

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 491**

51 Int. Cl.:

A61K 47/60 (2007.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2011** **PCT/EP2011/056824**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.11.2011** **WO11135067**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2011** **E 11716429 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019** **EP 2563400**

54 Título: **Proteínas de unión modificadas que inhiben la interacción del receptor VEGF-A**

30 Prioridad:

30.04.2010 EP 10161685

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2020

73 Titular/es:

MOLECULAR PARTNERS AG (100.0%)

Wagistrasse 14

8952 Schlieren, CH

72 Inventor/es:

BINZ, HANS KASPAR;

FORRER, PATRIK y

STUMPP, MICHAEL TOBIAS

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 745 491 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

Proteínas de unión modificadas que inhiben la interacción del receptor VEGF-A

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a proteínas de unión recombinantes modificadas específicas para VEGF-A, así como a composiciones farmacéuticas que comprenden tales proteínas, y el uso de tales proteínas en el tratamiento de tumores y enfermedades oculares.

10

Antecedentes de la invención

La angiogénesis, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasculatura preexistente, es un procedimiento clave en varias afecciones patológicas, que incluyen el crecimiento tumoral y enfermedades oculares, en particular enfermedades de neovascularización ocular tales como degeneración macular relacionada con la edad (AMD) o edema macular diabético (DME) (Carmeliet, P., *Nature* 438, 932-936, 2005). Los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) estimulan la angiogénesis y la linfangiogénesis activando las tirosina quinasas del receptor VEGF (VEGFR) en las células endoteliales (Ferrara, N., Gerber, H. P. y LeCouter, J., *Nature Med.* 9, 669-676, 2003).

20

La familia VEGF de mamíferos consiste en cinco glucoproteínas denominadas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D (también conocida como FIGF) y factor de crecimiento placentario (PlGF, también conocido como PGF). Se ha demostrado que VEGF-A es una diana efectiva para la terapia antiangiogénica (Ellis, L. M. y Hicklin, D. J., *Nature Rev. Cancer* 8, 579-591, 2008). Los ligandos VEGF-A se unen y activan tres tirosina quinasas receptoras de tipo III estructuralmente similares, denominadas VEGFR-1 (también conocido como FLT1), VEGFR-2 (también conocida como KDR) y VEGFR-3 (también conocida como FLT4). Los ligandos VEGF tienen especificidades de unión distintivas para cada uno de estos receptores de tirosina quinasa, que contribuyen a su diversidad de funciones. En respuesta a la unión del ligando, las tirosina quinasas VEGFR activan una red de distintas vías de señalización aguas abajo. VEGFR-1 y VEGFR-2 se encuentran principalmente en el endotelio vascular, mientras que VEGFR-3 se encuentra principalmente en el endotelio linfático. Todos estos receptores tienen un dominio extracelular, una única región transmembrana y una secuencia de consenso de tirosina quinasa interrumpida por un dominio de inserción de quinasa. Más recientemente, se demostró que la neuropilina (NRP-1), originalmente identificada como un receptor para la familia de mediadores de guía neuronal de semaforina / colapsina, actuó como un receptor específico de isoforma para VEGF-A.

35

Se conocen diversas isoformas de VEGF-A que se generan mediante un corte y empalme alternativo a partir de ocho exones dentro del gen VEGF-A. Todas las isoformas contienen los exones 1-5 y el exón terminal, exón 8. Los exones 6 y 7, que codifican dominios de unión a heparina, pueden incluirse o excluirse. Esto da lugar a una familia de proteínas denominada de acuerdo con su número de aminoácidos: VEGF-A165, VEGF-A121, VEGF-A189, y así sucesivamente. Sin embargo, el exón 8 contiene dos sitios de corte y empalme 3' en las secuencias de nucleótidos, que pueden ser utilizados por la célula para generar dos familias de isoformas con longitud idéntica, pero diferentes secuencias de aminoácidos C-terminales (Varey, AHR et al., *British J. Cancer* 98, 1366-1379, 2008). VEGF-Axxx ("xxx" denota el número de aminoácidos de la proteína madura), la familia de isoformas pro-angiogénicas, se genera mediante el uso de la secuencia más próxima en el exón 8 (lo que resulta en la inclusión del exón 8a). Las isoformas antiangiogénicas VEGF-Axxx b descritas más recientemente se generan mediante el uso de un sitio de corte y empalme distal, 66 pb más a lo largo del gen desde el sitio de corte y empalme proximal. Esto da como resultado la unión del exón 8a y la producción de secuencias de ARNm que codifican la familia VEGF-Axxx b. VEGF-A165 es la isoforma pro-angiogénica predominante y se sobreexpresa comúnmente en una variedad de tumores sólidos humanos. VEGF-A165b fue la primera de las isoformas codificadas en el exón 8b identificadas y demostró tener efectos antiangiogénicos (Varey et al., loc. cit.; Konopatskaya, O. et al., *Molecular Vision* 12, 626-632, 2006). Es una forma inhibitoria endógena de VEGF-A, que disminuye la proliferación inducida por VEGF-A y la migración de células endoteliales. Aunque puede unirse a VEGFR-2, la unión de VEGF-A165b no da como resultado la fosforilación del receptor ni la activación de las vías de señalización aguas abajo.

55

Existen varios enfoques para inhibir la señalización de VEGF-A, incluida la neutralización del ligando o receptor por anticuerpos, y el bloqueo de la activación del receptor de VEGF-A y la señalización con inhibidores de tirosina quinasa. Se ha demostrado que la terapia dirigida a VEGF-A es eficaz como agente único en AMD, DME, carcinoma de células renales y carcinoma hepatocelular, mientras que solo es beneficioso cuando se combina con quimioterapia para pacientes con cáncer metastásico colorrectal, de células no pequeñas y cáncer de mama metastásico (Narayanan, R. et al., *Nat Rev. Drug Discov.* 5, 815-816, 2005; Ellis y Hicklin, loc. cit).

60

Además de los anticuerpos, se pueden usar otros dominios de unión para neutralizar un ligando o un receptor (Skerra, A., *J. Mol. Recog.* 13, 167-187, 2000; Binz, H. K., Amstutz, por ejemplo, and Pluckthun, A., *Nat. Biotechnol.* 23, 1257-1268, 2005). Una de estas nuevas clases de dominios de unión se basa en dominios de

65

repetición diseñados (WO 02/20565; Binz, HK, Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, MT, Briand, C., Forrer, P., Grütter, MG y Pluckthun, A., Nat. Biotechnol. 22, 575-582, 2004). El documento WO 02/20565 describe cómo se pueden construir grandes bibliotecas de proteínas de repetición y su aplicación general. Sin embargo, el documento WO 02/20565 no describe la selección de dominios de repetición con especificidad de unión para VEGF-Axxx ni motivos concretos de secuencias de repetición de dominios de repetición que se unen específicamente a VEGF-Axxx.

El direccionamiento a VEGF-A con las terapias disponibles actualmente no es efectiva en todos los pacientes, o para todas las enfermedades (por ejemplo, cánceres que expresan EGFR). Incluso se ha vuelto cada vez más evidente que el beneficio terapéutico asociado con la terapia dirigida a VEGF-A es complejo y probablemente involucra múltiples mecanismos (Ellis y Hicklin, loc. cit.). Por ejemplo, medicamentos anti-VEGF comercializados, como bevacizumab (Avastin®) o ranibizumab (Lucentis®) (véase WO 96/030046, WO 98/045331 y WO 98/045332) o medicamentos en desarrollo clínico, como VEGF-Trap® (WO 00/075319) no distingue entre las formas pro- y anti-angiogénicas de VEGF-A, por lo que inhiben ambas. Como resultado, inhiben la angiogénesis, pero también privan a los tejidos sanos de un factor de supervivencia esencial, a saber, VEGF-Axxx, lo que resulta en citotoxicidad y efectos secundarios limitantes de la dosis, que a su vez limitan la eficacia. Los efectos secundarios comunes a las actuales terapias anti-VEGF-A son perforaciones gastrointestinales, sangrado, hipertensión, eventos tromboembólicos y proteinuria (Kamba, T. y McDonald, D.M., Br. J. Cancer 96, 1788-95, 2007). Otro medicamento anti-VEGF comercializado para el tratamiento de AMD es pegaptanib (WO 98/018480; Macugen®, una marca registrada de Pfizer). El pegaptanib es un aptámero anti-VEGF PEGilado, una sola cadena de ácido nucleico que se une con especificidad a la proteína diana. Para el tratamiento de la AMD neovascular, existe una amplia evidencia de que los resultados de la visión con Lucentis® son superiores a los de Macugen®, y no hay evidencia definitiva que sugiera una diferencia en la seguridad entre los medicamentos. Como resultado, Macugen® no es una terapia comúnmente utilizada para esta enfermedad.

En general, existe la necesidad de agentes antiangiogénicos mejorados para tratar el cáncer y otras afecciones patológicas.

El problema técnico subyacente a la presente invención es identificar nuevos agentes antiangiogénicos, tales como dominios de repetición con especificidad de unión a VEGF-Axxx, para un tratamiento mejorado del cáncer y otras afecciones patológicas, por ejemplo, enfermedades oculares como AMD o DME. La solución a este problema técnico se logra proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una proteína de unión recombinante que comprende un dominio de repetición de anquirina y un resto de polietilenglicol de al menos 5 kDa de peso molecular, en la que dicho dominio de anquirina se une a VEGF-A165 con una K_d inferior a 10^{-9} M e inhibe VEGF-A165 se une a VEGFR-2, y en la que dicho dominio de repetición de anquirina corresponde a los aminoácidos 1 a 126 de la SEQ ID NO: 3.

En una realización preferente, el resto de polietilenglicol está acoplado a un único residuo Cys del dominio de unión.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende una o más de las proteínas de unión mencionadas anteriormente. La divulgación se refiere además a una composición farmacéutica que comprende una o más moléculas de ácido nucleico.

La divulgación se refiere además a un procedimiento de tratamiento del cáncer y otras afecciones patológicas, por ejemplo, enfermedades oculares tales como AMD o DME, usando las proteínas de unión de la invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Unión específica de VEGF-A164 de perro de proteínas de repetición de anquirina diseñadas seleccionadas.

El ELISA de extracto bruto muestra la interacción de clones seleccionados con el VEGF-A164 (VEGF) de perro y una proteína de control negativo (MBP, proteína de unión a maltosa *Escherichia coli*). Los VEGF-A164 y MBP de perro biotinilados se inmovilizaron sobre NeutrAvidina. Los números se refieren a clones DARPIn individuales seleccionadas en la presentación de ribosomas contra el VEGF-A164 de perro o el VEGF-A165 humano correspondiente.

A = absorbancia. Las barras blancas indican la unión al VEGF-A164 de perro, las barras negras muestran una unión de fondo no específica a MBP.

Figura 2. Inhibición de crecimiento de esferoides por una DARPIn seleccionada.

La longitud de los brotes en un ensayo de inhibición de crecimiento de esferoides se muestra en presencia de varias concentraciones de (a) DARPIn # 30 (aminoácidos 1 a 126 de la SEQ ID NO: 4), una DARPIn con

especificidad para VEGF-Axxx, o (b) DARPin NC, una DARPin de control negativo sin especificidad para VEGF-Axxx.

Figura 3. *Reconocimiento específico de isoformas de VEGF-A.*

Análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) de proteínas de unión en isoformas de VEGF-A.

(a) y (b): análisis SPR de Avastin®. Se aplicaron 250 nM de Avastin® a una celda de flujo con el VEGF-A164 de perro inmovilizado (a) o el VEGF-A164b de perro (b) durante 100 segundos, seguido de lavado con flujo de tampón.

(c) y (d): análisis SPR de DARPin # 27 (aminoácidos 1 a 159 de la SEQ ID NO: 1). Se aplicaron 250 nM de DARPin # 27 a una celda de flujo con el VEGF-A164 de perro inmovilizado (c) o el VEGF-A164b de perro (d) durante 100 segundos, seguido de lavado con flujo de tampón.

RU = Unidades de Resonancia.

Figura 4. Inhibición eficiente del VEGF-A 165 humano en el ojo de conejo.

Modelo de conejo con merma vascular para mostrar la eficacia de una DARPin en la inhibición del VEGF-A165 humano en el ojo en comparación con Lucentis®. En el día 1, se aplica PBS, DARPin # 30 o Lucentis® mediante una inyección intravítrea en un ojo de cada conejo (ojo tratado). En el día 4 o el día 30, ambos ojos de cada conejo fueron reexpuestos por inyección intravítrea de 500 ng de VEGF-A165 humano. Todos los ojos fueron evaluados 48 horas después de la inyección de VEGF-A165 midiendo el contenido de fluoresceína en el vítreo y la retina de todos los ojos una hora después de la inyección intravenosa de fluoresceína de sodio.

R = relación de mediciones de fluoresceína de ojo tratado / ojo no tratado. Las desviaciones estándar se muestran mediante una barra de error. 4-PBS = relación 4 días después de la inyección de PBS (control); 4-D = relación de 4 días después de la inyección de DARPin # 30; 30-D = relación de 30 días después de la inyección de DARPin # 30; 4-L = relación de 4 días después de la inyección de Lucentis®; 30-L = relación de 30 días después de la inyección de Lucentis®.

Descripción detallada de la invención

El VEGF-A de mamífero existe como dos familias de isoformas alternativas empalmadas: (i) las isoformas pro-angiogénicas "VEGF-Axxx" generadas por el empalme proximal del exón 8 y (ii) las isoformas antiangiogénicas "VEGF-Axxx^b" generadas por el empalme distal del exón 8. Preferentemente, el dominio de unión de acuerdo con la divulgación es específico para el VEGF-Axxx pro-angiogénico de origen de perro, conejo, mono u humano. Más preferentemente, el dominio de unión de acuerdo con la divulgación es específico para el VEGF-Axxx pro-angiogénico de origen humano. El dominio de unión de acuerdo con la invención es específico para VEGF-A165 humano.

El término "proteína" se refiere a un polipéptido, en el que al menos parte del polipéptido tiene o puede adquirir una disposición tridimensional definida formando estructuras secundarias, terciarias o cuaternarias dentro y/o entre su(s) cadena(s) polipeptídica(s). Si una proteína comprende dos o más polipéptidos, las cadenas de polipéptidos individuales pueden unirse de forma no covalente o covalente, por ejemplo, por un enlace disulfuro entre dos polipéptidos. Una parte de una proteína, que individualmente tiene o puede adquirir una disposición tridimensional definida mediante la formación de estructuras secundarias o terciarias, se denomina "dominio de la proteína". Dichos dominios de proteínas son bien conocidos por el profesional experto en la técnica.

El término "recombinante" tal como se usa en proteína recombinante, dominio de proteína recombinante y similares, significa que dichos polipéptidos se producen mediante el uso de tecnologías de ADN recombinante bien conocidas por el profesional experto en la técnica relevante. Por ejemplo, una molécula de ADN recombinante (por ejemplo, producida por síntesis génica) que codifica un polipéptido puede clonarse en un plásmido de expresión bacteriano (por ejemplo, pQE30, Qiagen). Cuando dicho plásmido de expresión recombinante construido se inserta en una bacteria (por ejemplo, *E. coli*), esta bacteria puede producir el polipéptido codificado por este ADN recombinante. El polipéptido producido correspondientemente se denomina polipéptido recombinante.

El término "etiqueta de polipéptido" se refiere a una secuencia de aminoácidos unida a un polipéptido/proteína, en el que dicha secuencia de aminoácidos es útil para la purificación, detección o direccionamiento de dicho polipéptido/proteína, o en el que dicha secuencia de aminoácidos mejora el comportamiento fisicoquímico del polipéptido/proteína, o en el que dicha secuencia de aminoácidos posee una función efectora. Las etiquetas de polipéptidos individuales, restos y/o dominios de una proteína de unión se pueden conectar entre sí directamente o mediante ligadores de polipéptidos. Estas etiquetas de polipéptidos son bien conocidas en la técnica y están completamente disponibles para el experto en la técnica. Ejemplos de etiquetas polipeptídicas son pequeñas secuencias polipeptídicas, por ejemplo, etiquetas His, myc, FLAG o Strep o restos tales como enzimas (por ejemplo, enzimas como la fosfatasa alcalina), que permiten la detección de dicho polipéptido/proteína, o restos que pueden ser utilizados para direccionamiento (como inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas) y/o como moléculas efectoras.

El término "ligador polipeptídico" se refiere a una secuencia de aminoácidos, que puede unir, por ejemplo, dos dominios de proteínas, una etiqueta de polipéptido y un dominio de proteínas, un dominio de proteínas y un resto no polipéptido tal como polietilenglicol o dos etiquetas de secuencia. Dichos dominios adicionales, etiquetas, restos no polipeptídicos y ligadores son conocidos por el experto en la técnica relevante. Se proporciona una lista de ejemplos en la descripción de la solicitud de patente WO 02/20565. Ejemplos particulares de tales ligadores son los ligadores de glicina-serina y los ligadores de prolina-treonina de longitudes variables; preferentemente, dichos ligadores tienen una longitud entre 2 y 24 aminoácidos; más preferentemente, dichos ligadores tienen una longitud entre 2 y 16 aminoácidos.

En el contexto de la presente invención, el término "polipéptido" se refiere a una molécula que consiste en una o más cadenas de aminoácidos múltiples, es decir, dos o más, unidos mediante enlaces peptídicos. Preferentemente, un polipéptido consiste en más de ocho aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos.

El término "resto polimérico" se refiere a un resto polimérico proteico o un resto polimérico no proteico. Un "resto polimérico proteico" es preferentemente un polipéptido que no forma una estructura terciaria estable mientras que no forma más del 10% (preferentemente, no más del 5%; también se prefiere, no más del 2%; incluso más preferentemente, no más de 1%; y lo más preferentemente, no hay cantidades detectables, según lo determinado por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de oligómeros o agregados cuando se almacenan a una concentración de aproximadamente 0,1 mM en PBS a TA durante un mes. Tales restos poliméricos proteicos se ejecutan a un peso molecular aparente en SEC que es mayor que su peso molecular efectivo cuando se usan proteínas globulares como patrones de peso molecular para la SEC. Preferentemente, el peso molecular aparente de dichos restos poliméricos proteicos determinados por SEC es 1,5x, 2x o 2,5x mayor que su peso molecular efectivo calculado a partir de su secuencia de aminoácidos. También preferentemente, los pesos moleculares aparentes de dichos restos poliméricos no proteicos determinados por SEC son 2x, 4x u 8x más altos que su peso molecular efectivo calculado a partir de su composición molecular. Preferentemente, más del 50%, 70% o incluso el 90% de los aminoácidos de dicho resto polimérico proteico no forman estructuras secundarias estables a una concentración de aproximadamente 0,1 mM en PBS a TA según lo determinado por mediciones de Dicroísmo Circular (CD). Más preferentemente, dicho polímero proteico muestra un espectro de CD típico cercano a UV de una conformación de bobina aleatoria. Dichos análisis de CD son bien conocidos por el experto en la técnica. También son preferibles restos poliméricos proteicos que consisten en más de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 u 800 aminoácidos. Ejemplos de restos poliméricos proteicos son los polipéptidos XTEN® (una marca registrada de Amunix; WO 07/103515), o polipéptidos que comprenden residuos de prolina, alanina y serina como se describe en el documento WO 08/155134. Tales restos poliméricos proteicos se pueden unir covalentemente a, por ejemplo, un dominio de unión de la invención mediante la generación de polipéptidos de fusión genética usando tecnologías de clonación de ADN estándar, seguido de su expresión y purificación estándar. Los ejemplos de proteínas de unión que comprenden un dominio de unión de repetición VEGF-Axxx y tal resto polimérico proteico se muestran en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 4. Las posiciones de aminoácidos de 1 a 159 de la SEQ ID NO: 1 corresponden al dominio de repetición y la posición de aminoácidos 161 a 1025 de la SEQ ID NO: 1 corresponde al resto polimérico proteico. Las posiciones de aminoácidos de 1 a 126 de la SEQ ID NO: 4 corresponden al dominio de repetición y las posiciones de aminoácidos 131 a 640 de la SEQ ID NO: 4 corresponden al resto polimérico proteico.

Un resto polimérico de la invención puede variar ampliamente en peso molecular (es decir, de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 150 kDa). Preferentemente, el resto polimérico tiene un peso molecular de al menos 2, 5, 10, 20, 30, 50, 70 o 100 kDa.

Preferentemente, dicho resto polimérico está conectado por un ligador polipeptídico a un dominio de unión. Ejemplos de dichos ligadores polipeptídicos son los aminoácidos 1 a 8 de la SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9.

Ejemplos de restos poliméricos no proteicos son hidroxietilalmidón (HES), polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxiálqueno. El término "PEGilado" significa que un resto PEG está unido covalentemente a, por ejemplo, un polipéptido de la invención. Los ejemplos de proteínas de repetición que contienen un ligador polipeptídico entre el dominio de repetición y un residuo Cys C-terminal útil para unir un resto polimérico no proteico son las SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 y 7.

En una realización específica, un resto PEG o cualquier otro polímero no proteináceo puede, por ejemplo, acoplarse a un tiol de cisteína a través de un ligador maleimida con la cisteína acoplada a través de un ligador peptídico al extremo N- o C-terminal de un dominio de unión como se describe en la presente memoria (por ejemplo, SEQ ID NO: 3).

El término "proteína de unión" se refiere a una proteína que comprende uno o más dominios de unión y uno o más restos poliméricos como se explica adicionalmente a continuación. Preferentemente, dicha proteína de unión comprende hasta cuatro dominios de unión. Más preferentemente, dicha proteína de unión comprende hasta dos dominios de unión. Lo más preferentemente, dicha proteína de unión comprende solo un dominio de unión. Además, cualquiera de tales proteínas de unión puede comprender dominios de proteínas adicionales que

no son dominios de unión, restos de multimerización, etiquetas de polipéptidos, ligadores polipeptídicos y/o un solo residuo de Cys. Ejemplos de restos de multimerización son regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina que se emparejan para proporcionar dominios Fc de inmunoglobulina funcionales, y cremalleras de leucina o polipéptidos que comprenden un tiol libre que forma un enlace disulfuro intermolecular entre dos de dichos polipéptidos. El único residuo de Cys puede usarse para conjugar otros restos con el polipéptido, por ejemplo, usando la química de maleimida bien conocida por el experto en la técnica.

Preferentemente, dicha proteína de unión comprende hasta cuatro restos poliméricos. Más preferentemente, dicha proteína de unión comprende hasta dos restos poliméricos. Lo más preferentemente, dicha proteína de unión comprende solo un resto polimérico.

También preferentemente, dicha proteína de unión tiene un peso molecular aparente de al menos 70, 100, 200, 300, 500 u 800 kDa cuando se analiza a una concentración de 0,1 mM en PBS a TA por SEC usando proteínas globulares como patrones de peso molecular.

El término "dominio de unión" significa un dominio de proteína que muestra el mismo "pliegue" (disposición tridimensional) que un andamio de proteína y que tiene una propiedad predeterminada, como se define a continuación. Tal dominio de unión puede obtenerse mediante técnicas de ingeniería de proteínas combinatorias racionales, o más comúnmente, habilidades que se conocen en la técnica (Skerra, 2000, loc. cit.; Binz et al., 2005, loc. cit.). Por ejemplo, un dominio de unión que tiene una propiedad predeterminada se puede obtener mediante un procedimiento que comprende las etapas de (a) proporcionar una colección diversa de dominios de proteínas que exhiben el mismo pliegue que un andamio de proteínas como se define más adelante; y (b) seleccionar dicha colección diversa y/o seleccionar de dicha colección diversa para obtener al menos un dominio de proteína que tiene dicha propiedad predeterminada. La colección diversa de dominios de proteínas puede proporcionarse mediante varios procedimientos de acuerdo con el sistema de selección y/o escrutinio selección que se usa, y puede comprender el uso de procedimientos bien conocidos por el experto en la técnica, tales como visualización de fagos o visualización de ribosomas.

El término "andamio de proteínas" significa una proteína con áreas de superficie expuestas en las cuales las inserciones, sustituciones o deleciones de aminoácidos son altamente tolerables. Los ejemplos de estructuras de proteínas que pueden usarse para generar dominios de unión de la presente invención son anticuerpos o fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fv o Fab de cadena sencilla, proteína A de *Staphylococcus aureus*, la proteína de unión a bilina de *Pieris brassicae* u otras lipocalinas, repetición de anquirina proteínas u otras proteínas de repetición, y fibronectina humana. Los andamios de proteínas son conocidos por el experto en la técnica (Binz et al., 2005, loc. cit.; Binz et al., 2004, loc. cit.).

El término "propiedad predeterminada" se refiere a una propiedad tal como unión a una diana, bloqueo de una diana, activación de una reacción mediada por diana, actividad enzimática y otras propiedades relacionadas. Dependiendo del tipo de propiedad deseada, un experto en la técnica podrá identificar el formato y las etapas necesarias para realizar la selección y/o escrutinio de un dominio de unión con la propiedad deseada. Preferentemente, dicha propiedad predeterminada es vinculante para una diana.

Preferentemente, la proteína de unión de la invención no es un anticuerpo o un fragmento del mismo, tal como fragmentos Fab o scFv. Los anticuerpos y sus fragmentos son bien conocidos por el experto en la técnica.

También preferentemente, el dominio de unión de la invención no comprende un pliegue de inmunoglobulina como está presente en los anticuerpos y/o el dominio de fibronectina tipo III. Un pliegue de inmunoglobulina es un pliegue de proteína $\alpha\beta$ común que consiste en un emparejado de 2 capas de aproximadamente 7 cadenas β antiparalelas dispuestas en dos láminas β . Los pliegues de inmunoglobulina son bien conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, dichos dominios de unión que comprenden un pliegue de inmunoglobulina se describen en los documentos WO 07/080392 o WO 08/097497.

Además, preferentemente, el dominio de unión de la invención no comprende un dominio de tipo inmunoglobulina como se encuentra en VEGFR-1 o VEGFR-2. Dichos dominios de unión se describen en el documento WO 00/075319.

Un dominio de unión preferente es un dominio de unión que tiene efectos antiangiogénicos. El efecto antiangiogénico de un dominio de unión puede determinarse mediante ensayos bien conocidos por el experto en la técnica, tales como el ensayo de germinación de esferoides HUVEC descritos en el Ejemplo 2.

Se prefiere además un dominio de unión que comprende entre 70 y 300 aminoácidos, en particular entre 100 y 200 aminoácidos.

Se prefiere adicionalmente un dominio de unión desprovisto de un residuo de Cys libre. Un residuo de Cys libre no está involucrado en la formación de un enlace disulfuro. Aún más preferente es un dominio de unión libre de

cualquier residuo de Cys.

Un dominio de unión preferente de la divulgación es un dominio de repetición o un dominio de repetición diseñado, preferentemente como se describe en el documento WO 02/20565.

Un dominio de unión particularmente preferente es un dominio de repetición de anquirina diseñado (Binz, H. K. et al., 2004, loc. cit.), Preferentemente como se describe en el documento WO 02/20565. Los ejemplos de dominios de repetición de anquirina diseñados se muestran en los Ejemplos.

Las definiciones de aquí en adelante para proteínas de repetición se basan en las de la solicitud de patente WO 02/20565. La solicitud de patente WO 02/20565 contiene además una descripción general de características, técnicas y aplicaciones de las proteínas de repetición.

El término "proteínas de repetición" se refiere a una proteína que comprende uno o más dominios de repetición. Preferentemente, cada una de dichas proteínas de repetición comprende hasta cuatro dominios de repetición. Más preferentemente, cada una de dichas proteínas de repetición comprende hasta dos dominios de repetición. Lo más preferentemente, cada una de dichas proteínas de repetición comprende solo un dominio de repetición. Además, dicha proteína de repetición puede comprender dominios proteicos adicionales no de repetición, etiquetas de polipéptidos y/o ligadores polipeptídicos.

El término "dominio de repetición" se refiere a un dominio de proteína que comprende dos o más unidades de repetición consecutivas (módulos) como unidades estructurales, en el que dichas unidades estructurales tienen el mismo pliegue y se apilan firmemente para crear, por ejemplo, una estructura superhelicoidal que tiene un núcleo hidrófobo conjunto.

El término "proteína de repetición diseñada" y "dominio de repetición diseñado" se refieren a una proteína de repetición o dominio de repetición, respectivamente, obtenido como resultado del procedimiento descrito explicado en la solicitud de patente WO 02/20565. Las proteínas de repetición diseñadas y los dominios de repetición diseñados son sintéticos y no de origen natural. Son proteínas o dominios artificiales, respectivamente, obtenidos por expresión de ácidos nucleicos diseñados correspondientemente. Preferentemente, la expresión se realiza en células eucariotas o procariotas, tales como células bacterianas, o usando un sistema de expresión *in vitro* libre de células.

El término "unidad estructural" se refiere a una parte localmente ordenada de un polipéptido, formada por interacciones tridimensionales entre dos o más segmentos de estructura secundaria que están cerca uno del otro a lo largo de la cadena polipeptídica. Tal unidad estructural exhibe un motivo estructural. El término "motivo estructural" se refiere a una disposición tridimensional de elementos de estructura secundaria presentes en al menos una unidad estructural. Los motivos estructurales son bien conocidos por el experto en la técnica. Las unidades estructurales por sí solas no pueden adquirir una disposición tridimensional definida; sin embargo, su disposición consecutiva, por ejemplo, como módulos de repetición en un dominio de repetición, conduce a una estabilización mutua de las unidades vecinas, lo que resulta en una estructura superhelicoidal.

El término "unidad de repetición" se refiere a secuencias de aminoácidos que comprenden motivos de secuencia de repetición de una o más proteínas de repetición de origen natural, en el que dichas "unidades de repetición" se encuentran en múltiples copias, y que exhiben una topología de plegamiento definida común a todos dichos motivos que determinan el pliegue de la proteína. Ejemplos de tales unidades de repetición son unidades de repetición de armadillo, unidades de repetición ricas en leucina, unidades de repetición de anquirina, unidades de repetición tetrapéptido, unidades de repetición HEAT y unidades de repetición variantes ricas en leucina. Las proteínas de origen natural que contienen dos o más de tales unidades de repetición se denominan "proteínas de repetición de origen natural". Las secuencias de aminoácidos de las unidades de repetición individuales de una proteína de repetición pueden tener un número significativo de mutaciones, sustituciones, adiciones y/o deleciones cuando se comparan entre sí, mientras que aún conservan sustancialmente el patrón o motivo general de las unidades de repetición.

Preferentemente, las unidades de repetición utilizadas para la deducción de un motivo de secuencia de repetición son unidades de repetición homólogas obtenidas de dominios de repetición seleccionados en una diana, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1 y que tienen la misma especificidad de diana.

La expresión "motivo de secuencia de repetición" se refiere a una secuencia de aminoácidos, que se deduce de una o más unidades de repetición. Preferentemente, dichas unidades de repetición son de dominios de repetición que tienen especificidad de unión para la misma diana.

El término "topología de plegamiento" se refiere a la estructura terciaria de dichas unidades de repetición. La topología de plegamiento estará determinada por tramos de aminoácidos que forman al menos partes de hélices α o láminas β , o tramos de aminoácidos que forman polipéptidos o bucles lineales, o cualquier combinación de

hélices α , láminas β y/o bucles/polipéptidos lineales.

El término "consecutivo" se refiere a una disposición, en la que las unidades de repetición o los módulos de repetición están dispuestos en tándem. En las proteínas de repetición diseñadas, hay al menos 2, generalmente de aproximadamente 2 a 6, en particular al menos aproximadamente 6, frecuentemente 20 o más unidades de repetición. En la mayoría de los casos, las unidades de repetición exhibirán un alto grado de identidad de secuencia (los mismos residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes) o similitud de secuencia (los residuos de aminoácidos son diferentes, pero tienen propiedades fisicoquímicas similares), y algunos de los residuos de aminoácidos podrían ser clave los residuos están fuertemente conservados en las diferentes unidades de repetición que se encuentran en las proteínas naturales. Sin embargo, será posible un alto grado de variabilidad de secuencia por inserciones y/o deleciones de aminoácidos, y/o sustituciones entre las diferentes unidades de repetición encontradas en proteínas naturales siempre que se mantenga la topología de plegamiento común.

Los procedimientos para determinar directamente la topología de plegamiento de proteínas de repetición por medios fisicoquímicos tales como cristalografía de rayos X, espectroscopía de NMR o CD, son bien conocidos por el profesional experto en la técnica. Los procedimientos para identificar y determinar unidades de repetición o motivos de secuencia de repetición o para identificar familias de proteínas relacionadas que comprenden tales unidades de repetición o motivos, tales como búsquedas de homología (BLAST, etc.), están bien establecidos en el campo de la bioinformática, y son bien conocidos por los expertos en la materia. La etapa de refinar un motivo de secuencia de repetición inicial puede comprender un procedimiento iterativo.

El término "módulos de repetición" se refiere a las secuencias de aminoácidos repetidas de los dominios de repetición diseñados, que se derivan originalmente de las unidades de repetición de proteínas de repetición de origen natural. Cada módulo de repetición comprendido en un dominio de repetición se deriva de una o más unidades de repetición de la familia o subfamilia de proteínas de repetición de origen natural, por ejemplo, la familia de proteínas de repetición de armadillo o proteínas de repetición de anquirina.

Los "módulos de repetición" pueden comprender posiciones con residuos de aminoácidos presentes en todas las copias de los módulos de repetición correspondientes ("posiciones fijas") y posiciones con residuos de aminoácidos diferentes o "aleatorizados" ("posiciones aleatorias").

El término "módulo de protección" se refiere a un polipéptido fusionado con el módulo de repetición N- o C-terminal de un dominio de repetición, en el que dicho módulo de protección forma interacciones terciarias estrechas con dicho módulo de repetición proporcionando así una protección que protege el núcleo hidrófobo de dicho módulo de repetición en el lado que no está en contacto con el módulo de repetición consecutivo del solvente. Dicho módulo de limitación N y/o C-terminal puede ser, o puede derivarse de, una unidad de limitación u otro dominio que se encuentra en una proteína de repetición de origen natural adyacente a una unidad de repetición. El término "unidad de terminación" se refiere a un polipéptido plegado natural, en el que dicho polipéptido define una unidad estructural particular que está fusionada en el extremo N o C en una unidad de repetición, en el que dicho polipéptido forma interacciones terciarias estrechas con dicha unidad de repetición proporcionando así una terminación que protege el núcleo hidrófobo de dicha unidad de repetición a un lado del solvente. Dichas unidades de protección pueden tener similitudes de secuencia con dicho motivo de secuencia de repetición. Los módulos de terminación y las repeticiones de terminación se describen en el documento WO 02/020565. Por ejemplo, el módulo de protección N-terminal de la SEQ ID NO: 2 está codificado por los aminoácidos desde la posición 1 a la 32. También se prefiere un módulo de protección N-terminal que tenga un residuo de glicina o aspartato en la posición 5.

El término "diana" se refiere a una molécula individual tal como una molécula de ácido nucleico, un polipéptido o proteína, un carbohidrato o cualquier otra molécula de origen natural, incluyendo cualquier parte de dicha molécula individual, o complejos de dos o más de tales moléculas. La diana puede ser una célula completa o una muestra de tejido, o puede ser cualquier molécula o resto de origen no natural. Preferentemente, la diana es un polipéptido de origen natural o no natural o un polipéptido que contiene modificaciones químicas, por ejemplo, modificado por fosforilación, acetilación o metilación natural o no natural. En la aplicación particular de la presente divulgación, la diana es VEGF-Axxx o VEGFR-2.

El término "secuencia de consenso" se refiere a una secuencia de aminoácidos, en la que dicha secuencia de consenso se obtiene mediante la alineación estructural y/o la secuencia de múltiples unidades de repetición. Usando dos o más unidades de repetición alineadas estructurales y/o secuenciales, y permitiendo espacios intermedios en la alineación, es posible determinar el residuo de aminoácido más frecuente en cada posición. La secuencia de consenso es esa secuencia que comprende los aminoácidos que se representan con mayor frecuencia en cada posición. En el caso de que dos o más aminoácidos estén representados por encima del promedio en una sola posición, la secuencia de consenso puede incluir un subconjunto de esos aminoácidos. Dichas dos o más unidades de repetición pueden tomarse de las unidades de repetición comprendidas en una única proteína de repetición, o de dos o más proteínas de repetición diferentes.

Las secuencias de consenso y los procedimientos para determinarlos son bien conocidos por el experto en la técnica.

Un "residuo de aminoácidos de consenso" es el aminoácido encontrado en una determinada posición en una secuencia de consenso. Si dos o más, por ejemplo, tres, cuatro o cinco residuos de aminoácidos se encuentran con una probabilidad similar en dichas dos o más unidades de repetición, el aminoácido de consenso puede ser uno de los aminoácidos más frecuentemente encontrados o una combinación de dichos dos o más residuos de aminoácidos.

Se prefieren adicionalmente proteínas de unión o dominios de unión de origen no natural.

El término "de origen no natural" significa sintético o que no proviene de la naturaleza, más específicamente, el término significa hecho por la mano del hombre. El término "proteína de unión de origen no natural" o "dominio de unión de origen no natural" significa que dicha proteína de unión o dicho dominio de unión son sintéticos (es decir, se produce por síntesis química a partir de aminoácidos) o recombinante y no proviene de la naturaleza. "Proteína de unión de origen no natural" o "dominio de unión de origen no natural" es una proteína o dominio artificial, respectivamente, que se obtiene por expresión de ácidos nucleicos diseñados correspondientemente. Preferentemente, la expresión se realiza en células eucariotas o bacterianas, o usando un sistema de expresión *in vitro* libre de células. Además, el término significa que la secuencia de dicha proteína de unión o dicho dominio de unión no está presente como una entrada de secuencia no artificial en una base de datos de secuencias, por ejemplo, en GenBank, EMBL-Bank o Swiss-Prot. Estas bases de datos y otras bases de datos de secuencias similares son bien conocidas por el experto en la técnica.

Un dominio de unión puede inhibir la unión de VEGF-Axxx a VEGFR-2 ya sea uniéndose a VEGF-Axxx o uniéndose a VEGFR-2 de manera que la constante de disociación aparente (K_d) entre VEGF-Axxx y VEGFR-2 se incrementa más de 10^2 veces, preferentemente más de 10^3 veces, más preferentemente más de 10^4 veces, más preferentemente más de 10^5 veces y lo más preferentemente más de 10^6 veces. Preferentemente, la K_d para la interacción del dominio de unión a VEGF-Axxx o VEGFR-2 está por debajo de 10^{-7} M, preferentemente por debajo de 10^{-8} M, más preferentemente por debajo de 10^{-9} M, más preferentemente por debajo de 10^{-10} M, y lo más preferentemente por debajo de 10^{-11} M. Los procedimientos para determinar las constantes de disociación de las interacciones proteína-proteína, como las tecnologías basadas en resonancia de plasmón superficial (SPR), son bien conocidas por el experto en la técnica.

Un dominio de unión preferente se une a VEGF-Axxx. Aún más preferente es un dominio de unión que se une a VEGF-A165 humano.

El término "PBS" significa una solución de agua tamponada con fosfato que contiene NaCl 137 mM, fosfato 10 mM y KCl 2,7 mM y que tiene un pH de 7,4.

Se prefiere una proteína de unión y/o dominio de unión que no pierda su estructura tridimensional nativa tras la incubación en PBS que contiene ditiotretitol (DTT) 100 mM durante 1 o 10 horas a 37 °C.

En una realización particular, la descripción se refiere a una proteína de unión que comprende un dominio de unión que inhibe la unión de VEGF-Axxx a VEGFR-2 y que tiene la temperatura de desnaturalización de punto medio indicada o preferente y propiedades no agregantes como se definió anteriormente, en el que dicha proteína de unión inhibe brotación de esferoides HUVEC con un valor IC_{50} inferior a 100 nM.

El término "HUVEC" significa células endoteliales de la vena umbilical humana, que pueden aislarse de la vena umbilical humana normal y que responden a la estimulación con VEGF-A. Los expertos en la técnica conocen bien los ensayos para medir la germinación de esferoides HUVEC, como se describe en el Ejemplo 2.

Un valor IC_{50} es la concentración de una sustancia, tal como una proteína de unión o dominio de unión, que se requiere para una inhibición del 50% *in vitro* de un parámetro determinado experimental, tal como la germinación de esferoides HUVEC. El experto en la técnica puede determinar fácilmente los valores de IC_{50} (Korff T. y Augustin H.G., J. Cell Biol. 143 (5), 1341-52, 1998).

Se prefiere una proteína de unión y/o dominio de unión que inhibe la germinación del esferoide HUVEC con un valor de IC_{50} inferior a 10 nM, preferentemente inferior a 1 nM, más preferentemente inferior a 0,1 nM, y lo más preferentemente inferior a 0,05 nM.

Además, se prefiere una proteína de unión monomérica y/o un dominio de unión que inhiba la germinación de esferoides HUVEC con un valor IC_{50} inferior al valor IC_{50} correspondiente de ranibizumab (Lucentis®, una marca registrada de Genentech), bevacizumab (Avastin®, una marca registrada de Genentech), aflibercept (VEGF Trap®, una marca registrada de Regeneron) o pegaptanib (Macugen®, una marca registrada de Pfizer).

La K_d para la interacción de un dominio de unión preferente a VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF o PDGF es superior a 1 nM, preferentemente superior a 10 nM, más preferentemente superior a 10^2 nM, incluso más preferentemente superior a 10^3 nM, y lo más preferentemente superior a 10^4 nM.

- 5 Preferentemente, VEGF-Axxx es VEGF-A164 de perro o VEGF-A165 de simio o VEGF-A165 humano, y VEGF-Axxxb es VEGF-A164b de perro o VEGF-A165b de simio o VEGF-A165b de humano.

Otra divulgación preferente es una proteína de unión recombinante que comprende un dominio de unión, en la que dicho dominio de unión inhibe la unión de VEGF-Axxx a VEGFR-2 y en la que dicho dominio de unión es un
10 dominio de repetición o un dominio de repetición diseñado. Tal dominio de repetición puede comprender uno, dos, tres o más módulos de repetición internos que participarán en la unión a VEGF-Axxx. Preferentemente, dicho dominio de repetición comprende un módulo de limitación de N-terminal, dos a cuatro módulos de repetición internos y un módulo de limitación de C-terminal. Preferentemente, dicho dominio de unión es un
15 dominio de repetición de anquirina o un dominio de repetición de anquirina diseñado.

Una proteína de unión recombinante preferente comprende un dominio de unión como se describe en la presente memoria, conjugado con un resto de polietilenglicol (PEG), preferentemente en el que dicho resto de PEG está
20 acoplado a un único residuo Cys de dicho dominio de unión. Preferentemente, dicho residuo Cys se introduce genéticamente en el extremo C-terminal de dicho dominio de unión. El resto PEG se puede acoplar entonces por medios químicos, por ejemplo, usando química de maleimida bien conocida por el experto en la técnica. En los ejemplos se proporcionan ejemplos de tales proteínas de unión que comprenden un resto PEG conjugado con un solo residuo Cys.

Una divulgación preferente comprende una proteína de unión recombinante que comprende un dominio de unión como se describe en la presente memoria, en el que dicho dominio de unión se conjuga en su extremo C-terminal a través de un enlace peptídico con la SEQ ID NO: 8, que a su vez se conjuga en el tiol de cisteína C-terminal a un PEG acoplado a maleimida, tal como α -[3-(3-maleimido-1-oxopropil)amino]propil- ω -metoxipolioxietileno (NOF, Sunbright ME-200MA (20kD) o Sunbright ME-400MA (40kD)). En una divulgación, el α -[3-(3-maleimido-1-oxopropil)amino]propil- ω -metoxipolioxietileno tiene un peso molecular de al menos
30 aproximadamente 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 70 o 100 kD. En ciertas divulgaciones, el α -[3-(3-maleimido-1-oxopropil)amino]propil- ω -metoxipolioxietileno tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 20 o al menos aproximadamente 40 kD.

Otra divulgación preferente es una proteína de unión recombinante como se definió anteriormente que comprende al menos un dominio de repetición con especificidad de unión para VEGF-Axxx, en el que dicho dominio de repetición compite por unirse a VEGF-Axxx con un dominio de repetición seleccionado del grupo de dominios de repetición de la SEQ ID NO: 1 a 7. Preferentemente, dicho dominio de repetición compite por unirse a VEGF-Axxx con el dominio de repetición de la SEQ ID NO: 1 o 3. Más preferentemente, dicho dominio de repetición compite por unirse a VEGF-Axxx con el dominio de repetición de la SEQ ID NO: 3.
40

La expresión "compite por unirse" significa la incapacidad de dos dominios de unión diferentes de la invención para unirse simultáneamente a la misma diana, mientras que ambos pueden unirse a la misma diana individualmente. Por lo tanto, tales dos dominios de unión compiten por la unión a dicha diana. Los procedimientos, como el ELISA de competición o las mediciones de SPR de competición (por ejemplo, utilizando el instrumento Proteon de BioRad), para determinar si dos dominios de unión compiten por la unión a una diana son bien conocidos por el experto en la técnica.
45

Una proteína de unión recombinante que compite por unirse a VEGF-Axxx con una proteína de repetición seleccionada puede identificarse por procedimientos bien conocidos por el experto en la técnica, tales como un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) de competencia.
50

Otra divulgación preferente es una proteína de unión recombinante que comprende un dominio de repetición con especificidad de unión para VEGF-Axxx seleccionado del grupo que consiste en los dominios de repetición de la SEQ ID NO: 1 a 7. Preferentemente, dicho dominio de repetición se selecciona de dominios de repetición de la SEQ ID NO: 2 o 3. Más preferentemente, dicho dominio de repetición es el dominio de repetición de la SEQ ID NO: 3.
55

Se pueden unir uno o más restos de polietilenglicol en diferentes posiciones en la proteína de unión, y dicha unión se puede lograr por reacción con aminas, tioles u otros grupos reactivos adecuados. La unión de restos de polietilenglicol (PEGilación) puede estar dirigida al sitio, en el que se introduce un grupo reactivo adecuado en la proteína para crear un sitio en el que la PEGilación se produce preferentemente, o está originalmente presente en la proteína de unión. El grupo tiol puede estar presente en un residuo de cisteína; y el grupo amina puede ser, por ejemplo, una amina primaria encontrada en el extremo N-terminal del polipéptido o un grupo amina presente en la cadena lateral de un aminoácido, tal como lisina o arginina. En una realización preferente, la proteína de unión se modifica para tener un residuo de cisteína en una posición deseada, lo que permite la PEGilación
60
65

dirigida al sitio en la cisteína, por ejemplo, por reacción con un derivado de polietilenglicol que tiene una función maleimida. El resto de polietilenglicol puede variar ampliamente en peso molecular (es decir, de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 100 kDa) y puede ser ramificado o lineal. Preferentemente, el polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 kDa, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 kDa, incluso más preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 kDa, y lo más preferentemente de aproximadamente 20 kDa.

La divulgación se refiere además a moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de unión recombinantes particulares. Además, se considera un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico.

Además, una composición farmacéutica que comprende una o más de las proteínas de unión mencionadas anteriormente, en particular proteínas de unión recombinantes que comprenden dominios de repetición o moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de unión recombinantes particulares, y opcionalmente un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable es considerado. Los vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables son conocidos por el experto en la técnica y se explican con más detalle a continuación. Aún más, se considera una composición de diagnóstico que comprende una o más de las proteínas de unión recombinantes mencionadas anteriormente, en particular proteínas de unión que comprenden dominios de repetición.

La proteína de unión de la invención suprime o previene la angiogénesis patológica inducida por VEGF, merma vascular (edema), hipertensión pulmonar, formación de tumores y/o trastornos inflamatorios. Con "supresión" se entiende que la proteína recombinante previene las patologías mencionadas hasta cierto punto, por ejemplo, a 10% o 20%, más preferentemente 50%, en particular 70%, 80% o 90%, o incluso 95%.

El término "edema" significa una afección que es causada por una merma vascular. La vasodilatación y el aumento de la permeabilidad durante la inflamación pueden ser mecanismos patogénicos predominantes. Por ejemplo, el edema contribuye a la expansión del infarto después del accidente cerebrovascular y puede causar hipertensión intracraneal potencialmente mortal en pacientes con cáncer. Además, la extravasación de proteínas plasmáticas favorece la diseminación metastásica de tumores ocultos, y la congestión de las vías respiratorias puede causar ataques asmáticos fatales. El aumento de la merma vascular que ocurre durante la inflamación puede provocar dificultad respiratoria, ascitis, esclerosis peritoneal (en pacientes en diálisis), formación de adherencias (cirugía abdominal) y diseminación metastásica.

El término "angiogénesis" significa un procedimiento fundamental por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos. El período angiogénico primario en humanos tiene lugar durante los primeros tres meses de desarrollo embrionario, pero la angiogénesis también ocurre como un procedimiento fisiológico normal durante los períodos de crecimiento tisular, como un aumento en el músculo o la grasa y durante el ciclo menstrual y el embarazo.

El término "angiogénesis patológica" se refiere a la formación y crecimiento de vasos sanguíneos durante el mantenimiento y la progresión de varios estados de enfermedad. Se encuentran ejemplos particulares de angiogénesis patológica en los vasos sanguíneos (aterosclerosis, hemangioma, hemangioendotelioma), huesos y articulaciones (artritis reumatoide, sinovitis, destrucción de huesos y cartílagos, osteomielitis, crecimiento de pannus, formación de osteofitos, neoplasias y metástasis), piel (verrugas, piógenos) granulomas, crecimiento del cabello, sarcoma de Kaposi, cicatrices queloides, edema alérgico, neoplasias), hígado, riñón, pulmón, oído y otros epitelios (procedimientos inflamatorios e infecciosos que incluyen hepatitis, glomerulonefritis, neumonía; y asma, pólipos nasales, otitis, trastornos de trasplante, trastornos de regeneración hepática, neoplasias y metástasis), útero, ovario y placenta (sangrado uterino disfuncional debido a dispositivos anticonceptivos intrauterinos, formación de quistes foliculares, síndrome de hiperestimulación ovárica, endometriosis, neoplasias), cerebro, nervios y ojos (retinopatía del prematuro, diabético retinopatía, coroides y otros trastornos intraoculares, leucomalacia, neoplasias y metástasis), corazón y músculo esquelético debido a sobrecarga de trabajo, tejido adiposo (obesidad), órganos endocrinos (tiroiditis, agrandamiento de la tiroides, trastornos del trasplante de páncreas), hematopoyesis (síndrome de Kaposi en el SIDA), neoplasias hematológicas (leucemias) y vasos linfáticos (metástasis tumoral, trastornos linfoproliferativos).

La expresión "enfermedades isquémicas de la retina" significa que el suministro de sangre y oxígeno de la retina disminuye, las porciones periféricas de la retina pierden su fuente de nutrición y dejan de funcionar correctamente. Un ejemplo particular de una enfermedad isquémica retiniana es la retinopatía. Las enfermedades comunes que conducen a la retinopatía son la retinopatía diabética, la oclusión de la vena retiniana central, la estenosis de la arteria carótida y la retinopatía de células falciformes. La retinopatía diabética es una causa importante de pérdida visual en pacientes diabéticos. En la retina isquémica, se produce el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización). Estos vasos a menudo crecen en la superficie de la retina, en el nervio óptico o en la parte frontal del ojo en el iris. Los nuevos vasos no pueden reemplazar el flujo de nutrientes necesarios y, en cambio, pueden causar muchos problemas, como hemorragia vítrea, desprendimiento de retina y glaucoma no controlado. Estos problemas ocurren porque los nuevos vasos son

frágiles y son propensos a sangrar. Si se detecta en sus primeras etapas, la retinopatía diabética proliferativa a veces se puede detener con la fotocoagulación panretiniana. Sin embargo, en algunos casos, la cirugía de vitrectomía es la única opción.

- 5 Además de estas retinopatías, las enfermedades vasculares del ojo también incluyen enfermedades de neovascularización ocular, tales como degeneración macular y edema macular diabético (EMD). La degeneración macular resulta del crecimiento neovascular del vaso coroideo debajo de la mácula. Hay dos tipos de degeneración macular: seca y húmeda. Mientras que la degeneración macular húmeda solo comprende el 15% de toda la degeneración macular, casi toda la degeneración macular húmeda conduce a la ceguera.
- 10 Además, la degeneración macular húmeda casi siempre resulta de la degeneración macular seca. Una vez que un ojo se ve afectado por la degeneración macular húmeda, la afección casi siempre afecta al otro ojo. La degeneración macular húmeda a menudo se denomina degeneración macular húmeda relacionada con la edad de AMD húmeda, ya que se encuentra principalmente en personas de edad avanzada.

- 15 La retinopatía diabética (DR) y el DME son las principales causas de ceguera en la población en edad laboral de la mayoría de los países desarrollados. El creciente número de personas con diabetes en todo el mundo sugiere que DR y DME continuarán siendo los principales contribuyentes a la pérdida de visión y el deterioro funcional asociado en los próximos años. Varios mecanismos bioquímicos, incluida la activación de la proteína quinasa C- β , el aumento de la producción del factor de crecimiento endotelial vascular, el estrés oxidativo y la acumulación de sorbitol intracelular y productos finales de glicosilación avanzada, pueden contribuir a las alteraciones vasculares que caracterizan a DR/DME. La inhibición de estas vías promete una intervención para DR y DME.

- 25 El término "hipertensión pulmonar" significa un trastorno en el que la presión sanguínea en las arterias pulmonares es anormalmente alta. En ausencia de otras enfermedades del corazón o los pulmones, se denomina hipertensión pulmonar primaria. El estrechamiento difuso de las arteriolas pulmonares se produce como resultado de una arteriogénesis patológica seguida de hipertensión pulmonar como respuesta al aumento de la resistencia al flujo sanguíneo. La incidencia es de 8 de cada 100,000 personas. Sin embargo, la hipertensión pulmonar también puede ocurrir como una complicación de las Enfermedades Pulmonares Obstructivas Crónicas (EPOC) como el enfisema, la bronquitis crónica o la fibrosis intersticial difusa y en
- 30 pacientes con EPOC asmático. La incidencia de EPOC es de aproximadamente 5 de cada 10000 personas.

Además, las proteínas de unión de la invención pueden usarse para tratar la inflamación y más específicamente los trastornos inflamatorios.

- 35 El término "inflamación" como se usa en la presente memoria significa la reacción local a la lesión de los tejidos vivos, especialmente la reacción local de los vasos sanguíneos pequeños, sus contenidos y sus estructuras asociadas. La etapa de los componentes sanguíneos a través de las paredes de los vasos hacia los tejidos es el sello distintivo de la inflamación, y la colección de tejidos así formada se denomina exudados o edema. Cualquier procedimiento nocivo que dañe el tejido vivo, por ejemplo, la infección con bacterias, el calor excesivo, el frío, las lesiones mecánicas como aplastamiento, ácidos, álcalis, irradiación o infección con virus pueden causar inflamación independientemente del órgano o tejido involucrado. Debe quedar claro que las enfermedades clasificadas como "enfermedades inflamatorias" y reacciones tisulares que van desde quemaduras hasta
- 40 neumonía, lepra, tuberculosis y artritis reumatoide son todas "inflamaciones".

- 45 Las proteínas de unión de acuerdo con la invención pueden usarse para tratar la formación de tumores. El término "tumor" significa una masa de tejido anormal que surge sin causa obvia de las células corporales preexistentes, no tiene una función intencional y se caracteriza por una tendencia al crecimiento autónomo y sin restricciones. Los tumores son bastante diferentes de las inflamaciones inflamatorias u otras porque las células en los tumores son anormales en su apariencia y otras características. Las células anormales, es decir, el tipo de células que generalmente forman tumores, difieren de las células normales en haber sufrido una o más de las siguientes alteraciones:
- 50

- (1) hipertrofia, o un aumento en el tamaño de las células individuales; (2) hiperplasia o un aumento en el número de células dentro de una zona dada; (3) anaplasia, o una regresión de las características físicas de una célula hacia un tipo más primitivo o indiferenciado. Los tumores pueden ser benignos, por ejemplo, lipomas, angiomas, osteomas, condromas y adenomas. Ejemplos de tumores malignos son los carcinomas (como los tumores de mama, los carcinomas en las vías respiratorias y gastrointestinales, las glándulas endocrinas y el sistema genitourinario), los sarcomas (en los tejidos conectivos, incluidos los tejidos fibrosos, los tejidos adiposos (grasos), los músculos, la sangre vasos, huesos y cartílagos), carcinosarcoma (tanto en el tejido epitelial como
- 55 conectivo), leucemias y linfomas, tumores de los tejidos nerviosos (incluido el cerebro) y melanoma (un cáncer de las células pigmentadas de la piel). El uso de las proteínas de unión de la presente invención contra tumores también puede combinarse con cualquier otra terapia tumoral conocida en la técnica, tal como irradiación, terapia fotodinámica, quimioterapia o cirugía.
- 60

- 65 Una composición farmacéutica comprende proteínas de unión como se describió anteriormente y un vehículo,

excipiente o estabilizador farmacéuticamente aceptable (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. [1980]). Los vehículos, excipientes o estabilizadores adecuados conocidos por el experto en la técnica son solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank, aceites fijos, oleato de etilo, dextrosa al 5% en solución salina, sustancias que mejoran la isotonicidad y la estabilidad química, tampones y conservantes. Otros vehículos adecuados incluyen cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos y copolímeros de aminoácidos. Una composición farmacéutica también puede ser una formulación combinada, que comprende un agente activo adicional, tal como un agente anticancerígeno o un agente antiangiogénico (por ejemplo, VEGF-Axxx humano; preferentemente, VEGF-A165b humano).

Una composición farmacéutica preferente para el tratamiento de enfermedades oculares comprende proteínas de unión como se describió anteriormente y un detergente tal como detergente no iónico, que incluye, pero no se limita a polisorbato 20 (por ejemplo, aproximadamente 0,04%), un tampón tal como histidina, fosfato o ácido láctico y un azúcar como sacarosa o trehalosa. Preferentemente, dicha composición comprende proteínas de unión como se describió anteriormente y PBS. Dichas o cualquier otra composición farmacéutica descrita en la presente memoria pueden administrarse localmente, ya sea tópicamente a una porción del ojo o inyectarse en el ojo, por ejemplo, en el espacio subconjuntival, peri- o retro-bulbar o directamente en el ojo. De manera alternativa, dichas u otras composiciones farmacéuticas pueden administrarse sistémicamente por administración parenteral. Preferentemente, dicha u otra composición farmacéutica se aplica al ojo mediante una inyección intravítrea. También preferentemente, dicha composición farmacéutica se aplica al ojo tópicamente y como una gota para los ojos. La gota para los ojos se puede aplicar a la córnea (parte transparente en el centro del ojo) permitiendo así que las moléculas penetren en el ojo. Para el tratamiento de una enfermedad que afecta la parte posterior del ojo, puede ser más deseable que la proteína de unión penetre en la esclerótica cuando se inyecta debajo de la conjuntiva o alrededor del globo ocular. La administración de la proteína de unión puede realizarse después de un paso preliminar de modulación de la superficie del ojo para mejorar la penetración de las moléculas. Preferentemente, la capa epitelial tal como el epitelio corneal está modulada por un potenciador de penetración para permitir una penetración suficiente y rápida de las moléculas como se describió anteriormente, por ejemplo. El uso de las proteínas de unión de la presente invención contra enfermedades oculares también puede combinarse con cualquier otra terapia conocida en la técnica, tal como terapia fotodinámica.

Las formulaciones a utilizar para la administración *in vivo* deben ser asépticas o estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Además, se describe un implante intraocular que puede usarse para proporcionar la proteína de unión de la invención. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen un polipéptido de la invención, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, no degradable etileno-acetato de vinilo, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico como el LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

La composición farmacéutica puede administrarse por cualquier procedimiento adecuado dentro del conocimiento del experto en la técnica. La vía de administración preferente es parenteral. En la administración parenteral, el medicamento de la presente invención se formulará en una forma inyectable de dosificación unitaria, tal como una solución, suspensión o emulsión, en asociación con los excipientes farmacéuticamente aceptables como se definió anteriormente. La dosificación y el modo de administración dependerán del individuo a tratar y la enfermedad particular. Generalmente, la composición farmacéutica se administra de manera que la proteína de unión de la presente invención se administra a una dosis entre 1 µg/kg y 20 mg/kg, más preferentemente entre 10 µg/kg y 5 mg/kg, lo más preferentemente entre 0,1 y 2 mg/kg. Preferentemente, se administra como una dosis en bolo. La infusión continua también se puede usar e incluye la administración subcutánea continua a través de una minibomba osmótica. Si es así, la composición farmacéutica puede infundirse a una dosis entre 5 y 20 µg/kg/minuto, más preferentemente entre 7 y 15 µg/kg/minuto. En particular, la composición farmacéutica se administra mediante inyecciones en el ojo de modo que la proteína de unión de la invención se administra a una dosis entre 0,1 mg y 10 mg por inyección, más preferentemente entre 0,3 y 6 mg por inyección, lo más preferentemente entre 1 mg y 4 mg por inyección. Además, la composición farmacéutica se administra mediante gotas oculares en el ojo de modo que una sola gota de una solución que contiene una concentración de la proteína de unión de la invención entre 10 y 120 mg/ml, más preferentemente entre 20 y 100 mg/ml, la mayoría preferentemente se aplica entre 40 y 80 mg/ml al ojo.

Además, se divulga una proteína de unión que inhibe la actividad de VEGF-Axxx, como se describió anteriormente, que se puede usar en combinación con una proteína de unión o molécula pequeña que inhibe la actividad de PIGF, con los mismos niveles de inhibición de PIGF que se describieron anteriormente. para VEGF-

Axxx. Esta divulgación se basa en el hecho de que se ha encontrado que PIGF es angiogénico en sitios en los que se incrementan los niveles de VEGF-Axxx. Además, una proteína de unión que inhibe la actividad de VEGF-Axxx, como se describió anteriormente, se puede usar en combinación con una proteína de unión o molécula pequeña que inhibe la actividad del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), VEGF-C u otros miembros de la familia de proteínas VEGF, factor de necrosis tumoral alfa (TNFalfa), ligando 4 delta-like (DII4), interleucina 6 (IL-6), neuropilina o angiopoietina 2 (Ang2).

La divulgación proporciona además procedimientos de tratamiento. En una divulgación, se proporciona un procedimiento para tratar una retinopatía, el procedimiento comprende administrar, a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión de la invención, en particular una proteína de unión que inhibe la interacción entre VEGF humano. Axxx y VEGFR-2 humano, pero no la interacción entre VEGF-Axxx humano y VEGFR-2 humano, y la proteína de unión inhibe la angiogénesis mediada por VEGFR-2.

La divulgación se refiere además a procedimientos para usar una proteína de unión como se describe para inhibir una actividad biológica de VEGF-A en una célula o para inhibir una actividad biológica mediada por VEGFR-2. La célula puede estar situada *in vivo* o *ex vivo*, y puede ser, por ejemplo, una célula de un organismo vivo, una célula cultivada o una célula en una muestra de tejido. El procedimiento puede comprender poner en contacto dicha célula con cualquiera de las proteínas de unión inhibitorias de la interacción VEGF-A/VEGFR-2 descritas en la presente memoria, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inhibir dicha actividad biológica.

La divulgación proporciona un procedimiento para tratar a un sujeto que tiene una afección que responde a la inhibición de VEGF-Axxx o VEGFR-2. Tal procedimiento comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una proteína de unión descrita en la presente memoria. Una afección puede ser una que se caracteriza por una angiogénesis inapropiada. Una afección puede ser una afección hiperproliferativa. Los ejemplos de afecciones (o trastornos) adecuadas para el tratamiento incluyen trastornos autoinmunes, trastornos inflamatorios, retinopatías (particularmente retinopatías proliferativas) y cánceres, en particular una de las enfermedades descritas anteriormente. Cualquiera de las proteínas de unión descritas en la presente memoria puede usarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento de dicho trastorno, particularmente un trastorno seleccionado del grupo que consiste en: un trastorno autoinmune, un trastorno inflamatorio, una retinopatía y un cáncer. Las afecciones (o trastornos) preferentes adecuadas para el tratamiento son carcinoma metastásico de células renales de primera línea, glioblastoma multiforme recidivante, cáncer de colon adyuvante, cáncer de mama adyuvante negativo para HER2, cáncer de mama adyuvante positivo para HER2, cáncer de pulmón adyuvante de células no pequeñas, linfoma difuso de células B grandes, cáncer gástrico avanzado de primera línea, cáncer de mama metastásico negativo para HER2 de primera línea, cáncer de mama metastásico positivo para HER2 de primera línea, cáncer de ovario metastásico de primera línea, tumores del estroma gastrointestinal, carcinoide de alto riesgo, cáncer de próstata refractario a hormonas, glioblastoma multiforme recién diagnosticado, cáncer de cabeza y cuello metastásico, cáncer de ovario recidivante sensible al platino, cáncer de mama metastásico de segunda línea, cáncer de pulmón extenso de células pequeñas, cáncer de pulmón no escamoso de células no pequeñas con metástasis del SNC previamente tratadas y mieloma múltiple recidivante, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer colorrectal y cáncer de páncreas, cáncer de ovario avanzado (AOC), pacientes con AOC con ascitis maligna sintomática y linfoma no Hodgkin.

La proteína de unión recombinante de acuerdo con la invención puede obtenerse y/o evolucionarse adicionalmente por varios procedimientos tales como la visualización en la superficie de bacteriófagos (WO 90/02809, WO 07/006665) o células bacterianas (WO 93/10214), visualización ribosómica (WO 98/48008), visualización en plásmidos (WO 93/08278) o mediante el uso de constructos híbridos de proteínas de repetición de ARN covalente (WO 00/32823), o expresión y selección/escrutinio intracelular, tal como por ensayo de complementación de proteínas (WO 98/341120). Dichos procedimientos son conocidos por el experto en la técnica.

Se puede obtener una biblioteca de proteínas de repetición de anquirina usadas para la selección/escrutinio de una proteína de unión recombinante de acuerdo con la invención de acuerdo con protocolos conocidos por el experto en la técnica (WO 02/020565, Binz, HK et al., JMB, 332, 489-503, 2003, y Binz et al., 2004, loc. cit.). El uso de dicha biblioteca para la selección de DARPin específicas para VEGF-Axxx se proporciona en el Ejemplo 1. En analogía, los motivos de secuencia de repetición de anquirina como se presentaron anteriormente pueden usarse para construir bibliotecas de proteínas de repetición de anquirina que pueden usarse para la selección o selección de DARPin específicas para VEGF-Axxx. Además, los dominios de repetición de la presente invención pueden ensamblarse modularmente a partir de módulos de repetición de acuerdo con las invenciones actuales y los módulos de protección apropiados (Forrer, P., et al., FEBS letras 539, 2-6, 2003) usando tecnologías estándar de ADN recombinante (por ejemplo, WO 02/020565, Binz et al., 2003, loc. cit. y Binz et al., 2004, loc. cit.).

Ejemplos

Todos los materiales de partida y reactivos divulgados a continuación son conocidos por los expertos en la técnica, y están disponibles comercialmente o pueden prepararse usando técnicas bien conocidas. Se pueden usar y procesar otras fuentes siguiendo el esquema general que se describe a continuación.

Materiales

Se compraron productos químicos de Fluka (Suiza). Los oligonucleótidos fueron de Microsynth (Suiza). A menos que se indique lo contrario, las ADN polimerasas, las enzimas de restricción y los tampones pertenecían a New England Biolabs (EE. UU.) o Fermentas (Lituania). La cepa de clonación y producción de proteínas fue *E. coli* XL1-blue (Stratagene, EE. UU.). Las variantes de VEGF fueron de R&D Systems (Minneapolis, EE. UU.) o se produjeron en células de ovario de hámster chino o en *Pichia pastoris* y se purificaron según protocolos estándar (Rennel, ES et al., European J. Cancer 44, 1883-94, 2008; Sistema de expresión de *Pichia* de Invitrogen). Las variantes de VEGF biotiniladas se obtuvieron químicamente mediante el acoplamiento del resto de biotina a las aminas primarias de las variantes de VEGF purificadas utilizando reactivos y procedimientos de biotinilación estándar (Pierce, EE. UU.).

Biología Molecular

A menos que se indique lo contrario, los procedimientos se realizan según los protocolos descritos (Sambrook J., Fritsch E. F. y Maniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory 1989, Nueva York).

Diseño bibliotecas de proteínas de repetición de anquirina

Se describen las bibliotecas de proteínas de repetición de anquirina diseñadas por N2C y N3C (WO 02/20565; Binz et al. 2003, loc. cit.; Binz et al. 2004, loc. cit.). El dígito en N2C y N3C describe el número de módulos de repetición aleatorizados presentes entre los módulos de límite N-terminal y C-terminal. La nomenclatura utilizada para definir las posiciones dentro de las unidades y módulos de repetición se basa en Binz et al. 2004, loc. cit. con la modificación de que los bordes de los módulos de repetición y las unidades de repetición se desplazan por una posición de aminoácido. Por ejemplo, la posición 1 de un módulo de repetición de Binz et al. 2004 (loc. cit.) corresponde a la posición 2 de un módulo de repetición de la divulgación actual y, por consiguiente, la posición 33 de un módulo de repetición de Binz et al. 2004, loc. cit. corresponde a la posición 1 de un siguiente módulo de repetición de la divulgación actual.

Todas las secuencias de ADN se confirmaron por secuenciación, y el peso molecular calculado de todas las proteínas descritas se confirmó por espectrometría de masas.

Ejemplo 1: Selección de proteínas de unión que comprenden un dominio de repetición con especificidad de unión para VEGF-Axxx

Usando la presentación de ribosomas (Hanes, J. y Pluckthun, A., PNAS 94, 4937-42, 1997), muchas proteínas de repetición de anquirina (DARPin) diseñadas con especificidad de unión para VEGF-Axxx se seleccionaron de las bibliotecas DARPin N2C o N3C descritas por Binz et al. 2004 (loc. cit.). La unión de los clones seleccionados a dianas específicas (VEGF-Axxx) y no específicas (MBP, proteína de unión a maltosa de *E. coli*) se evaluó mediante un ELISA de extracto bruto que indica que las proteínas de unión a VEGF-Axxx se seleccionaron con éxito (Figura 1). Los dominios de repetición de la SEQ ID NO: 1 a 7 constituyen secuencias de aminoácidos de proteínas de unión seleccionadas que comprenden un dominio de repetición con especificidad de unión para VEGF-Axxx. El análisis de secuencia de aglutinantes seleccionados reveló motivos específicos de secuencia de repetición de anquirina inherentes a ciertas familias de aglutinantes seleccionados.

Selección de proteínas de repetición de anquirina específicas de VEGF-Axxx por visualización de ribosomas

La selección de proteínas de repetición de anquirina específicas para VEGF-Axxx se realizó mediante visualización de ribosomas (Hanes y Pluckthun, loc. cit.) usando VEGF-A164 de perro o VEGF-A165 humano como proteínas diana, la biblioteca de proteínas de repetición de anquirina diseñadas como descrito (WO 02/020565, Binz et al., 2003, loc. cit. y Binz et al., 2004, loc. cit) y protocolos establecidos (Zahnd, C., Amstutz, por ejemplo, y Pluckthun, A., Nat Methods 4, 69-79, 2007). Las rondas de selección de presentación de ribosomas se realizaron en variantes de VEGF de perro o humano (incluidas variantes biotiniladas inmovilizadas sobre neutravidina o estreptavidina) con las bibliotecas DARPin N2C y N3C utilizando protocolos establecidos (Binz et al. 2004, loc. cit.). El número de ciclos de transcripción inversa (RT)-PCR después de cada ronda de selección se redujo constantemente de 40 a 30, ajustándose al rendimiento debido al enriquecimiento de los aglutinantes. Cuatro rondas de selección inicial en VEGF de perro produjeron grupos de DARPin de afinidad nanomolar, como lo revelaron las mediciones ELISA y SPR de clones individuales. Para encontrar DARPin con

afinidades aún más mejoradas, se realizaron selecciones adicionales fuera de la frecuencia en VEGF biotinilado humano o de perro inmovilizado sobre neutravidina o estreptavidina, tomando agrupaciones después de la segunda y tercera rondas iniciales de selección de presentación de ribosomas, seguido de una ronda de selección de frecuencia VEGF humano.

Los clones seleccionados se unen específicamente a VEGF-Axxx como se muestra por el ELISA de extracto bruto

Las DARPin individuales seleccionadas que se unían específicamente a VEGF-Axxx se identificaron mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando extractos brutos de *Escherichia coli* de células de expresión de DARPin usando protocolos estándar. Los clones seleccionados se clonaron en el vector de expresión pQE30 (Qiagen), se transformaron en *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) y luego se cultivaron durante la noche a 37 °C en una placa de 96 pocillos (cada clon en un solo pocillo) que contiene 1 ml de medio de crecimiento (2YT que contiene 1% de glucosa y 100 µg/ml de ampicilina). Se inoculó 1 ml de 2YT reciente que contenía 50 µg/ml de ampicilina con 100 µl del cultivo nocturno en una placa nueva de 96 pocillos de profundidad. Después de la incubación durante 2 h a 37 °C, se indujo la expresión con IPTG (concentración final 1 mM) y continuó durante 3 h. Las células se cosecharon, se resuspendieron en 100 µl de B-PERII (Pierce) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación. Luego, se añadieron 900 µl de PBS-TB (PBS suplementado con 0,2% de BSA, 0,1% de Tween 20, pH de 7,4) y los restos celulares se eliminaron por centrifugación. Se aplicaron 100 µl de cada clon lisado a un pocillo de una placa MaxiSorp recubierta con NeutrAvidina que contenía una variante VEGF-Axxx o la MBP no relacionada inmovilizada a través de su resto de biotina y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Después de un lavado exhaustivo con PBS-T (PBS suplementado con Tween 20 al 0,1%, pH de 7,4), la placa se desarrolló utilizando procedimientos ELISA estándar utilizando el anticuerpo monoclonal anti-RGS(His)₄ (34650, Qiagen) como anticuerpo primario y una cabra policlonal anticuerpo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (A3562, Sigma) como reactivo secundario. Luego se detectó la unión utilizando 4-nitrofenil fosfato disódico (4NPP, Fluka) como sustrato para la fosfatasa alcalina. El desarrollo del color se midió a 405 nm. Los resultados de un ejemplo de ELISA de extracto bruto utilizado para identificar la unión de DARPin a VEGF-Axxx se muestran en la Figura 1. El escrutinio de varios cientos de clones mediante dicho ELISA de extracto bruto de células reveló más de cien DARPin diferentes con especificidad para VEGF-Axxx. Estas proteínas de unión fueron elegidas para su posterior análisis. Los ejemplos de secuencias de aminoácidos de dominios de repetición de anquirina seleccionados que se unen específicamente a VEGF-Axxx se proporcionan en la SEQ ID NO: 1 a 7.

Deducción de motivos de secuencia de repetición a partir de dominios de repetición seleccionados con especificidad de unión para VEGF-Axxx

Las secuencias de aminoácidos de dominios de repetición seleccionados con especificidad de unión para VEGF-Axxx se analizaron adicionalmente mediante herramientas de análisis de secuencia conocidas por el profesional en la materia (WO 02/020565; Forrer et al., 2003, loc. cit.; Forrer, P., Binz, HK, Stumpp, MT y Pluckthun, A., ChemBioChem, 5(2), 183-189, 2004). Sin embargo, en contraste con el documento WO 02/020565, en el que se usaron motivos de repetición de origen natural para deducir motivos de secuencia de repetición; en este caso, los motivos de secuencia de repetición se dedujeron de las unidades de repetición de dominios de repetición seleccionados con especificidad de unión para VEGF-Axxx. De este modo, se determinaron familias de dominios de repetición seleccionados que comprenden un motivo de secuencia de repetición común.

Alto nivel y expresión soluble de DARPin

Para un análisis adicional, los clones seleccionados que muestran la unión específica de VEGF-Axxx en el ELISA de extracto bruto de células como se describió anteriormente se expresaron en células *E. coli* XL1-blue y se purificaron usando su etiqueta His usando protocolos estándar. Se usaron 25 ml de cultivos estacionarios durante la noche (LB, glucosa al 1%, 100 mg/l de ampicilina; 37 °C) para inocular cultivos de 1 l (mismo medio). En A(600) = 0,7, los cultivos se indujeron con IPTG 0,5 mM y se incubaron a 37 °C durante 4 h. Los cultivos se centrifugaron y los sedimentos resultantes se resuspendieron en 40 ml de TBS500 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, pH de 8) y se sonicaron. El lisado se volvió a centrifugar, y se añadieron al sobrenadante resultante glicerol (concentración final al 10% (v/v)) e imidazol (concentración final 20 mM). Las proteínas se purificaron sobre una columna de ácido nitrilotriacético (volumen de columna de 2,5 ml) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (QIAgen, Alemania). Se pueden purificar hasta 200 mg de DARPin altamente solubles con especificidad de unión a VEGF-Axxx a partir de un litro de cultivo de *E. coli* con una pureza > 95% según la estimación de SDS-15% PAGE. Tales DARPin purificadas se usan para caracterizaciones adicionales.

Ejemplo 2: Determinación de los valores de IC₅₀ de DARPin seleccionadas con especificidad de unión a VEGF-Axxx en un ensayo de crecimiento de esferoides

La adición de VEGF-Axxx a los esferoides HUVEC incrustados en matrices de colágeno conduce a la germinación esferoide. La adición de un inhibidor de VEGF-Axxx bloqueará la formación de brotes, que puede

cuantificarse estadísticamente por el número y la longitud de los brotes. Al agregar diferentes concentraciones de inhibidor y una cantidad constante de VEGF, se puede determinar la IC₅₀.

Inhibición del brote de esferoides por DARPin específicas de VEGF-Axxx

Los ensayos de crecimiento de esferoides se realizaron de acuerdo con protocolos estándar (Korff et al., loc. cit.). Las DARPins con especificidad para VEGF-Axxx se seleccionaron y purificaron a > 96% de pureza como se describe en el Ejemplo 1. Las células de la vena umbilical humana se cultivaron hasta confluencia en un cultivo en monocapa. Después de la tripsinización, la suspensión celular se colocó en una gota colgante para formar esferoides, es decir, aproximadamente 500 HUVEC agregados organizados. Los esferoides se incrustaron en una matriz de colágeno y se estimularon con VEGF-A165 para iniciar el crecimiento de brotes. Los inhibidores de la germinación se agregaron adicionalmente para observar sus efectos sobre la inhibición de la germinación. Los números de brotes por esferoide y longitudes de brotes se cuantificaron usando un software gráfico.

Los resultados de dos ensayos de germinación de esferoides de ejemplo se muestran en la Figura 2a (DARPin # 30 con especificidad de unión para VEGF-Axxx) y la Figura 2b (DARPin NC, una DARPin de control negativo sin especificidad de unión para VEGF-Axxx; por ejemplo, DARPin E3_5 (Binz et al., 2005, loc. cit.)). Las DARPins de mejor rendimiento en este ensayo mostraron valores de IC₅₀ en el intervalo de 10 a 50 pM, mientras que Avastin®, Lucentis® y Macugen® mostraron valores de IC₅₀ en experimentos paralelos en el intervalo de 150 y 500 pM.

Ejemplo 3: Determinación de la especificidad diana de DARPin # 27 en comparación con Avastin® por análisis de Resonancia de Plasmón Superficial

El VEGF-A164 de perro o el VEGF-A164b de perro se inmovilizaron en una celda de flujo y se analizó la interacción de DARPin # 27 (el dominio de repetición de la SEQ ID NO: 1, correspondiente a los aminoácidos 1 a 159) y Avastin® con las dianas inmovilizadas.

Análisis de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)

El SPR se midió usando un instrumento ProteOn (BioRad). El tampón de ejecución era HEPES 20 mM, pH de 7,4, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,005%. Se inmovilizaron aproximadamente 1200 RU de VEGF-A164 de perro o de VEGF-A164b de perro en un chip GLC (BioRad). Las interacciones se midieron a un flujo de 60 µl/min con 5 min de flujo de tampón, 100 segundos de inyección de Avastin® o DARPin # 27 a una concentración de 250 nM y una medición fuera de velocidad de unos minutos con flujo de tampón. La señal de una celda de referencia no revestida se resta de las mediciones.

Los resultados se muestran en la Figura 3a (interacción de Avastin con el VEGF-A164 de perro), Figura 3b (interacción de Avastin con el VEGF-A164b de perro), Figura 3c (interacción de DARPin # 27 con el VEGF-A164 de perro) y Figura 3d (interacción de DARPin # 27 con el VEGF-A164b de perro). Mientras que Avastin interactúa claramente con ambas isoformas de VEGF inmovilizadas, la DARPin # 27 muestra solo interacción con VEGF-A164 y no con VEGF-A164b.

Ejemplo 4: eficacia *in vivo* de DARPin # 30 en la inhibición de VEGF-A165 en un modelo de conejo con merma vascular.

DARPin PEGilada # 30 (el dominio de repetición de la SEQ ID NO: 4 correspondiente a los aminoácidos 1 a 126) o Lucentis® se aplica mediante inyección intravítrea en un ojo de conejo para probar su eficacia para inhibir la merma vascular inducida por una inyección intravítrea posterior de VEGF-A165 humano.

Mediciones de inhibición de merma vascular en conejos

En el día 1 se aplica PBS, DARPin PEGilada # 30 (125 µg) o la cantidad equimolar de Lucentis® (162 µg) mediante una inyección intravítrea en un ojo de cada conejo (ojo tratado). El día 4 o el día 30, el ojo tratado de cada conejo se expuso mediante inyección intravítrea de 500 ng de VEGF-A165 humano. Ambos ojos de todos los animales fueron evaluados 48 horas después de la inyección de VEGF-A165 midiendo el contenido de fluoresceína en todos los ojos 1 h después de la inyección intravenosa de fluoresceína de sodio (50 mg/kg de peso corporal del animal, 10% (p/v) en 0,9% (p/v) de solución salina). Las proporciones de las cantidades de fluorescencia en los ojos tratados y no tratados se calcularon para cada animal. Una proporción de uno corresponde a la ausencia de merma de fluorescencia adicional en el ojo tratado, una proporción mayor que uno indica más merma de fluorescencia en el ojo tratado que en el ojo de control no tratado.

Preparación de DARPin PEGilada

La PEGilación de proteínas mediante el uso de un solo residuo de Cys y química de maleimida es bien conocida por el experto en la técnica y puede realizarse de acuerdo con protocolos establecidos (por ejemplo, de Pierce).

La DARPin # 30 que comprende un ligador adicional C-terminal (GGGSGGGSC, SEQ ID NO: 8) se purificó hasta casi la homogeneidad usando procedimientos cromatográficos estándar. La proteína se reduce completamente usando DTT y se purifica por filtración en gel para eliminar la DTT e intercambiar el tampón por PBS. La PEG-maleimida (metoxi-poli(etilenglicol)-oxopropilamino-propil maleimida; NOF, n.º Sunbright ME-200MA) disuelta en PBS se mezcla con la DARPin en PBS a aproximadamente un 15% de exceso molar de PEG-maleimida durante 2-4 horas a temperatura ambiente. La DARPin PEGilada se separa luego de los restos DARPin no reactivos y de los restos PEG no reactivos mediante el uso de cromatografía de intercambio aniónico estándar.

Los resultados se muestran en la Figura 4. Tanto la DARPin PEGilada # 30 como Lucentis® pudieron proteger el ojo de conejo de la merma vascular inducida por VEGF-A165 4 días después de que se aplicaron mediante inyecciones intravítreas. Sin embargo, solo la DARPin # 30 PEGilada, y no Lucentis®, fue capaz de proteger el ojo de conejo de la merma vascular inducida por VEGF-A165 hasta 30 días después de la inyección intravítrea.

En otros experimentos, se midieron las semividas terminales intravítreas de las diferentes proteínas de unión de la invención después de inyecciones intravítreas en ojos de conejo. DARPin # 30 que comprende un ligador C-terminal adicional (GGGSGGGSC, SEQ ID NO: 8) se conjugó con un resto de PEG no proteico de 20 kDa y 40 kDa usando los respectivos PEG de maleimida de NOF (véase el Ejemplo 5). Las vidas medias terminales se determinaron en 3,5 días (+/- 0,3 días), 6,1 días (+/- 1,0 días) y 5,4 días (+/- 0,8 días) para la DARPin # 30, la DARPin # 30 conjugado con el resto PEG de 20 kDa y la DARPin # 30 conjugado con el resto PEG de 40 kDa. Sorprendentemente, el aumento del peso molecular del resto PEG no proteínico de 20 kDa a 40 kDa no dio como resultado un aumento de la vida media terminal. La misma tendencia se observó en los experimentos correspondientes en los que se utilizaron proteínas de unión que comprenden el dominio de repetición de la SEQ ID NO: 1 (aminoácidos 1 a 159) o SEQ ID NO: 3 (aminoácidos 1 a 126) en lugar del dominio de repetición de la SEQ ID NO: 4.

Ejemplo 5: proteínas de unión recombinantes

Ejemplos de proteínas de unión recombinante que comprenden un VEGF-Axxx de unión a dominio de repetición y un resto polimérico proteico son las SEQ ID NO: 1 y 4. El dominio de repetición de la SEQ ID NO: 1 corresponde a los aminoácidos 1 a 159 y el resto polimérico proteico de la SEQ ID NO: 1 corresponde a los aminoácidos 160 a 1024. El dominio de repetición de la SEQ ID NO: 4 corresponde a los aminoácidos 1 a 126 y el resto polimérico proteico de la SEQ ID NO: 4 corresponde a los aminoácidos 127 a 536.

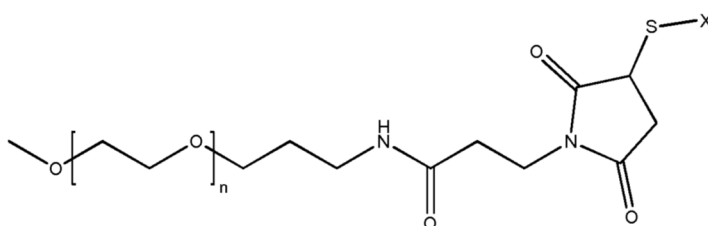
Las proteínas de unión de la SEQ ID NO: 1 y 4 se expresaron en el citoplasma de *Escherichia coli* usando técnicas estándar conocidas por el experto en la técnica (véase, por ejemplo, el sistema de expresión pQE de Qiagen (Alemania)). El residuo Met codificado adicionalmente por el vector de expresión se escindió eficientemente en el citoplasma de *E. coli* del polipéptido expresado ya que el Met inicial es seguido por un pequeño residuo Gly (es decir, el aminoácido en la posición 1 de la SEQ ID NO: 1 y 4). Las células se lisaron (por ejemplo, utilizando una prensa francesa) y las proteínas de unión se purificaron hasta casi la homogeneidad del extracto bruto de células utilizando técnicas cromatográficas estándar conocidas por el experto en la técnica.

Se produjeron ejemplos de proteínas de unión recombinante que comprenden un VEGF-Axxx de unión a dominio de repetición y un resto polimérico no proteico utilizando las proteínas de repetición de la SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 y 7. Estas proteínas de repetición comprenden un dominio de repetición N-terminal, seguido de un ligador polipeptídico y un Cys C-terminal. Los dominios de repetición respectivos corresponden a los aminoácidos 1 a 159 para la SEQ ID NO: 2 y 7, y a los aminoácidos 1 a 126 para la SEQ ID NO: 3 a 6. Las proteínas de repetición de la SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 y 7 se expresaron en el citoplasma de *Escherichia coli* utilizando técnicas estándar conocidas por el experto en la técnica (véase, por ejemplo, The Expressionist de Qiagen (Alemania)). El residuo Met codificado adicionalmente por el vector de expresión se escindió eficientemente en el citoplasma de *E. coli* del polipéptido expresado ya que el Met inicial es seguido por un pequeño residuo Gly (es decir, el aminoácido en la posición 1 de la SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 y 7). Las células se lisaron (por ejemplo, utilizando una prensa francesa) y las proteínas de unión se purificaron hasta casi la homogeneidad del extracto bruto de células mediante el uso de técnicas cromatográficas estándar conocidas por el experto en la técnica.

Las proteínas de repetición purificadas que comprenden un único residuo de Cys se conjugaron luego a un resto polimérico no proteico usando química maleimida estándar como se describe en el Ejemplo 4. Por lo tanto, se produjo una proteína de unión de la divulgación o la invención que comprende la proteína de repetición de la SEQ ID NO: 2 y un resto de PEG no proteico de 40 kDa (por ejemplo, un maleimida-PEG de 40 kDa (α -[3-(3-maleimido-1-oxopropil)amino]propil- ω -metoxi-polioxietileno) de NOF, n.º de producto Sunbright ME-400MA), la proteína de repetición de la SEQ ID NO: 3 y un resto de PEG no proteínico de 20 kDa (por ejemplo, 20 kDa maleimida-PEG (α -[3-(3-maleimido-1-oxopropil)amino]propil- ω -metoxi-polioxietileno) de NOF, n.º de producto Sunbright ME-200MA), la proteína de repetición de la SEQ ID NO: 5 y un resto de PEG no proteínico de 12 kDa (por ejemplo, un PEG de maleimida (α -[3-(3-maleimido-1-oxopropil)amino]propil- ω -metoxi-polioxietileno de 12 kDa) de NOF, n.º de producto Sunbright ME-120MA), la proteína de repetición de la SEQ ID NO: 6 y un resto de PEG no proteínico de 5 kDa (por ejemplo, un PEG de maleimida (α -[3-(3-maleimido-1-oxopropil)amino]propil- ω -metoxi-polioxietileno de 5 kDa) de NOF, n.º de producto Sunbright ME-050MA) y la proteína de repetición de la

SEQ ID NO: 7 y un resto de PEG no proteináceo de 2 kDa (por ejemplo, un PEG de maleimida (α -[3-(3-maleimido-1-oxopropil)amino]propil- ω -metoxi-polioxietileno de 2 kDa) a partir de NOF, n.º de producto Sunbright ME-020MA). Las proteínas de repetición PEGiladas se separaron luego adicionalmente de las proteínas de repetición no PEGiladas y el exceso de PEG mediante técnicas cromatográficas estándar conocidas por el experto en la técnica.

Por lo tanto, las SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 y 7 se conjugaron en el tiol de su cisteína C-terminal a un PEG de maleimida (α -[3-(3-maleimido-1-oxopropil)amino]propil- ω -metoxi-polioxietileno). De este modo se produjo la siguiente estructura:



en la que X es la SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 o 7; y n es un entero positivo.

Listado de secuencias

<110> Molecular Partners AG

Binz, Hans Kaspar

Forrer, Patrik

Stumpp, Michael Tobias

<120> Proteínas de unión modificadas que inhiben la interacción del receptor VEGF-A

<130> P384A

<150> EP10161685.2

<151> 2010-04-30

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1025

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína de repetición de anquirina

<400> 1

ES 2 745 491 T3

	Gly	Ser	Asp	Leu	Gly	Lys	Lys	Leu	Leu	Glu	Ala	Ala	Arg	Ala	Gly	Gln	
	1				5					10					15		
5	Asp	Asp	Glu	Val	Arg	Ile	Leu	Met	Ala	Asn	Gly	Ala	Asp	Val	Asn	Ala	
				20					25					30			
10	Phe	Asp	Trp	Met	Gly	Trp	Thr	Pro	Leu	His	Leu	Ala	Ala	His	Glu	Gly	
			35					40					45				
15	His	Leu	Glu	Ile	Val	Glu	Val	Leu	Leu	Lys	Asn	Gly	Ala	Asp	Val	Asn	
		50					55					60					
20	Ala	Thr	Asp	Val	Ser	Gly	Tyr	Thr	Pro	Leu	His	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp	
	65					70					75					80	
25	Gly	His	Leu	Glu	Ile	Val	Glu	Val	Leu	Leu	Lys	Tyr	Gly	Ala	Asp	Val	
					85					90					95		
30	Asn	Thr	Lys	Asp	Asn	Thr	Gly	Trp	Thr	Pro	Leu	His	Leu	Ser	Ala	Asp	
				100					105					110			
35	Leu	Gly	Arg	Leu	Glu	Ile	Val	Glu	Val	Leu	Leu	Lys	Tyr	Gly	Ala	Asp	
			115					120					125				
40	Val	Asn	Ala	Gln	Asp	Lys	Phe	Gly	Lys	Thr	Ala	Phe	Asp	Ile	Ser	Ile	
		130					135					140					
45																	
50																	
55																	
60																	
65																	

ES 2 745 491 T3

	Asp	Asn	Gly	Asn	Glu	Asp	Leu	Ala	Glu	Ile	Leu	Gln	Lys	Ala	Ala	Ser	145	150	155	160
5	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Thr	Glu	Glu	Gly	Thr	Ser	Glu	165	170	175	
10	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	180	185	190	
15	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Thr	Glu	Glu	195	200	205	
20	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	210	215	220	
25	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	225	230	235	240
30	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro	245	250	255	
35	Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro	Gly	Ser	Pro	Ala	260	265	270	
40	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Thr	Glu	Glu	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	275	280	285	
45	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	290	295	300	
50	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Pro	Ala	305	310	315	320
55	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Thr	Glu	Glu	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	325	330	335	
60	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	340	345	350	
65	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	355	360	365	
	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	370	375	380	
	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro	385	390	395	400
	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr				

ES 2 745 491 T3

	405							410							415						
5	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro					
				420					425					430							
10	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro					
			435					440					445								
15	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Thr	Glu	Glu	Gly	Thr	Ser	Glu					
		450					455					460									
20	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly					
	465					470					475					480					
25	Ser	Glu	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro					
					485					490					495						
30	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr					
				500					505					510							
35	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu					
			515					520					525								
40	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro					
		530					535					540									
45	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr					
	545					550					555					560					
50	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr					
				565						570					575						
55	Ser	Thr	Glu	Glu	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro					
			580						585					590							
60	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Pro					
			595					600					605								
65	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro					
	610						615					620									
70	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro					
	625					630					635					640					
75	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr					
				645						650					655						
80	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro					
			660						665					670							

ES 2 745 491 T3

	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Thr	Glu	Glu
			675					680					685			
5	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Thr	Glu	Glu	Gly	Ser	Pro	Ala
			690				695				700					
10	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Thr	Glu	Glu	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro
	705					710					715					720
15	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro
					725					730					735	
20	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Pro
				740					745					750		
25	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro
			755					760					765			
30	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro
		770					775					780				
35	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr
	785					790					795					800
40	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr
					805					810					815	
45	Ser	Thr	Glu	Glu	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro
				820					825					830		
50	Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu
			835					840					845			
55	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr
		850					855					860				
60	Ser	Thr	Glu	Glu	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Thr	Glu	Glu
	865					870					875					880
65	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu
					885					890					895	
70	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro
				900					905					910		
75	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro
			915					920						925		

ES 2 745 491 T3

	Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro	
	930 935 940	
5	Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr	
	945 950 955 960	
10	Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro	
	965 970 975	
15	Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro	
	980 985 990	
20	Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro	
	995 1000 1005	
25	Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala	
	1010 1015 1020	
30	Pro Gly	
	1025	
	<210> 2	
	<211> 168	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Proteína de repetición de anquirina	
35	<400> 2	
40	Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln	
	1 5 10 15	
45	Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala	
	20 25 30	
50	Phe Asp Trp Met Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala His Glu Gly	
	35 40 45	
55	His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn	
	50 55 60	
60	Ala Thr Asp Val Ser Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Asp	
	65 70 75 80	
65	Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val	
	85 90 95	
	Asn Thr Lys Asp Asn Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ser Ala Asp	
	100 105 110	

ES 2 745 491 T3

	Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp	
	115 120 125	
5	Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile	
	130 135 140	
10	Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Gly	
	145 150 155 160	
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Cys	
	165	
15	<210> 3	
	<211> 135	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Proteína de repetición de anquirina	
	<400> 3	
25	Gly Ser Asp Leu Asp Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln	
	1 5 10 15	
30	Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala	
	20 25 30	
35	Arg Asp Ser Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Pro Trp Gly	
	35 40 45	
40	His Pro Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn	
	50 55 60	
	Ala Ala Asp Phe Gln Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Val	
	65 70 75 80	
45	Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val	
	85 90 95	
50	Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp	
	100 105 110	
55	Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Gly Gly	
	115 120 125	
	Gly Ser Gly Gly Gly Ser Cys	
	130 135	
60	<210> 4	
	<211> 540	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
65		

ES 2 745 491 T3

<220>

<223> Proteína de repetición de anquirina

<400> 4

```

5      Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
      1          5          10          15

10     Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Thr
      20          25          30

15     Ala Asp Ser Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Val Pro Trp Gly
      35          40          45

20     His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn
      50          55          60

25     Ala Lys Asp Phe Gln Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Ile
      65          70          75          80

30     Gly His Gln Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val
      85          90          95

35     Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp
      100         105         110

40     Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser
      115         120         125

45     Gly Ser Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro
      130         135         140

50     Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser
      145         150         155         160

55     Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro
      165         170         175

60     Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser
      180         185         190

65     Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro
      195         200         205

70     Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro
      210         215         220

```

ES 2 745 491 T3

	Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser	225	230	235	240
5	Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro	245	250	255	
10	Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser	260	265	270	
15	Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala	275	280	285	
20	Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro	290	295	300	
25	Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser	305	310	315	320
30	Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro	325	330	335	
35	Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser	340	345	350	
40	Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala	355	360	365	
45	Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro	370	375	380	
50	Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser	385	390	395	400
55	Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala	405	410	415	
60	Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser	420	425	430	
65	Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala	435	440	445	
	Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro	450	455	460	
	Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser	465	470	475	480
	Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro				

ES 2 745 491 T3

	485	490	495
5	Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser 500 505 510		
10	Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala 515 520 525		
15	Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser 530 535 540		
20	<210> 5 <211> 135 <212> PRT <213> Artificial		
25	<220> <223> Proteína de repetición de anquirina		
30	<400> 5		
35	Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Val Gly Gln 1 5 10 15		
40	Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asp Gly Ala Asp Val Asn Ala 20 25 30		
45	Ser Asp Phe Lys Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ser Gln Gly 35 40 45		
50	His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn 50 55 60		
55	Ala Tyr Asp Met Leu Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asp Leu 65 70 75 80		
60	Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val 85 90 95		
65	Asn Ala Gln Asp Arg Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp 100 105 110		
	Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Gly Ser 115 120 125		
	Pro Ser Thr Ala Asp Gly Cys 130 135		
65	<210> 6 <211> 130 <212> PRT <213> Artificial		
	<220>		

ES 2 745 491 T3

<223> Proteína de repetición de anquirina

<400> 6

```

5      Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Val Arg Ala Gly Gln
      1          5          10          15

10     Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Thr Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
          20          25          30

15     Lys Asp Gln Phe Gly Phe Thr Pro Leu Gln Leu Ala Ala Tyr Asn Gly
          35          40          45

20     His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn
          50          55          60

25     Ala Phe Asp Ile Phe Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asp Leu
          65          70          75          80

30     Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val
          85          90          95

35     Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Arg Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp
          100          105          110

35     Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Ser Gly
          115          120          125

      Ser Cys
          130

```

40 <210> 7
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Proteína de repetición de anquirina

<400> 7

```

50     Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
      1          5          10          15

55     Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
          20          25          30

60     Val Asp Tyr Ile Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Tyr Gly
          35          40          45

      His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Ser Ala Asp Val Asn

```

65

ES 2 745 491 T3

	50	55	60
5	Ala Glu Asp Phe Ala Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ser Asn 65 70 75 80		
10	Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val 85 90 95		
15	Asn Thr Lys Asp Asn Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ser Ala Asp 100 105 110		
20	Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp 115 120 125		
25	Val Asn Thr Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile 130 135 140		
30	Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Gly 145 150 155 160		
35	Ser Pro Ser Thr Ala Asp Gly Cys 165		
40	<210> 8 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial		
45	<220> <223> Ligador polipeptídico		
50	<400> 8		
55	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Cys 1 5		
60	<210> 9 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial		
65	<220> <223> Ligador polipeptídico		
	<400> 9		
	Gly Ser Pro Ser Thr Ala Asp Gly Cys 1 5		

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión recombinante que comprende un dominio de repetición de anquirina y un resto de polietilenglicol de al menos 5 kDa de peso molecular, en la que dicho dominio de repetición de anquirina se une a VEGF-A165 con una K_d inferior a 10^{-9} M e inhibe la unión de VEGF-A165 a VEGFR-2, y en la que dicho dominio de repetición de anquirina corresponde a los aminoácidos 1 a 126 de la SEQ ID NO: 3.
2. La proteína de unión según la reivindicación 1, en la que dicho dominio de repetición de anquirina se conjuga en su extremo C a través de un enlace peptídico con un ligador polipeptídico y un residuo Cys C-terminal, en la que el tiol de dicho Cys C-terminal se conjuga adicionalmente con dicho resto de polietilenglicol, en la que dicho resto de polietilenglicol es un polietilenglicol acoplado a maleimida, y en la que dicho ligador polipeptídico tiene una longitud entre 2 y 24 aminoácidos.
3. La proteína de unión según la reivindicación 2, en la que dicho polietilenglicol acoplado a maleimida es α -[3-(3-maleimido-1-oxopropil)amino]propil- ω -metoxi-polióxietileno.
4. La proteína de unión según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 en la que el tiol del Cys C-terminal de dicha SEQ ID NO: 3 se conjuga con dicho resto de polietilenglicol, y en la que dicho resto de polietilenglicol es un polietilenglicol acoplado a maleimida.
5. La proteína de unión según la reivindicación 4, en la que dicho polietilenglicol acoplado a maleimida es α -[3-(3-maleimido-1-oxopropil)amino]propil- ω -metoxi-polióxietileno, y en la que el resto de polietilenglicol tiene un peso molecular de al menos 10 kDa.
6. La proteína de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho resto de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.
7. La proteína de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el resto de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 40 kDa.
8. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y opcionalmente un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.
9. Una composición farmacéutica según la reivindicación 8 para uso en el tratamiento de una enfermedad ocular.
10. Una composición farmacéutica según la reivindicación 8 para uso en el tratamiento de una enfermedad ocular por inyección intravítrea.
11. Una composición farmacéutica según la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento de angiogénesis patológica.
12. Una composición farmacéutica según la reivindicación 8 para uso en el tratamiento de una enfermedad de neovascularización ocular.
13. Una composición farmacéutica según la reivindicación 8 para uso en el tratamiento de una enfermedad isquémica de la retina.
14. Una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 9, en la que la enfermedad ocular es degeneración macular húmeda.
15. Una composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 9, en la que la enfermedad ocular es edema macular diabético.

Fig. 1

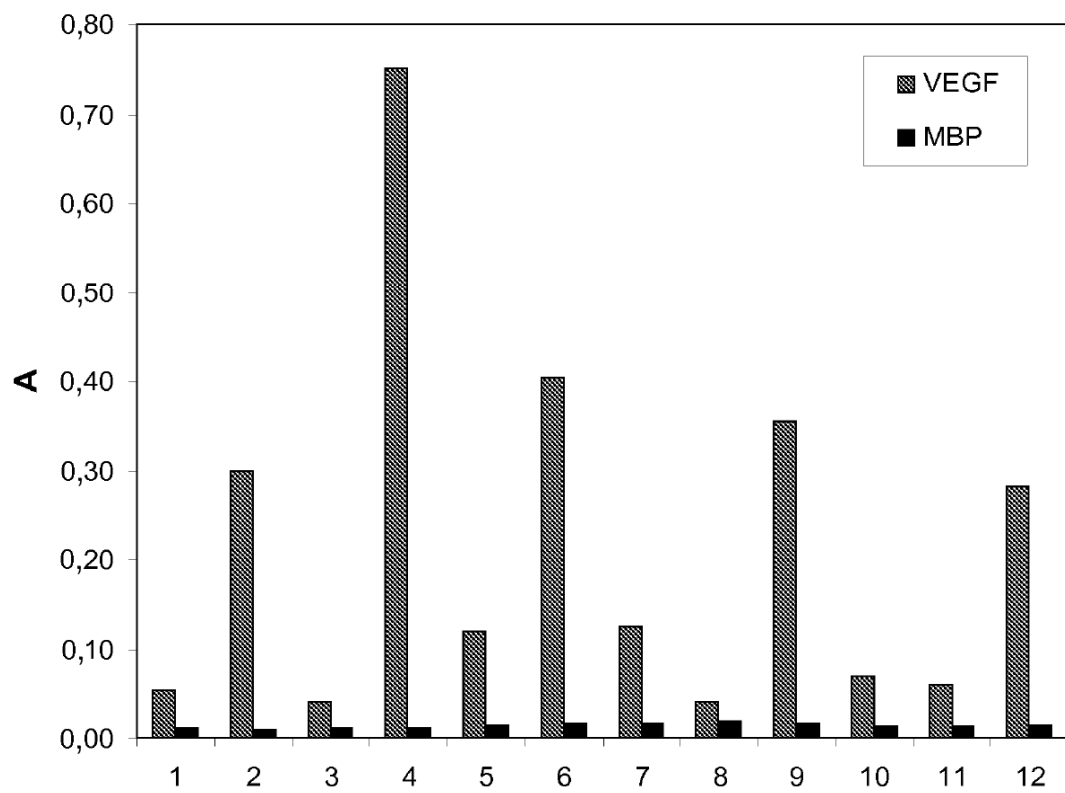


Fig. 2a

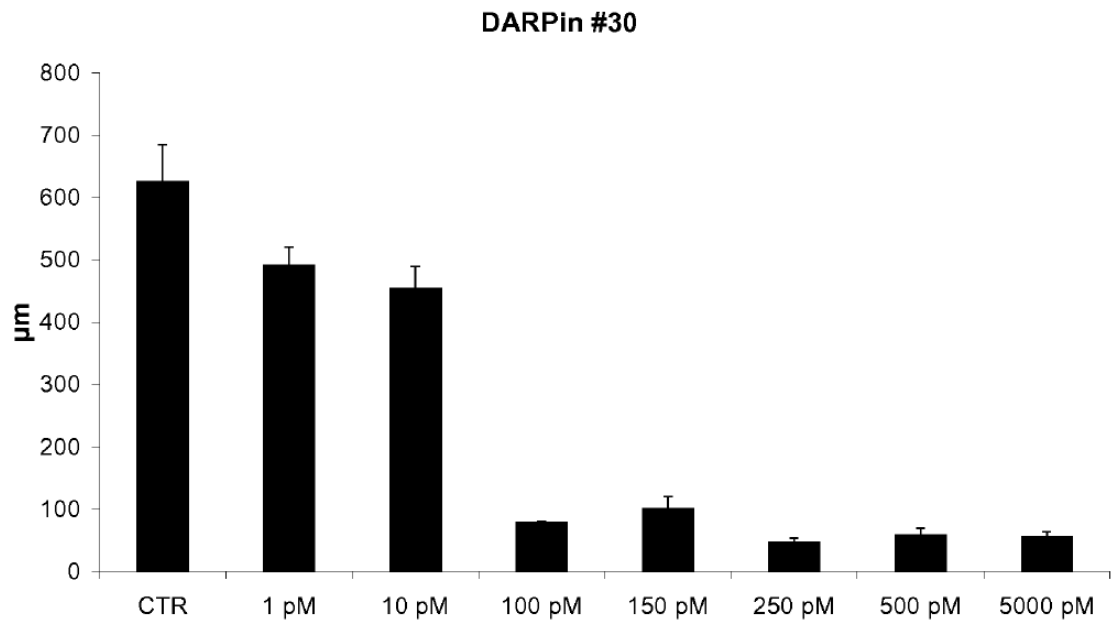


Fig. 2b

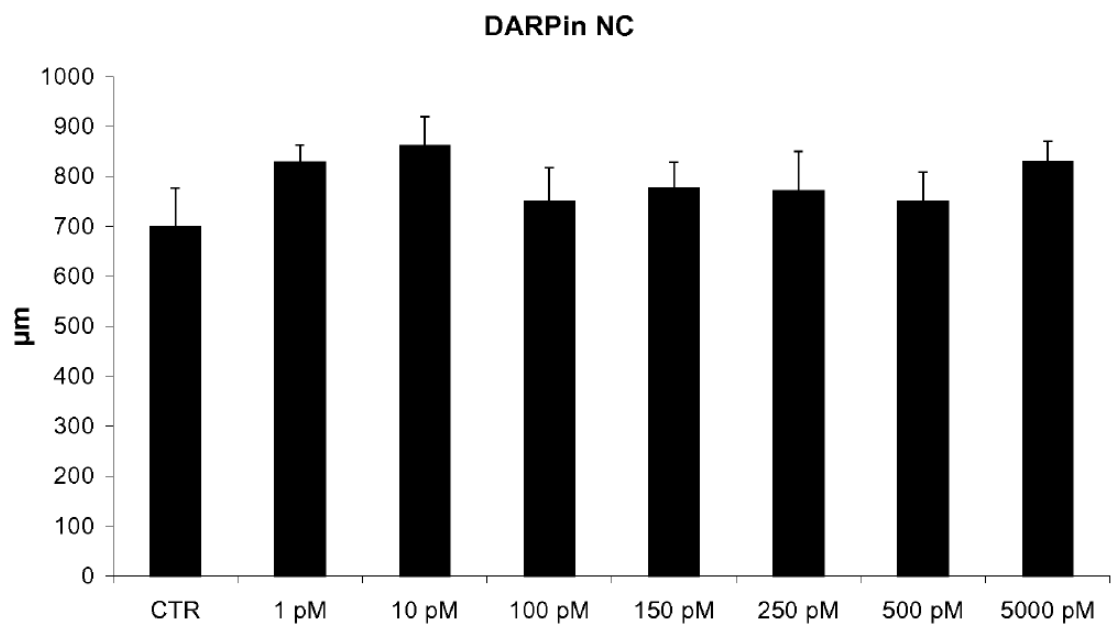


Fig. 3a

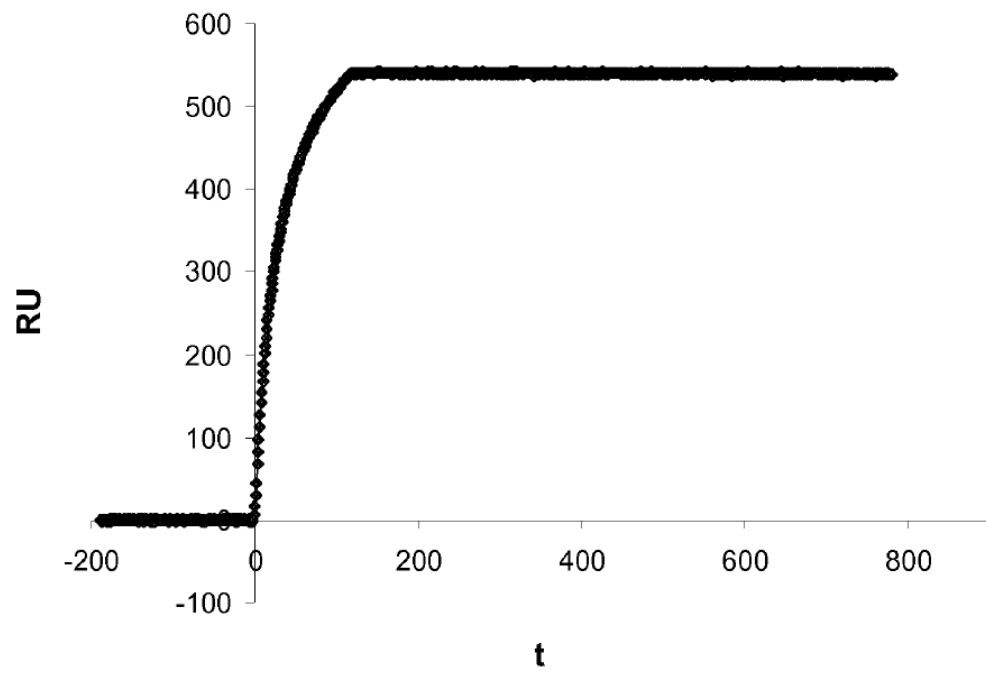


Fig. 3b

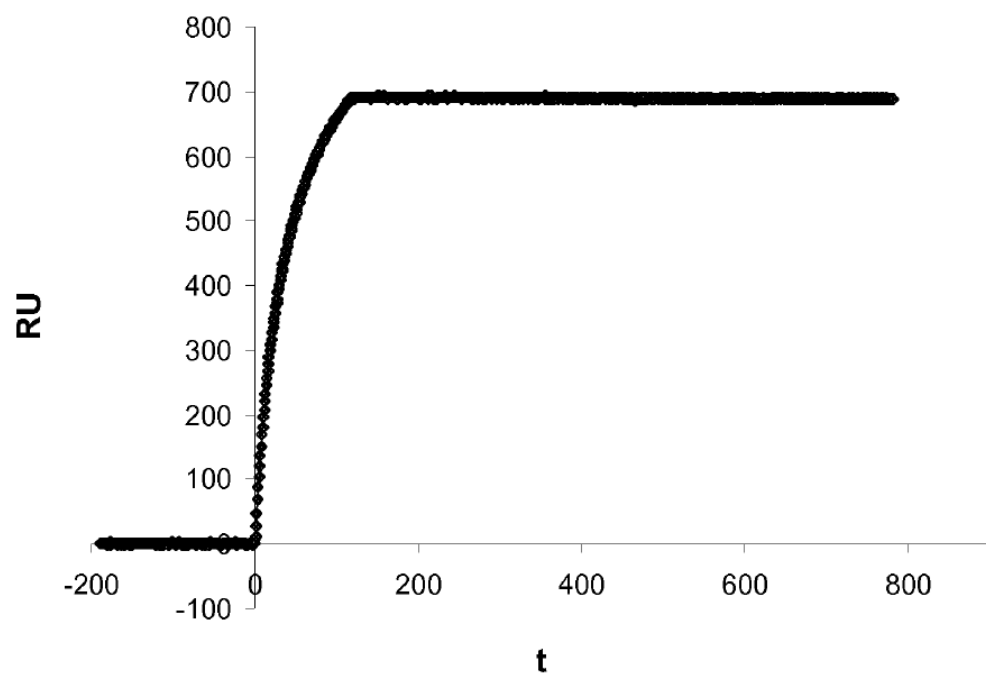


Fig. 3c

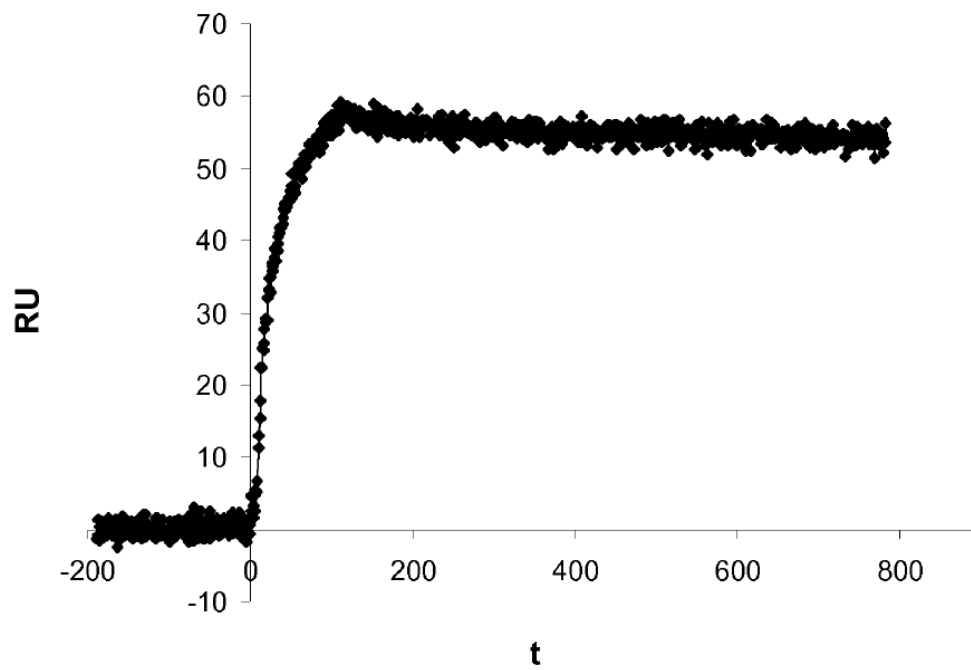


Fig. 3d

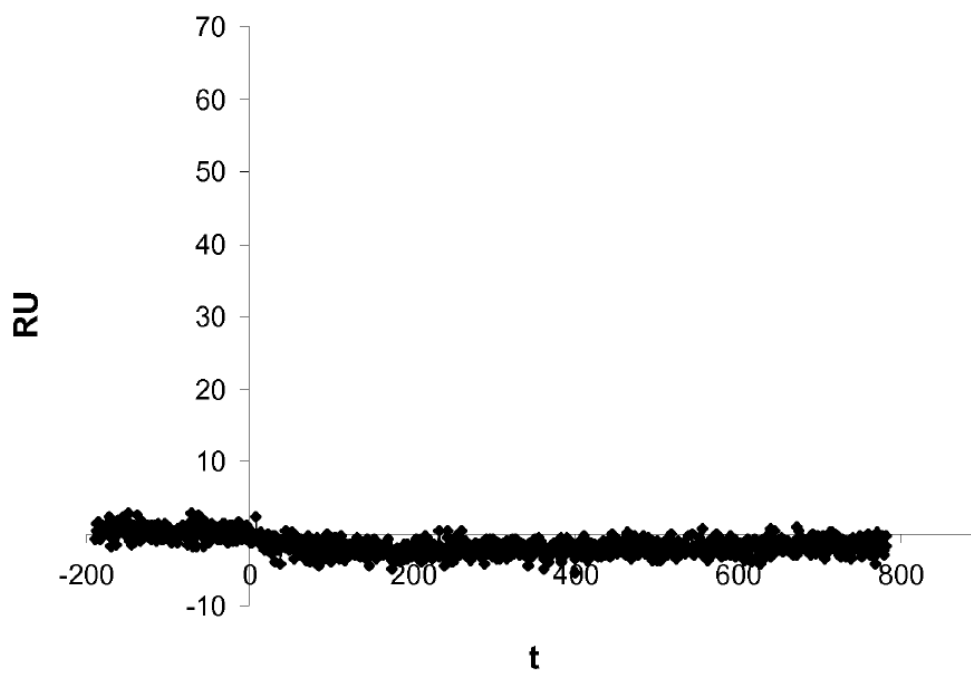


Fig. 4

