el dominio extracelular del VEGFR se fusiona a la región Fc del dominio de tipo inmunoglobulina.

**Técnica anterior**

15 Un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una proteína de señalización que desempeña un papel importante en la promoción tanto de vasculogénesis como de angiogénesis. El VEGF funciona como parte del sistema que restaura y suministra oxígeno a los tejidos, cuando la circulación sanguínea es inadecuada. La función bien conocida del VEGF es crear nuevos vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario, en el sitio lesionado, en el músculo después del ejercicio y en la formación de vasos para evitar vasos bloqueados.

20 La cantidad aumentada de VEGF, sin embargo, puede causar angiogénesis anormal. En particular, la angiogénesis está relacionada con el desarrollo tumoral de manera que está implicada en la generación de tumores primarios o metastásicos. Además, la metástasis del cáncer se produce cuando una célula cancerosa primaria es introducida en el vaso sanguíneo por la angiogénesis. Se ha notificado que la angiogénesis causa, por ejemplo, asma, dificultad para respirar, endometriosis; inflamación aguda y crónica, tal como, aterosclerosis y edema tisular; enfermedad infecciosa, tal como, hepatitis y sarcoma de Kaposi; enfermedades autoinmunitarias, tales como, diabetes, psoriasis, reumatitis y tiroiditis; y otras enfermedades que comprenden retinopatía diabética, neovascularización coroidea (CNV), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), angiofibroma, etc. (Carmeliet, P. & Jain, RK. 2000. Nature 407: 249-257; Kuwano M. et al. 2001. Intern Med 40: 565-572).

30 El VEGF, que desempeña un papel importante en la angiogénesis, influye principalmente en las células del endotelio de los vasos. De acuerdo con un ensayo in vitro, el VEGF estimula la división y la migración de las células endoteliales, y aumenta la permeabilidad de los vasos capilares también.

35 En mamíferos, el VEGF se clasifica en 5 tipos, tales como, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PIGF (factor de crecimiento placentario). El VEGF-A estimula la angiogénesis, la migración de células endoteliales, la división, la formación de la luz de vasos sanguíneos, la quimiotaxis de macrófagos y granulocitos, y la expansión de vasos sanguíneos. El VEGF-B promueve la angiogénesis embrionaria, en particular, el desarrollo de tejidos miocárdicos. El VEGF-C acelera la linfangiogénesis, y el VEGF-D es necesario para el crecimiento de vasos linfáticos que encierran a los bronquiolos pulmonares. Además, el PIGF es importante para la angiogénesis en la vasculogénesis, isquemia, inflamación, recuperación de lesiones y cáncer.

45 El receptor del VEGF (VEGFR), un receptor cuyo ligando es VEGF, consiste en 3 subtipos (VEGFR1 (flt-1), VEGFR2 (Kdr/flk-1) y VEGFR3 (flt-4)), y existe en forma de VEGFR unido a la membrana (mbVEGFR) o VEGFR soluble (sVEGFR) a través del corte y empalme alterno de genes.

El VEGFR se expresa en neuronas, sarcoma de Kaposi y células madre hematopoyéticas, mientras que se encuentra habitualmente en células endoteliales. Una vez que el VEGF se une al VEGFR, las señales se transfieren por dimerización del receptor y fosforilación de los residuos de tirosina del receptor.

50 El VEGF se une a sus receptores, VEGFR1 y VEGFR2, con alta afinidad y transfiere señales principalmente a través del VEGFR2, e induce el mecanismo de angiogénesis que comprende el crecimiento y la migración de células endoteliales.

Por lo tanto, VEGF y VEGFR2 han sido estudiados como dianas para inhibir o suprimir la angiogénesis inducida por el VEGF (Ellis y Hicklin, 2008. Nature Rev. Cancer, 8:579; Youssoufian et al. 2007. Clin. Cancer Res., 13:5544s).

55 El anticuerpo biespecífico o anticuerpo multiespecífico notificado en los estudios previos incluye i) Conbercept que consiste en el dominio 2 de VEGFR1, el dominio 3, el dominio 4 de VEGFR2 y Fc de IgG1, ii) VEGF-Trap (aflibercept) que consiste en el dominio 2 de VEGFR1, el dominio 3 de VEGFR2 y Fc de IgG1, y iii) VEGF-Grab que consiste en el dominio 2, el dominio 3 de VEGFR1 y Fc de IgG1.

60 Los inventores, han estudiado con entusiasmo para desarrollar un anticuerpo multiespecífico para el tratamiento de cánceres y enfermedades oculares suprimiendo o inhibiendo la angiogénesis, y han descubierto sorprendentemente que la construcción de proteína de fusión del dominio de tipo inmunoglobulina de la presente invención se une a VEGF-A y PIGF con sensibilidad y especificidad elevadas, y tiene efectos significativamente excelentes de inhibición de la proliferación, el crecimiento y/o la angiogénesis de diversos tumores.

PROBLEMA TÉCNICO

Por consiguiente, el objetivo de la presente invención es proporcionar una proteína de fusión recombinante para el tratamiento de cánceres y/o enfermedades oculares causadas por angiogénesis.

5 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar ácidos nucleicos, vectores recombinantes que comprenden los ácidos nucleicos, y células huésped para expresar los vectores recombinantes.

10 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende las proteínas de fusión recombinantes expresadas por las células huésped para prevenir o tratar cánceres y/o enfermedades oculares.

SOLUCIÓN TÉCNICA

15 Con el fin de resolver los problemas técnicos, La presente invención proporciona una proteína de fusión de VEGFR de un anticuerpo multiespecífico 4-valente. La proteína de fusión de la presente invención, que es una proteína de fusión recombinante del dominio de tipo inmunoglobulina que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), comprende (a) un dominio Fc de IgG1, en el que las dos cadenas pesadas están enlazadas por un puente disulfuro, y (b) cuatro dominios de inmunoglobulina 2 del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular VEGFR1, en el que un primer y un segundo dominios de inmunoglobulina 2 se fusionan secuencialmente a cada cadena pesada del dominio Fc de (a).

25 Además, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica dicha proteína de fusión recombinante, en la que dicha proteína de fusión comprende (a) un dominio Fc de IgG1, en el que dos cadenas pesadas están enlazadas por un puente disulfuro; y (b) cuatro dominios de inmunoglobulina 2 del VEGFR1, en la que un primer dominio de inmunoglobulina 2 (SEQ ID NO: 1) del VEGFR1 y un segundo dominio de inmunoglobulina 2 (SEQ ID NO: 1) del VEGFR1 se fusionan secuencialmente a cada cadena pesada (SEQ ID NO: 2) del dominio Fc de (a),

30 y la molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio Fc y la secuencia de ácido nucleico que codifica cuatro dominios de inmunoglobulina 2 del VEGFR1.

Además, la presente invención proporciona un vector de expresión recombinante que comprende dicha molécula de ácido nucleico aislada. Dicho vector de expresión recombinante puede ser uno seleccionado entre el grupo que consiste en YAC (cromosoma artificial de levadura), YE<sub>p</sub> (plásmido episómico de levadura), YI<sub>p</sub> (plásmido integrativo de levadura) y virus recombinantes.

35 En una realización de la presente invención, se proporciona una célula huésped que comprende dicho vector de expresión recombinante. El vector de expresión recombinante se inserta en la célula huésped para producir células transformadas. La célula huésped apropiada para el vector de expresión recombinante puede ser una seleccionada entre el grupo que consiste en bacterias, levadura, célula de insecto y célula de mamífero.

Puede ser un procarionta, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* genus, *Pseudomonas* genus, *Proteus mirabilis* genus o *Staphylococcus* genus.

45 Además, la célula huésped bacteriana puede ser una célula eucariota, incluyendo, por ejemplo, hongos, tales como *Aspergillus* genus; levadura, tal como *Pichia pastoris* genus, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* genus y *Neurospora crassa*; otras células eucariotas inferiores; y células eucariotas superiores, tales como células de insecto. Además, la célula eucariota puede ser una célula vegetal o una célula de mamífero, preferentemente célula COS7 (células de riñón de mono), célula NSO, célula SP2/0, célula CHO (ovario de hámster chino), célula W138, célula BHK (célula de riñón de cría de hámster), célula MDCK, línea celular de mieloma múltiple, la célula HuT78 y la célula HEK293 pueden usarse para la expresión. En una realización preferida de la invención, la célula huésped es una célula CHO.

55 En la presente invención, el método para la transformación de células huésped comprende introducir ácidos nucleicos en organismos, células, tejidos u órganos, aunque el método más apropiado puede seleccionarse de acuerdo con la célula huésped. Los métodos de transformación disponibles incluyen, por ejemplo electroporación, fusión de protoplastos, precipitación con CaPO<sub>4</sub>, precipitación con CaC<sub>12</sub>, agitación con fibras de carburo de silicio, transformación mediada por *Agrobacterium*, y transformación mediada por PEG, sulfato de dextrano, lipofectamina y secado/inhibición.

60 Para expresar la proteína de fusión de la presente invención, pueden emplearse diversas combinaciones de vectores de expresión recombinantes y células huésped. El vector de expresión preferido para células eucariotas comprende secuencias reguladoras de la expresión génica derivadas de, pero sin limitación, SV40, papilomavirus bovino, adenovirus, virus adenoasociados, citomegalovirus y retrovirus.

65 El vector de expresión, que se puede usar para huéspedes bacterianos, comprende plásmidos bacterianos, tales

como, pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, vector pUC, col EI, pCRI, pBR322, pMB9 y derivados de los mismos, obtenidos a partir de E. coli; un plásmido que tiene un amplio rango de huéspedes, tal como RP4; ADN de fago ejemplificados por diversos derivados de fago lambda, tales como  $\lambda$ gt10,  $\lambda$ gt11 y NM989; otros fagos de ADN, tales como M13 y fago de ADN monocatenario filamentoso. El vector de expresión disponible para células de levadura puede ser un plásmido y sus derivados. El vector de expresión para células de insecto incluye pVL941. Por lo tanto, en la presente invención, el vector de expresión recombinante puede ser un plásmido, YAC (cromosoma artificial de levadura), YE<sub>p</sub> (plásmido episómico de levadura), Y<sub>ip</sub> (plásmido integrativo de levadura) o virus recombinantes.

En una realización de la presente invención, se proporciona un método para producir la proteína de fusión de VEGFR. El método para producir una proteína de fusión de un dominio de tipo inmunoglobulina que se une al VEGF comprende (a) incubar las células huésped de acuerdo con la invención en condiciones para producir un polipéptido (que es un polipéptido de fusión), y (b) recuperar el polipéptido producido de este modo. La célula huésped tiene el vector de expresión recombinante en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión está enlazada de forma operativa a la secuencia reguladora de la expresión.

El polipéptido de fusión puede expresarse usando el vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica (a) un primer dominio de tipo inmunoglobulina 2 de VEGFR1; (b) un segundo dominio de tipo inmunoglobulina 2 de VEGFR1; y (c) un polipéptido de la región Fc de IgG humana, en un sistema de expresión procarionta o eucariota. El polipéptido de fusión obtenido puede purificarse mediante los métodos convencionales para producir proteínas biológicamente estables. Por ejemplo, para este fin puede usarse diálisis, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) y PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida), aunque sin limitarse a los mismos.

Además, la presente invención proporciona una proteína de fusión de un dominio de tipo inmunoglobulina producida de acuerdo con el método anterior en el presente documento, y concretamente una proteína de fusión de VEGFR preparada mediante el método anterior. De acuerdo con los ejemplos 2 a 4 de la memoria descriptiva, las proteínas de fusión de la presente invención tienen afinidades de unión significativamente aumentadas por los ligandos diana, VEGF-A y PlGF, en comparación con aflibercept y bevacizumab. Además, de acuerdo con el ejemplo 5, la proteína de fusión de la presente invención (KP-VR2) puede usarse como anti-VEGF, dado que se une al VEGF con sensibilidad y selectividad elevadas cuando se administra a un sujeto que necesita tratamiento de una enfermedad relacionada con el VEGF. Además, de acuerdo con el ejemplo 6, la proteína de fusión (KP-VR2) tiene perfiles farmacocinéticos similares a aflibercept y, por lo tanto, puede sustituir al anti-VEGF comercializado o usarse en combinación con él.

Por lo tanto, la proteína de fusión de la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de tumores que comprende la proteína de fusión de acuerdo con la invención como un ingrediente farmacológicamente activo y excipientes farmacéuticamente aceptables.

Además, la proteína de fusión de la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades oculares causadas por la angiogénesis en el ojo, que comprende la proteína de fusión de acuerdo con la invención como un ingrediente farmacológicamente activo, y excipientes farmacéuticamente aceptables.

En la presente invención, las enfermedades oculares relacionadas con la angiogénesis comprenden, por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad (ARMD), degeneración macular relacionada con la edad exudativa, neovascularización coroidea (CNV), miopía patológica, retinopatía diabética, edema macular diabético, oclusiones vasculares retinianas, retinopatía del prematuro (ROP), glaucoma neovascular (NVG) y glioma angiogénico. Además, La neovascularización coroidea puede ser CNV miópica, CNV traumática, CNV debida a uveítis, histoplasmosis ocular o neovascularización coroidea idiopática.

Además, de acuerdo con el ejemplo 7, la proteína de fusión de la presente invención inhibe o suprime de forma más eficiente la migración y la invasión de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y Ea-hy926 (línea celular híbrida endotelial humana), a menor concentración. Esto sugiere que la presente proteína de fusión puede usarse como un agente de inhibición de la angiogénesis eficaz para tratar enfermedades, incluyendo cánceres y enfermedades oculares angiogénicas, dado que la migración y la invasión celulares son importantes en la progresión de la vasculogénesis de células endoteliales.

Además, los ejemplos 8 a 10 respaldan que la presente proteína de fusión (KP-VR2) tiene actividad inhibitoria sobre diversos carcinomas y líneas celulares de fibroblastos derivadas de ser humano, y actividad inhibitoria sobre sus xenoinjertos en ratones atímicos.

En una realización, el tumor que puede ser tratado mediante la proteína de fusión de la presente invención comprende, por ejemplo, tumores epidermoides, tumores escamosos en cabeza y cuello, tumor colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón microcítico y cáncer de pulmón no microcítico), cáncer pancreático, cáncer de tiroides, cáncer de ovario, cáncer de hígado, sarcoma de Kaposi, anomalías de proliferación del sistema nervioso central (SNC) (neuroblastoma, carcinoma de vasos capilares,

meningioma y metástasis cerebral), melanoma, cáncer de riñón, tumor gastrointestinal, rhabdomyosarcoma (RMS), neuroblastoma, leiomyosarcoma, etc.

5 La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por separado o en combinación con otro  
tratamiento al mismo tiempo o secuencialmente, de acuerdo con la enfermedad a tratar. La composición  
farmacéutica de la presente invención puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, solución  
tampón, estabilizante o un vehículo farmacéuticamente aceptable u otros materiales bien conocidos por los expertos  
en la materia. Estos materiales no son tóxicos y no interfieren ni interactúan con los efectos farmacológicos de los  
10 principios activos, y sus propiedades precisas pueden depender de las vías de administración, tales como oral,  
mucosal y parenteral (por ejemplo, intravenosa). La proteína de fusión de la presente invención se puede inyectar  
con la cantidad de 0,001 a 5 mg/ojo, o 1 ~ 10 mg/kg.

#### EFFECTOS VENTAJOSOS

15 El VEGFR de la presente invención, un anticuerpo 4-valente, es una proteína de fusión de un dominio de tipo  
inmunoglobulina, y comprende (a) un dominio Fc de IgG1, en el que las dos cadenas pesadas están enlazadas por  
un puente disulfuro, y (b) cuatro dominios de inmunoglobulina 2 de VEGFR1, en el que dos dominios de  
inmunoglobulina 2 se fusionan secuencialmente a cada cadena pesada del dominio Fc de (a). El VEGFR de la  
presente invención tiene una afinidad de unión significativamente mejorada a VEGF y PIGF, y tiene una excelente  
20 actividad inhibitoria sobre la migración y la invasión de células endoteliales, e inhibe el crecimiento y la proliferación  
de diversos cánceres y fibroblastos. De este modo, la presente proteína de fusión puede usarse para el desarrollo de  
un agente farmacéutico para el tratamiento de cánceres y enfermedades oculares causadas por angiogénesis.

#### Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 ilustra construcciones de proteína de fusión que incluyen la proteína de fusión de la presente  
invención y otras proteínas de fusión de la técnica anterior.

30 Las figuras 2a, 2b y 3 ilustran las estructuras de aflibercept y KP-VR2 (proteína de fusión de VEGFR) de la  
presente invención. La figura 2a muestra las interacciones de ligandos de VEGF y receptores de VEGF.

La figura 4 muestra el peso molecular de la proteínas de fusión KP-VR2 confirmado mediante SDS-PAGE y  
transferencia Western.

35 La figura 5 muestra afinidades de unión de la proteína de fusión de la presente invención, aflibercept y  
bevacizumab por VEGF-A165 o VEGF-A121.

La figura 6 muestra afinidades de unión de la proteína de fusión de la presente invención, aflibercept y  
bevacizumab por PIGF.

40 La figura 7 muestra las interacciones de unión máximas entre la presente proteína de fusión o aflibercept y  
VEGF-A165.

45 Las figuras 8a y 8b muestran perfiles farmacocinéticos dependiendo de vías de administración de la presente  
proteína de fusión, en comparación con aflibercept.

Las figuras 9a y 9b muestran los efectos de la proteína de fusión de la presente invención, aflibercept y  
bevacizumab sobre la invasión de HUVEC.

50 Las figuras 10a y 10b muestran los efectos de la proteína de fusión de la presente invención, aflibercept y  
bevacizumab sobre la migración de Ea-hy926.

Las figuras 11a y 11b muestran la capacidad de la proteína de fusión de la presente invención para inhibir  
proliferaciones de nueve carcinomas, en comparación con aflibercept.

55 Las figuras 12 y 13 muestran la capacidad inhibitoria de la proteína de fusión de la presente invención, para  
viabilidades celulares de carcinomas y fibroblastos resistentes anti-VEGF, en comparación con aflibercept.

60 Las figuras 14 a 17 representan la comparación del crecimiento tumoral y pesos tumorales en modelos de cáncer  
en ser humano (HT-29, LOVO y SKUT1B).

La figura 18 muestra el vector de expresión recombinante para KP-VR2.

La figura 19 muestra el vector de expresión recombinante para KP-VR3.

65

## MEJOR MODO

La presente invención se refiere, en general, a proteínas de fusión de Fc 4-valentes, y más particularmente a proteínas de fusión de Fc. Las proteínas de fusión de Fc se forman normalmente mediante fusión del fragmento Fc de inmunoglobulina (Ig) a una región de unión al ligando de un receptor y tienen una estructura similar a la de un anticuerpo.

En la bibliografía se sugieren una amplia variedad de moléculas de inmunoadhesión. Sin embargo, las moléculas de inmunoadhesión de acuerdo con la presente invención tienen una estructura diferente de las moléculas de inmunoadhesión convencionales, y tampoco existe técnica anterior que prediga o describa preparaciones de las moléculas de inmunoadhesión de acuerdo con la presente invención.

## MODO PARA LA INVENCION

A partir de ahora en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes de la presente invención.

**Ejemplo 1: Producción de la proteínas de fusión de VEGFR, KP-VR2**

El dominio 3 de VEGFR2 humano fusionado al dominio Fc de IgG1 humana (KP-VR1); el dominio 2 de VEGFR1 humano (SEQ ID NO: 1) fusionado al dominio Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO: 2), KP-VR2); el dominio 3 de VEGFR2 humano (SEQ ID NO: 3) y el dominio 2 de VEGFR1 fusionados al dominio Fc de IgG1 humana (KP-VR3); el dominio 2 del VEGFR1 humano y el dominio 3 del VEGFR2, fusionados al dominio Fc de IgG1 humana (KP-VR4, aflibercept) se clonaron en el vector pCHO 1.0 (Invitrogen), respectivamente.

Las células CHO-S (Invitrogen) se transfectaron con las construcciones KP-VR1, KP-VR2, KP-VR3 y KP-VR4, respectivamente, y las células transfectadas se seleccionaron usando metotrexato y puromicina. KP-VR2 y KP-VR4 (VEGF-Trap; aflibercept; Eylea) se purificaron con cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharose. Las proteínas purificadas se cuantificaron mediante análisis por HPLC, y a continuación se realizaron secuencialmente SDS-PAGE y transferencia Western. La figura 1 muestra cada construcción. La figura 3 representa los resultados de la transferencia Western. Como se muestra en la figura 3, el dominio 2 de VEGFR1 humano fusionado al dominio Fc de IgG1 humana (KP-VR2) tenía un tamaño de banda de aproximadamente 120 kDa.

**Ejemplo 2: Determinación de afinidades de unión del KP-VR2 de la presente invención, aflibercept y bevacizumab a VEGF-A**

Las afinidades de unión del KP-VR2 de la presente invención, aflibercept y bevacizumab a VEGF-A se compararon en este experimento. Se llevó a cabo un ensayo ELISA de acuerdo con el documento BEVACIZUMAB Summary Validation Report (28 de febrero de 2014). La placa de 96 pocillos (Nunc) se revistió con 50 ng/ml de VEGFA165(I) o VEGFA121(III) (R&D systems), y a continuación se añadió KP-VR2, KP-VR4 (aflibercept) o Avastin (bevacizumab) al pocillo en una cantidad creciente gradualmente de 0,0122 a 1.000 ng/ml. A continuación, la placa se lavó y se hizo reaccionar con anticuerpo anti-Fc humano conjugado con peroxidasa. Después, se añadió solución de 3,3,5,5-tetrametil-bencidina (TMB) (Roche), y seguidamente la absorbancia se detectó a 450 nm usando un lector de ELISA (espectrofotómetro, Biorad). La figura 5 (I y III) muestra los resultados.

Además, la placa de 96 pocillos se revistió con 2 nM de KP-VR2 o KP-VR4 (aflibercept), y a continuación se le añadió VEGF 165(11) o VEGF121(IV) (R&D systems) en una cantidad creciente gradualmente de 0,03125 a 64 nM, para comparar la cantidad de unión de KP-VR2 o KP-VR4 (aflibercept) a VEGF-A. A continuación, la placa se lavó y se hizo reaccionar con anticuerpo anti-VEGF humano durante 1 hora. Después, la placa se lavó de nuevo y se hizo reaccionar con anticuerpo anti-Ig de cabra conjugado con peroxidasa. A continuación, se añadió solución de 3,3,5,5-tetrametilbencidina, y seguidamente la absorbancia se detectó a 450 nm usando un lector de ELISA (espectrofotómetro, Biorad). La figura 5 (II y IV) muestra los resultados.

**Ejemplo 3: Comparación de la actividad de neutralización para PIGF (factor de crecimiento placentario) del KP-VR2 de la presente invención, aflibercept o bevacizumab**

Se realizó ELISA para la detección de afinidades de unión del KP-VR2 de la presente invención, aflibercept o bevacizumab a PIGF (factor de crecimiento placentario). La placa de 96 pocillos se revistió con 50 ng/ml de PIGF(I), y a continuación se añadió KP-VR2 (0,0122 ~ 1.000 ng/ml, KP-VR4 (aflibercept) (0,390625 ~ 16.000 ng/ml o Avastin (bevacizumab) (0,0122 ~ 1.000 ng/ml al pocillo en una cantidad creciente gradualmente. Después, la placa se lavó y se hizo reaccionar con anticuerpo anti-Fc humano conjugado con peroxidasa. A continuación, se añadió solución de 3,3,5,5-tetrametilbencidina, y la absorbancia se detectó a 450 nm usando un lector de ELISA (espectrofotómetro, Biorad).

Además, la placa de 96 pocillos se revistió con 400 ng/ml de KP-VR2 o KP-VR4 (aflibercept), y a continuación se le

añadió PIGF en una cantidad creciente de 0,8 a 12.500 ng/ml para comparar la cantidad de unión de KP-VR2 o KP-VR4 (aflibercept) a PIGF. A continuación, la placa se hizo reaccionar con anticuerpo para PIGF biotiniliado durante 1 hora, y a continuación se lavó. Seguidamente, la placa se hizo reaccionar adicionalmente con anticuerpo anti-Ig de cabra conjugado con peroxidasa (R&D systems). A continuación, se añadió solución de 3,3,5,5-tetrametilbencidina (TMB), y a continuación la absorbancia se detectó a 450 nm usando un lector de ELISA.

Además, la placa de 96 pocillos se revistió con 50 ng/ml de PIGF, y a continuación se le añadió KP-VR2 o aflibercept en una cantidad creciente gradualmente de 2 a 31.250 ng/ml para comparar la cantidad de unión de KP-VR2 y KP-VR4 (aflibercept) a PIGF. A continuación, la placa se lavó y se hizo reaccionar con anticuerpo anti-Fc humano. Seguidamente, se añadió solución de 3,3,5,5-tetrametilbencidina (TMB) (Roche), y la absorbancia se detectó a 450 nm usando un lector de ELISA. La figura 6 (I, II y III) muestra los resultados.

Como se muestra en la figura 6(I), el título del KP-VR2 a PIGF aumentó aproximadamente 42 veces en comparación con el KP-VR4 (aflibercept), y la cantidad de unión máxima del KP-VR2 a PIGF aumentó aproximadamente un 54,3% en comparación con el KP-VR4 (aflibercept) (figura 6(II)). Estos resultados respaldan que el KP-VR2 tiene una afinidad de unión significativamente mayor al PIGF. Mientras tanto, el KP-VR2 de la presente invención mostró una afinidad de unión al PIGF similar al KP-VR4 (aflibercept).

**Ejemplo 4: Comparación de la avidéz total de la presente proteína de fusión KP-VR2 a su ligando (VEGFA165, VEGFA121 o PIGF)**

La avidéz de KP-VR2 y KP-VR4 (aflibercept) respecto a VEGFA165, VEGFA121 o PIGF se determinaron mediante ELISA, y los resultados se muestran en la tabla 1 (la comparación de la avidéz de KP-VR2 y aflibercept respecto a VEGF y PIGF) a continuación.

25

Tabla 1

		Afinidad de unión al ligando	
	ligando	Bmax (DO)	nota
KP-VR2	VEGF-A165	1,93±0,01	Aumento del 54,4%
aflibercept	VEGF-A165	1,25±0,05	
KP-VR2	VEGF-A121	2,10±0,03	Aumento del 44,83%
aflibercept	VEGF-A121	1,45±0,03	
KP-VR2	PLGF	3,42±0,02	Aumento del 54,3%
aflibercept	PLGF	2,21±0,03	

Como se muestra en la tabla 1, el KP-VR2 tenía una afinidad de unión aproximadamente un 45 ~ 55% mayor a VEGFA que el aflibercept, y tenía una afinidad de unión aproximadamente un 55% mayor a PIGF que el aflibercept.

30

**Ejemplo 5: Comparación de las afinidades de unión de la presente proteína de fusión de KP-VR2 y aflibercept a VEGF-A165**

El experimento de comparación de afinidades de unión usando SPR (resonancia del plasmón superficial) se llevó a cabo siguiendo la referencia (Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*. 2012, 15(2):171-185). En primer lugar, El chip de SPR se estabilizó con tampón HBST (HEPES 50 nM, NaCl 150 nM, Tween 20 al 0,1%) y la proteína A se le unió a una densidad de 1.000 UR (unidad de resonancia). El chip se lavó usando tampón glicina 10 mM, y la proteína A no unida restante se retiró del mismo. A continuación, se añadieron KP-VR2, KP-VR4 (aflibercept) y bevacizumab (2 nM) y se unieron al chip, respectivamente. El VEGFA165 (0,5 ~ 8 nM) se hizo fluir sobre el chip. Los resultados se muestran en la figura 7 y la tabla 2 (afinidad de unión del KP-VR2, KP-VR4 y KP-VR3 a VEGF).

35

40

Tabla 2

		Parámetros cinéticos de unión	
	ligando	Rmax(UR)	nota
KP-VR2	VEGF	119,55±6,12	Aumento del 47,5%
aflibercept	VEGF	~ 87,44	

		Parámetros cinéticos de unión	
	ligando	Rmax(UR)	nota
Avastin	VEGF	~ 74,66	

Como se muestra en la figura 7, la cantidad de KP-VR2 aumentaba en proporción a la concentración de VEGFA165, mientras que KP-VR4 (aflibercept) y bevacizumab alcanzaron el valor máximo de unión a 4 nM. Además, como se muestra en la tabla 2, el valor máximo de unión de KP-VR2 a VEGF-A fue de aproximadamente 120 UR, mientras que los valores máximos de unión de KP-VR4 (aflibercept) y bevacizumab (Avastin) fueron de 87 UR y 75 UR, respectivamente. Por lo tanto, se confirmó que el KP-VR2 de la presente invención tenía una avidéz total aumentada significativamente respecto a VEGF-A, en comparación con KP-VR4 (aflibercept) y bevacizumab.

#### Ejemplo 6. El perfil farmacocinético del presente KP-VR2 en una rata

Las ratas se clasificaron en dos grupos para evaluar los perfiles farmacocinéticos de VR-2 y KP-VR4 (aflibercept). 1 mg/kg del KP-VR2 y 1 mg/kg del KP-VR4 (aflibercept) se inyectaron i.v. (por vía intravenosa) en un grupo de ratas, y se inyectaron s.c. (por vía subcutánea) en otro grupo de ratas.

En cuanto al grupo de inyección i.v., la sangre se obtuvo de las venas yugulares de las ratas a 0 min, 5 min, 15 min, 45 min, 3 horas, 5 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas y 168 horas después de la inyección respectiva en la vena caudal de KP-VR2 y KP-VR4 (aflibercept) a ratas SD (Sprague-Dawley) hembra de 6 semanas de edad que pesaban 180 ~ 200 g (VEGF-Trap: A VEGF Blocker With Potent Anti-Tumor Effects. PNAS. 2002, 99(17): 139311398), y seguidamente se evaluó la cantidad modificada de los materiales inyectados. A continuación, en cuanto al grupo de inyección s.c., la sangre se recogió de la vena yugular de la rata a las 0 horas, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 20 horas, 22 horas, 24 horas, 26 horas, 28 horas, 48 horas, 96 horas, 168 horas, 240 horas y 336 horas después de la inyección respectiva del KP-VR2 y KP-VR4 (aflibercept) en la zona posterior del cuello de la rata de ratas SD (Sprague-Dawley) hembra de 6 semanas de edad que pesaban 180 ~ 200 g, y seguidamente se evaluó la cantidad modificada de los materiales inyectados. Los resultados se muestran en las figuras 8a y 8b. El KP-VR2 mostró una semivida in vivo y perfiles farmacocinéticos similares a los de KP-VR4 (aflibercept).

#### Ejemplo 7: Análisis de la inhibición de la migración e invasión celulares por KP-VR2 en células endoteliales

##### Ejemplo 7-1. Detección de inhibición de la invasión celular inducida por el VEGF-A después de tratar HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) con el KP-VR2 y KP-VR4 (aflibercept)

La migración celular se evaluó usando un ensayo de motilidad quimiotáctica en el sistema Transwell, para detectar la migración y la invasión celulares de células endoteliales por el KP-VR2. El factor de crecimiento reducido Matrigel (Millipore) se aplicó como revestimiento sobre el sistema Transwell, y a continuación la invasión celular se determinó usando el ensayo de invasión. El análisis cuantitativo de la migración celular y el ensayo de invasión celular se realizaron de la siguiente manera. El fondo del Transwell se revistió con 10 µl de gelatina al 0,1% y se secó durante 24 horas. El kit de ensayo de invasión celular de 24 pocillos QCM (Corning) se usó para este experimento. Las células separadas se recogieron con medio de ensayo de invasión celular (medio basal de células endoteliales, EBM, FBS al 0,1%). El número de células se ajustó a 5 x 10<sup>4</sup> células/300 µl de medio de invasión celular, y las células se sembraron en cada inserto. Se trataron 6 pocillos con 0 ~ 200 nM de KP-VR2, KP-VR4 (aflibercept) (Eylea, marca registrada) o bevacizumab (Avastin, marca registrada). Los VEGF (350 ng/ml en los 6 pocillos se trataron y a continuación se incubaron durante 48 horas a 37°C. Después de la incubación, las células y el medio restantes se retiraron y el inserto se movió a un nuevo pocillo. A continuación, el inserto se colocó en 225 µl de la solución de aislamiento celular y se incubó durante 30 minutos adicionales, a 37°C en una incubadora.

El inserto se agitó para separar las células restantes. Seguidamente, se añadieron adicionalmente 75 µl de la solución de tampón de lisis/colorante a la solución mixta de la solución de aislamiento celular y las células, y la solución resultante se colocó durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se movieron 200 µl de la solución a 96 pocillos y se obtuvo una imagen de fluorescencia a 595 nm. Los resultados se muestran en las figuras 9a, 9b y en la tabla 3 (análisis de la inhibición de la migración e invasión de células endoteliales por KP-VR2).

Tabla 3

		tasa de inhibición de la migración de células endoteliales	
inhibidor de VEGF	ligando	CI50 (nM)	nota
KP-VR2	VEGF-A165	11,00±1,40	
aflibercept	VEGF-A165	20,08±3,95	



		tasa de inhibición de la migración de células endoteliales	
bevacizumab	VEGF-A165	21,28±2,72	

Como se muestra en las figuras 9a y 9b, mientras que VEGF indujo la migración y la invasión celulares en HUVEC (Lonza), KP-VR2, KP-VR4 (aflibercept) y bevacizumab inhibieron la migración e invasión celulares inducidas. El KP-VR2 de la presente invención mostró una actividad inhibitora mayor que KP-VR4 (aflibercept) y bevacizumab a la misma concentración (13 nM). Además, como se muestra en la tabla 3, las CI50 de KP-VR2, KP-VR4 (aflibercept) y bevacizumab fueron aproximadamente 11 nM, 20 nM y 21 nM, respectivamente, lo que explica que el KP-VR2 tenga una actividad inhibitora sobresaliente para la invasión celular.

**Ejemplo 7-2. Detección de la inhibición de la invasión celular inducida por el VEGF-A después del tratamiento de la línea celular EA-hy926 con KP-VR2, KP-VR4 (aflibercept) o bevacizumab**

Se sembraron líneas celulares EA-hy926 (ATCC®CRL-2922™) (3,5 x 10<sup>5</sup> células/ml en una placa de 96 pocillos en DMEM (Medio Eagle modificado por Dulbecco) que tenía FBS al 0,1%. A continuación, la placa se trató con KP-VR2 (1.500 µg/ml), KP-VR4 (aflibercept) (3.000 µg/ml) y bevacizumab (3.000 µg/ml), respectivamente, a 37°C, condición de CO<sub>2</sub> al 5% durante 24 horas. Como control negativo, se usó un medio no tratado con las proteínas de fusión. Los resultados se muestran en las figuras 10a y 10b. Como se muestra en las figuras 10a y 10b, el KP-VR2 de la presente invención inhibió de forma muy eficaz el crecimiento y la proliferación de células EA-hy926 inducidas por VEGF a menor concentración que KP-VR4 (aflibercept) y bevacizumab.

**Ejemplo 8: Comparación de las capacidades inhibitoras de la proliferación celular del carcinoma entre KP-VR2 y KP-VR4**

Se realizó un ensayo colorimétrico de proliferación celular MTS para 9 (nueve) clases de líneas celulares de carcinoma para determinar la capacidad inhibitora de KP-VR2 frente a la división celular del carcinoma. La tabla 4 muestra 9 líneas celulares de carcinoma usadas en este experimento.

Tabla 4

nombre	Biomarcador	orígenes	nota
HT29	positivo para VEGF	Adenocarcinoma colorrectal humano	ATCC HTB-38™
LoVo	positivo para VEGF	Adenocarcinoma colorrectal humano	ATCC®CCL-229™
	positivo para PLGF		
AGS	positivo para PLGF	Adenocarcinoma gástrico humano	ATCC®CRL-1739™
	positivo para VEGF		
SKUT1b	positivo para VEGF	Sarcoma uterino humano	ATCC®HTB-115™
	positivo para VEGFR1		
Caki-1	positivo para VEGF	Carcinoma de células transparentes renales	ATCC®HTB-46™
	positivo para VEGFR1		
Hy-926	positivo para VEGF	Endotelial humano	ATCC®CRL-2922™
	positivo para VEGFR1		
HCT 116	positivo para VEGF	Carcinoma colorrectal humano	ATCC®CCL-247™
PANC 02.03	positivo para VEGF	Adenocarcinoma pancreático humano	ATCC®CRL-2553™
SW480	positivo para VEGF	Adenocarcinoma colorrectal humano	ATCC®CCL-228™
	positivo para PLGF		
PC-3	positivo para VEGF	Adenocarcinoma de próstata humano	ATCC®CRL-1435™
	positivo para PLGF		

Las 9 clases de líneas celulares de carcinoma, HT-29 (ATCC®HTB-38™), LOVO (ATCC®CCL-229™), HCT116 (ATCC®CCL-247™), SKUTib (ATCC®HTB-115™), Caki-1 (ATCC®HTB-46™), AGS (ATCC®CRL-1739™), Panc0203 (ATCC®CRL-2553™), SW480 (ATCC®CCL-228™) y PC-3 (ATCC®CRL-1435™) se incubaron para alcanzar una confluencia total a 37°C, condición de CO2 al 5%. A continuación, las líneas celulares de carcinoma se retiraron y se sembraron (3 x 10<sup>3</sup> células/pocillo) en medio RPMI1640 (Sigma) que comprendía FBS al 10%. Seguidamente, las líneas celulares se incubaron a 37°C durante 24 horas. A continuación, el medio se sustituyó con medio RPMI1640 (Sigma) que tenía FBS al 0,5%. Posteriormente, las líneas celulares se trataron con 2, 4 o 6 nM de KP-VR2 o KP-VR4 (aflibercept), y se incubaron adicionalmente durante 72 horas. Se añadió el reactivo MTS (Qiagen) a la placa y se detectó la absorbancia a 490 nm. Los resultados se muestran en la figura 11a, la figura 11b y la tabla 5. Como se muestra en las figuras 11a y 11b, el KP-VR2 de la presente invención mostró una actividad de inhibición de la división celular significativamente excelente para todas las líneas de carcinoma empleadas en este experimento.

Tabla 5

Tipos	método de ensayo	eficacia in vitro, KP-VR4	eficacia in vitro, KP-VR2
EA-hy926	eficacia in vitro	~ 17% de inhibición del crecimiento	~ 33% de inhibición del crecimiento
HT29	eficacia in vitro	-	~ 44% de inhibición del crecimiento
LoVo	eficacia in vitro	~ 35% de inhibición del crecimiento	~ 65% de inhibición del crecimiento
HCT116	eficacia in vitro	-	~ 44% de inhibición del crecimiento
SKUTib	eficacia in vitro	-	~ 26% de inhibición del crecimiento
CaKi-1	eficacia in vitro	-	~ 67% de inhibición del crecimiento
PANC020 3	eficacia in vitro	-	~ 37% de inhibición del crecimiento
SW480	eficacia in vitro	-	~ 38% de inhibición del crecimiento
AGS	eficacia in vitro	-	~ 34% de inhibición del crecimiento
PC-3	eficacia in vitro	-	~ 20% de inhibición del crecimiento

Además, como se desvela en la tabla 5 (actividad de inhibición del crecimiento celular), el KP-VR2 de la presente invención mostró un efecto altamente mejorado de la inhibición del crecimiento celular hacia los 9 carcinomas, con VEGF y PIGF como diana.

**Ejemplo 9: Comparación de las actividades de inhibición de la división celular de KP-VR2 y aflibercept en carcinomas y líneas celulares de fibroblastos resistentes a anti-VEGF**

Se realizó el ensayo de crecimiento de células MTS para células de carcinoma y líneas celulares de fibroblastos resistentes a anti-VEGFA o anti-VEGFR, para evaluar la actividad inhibidora de KP-VR2 a la división celular de carcinoma. La tabla 6 muestra 4 clases de líneas celulares de carcinoma y 2 clases de líneas celulares de fibroblastos usadas en estos experimentos.

Tabla 6

tipos	Biomarcador	Origen	nota
CT26	Un modelo resistente a anti-VEGFR	Carcinoma de colon de ratón	ATCC®CRL-2638™
B16-F10	Un modelo resistente a FOLFIRY(p38)	Melanoma cutáneo de ratón	ATCC®CRL-6475™
EL4	Resistente a anti-VEGF-A	Linfoma de ratón	ATCC®TIB-39™
LCC1	Resistente a anti-VEGF-A	Carcinoma de pulmón de ratón	ATCC®CRL-1642™
NIH3T3	fibroblasto	Fibroblasto embrionario de ratón	KCLB NO21658
Hs27	fibroblasto	Fibroblasto de piel humana	ATCC®CRL-1634™

Las 4 clases de líneas celulares de carcinoma, (EL-4 (ATCC®TIB-39™), LLC1 (ATCC®TIB-39™), B16F10

(ATCC®CRL-6475™), CT-26 (ATCC®CRL-2638™) y PC-3 (ATCC®CRL-1435™); y la línea celular de fibroblastos NIH3T3 (KCLB No. 21658) y Hs27 (ATCC®CRL-1634™) se incubaron para alcanzar una confluencia total a 37°C, condición de CO<sub>2</sub> al 5%. A continuación, las líneas celulares de carcinoma y de fibroblastos se retiraron y se sembraron (3 x 10<sup>3</sup> células/pocillo) en medio RPMI1640 (Sigma) que comprendía FBS al 10%. Seguidamente, las líneas celulares se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después, el medio se substituyó con medio RPMI1640 (Sigma) que tenía FBS al 0,5% y las líneas celulares se trataron respectivamente con 2, 4 o 6 nM de KP-VR2 o KP-VR4 (aflibercept). Posteriormente, las líneas celulares tratadas se incubaron adicionalmente durante 72 horas. A continuación, se añadió el reactivo MTS (Qiagen) a la placa y se detectó la absorbancia a 490 nm. Los resultados se ilustran en la figura 12, la figura 13 y la tabla 7 (líneas celulares de carcinoma y fibroblastos).

Tabla 7

clases	método de ensayo	KP-VR4	KP-VR2
CT26	eficacia in vitro	-	~56% de inhibición del crecimiento
B16-F10	eficacia in vitro	-	~30% de inhibición del crecimiento
EL4	eficacia in vitro	~49% de inhibición del crecimiento	~67% de inhibición del crecimiento
LLC1	eficacia in vitro	~12% de inhibición del crecimiento	~70% de inhibición del crecimiento
NIH3T3	eficacia in vitro	~41% de inhibición del crecimiento	~52% de inhibición del crecimiento
Hs27	eficacia in vitro	~15% de inhibición del crecimiento	~25% de inhibición del crecimiento

Como se muestra en las figuras 12, 13 y la tabla 7, el KP-VR2 de la presente invención mostró una actividad significativamente mejorada de inhibición del crecimiento celular no solo para las células cancerosas (véase el experimento 8), sino también para las líneas celulares de carcinoma (EL-4, LLC1, B16F10 y CT-26) y las líneas celulares de fibroblastos (Hs27 y NIH3T3) resistentes a anti-VEGF/VEGFR.

#### **Ejemplo 10: Comparación de la inhibición del crecimiento tumoral de KP-VR2 y aflibercept en un ratón atímico**

Los diversos tipos de modelos de xenoinjertos tumorales (HT-29, LOVO y SKUT1b) se emplearon en ratones atímicos BALB/c para realizar experimentos in vivo para la evaluación de la actividad de inhibición del crecimiento tumoral de KP-VR2.

#### **Experimento 10-1. Xenoinjerto in vivo de HT-29**

Se inyectaron células HT-29 (ATCC®HTB-38™) (5 x 10<sup>6</sup> células/0,2 ml) por vía subcutánea en la zona posterior de un ratón atímico (Orient bio, hembra, 4 semanas de edad). Cuando el volumen del tumor aumentó a más de 200 mm<sup>3</sup>, se inyectaron KP-VR2 (1 mg/kg o 2 mg/kg) y KP-VR4 (aflibercept) (2 mg/kg o 3 mg/kg), respectivamente, en la cavidad abdominal del ratón dos veces por semana, y se inyectó la misma cantidad de PBS (solución salina tamponada con fosfato) en la cavidad abdominal del ratón de control negativo al mismo tiempo y en el mismo período. El volumen del tumor se midió cada 3 a 4 días, y los resultados se desvelaron en la figura 14. Como se muestra en la figura 14, el KP-VR2 de la presente invención mostró aproximadamente un aumento del 40% de actividad de inhibición del crecimiento para la línea celular de cáncer de colon HT-29 a dosis de 2 mg/kg, en comparación con la misma cantidad de aflibercept (KP-VR4). Además, se observaron efectos similares entre el KP-VR2 (1 mg/kg) y el aflibercept (KP-VR4) (3 mg/kg).

#### **Ejemplo 10-2. Xenoinjerto in vivo de LOVO**

Se realizó el mismo experimento que en el ejemplo 10-1 usando líneas celulares LOVO (ATCC CCL-229™) en lugar de líneas celulares HT-29. Las líneas celulares LOVO (5 x 10<sup>6</sup> células/0,2 ml) se inyectaron por vía subcutánea en la zona posterior de un ratón atímico (Orient bio, hembra, 4 semanas de edad). Cuando el volumen del tumor aumentó a más de 200 mm<sup>3</sup>, se inyectaron KP-VR2 (1 mg/kg) y KP-VR4 (aflibercept) (1 mg/kg), respectivamente, en la cavidad abdominal del ratón atímico dos veces por semana, y se inyectó la misma cantidad de PBS (solución salina tamponada con fosfato) en la cavidad abdominal del ratón de control negativo al mismo tiempo y en el mismo período. El volumen del tumor se midió cada 3 a 4 días, y el tumor se extrajo en el último día 42 para comparar los pesos. Los resultados se desvelaron en las figuras 15a y 15b. Como se muestra en las figuras 15a y 15b, el KP-VR2 de la presente invención tenía un aumento del 50% ~ 60% de actividad inhibidora del crecimiento para la línea celular de cáncer rectal (LOVO) a dosis de 1 mg/kg, en comparación con la misma cantidad de aflibercept (KP-VR4) (P < 0,05). La actividad de inhibición del crecimiento tumoral del KP-VR2 de la presente invención se observó desde el momento inicial de la inyección, y la diferencia en la actividad de inhibición entre el KP-VR2 y el aflibercept (KP-

VR4) ha aumentado desde la inyección. Además, la inyección del presente KP-VR2 dio como resultado aproximadamente un 50% de reducción del peso tumoral, en comparación con el aflibercept a la misma dosis de inyección.

**5 Ejemplo 10-3. Xenoinjerto in vivo de SKUT1B**

La línea celular de cáncer de útero SKUT1B (ATCC®HTB-115™), que es una línea celular positiva para VEGFR1, se inyectó en el ratón atímico. Las líneas celulares SKUT1B (1 x 10<sup>7</sup> células/0,2 ml) se inyectaron por vía subcutánea en la zona posterior del ratón atímico, y el KP-VR2 (2 mg/kg) y KP-VR4 (aflibercept) (2 mg/kg) se inyectaron, respectivamente, en la cavidad abdominal del ratón atímico dos veces por semana desde 1 día hasta 32 días después de la inyección. Se inyectó la misma cantidad de PBS (solución salina tamponada con fosfato) en la cavidad abdominal del ratón de control negativo al mismo tiempo y en el mismo período. El volumen del tumor se observó cada 3 a 4 días, y el tumor se extrajo en el último día 37 para comparar los pesos de los tumores. Los resultados se desvelan en la figura 16. Como se muestra en las figuras 16a y 16b, el KP-VR2 de la presente invención tenía un aumento del 60% ~ 70% de actividad inhibidora del crecimiento para las líneas celulares usadas en este experimento a una dosis de 2 mg/kg, en comparación con la misma cantidad de aflibercept (KP-VR4) (P <0,05). Además, la inyección del presente KP-VR2 dio como resultado aproximadamente un 70% de reducción del peso tumoral, en comparación con el aflibercept a la misma dosis de inyección.

**20 Aplicabilidad Industrial**

Como se ha descrito anteriormente, la proteína de fusión de la presente invención comprende (a) un dominio Fc de IgG1, en el que las dos cadenas pesadas están enlazadas por un puente disulfuro, y (b) cuatro dominios de inmunoglobulina 2 del VEGFR1, en el que dos dominios de inmunoglobulina 2 se fusionan secuencialmente a cada cadena pesada del dominio Fc de (a). Por consiguiente, la presente invención permite proporcionar una composición farmacéutica para el tratamiento de cánceres y/o enfermedades oculares causadas por angiogénesis.

<110> Korea Prime Pharm Co., Ltd.

30 <120> Una proteína de fusión de VEGFR

<130> CKR0416P-0001-KR

35 <160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 102

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> dominio 2 de VEGFR1

<400> 1

ES 2 689 527 T3

Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu  
 1 5 10 15  
 Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val  
 20 25 30  
 Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr  
 35 40 45  
 Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe  
 50 55 60  
 Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu  
 65 70 75 80  
 Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg  
 85 90 95  
 Gln Thr Asn Thr Ile Ile  
 100

<210> 2  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Región Fc de IgG1 humana

<400> 2

Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 1 5 10 15  
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 20 25 30  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 35 40 45  
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 50 55 60

5

10

ES 2 689 527 T3

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 85 90 95  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 100 105 110  
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 115 120 125  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
 130 135 140  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 145 150 155 160  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 165 170 175  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 180 185 190  
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 195 200 205  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 210 215 220  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 225 230

<210> 3  
 <211> 103  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> VEGFR2-D3

<400> 3

Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile  
 20 25 30  
 Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu  
 35 40 45  
 Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe  
 50 55 60  
 Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr  
 85 90 95  
 Phe Val Arg Val His Glu Lys  
 100

5

10

15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una proteína de fusión del dominio de tipo inmunoglobulina que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), **caracterizada por que** comprende:
- 10 (a) un dominio Fc de IgG1, en el que las dos cadenas pesadas están enlazadas por un puente disulfuro; y  
(b) cuatro dominios de inmunoglobulina 2 del receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1), en la que un primer dominio de inmunoglobulina 2 del VEGFR1 y un segundo dominio de inmunoglobulina 2 del VEGFR1 se fusionan secuencialmente a cada cadena pesada del dominio Fc de (a).
- 15 2. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína de fusión, **caracterizada por que** dicha proteína de fusión comprende:
- (a) un dominio Fc de IgG1, en el que las dos cadenas pesadas están enlazadas por un puente disulfuro; y  
15 (b) cuatro dominios de inmunoglobulina 2 del VEGFR1, en la que un primer dominio de inmunoglobulina 2 (SEQ ID NO: 1) del VEGFR1 y un segundo dominio de inmunoglobulina 2 (SEQ ID NO: 1) del VEGFR1 se fusionan secuencialmente a cada cadena pesada (SEQ ID NO: 2) del dominio Fc de (a),
- 20 y la molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio Fc y la secuencia de ácido nucleico que codifica cuatro dominios de inmunoglobulina 2 del VEGFR1.
- 25 3. Un vector de expresión recombinante, **caracterizado por que** comprende la moléculas de ácido nucleico aislada de la reivindicación 2.
4. El vector de expresión recombinante de la reivindicación 3, que es uno cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en YAC (cromosoma artificial de levadura), YEp (plásmido episómico de levadura), YIp (plásmido integrativo de levadura) y virus recombinantes.
- 30 5. Una célula huésped, **caracterizada por que** comprende el vector de expresión recombinante de la reivindicación 4.
6. La célula huésped de la reivindicación 5, que es una cualquiera seleccionada entre el grupo que consiste en bacterias, levadura, célula de insecto y célula de mamífero.
- 35 7. La célula huésped de la reivindicación 6, en la que la célula de mamífero es una célula CHO (ovario de hámster chino).
- 40 8. Un método para producir una proteína de fusión del dominio de tipo inmunoglobulina que se une a VEGF, **caracterizado por que** comprende:
- (a) incubar la célula huésped de una cualquiera de la reivindicación 5 a la reivindicación 7 en condiciones para la producción de un polipéptido; y  
(b) recuperar el polipéptido producido en la etapa (a) anterior.
- 45 9. Una proteína de fusión del dominio de tipo inmunoglobulina producida de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 8.
- 50 10. Una composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor angiogénico, que comprende la proteína de fusión de la reivindicación 1 como un ingrediente farmacológicamente activo, y excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 55 11. La composición farmacéutica para el tratamiento del tumor angiogénico de la reivindicación 10, en la que el tumor es cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer rectal, cáncer de estómago, cáncer de riñón, cáncer de próstata, sarcoma uterino, leucemia o cáncer de piel.
- 60 12. Una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad ocular angiogénica, que comprende la proteína de fusión de la reivindicación 1 como un ingrediente farmacológicamente activo, y excipientes farmacéuticamente aceptables.
13. La composición farmacéutica para el tratamiento de la enfermedad ocular angiogénica de la reivindicación 12, en la que la enfermedad ocular es degeneración macular senil, degeneración macular senil exudativa, neovascularización coroidea, miopía patológica, retinopatía diabética, edema macular diabético, oclusiones vasculares retinianas, retinopatía del prematuro o glioma angiogénico.

	Nombre de la construcción	Diagramas
1	VEGFR2-VEGFR2-FC(KP-VR1)	
2	VEGFR1-VEGFR1-FC(KP-VR2)	
3	VEGFR2-VEGFR1-FC(KP-VR3)	
4	VEGFR1-VEGFR2-FC(KP-VR4)	

Figura 1

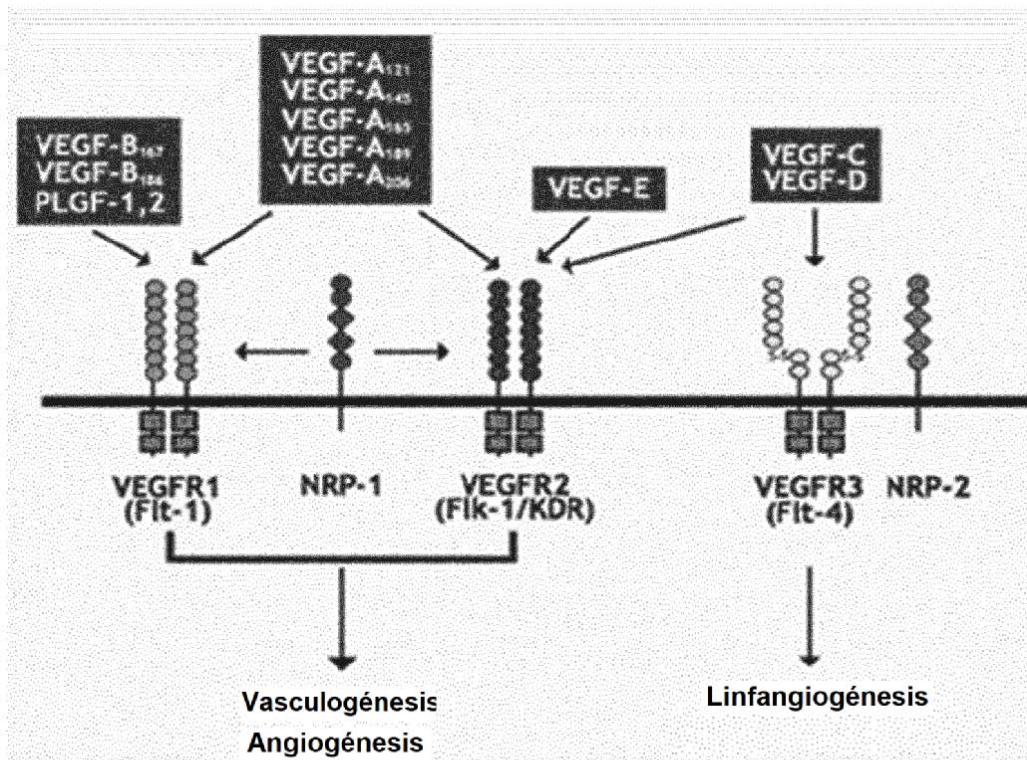


Figura 2a



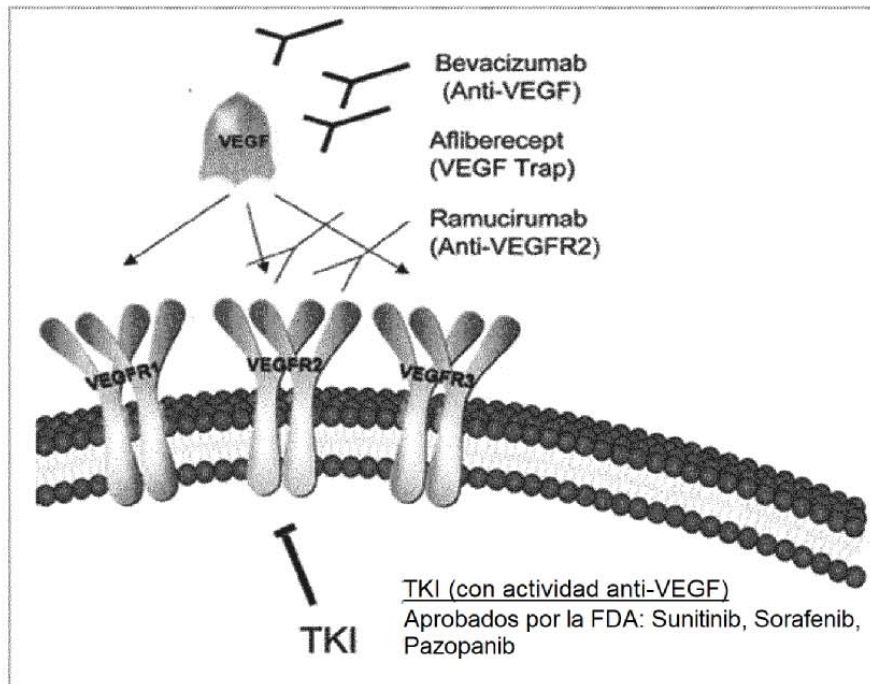


Figura 2b

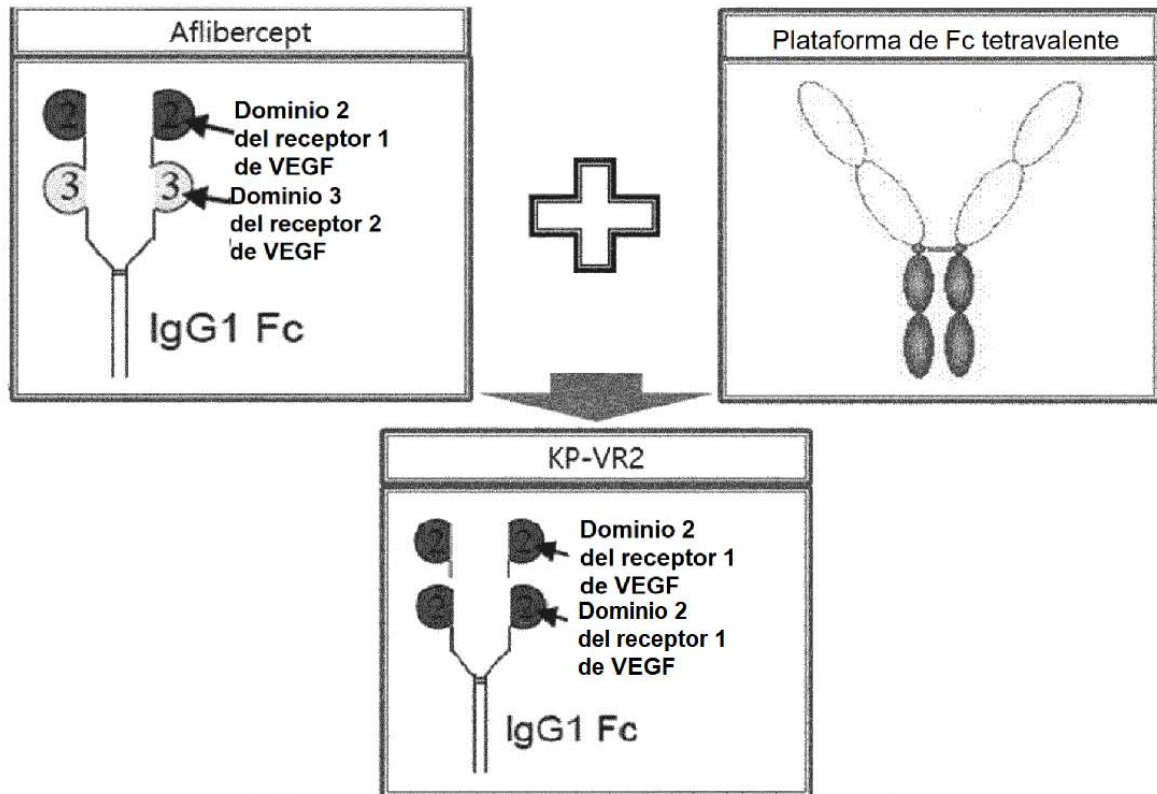
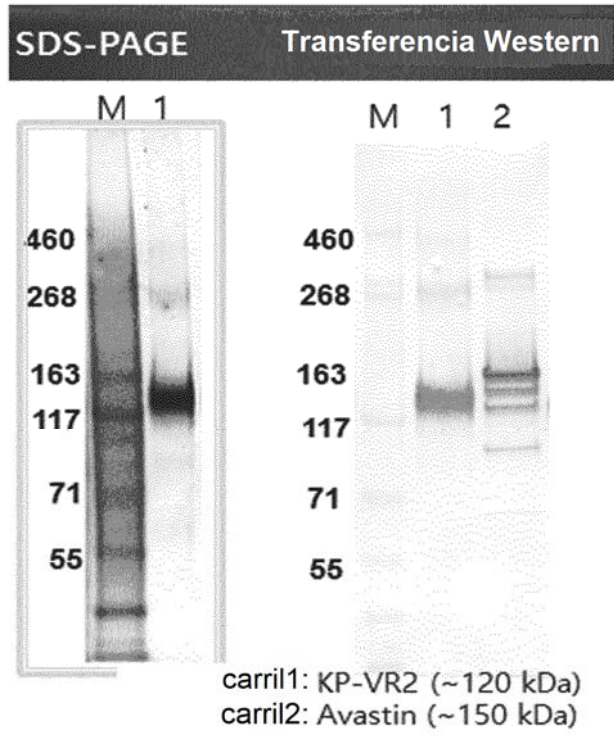
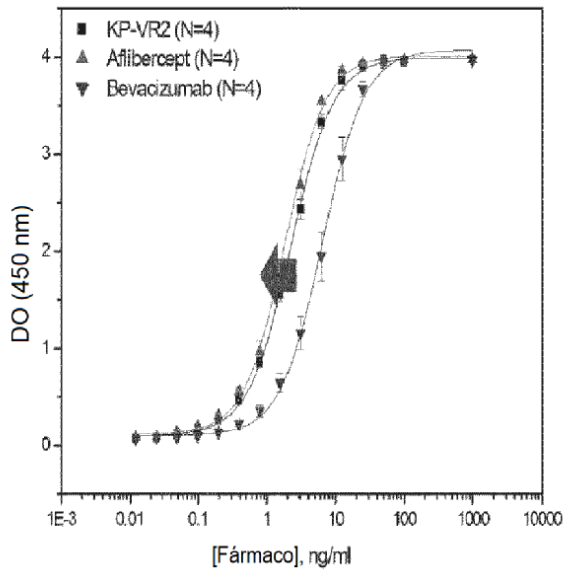


Figura 3

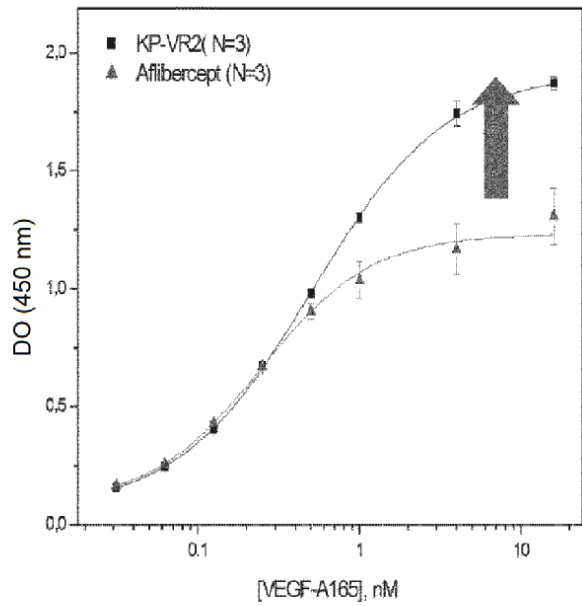


**Figura 4**

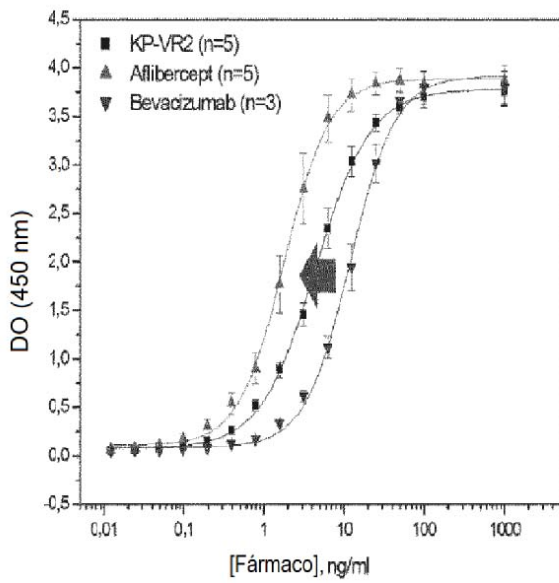
I. Afinidades de unión a VEGF-A<sub>165</sub>



II. Afinidades de unión a VEGF-A<sub>165</sub>



III. Afinidades de unión a VEGF-A<sub>121</sub>



IV. Afinidades de unión a VEGF-A<sub>121</sub>

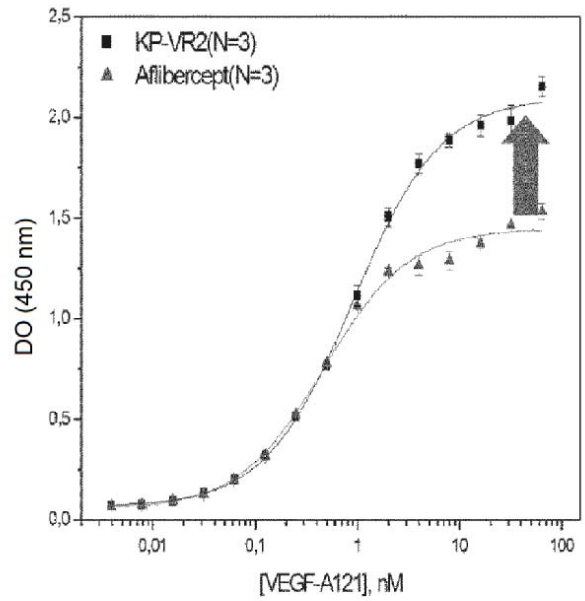


Figura 5

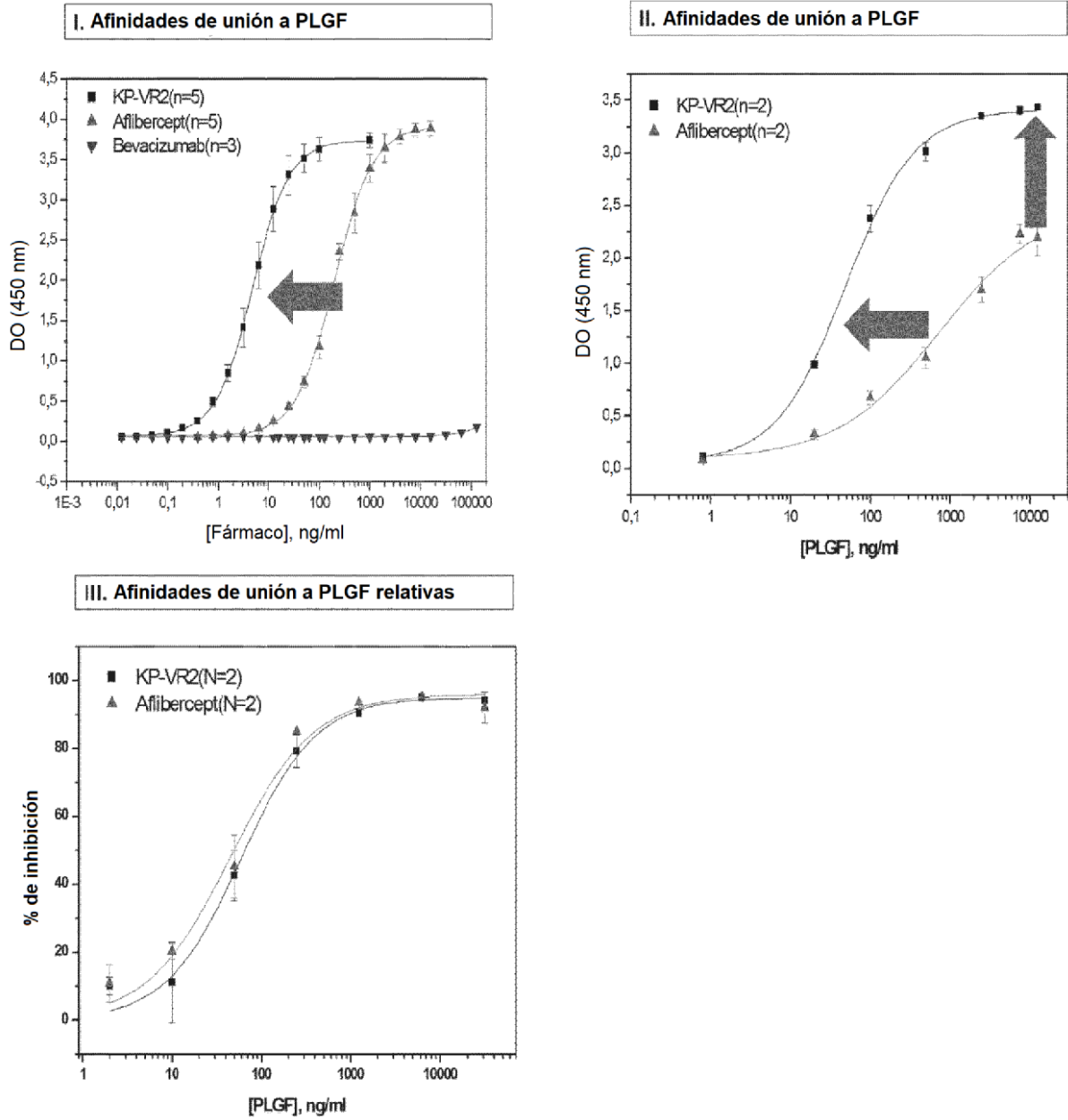
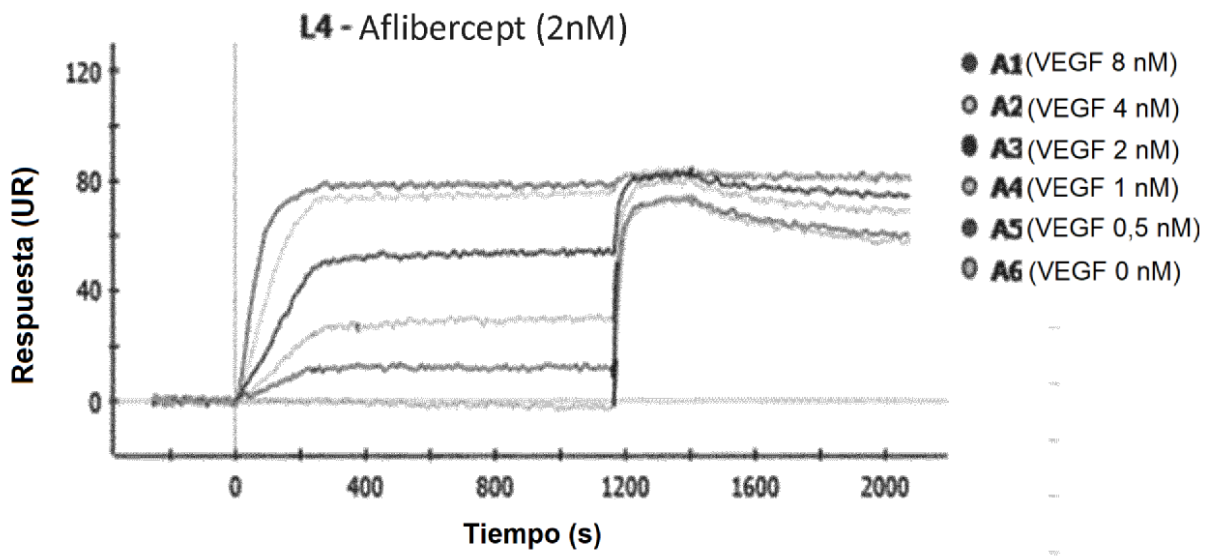
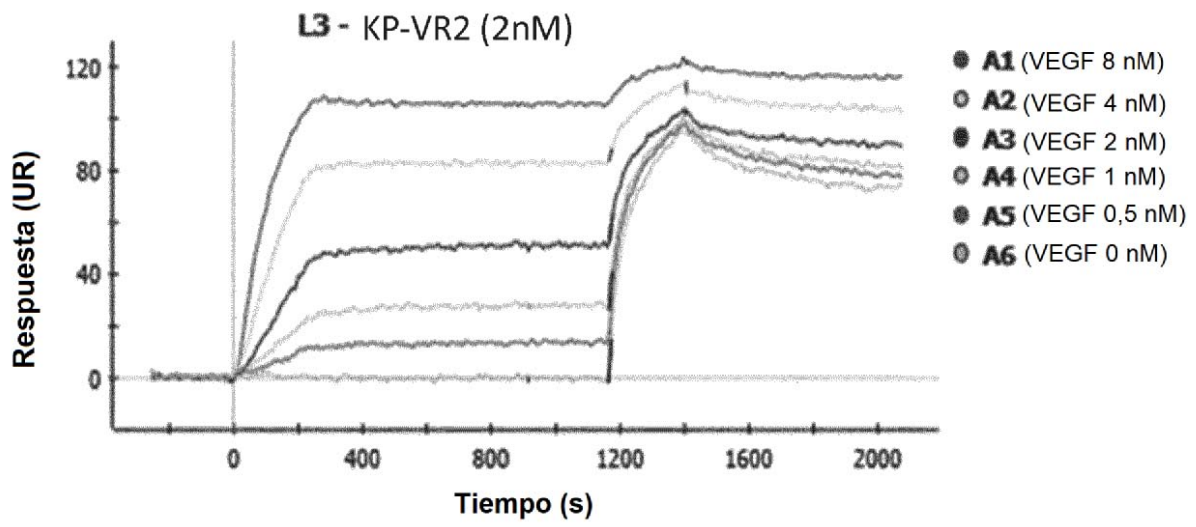


Figura 6



**Figura 7**

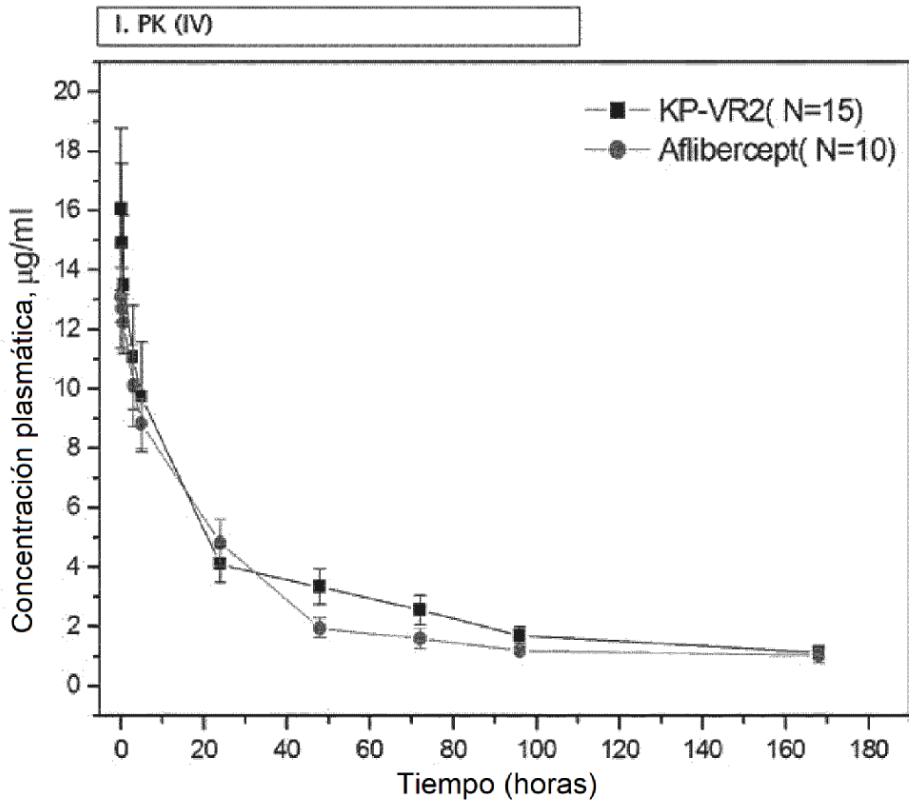


Figura 8a

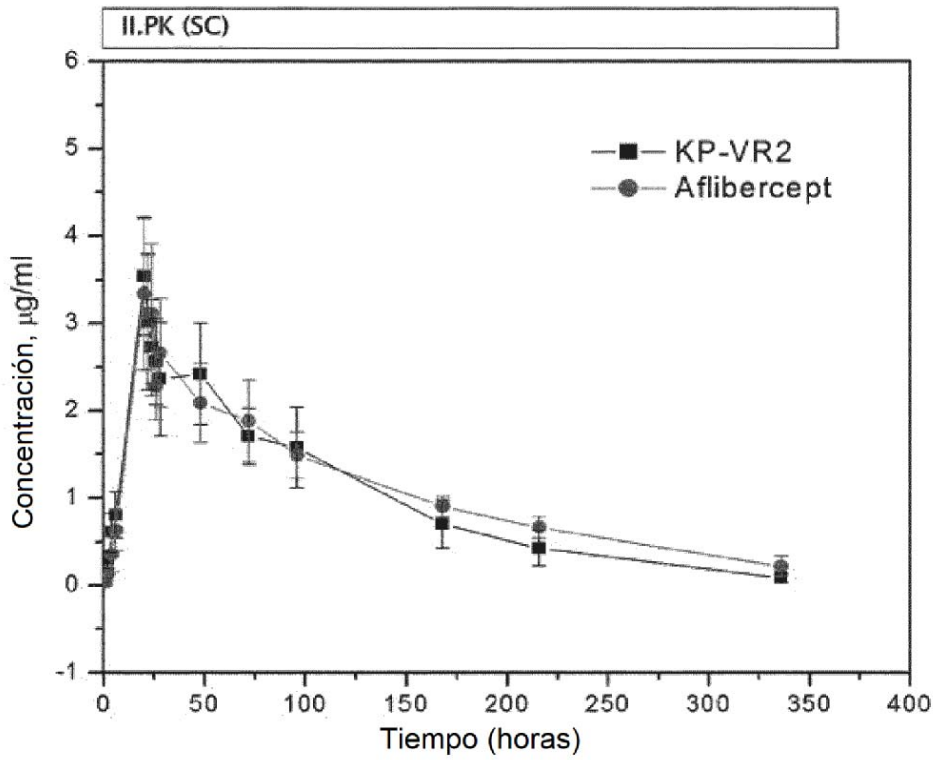
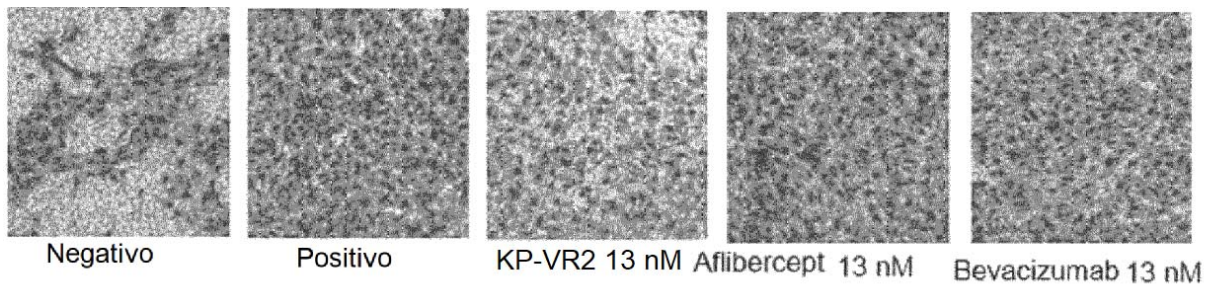
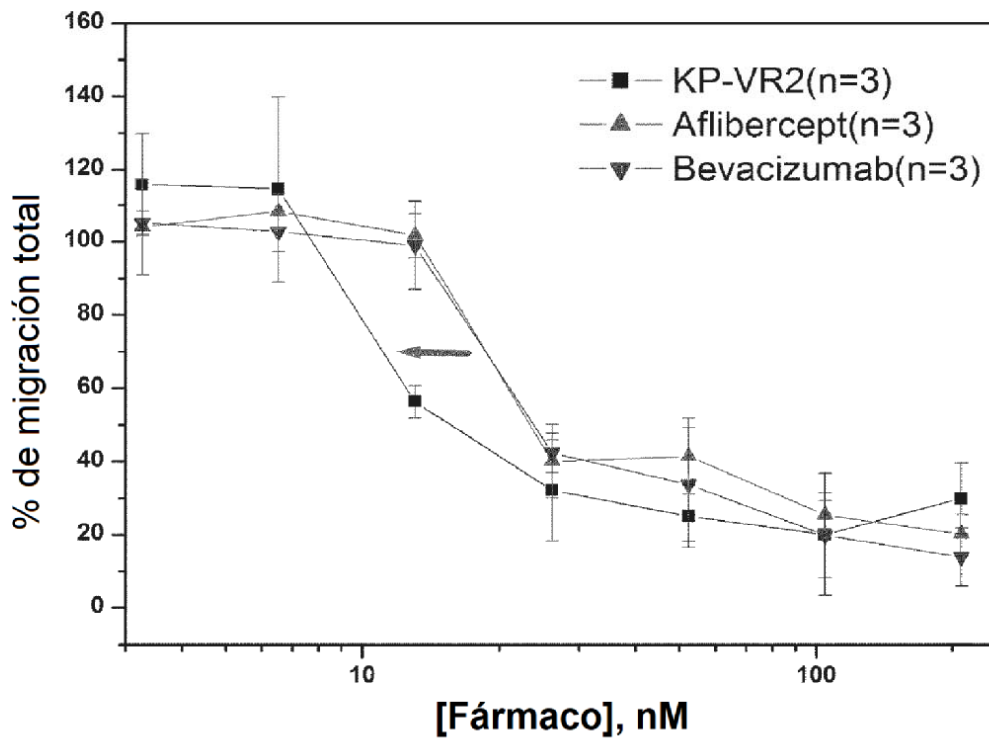


Figura 8b



**Figura 9a**



**Figura 9b**

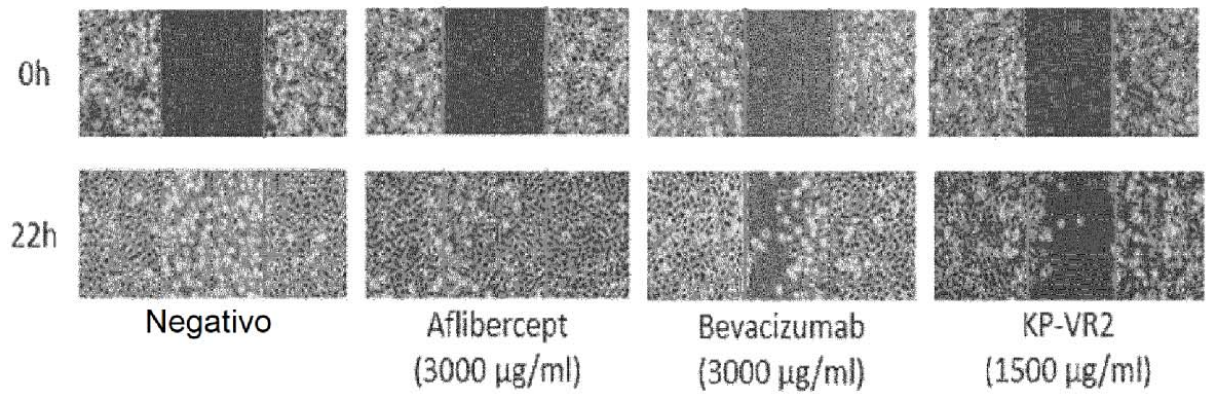


Figura 10a

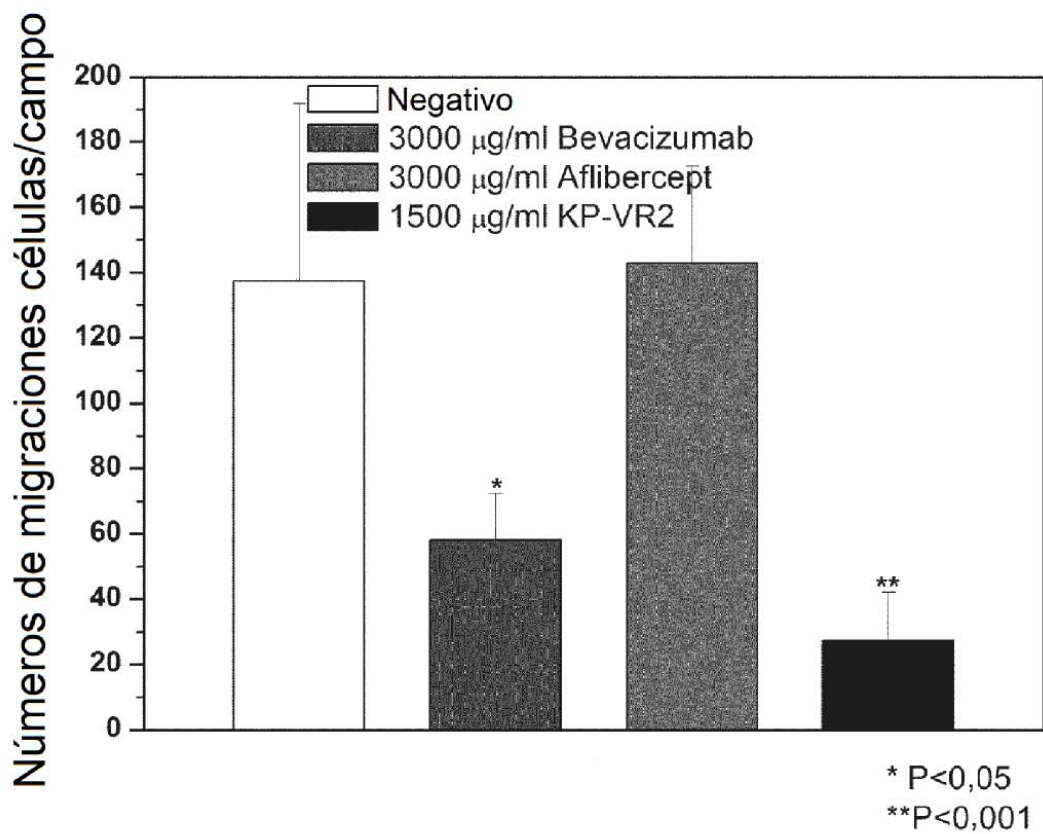


Figura 10b



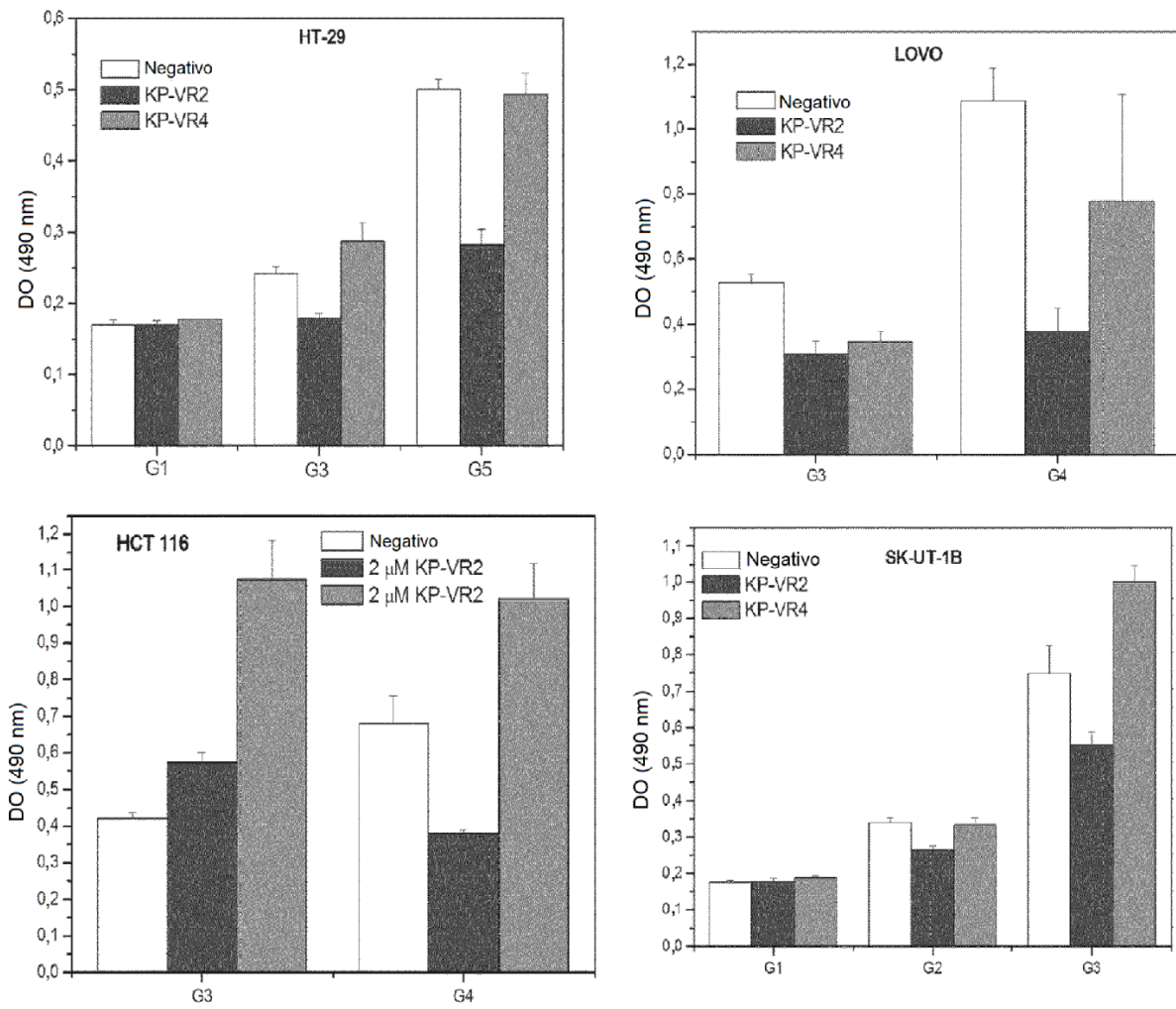


Figura 11a

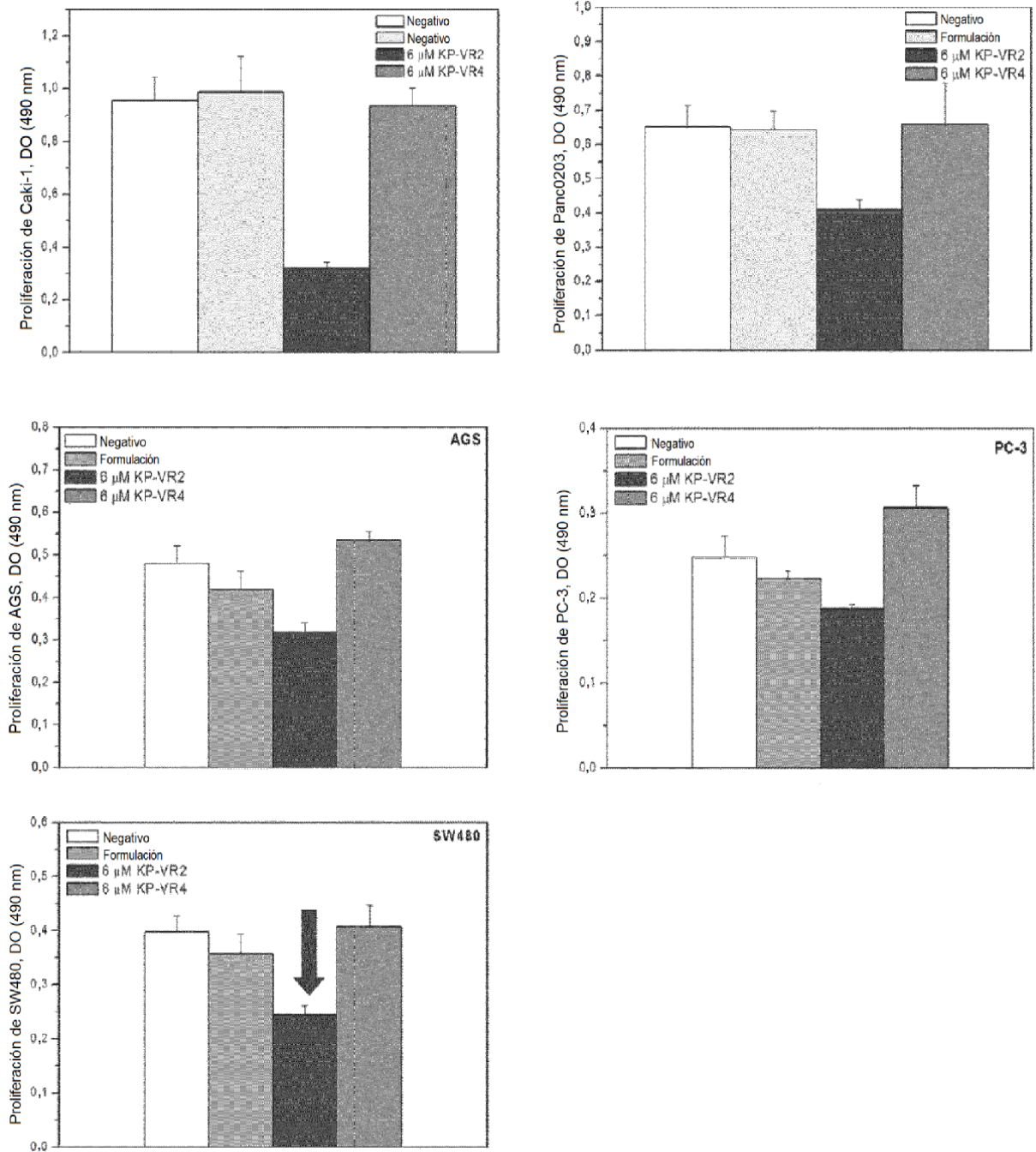


Figura 11b

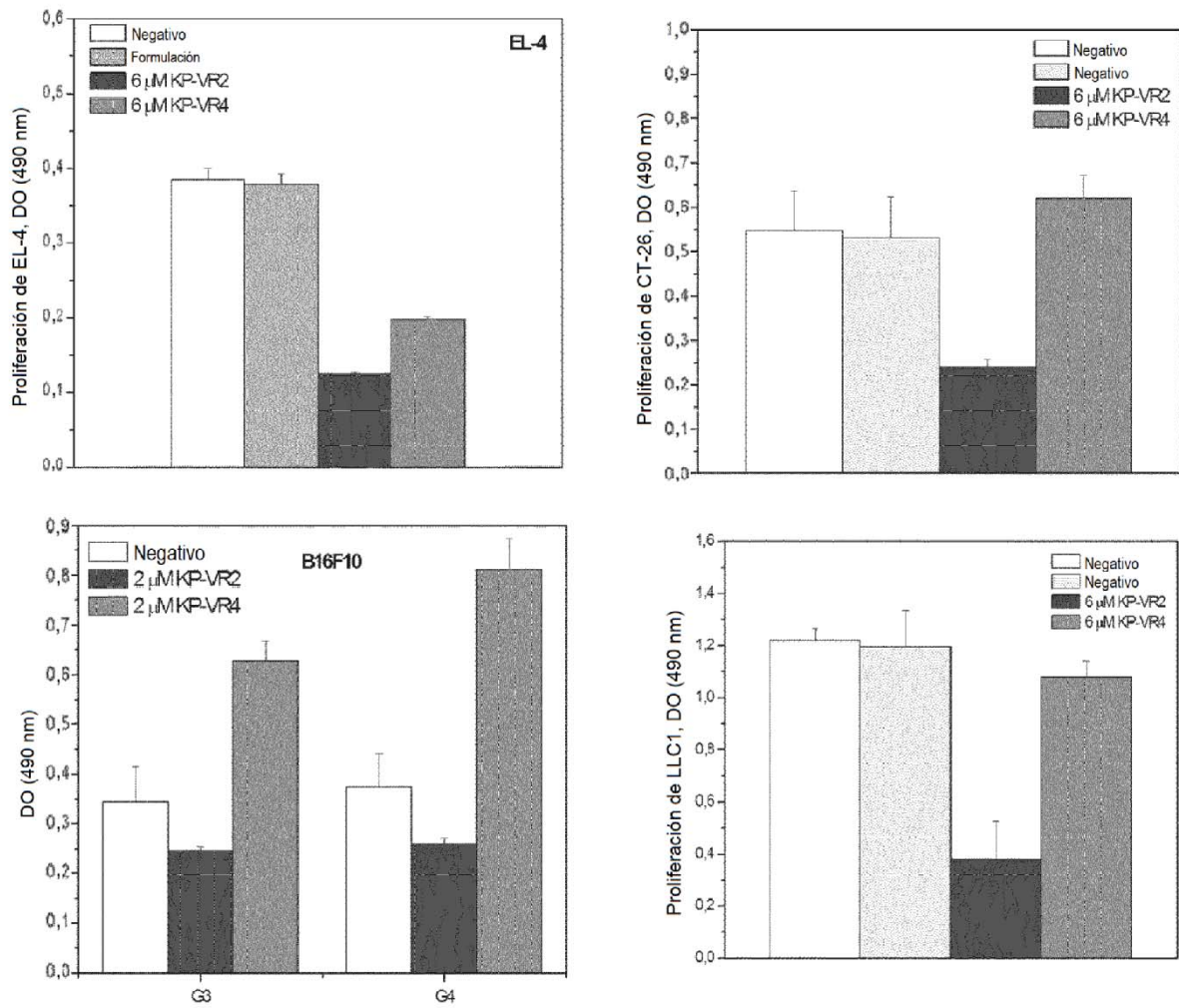


Figura 12

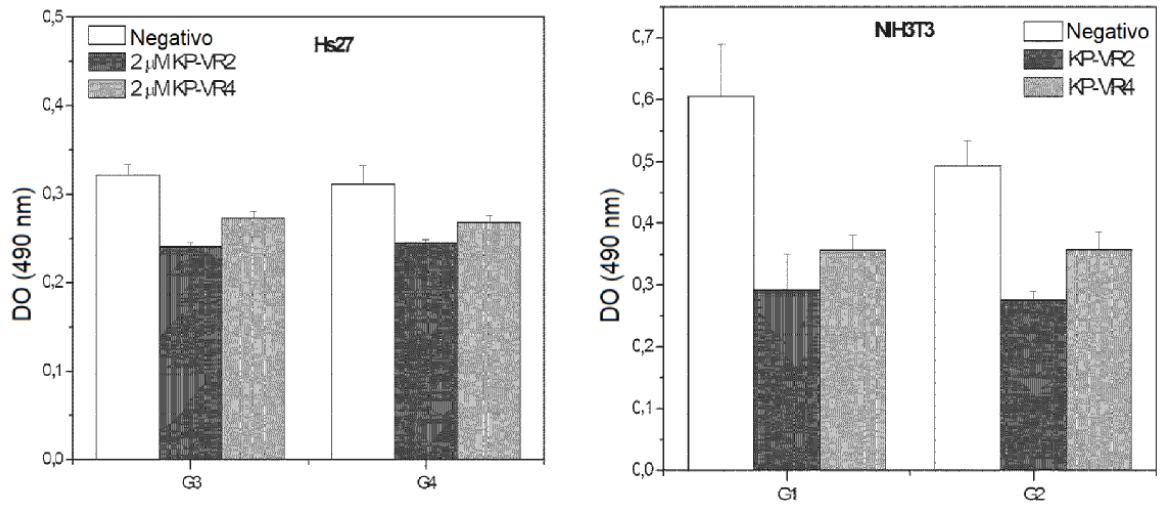


Figura 13

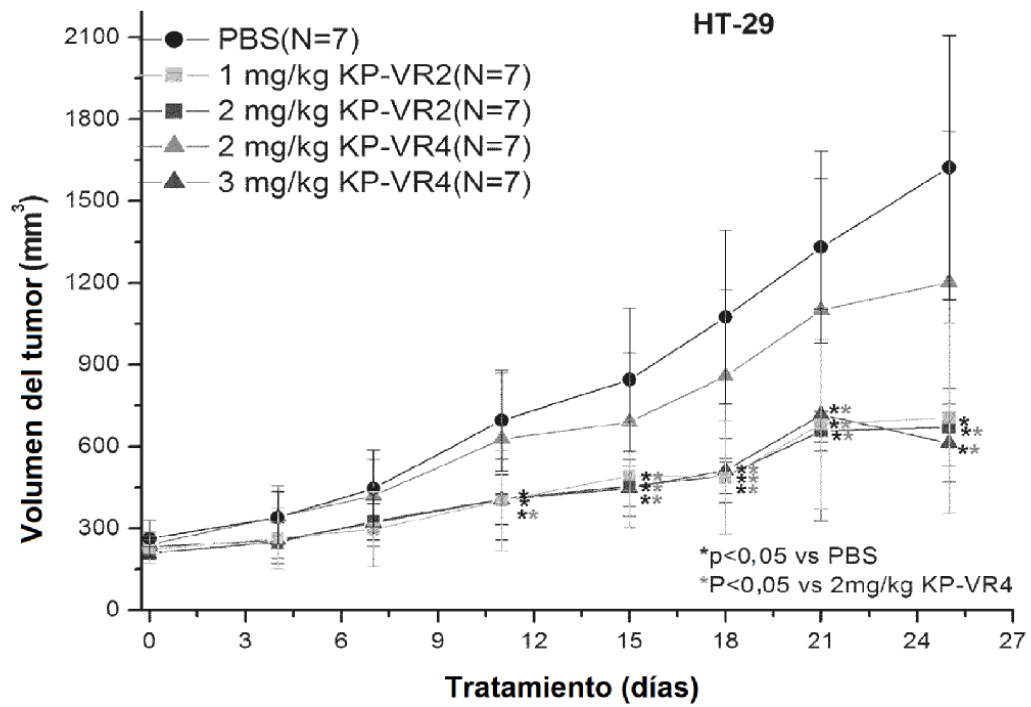
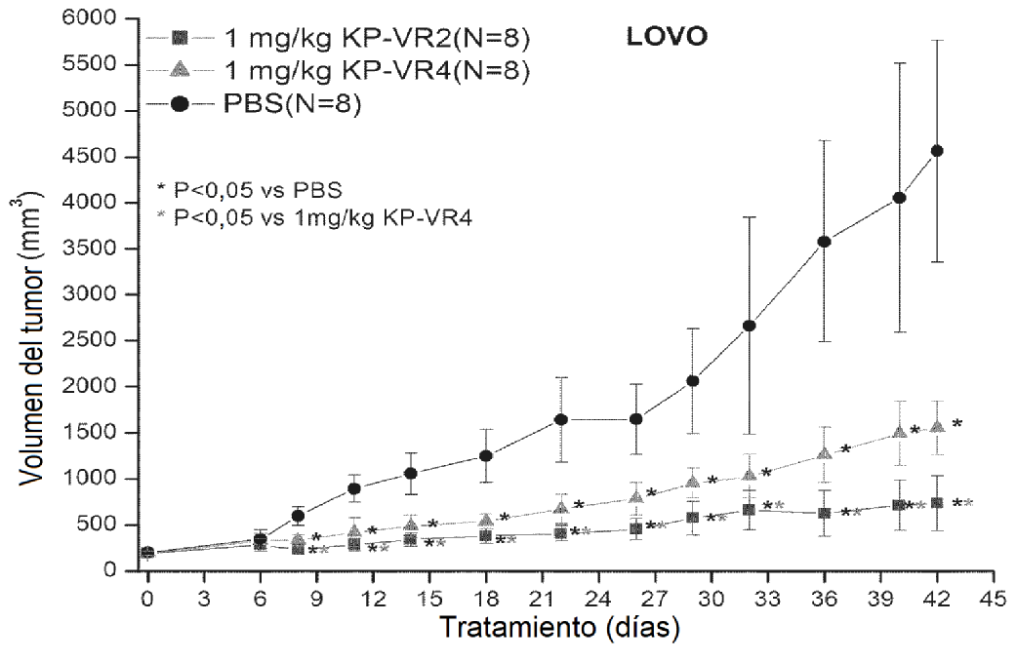
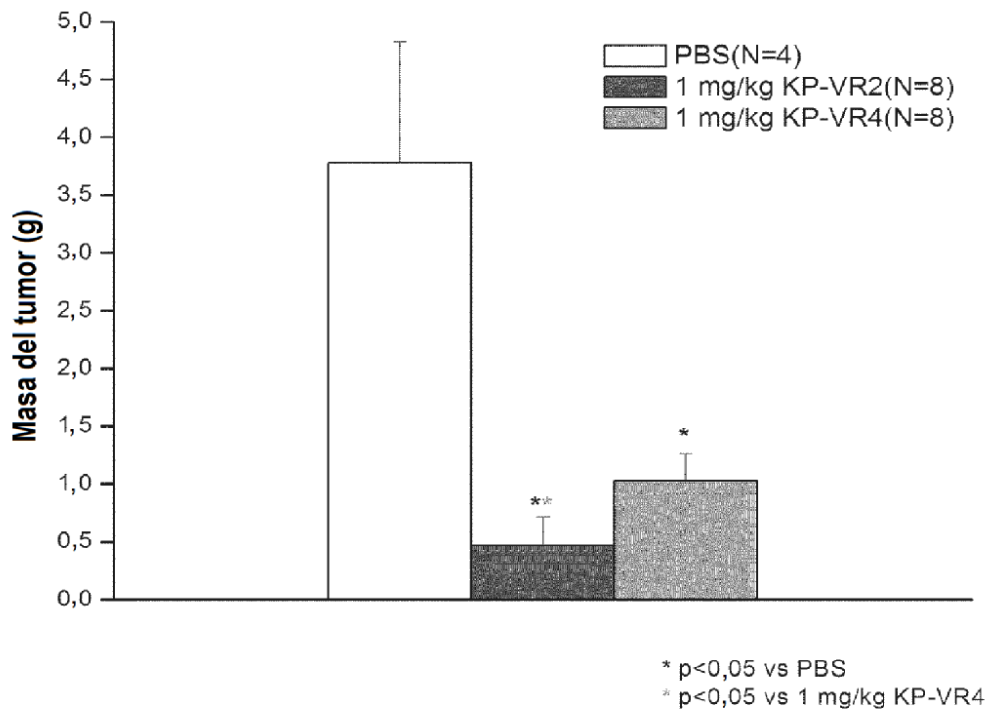


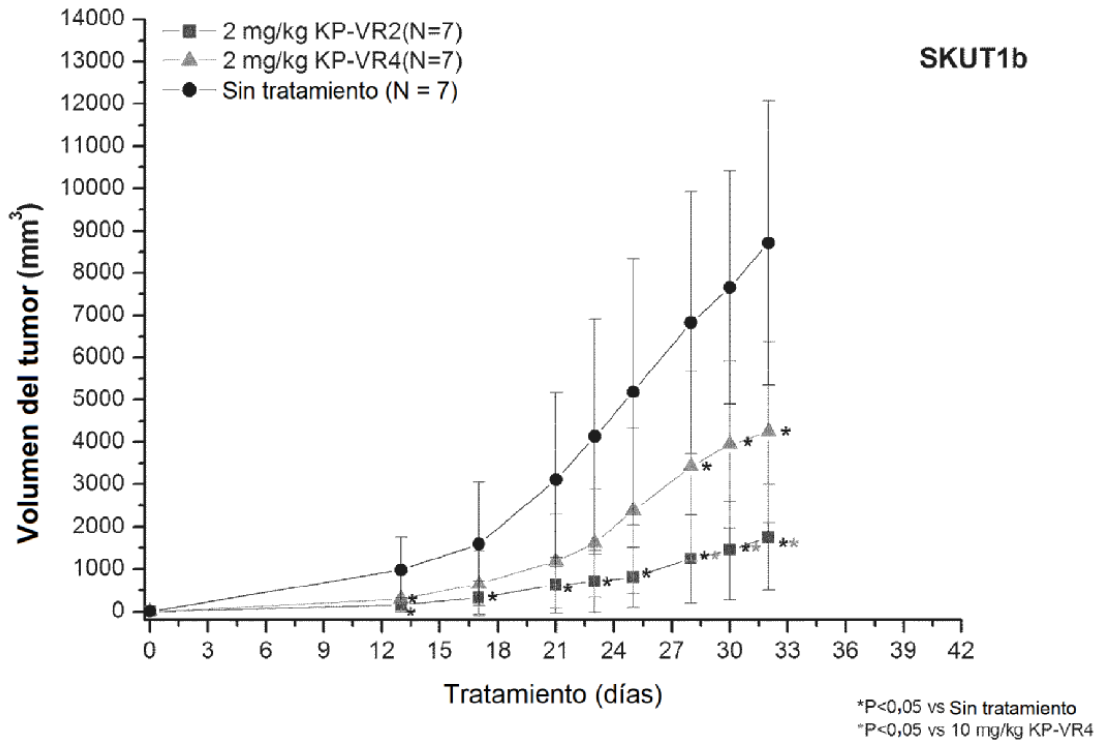
Figura 14



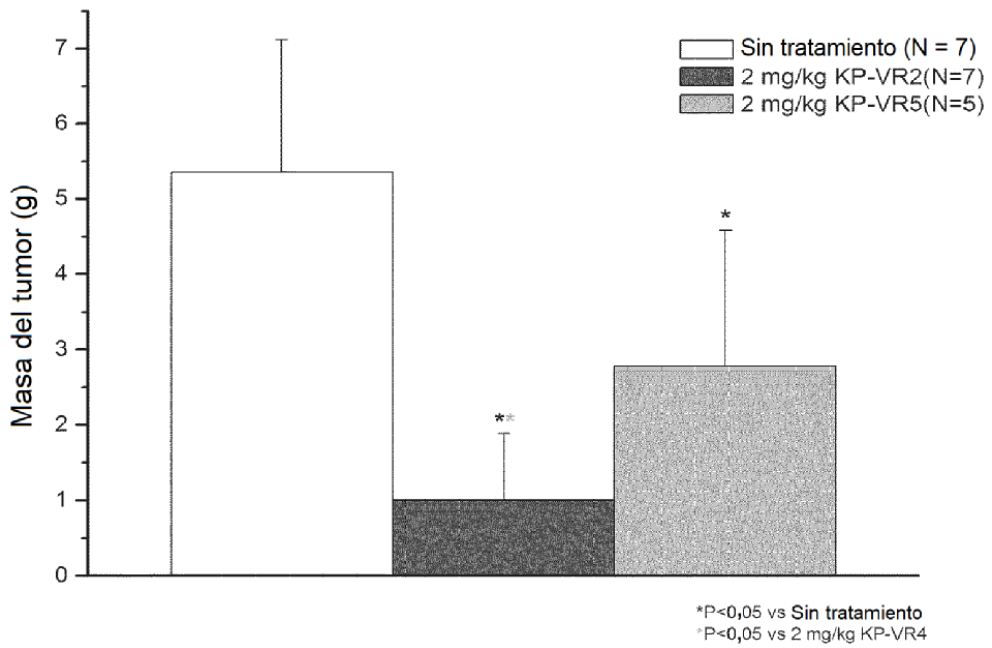
**Figura 15a**



**Figura 15b**



**Figura 16a**



**Figura 16b**

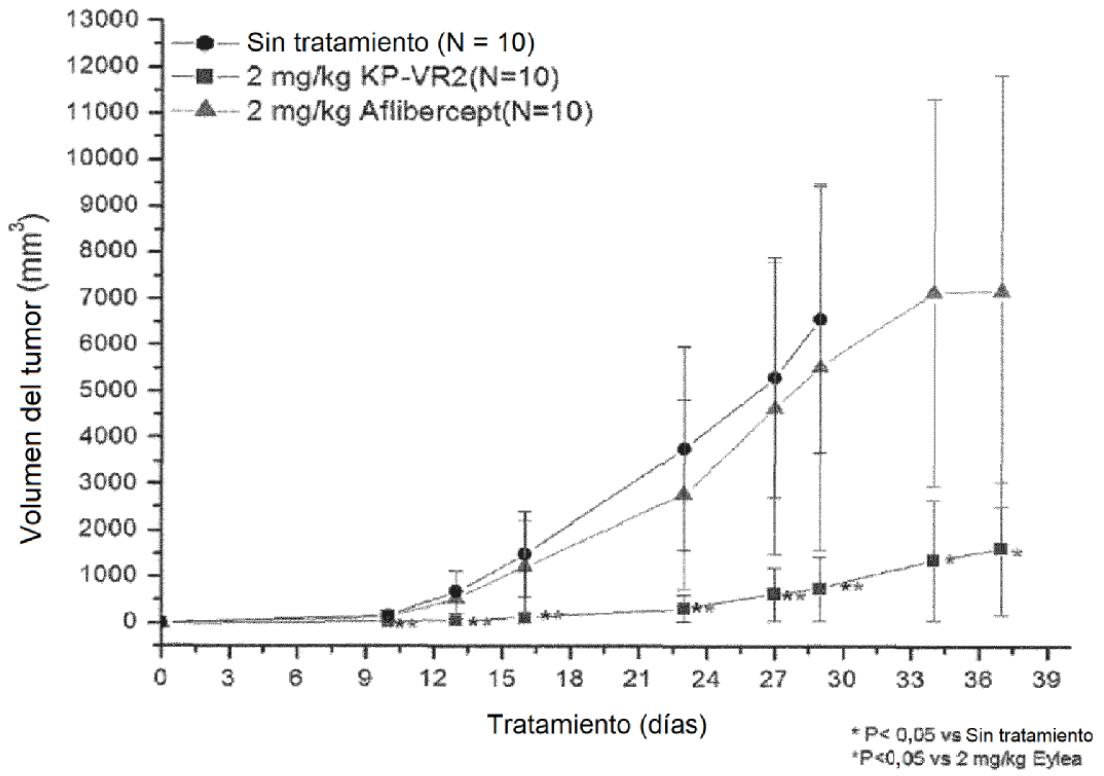


Figura 17a

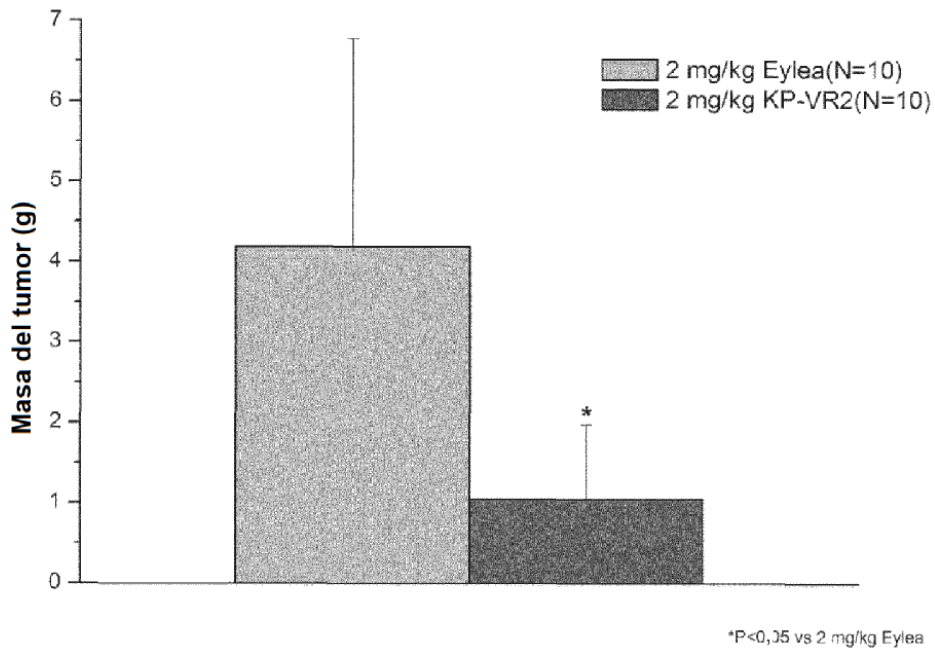
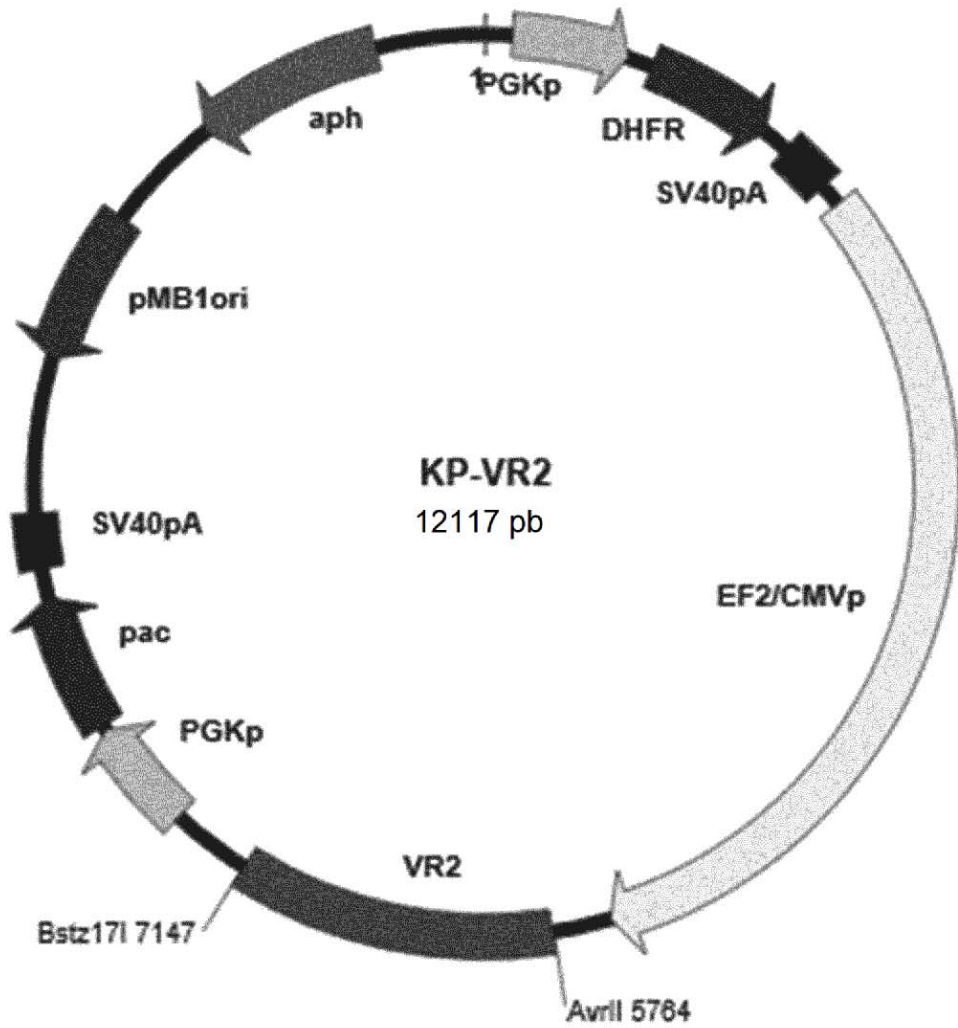


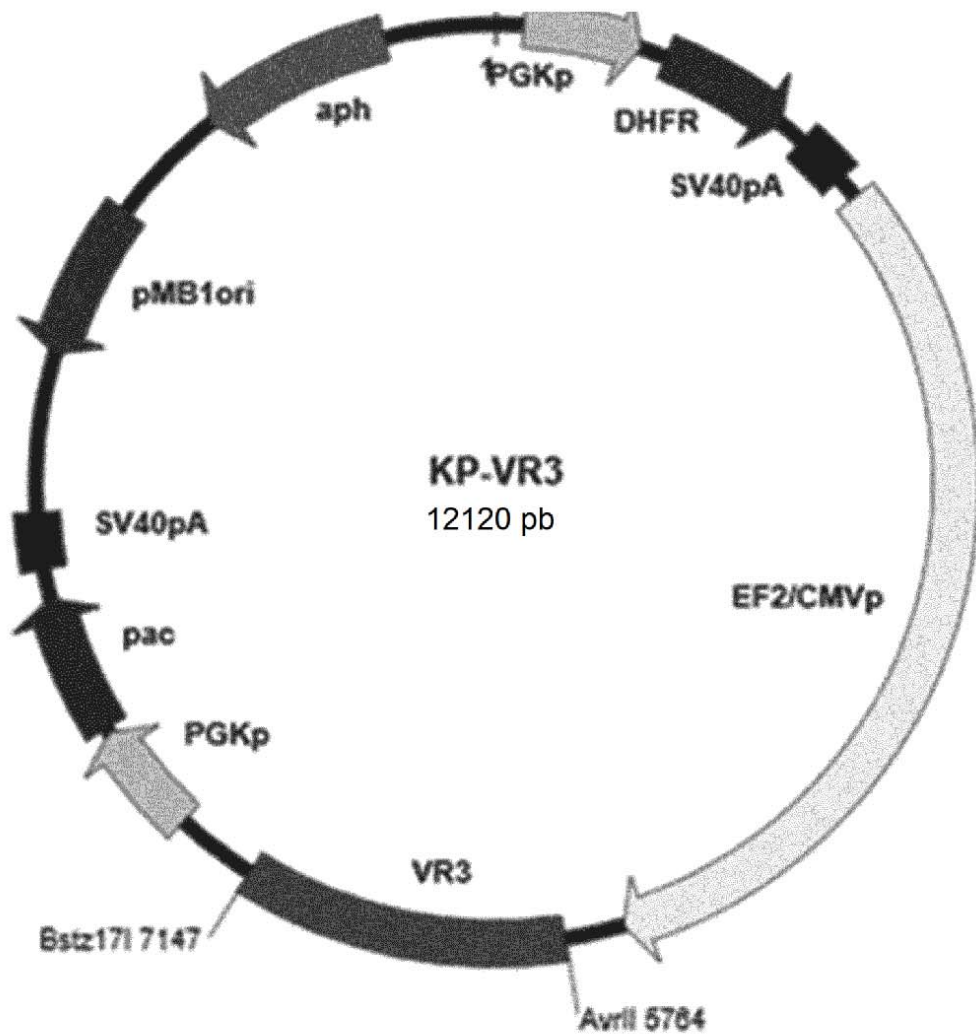
Figura 17b



PGKp: promotor de PGK (fosfoglicerato cinasa)  
DHFR: gen de DHFR (dihidrofolato reductasa)  
SV40pA: señal de poliadenilación de SV40  
EF2/CMVp: promotor híbrido de EF2/CMV  
pac: gen de resistencia a puromicina  
pMB1ori: origen de replicación pMB1  
Aph: gen de resistencia a kanamicina

**Figura 18**





PGKp: promotor de PGK (fosfoglicerato cinasa)  
 DHFR: gen de DHFR (dihidrofolato reductasa)  
 SV40pA: señal de poliadenilación de SV40  
 EF2/CMVp: promotor híbrido de EF2/CMV  
 pac: gen de resistencia a puromicina  
 pMB1ori: origen de replicación pMB1  
 Aph: gen de resistencia a kanamicina

**Figura 19**