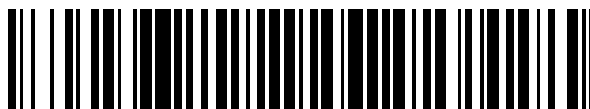


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 135**

51 Int. Cl.:

A61P 27/02 (2006.01)

A61K 47/60 (2007.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2013 PCT/US2013/039619**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13169614**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2013 E 13723356 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2846836**

54 Título: **Método de tratamiento de DMAE en pacientes resistentes a terapia anti-VEGF**

30 Prioridad:

07.05.2012 US 201261643878 P
19.11.2012 US 201261728017 P
29.11.2012 US 201261731238 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.04.2020

73 Titular/es:

ALLERGAN, INC. (100.0%)
2525 Dupont Drive
Irvine, CA 92612, US

72 Inventor/es:

HOHMAN, THOMAS C.

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 753 135 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

Método de tratamiento de DMAE en pacientes resistentes a terapia anti-VEGF

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/643.878 presentada el 7 de mayo de 2012, la solicitud provisional estadounidense n.º 61/728.017 presentada el 19 de noviembre de 2012 y la solicitud provisional estadounidense n.º 61/731.238 presentada el 29 de noviembre de 2012.

10 Antecedentes

La retina es una capa delgada de tejido nervioso que reviste la superficie interna de la parte posterior del ojo. La retina consiste en diversas clases de neuronas, siendo las más familiares los fotorreceptores responsables de la visión: bastones, que son más sensibles a la luz, y conos, que son más sensibles al color. Los conos están altamente concentrados en la mácula, la pequeña parte central de la retina. Es esta porción del ojo la que es la responsable de la visión central de alta agudeza.

Las enfermedades de la retina, y de la mácula en particular, son la principal causa de deficiencia visual y ceguera en personas con más de 50 años de edad en países desarrollados. Estas enfermedades incluyen degeneración macular asociada a la edad, degeneración macular miópica, edema macular diabético, retinopatía diabética, oclusión venosa retiniana de rama y oclusión venosa retiniana central. La degeneración macular también puede producirse en niños.

Algunas de estas enfermedades pueden tratarse con agentes que inhiben una proteína denominada factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A). El VEGF-A estimula el crecimiento de vasos sanguíneos. En la forma exudativa (o vascular) de degeneración macular asociada a la edad, los niveles anómalamente altos de VEGF estimulan el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en la mácula provocando un daño irreversible a fotorreceptores; además, de estos vasos sanguíneos recién formados se escapa sangre y proteínas hacia la retina, lo que provoca la formación de una cicatriz en el área que estaba ocupada previamente por fotorreceptores. La inhibición de VEGF-A bloquea la formación de estos nuevos vasos, y bloquea el escape de sangre y proteínas, conservándose así la visión.

Existen unos pocos fármacos que se usan para inhibir el VEGF-A en el ojo. Estos incluyen ranibizumab, bevacizumab, aflibercept y, en menor medida, pegaptanib. Son eficaces en diversos grados, pero todos presentan dos inconvenientes significativos: no son eficaces en todos los pacientes, y deben dosificarse de manera frecuente (al menos cada cuatro a ocho semanas) mediante un método de administración que muchos pacientes encuentran desagradable.

El ranibizumab es un fragmento de anticuerpo derivado del mismo anticuerpo de ratón original que el bevacizumab. Se comercializa con el nombre comercial LUCENTIS® en los Estados Unidos. El ranibizumab está indicado para el tratamiento de degeneración macular asociada a la edad neovascular (exudativa), edema macular tras oclusión venosa retiniana y edema macular diabético.

El ranibizumab se administra a una dosis de 0,3 mg o 0,5 mg, dependiendo del estado tratado, cada 28 días. El fármaco se inyecta por medio de jeringa directamente en el humor vítreo del ojo, el material gelatinoso transparente que comprende la mayor parte del volumen del ojo. Se muestra un ejemplo en la figura 1. Puede realizarse una inyección intravítrea a través de la *pars plana*, de 3 mm a 4 mm de manera posterior al limbo. Para la degeneración macular asociada a la edad, se administran 0,5 mg de ranibizumab al ojo afectado mediante inyección intravítrea aproximadamente cada 28 días. La información de prescripción que acompaña al producto establece que “el tratamiento puede reducirse a una inyección cada 3 meses después de las primeras cuatro inyecciones si las inyecciones mensuales no son viables”, pero que tales dosis son “menos eficaces”, y que “la dosificación cada 3 meses conducirá a una pérdida aproximada de 5 letras (1 línea) del beneficio de agudeza visual, en promedio, a lo largo de los 9 meses siguientes” en comparación con la dosificación mensual continuada.

El bevacizumab es un inhibidor de anticuerpo monoclonal humanizado contra VEGF-A. Se comercializa con el nombre comercial AVASTIN® en los Estados Unidos. El bevacizumab está indicado como terapia de un solo uso para glioblastoma y como terapia complementaria para cáncer colorrectal metastásico, cáncer de pulmón de células no pequeñas no escamosas y carcinoma metastásico de células renales. También se usa, como indicación no autorizada, para el tratamiento de los estados para los que está indicado el ranibizumab. La pauta posológica es la misma que para el ranibizumab.

El aflibercept es una proteína de fusión recombinante que comprende dominios extracelulares de los receptores 1 y 2 de VEGF humano fusionados a la parte Fc de IgG1 humana. Se comercializa con el nombre comercial EYLEA® en los Estados Unidos. El aflibercept está indicado para el tratamiento de degeneración macular asociada a la edad neovascular (exudativa), administrado en una dosis de 2 mg mediante inyección intravítrea cada 4 semanas durante

las primeras 12 semanas, seguido por 2 mg mediante inyección intravítrea una vez cada 8 semanas. El fármaco también puede dosificarse de manera tan frecuente como 2 mg cada 4 semanas.

El pegaptanib es una cadena sencilla de ácido nucleico, más específicamente, un oligonucleótido de veintiocho nucleótidos, que se une a VEGF-A165. Se comercializa con el nombre comercial MACUGEN® en los Estados Unidos. El pegaptanib está aprobado para el tratamiento de degeneración macular asociada a la edad neovascular (exudativa), administrado en una dosis de 0,3 mg cada 6 semanas mediante inyección intravítrea. El fármaco no es tan eficaz como el ranibizumab, bevacizumab o aflibercept y, por tanto, no se usa con tanta frecuencia.

Los documentos WO 2011/135067 y WO 2010/060748 divulgan proteínas de unión recombinantes que comprenden un dominio de repeticiones de anquirina que se une a VEGF-Axxx. Estos documentos no divulgan el tratamiento de pacientes que son resistentes a la terapia con ranibizumab, bevacizumab, aflibercept o pegaptanib.

A pesar de la eficacia del ranibizumab, bevacizumab, aflibercept y pegaptanib, todavía hay pacientes que no responde a esos fármacos. Además, esos fármacos requieren la administración frecuente cada cuatro a ocho semanas. Esto puede que no parezca tan malo, y de hecho no lo sería, si esos fármacos se ingirieran como pastillas, o se aplicaran de manera tópica como gotas para los ojos. En cambio, esos fármacos se administran mediante una aguja que perfora la parte frontal del ojo (incluyendo, pero sin limitarse a, la conjuntiva y la esclerótica) y se extiende hacia el cuerpo vítreo del ojo cuando se administra el fármaco. El procedimiento es seguro, cuando lo realiza personal capacitado, pero se invita a los lectores que duden de que alguien se oponga a someterse a un procedimiento de este tipo cada cuatro semanas a coger una aguja, sostenerla cerca del ojo y contemplar la trayectoria requerida para llegar al cuerpo vítreo. Por tanto, existe la necesidad en la técnica de terapias capaces de tratar pacientes que desean un alivio de enfermedades de la retina a quienes no ayuda el ranibizumab, bevacizumab, aflibercept o pegaptanib, pacientes que desean un tratamiento menos frecuente y pacientes que desean ambas cosas.

Sumario de la invención

Los inventores han descubierto sorprendentemente que las composiciones y los métodos anti-VEGF de la invención pueden usarse para tratar degeneración macular exudativa asociada a la edad y otros estados del ojo con sorprendentemente menos inyecciones que las que requieren el ranibizumab, bevacizumab, aflibercept y pegaptanib. Este uso se describe y se define en las reivindicaciones. Al igual que esos fármacos, las composiciones de las invenciones también inhiben el VEGF-A, y por tanto tienen el mismo mecanismo de acción (es decir, funcionan en gran parte de la misma manera), aunque las composiciones y los métodos de la invención pueden usarse para tratar a pacientes a los que no pueden tratar el ranibizumab, bevacizumab, aflibercept y pegaptanib. Además, pueden administrarse los fármacos para tratar estados oculares tales como degeneración macular asociada a la edad, edema macular diabético, miopía patológica, oclusión venosa retiniana de rama u oclusión venosa retiniana central.

Por consiguiente, en una realización, una proteína de unión recombinante que comprende un dominio de repeticiones de anquirina, en la que el dominio de anquirina se une a VEGF-Axxx con una Kd por debajo de 10^7 M, para su uso en un método de inhibición de la unión entre VEGF-Axxx y VEGFR-2, en la que dicha proteína de unión recombinante ha de administrarse a un paciente que necesita tal inhibición a una frecuencia de entre 8 semanas y 16 semanas, a una dosis de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 4 mg, en la que el uso es para tratar degeneración macular asociada a la edad, edema macular diabético, miopía patológica, oclusión venosa retiniana de rama u oclusión venosa retiniana central en un paciente que tiene ese estado, en la que el paciente es resistente a la terapia con ranibizumab, bevacizumab, aflibercept o pegaptanib. En algunas realizaciones, la proteína de unión incluye además un resto de polietilenglicol de al menos 5 kDa de peso molecular. Según algunas realizaciones, el módulo de ocupación de extremos N-terminal del dominio de repeticiones de anquirina comprende un residuo de Asp en la posición 5. En algunas realizaciones, el dominio de repeticiones de anquirina compite por la unión a VEGF-Axxx con los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO:1 ó 3. En algunas realizaciones, el dominio de repeticiones de anquirina se selecciona del grupo que consiste en los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 1 a 7. Según algunas realizaciones, la proteína de unión inhibe la unión de VEGF-Axxx a VEGFR-1. En algunas realizaciones, el dominio de repeticiones de anquirina se conjuga en su extremo C-terminal por medio de un enlace peptídico con un ligador polipeptídico y un residuo de Cys C-terminal, en el que el tiol de la Cys C-terminal se conjuga además con un polietilenglicol acoplado a maleimida. En algunas realizaciones, el polietilenglicol acoplado a maleimida es α -[3-(3-maleimido-1-oxopropil)amino]propil- ω -metoxi-polioxietileno. Según algunas realizaciones, la proteína de unión es una proteína de repeticiones de anquirina seleccionada del grupo que consiste en las proteínas de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 ó 7. En algunas realizaciones, el resto de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa. En algunas realizaciones, la proteína de unión incluye la proteína de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO:3 y el tiol de la Cys C-terminal de la proteína de repeticiones de anquirina se conjuga además con un polietilenglicol acoplado a maleimida. Según algunas realizaciones, el polietilenglicol acoplado a maleimida es α -[3-(3-maleimido-1-oxopropil)amino]propil- ω -metoxi-polioxietileno, y el resto de polietilenglicol tiene un peso molecular de al menos 10 kDa. Según algunas realizaciones, la proteína de unión se administra con un portador y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, en algunas realizaciones, el portador es PBS. En algunas realizaciones, la proteína de unión se administra mediante inyección intravítrea. Según algunas

realizaciones, la proteína de unión se administra cada 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 semanas. En algunas realizaciones, la proteína de unión se administra a una dosis de 2 mg, 3 mg ó 4 mg, o a una dosis de 2,0 mg, 3,0 mg o 4,0 mg. El uso es para el tratamiento de degeneración macular asociada a la edad, edema macular diabético, miopía patológica oclusión venosa retiniana de rama u oclusión venosa retiniana central en un paciente que tiene ese estado, en el que el paciente es resistente a la terapia con ranibizumab, bevacizumab, aflibercept o pegaptanib. En algunas realizaciones, el paciente resistente a terapia con ranibizumab, bevacizumab, aflibercept o pegaptanib tiene una disminución de menos del 20% en el área de 1 mm² central de la mácula después de 3 inyecciones intravítreas de ranibizumab, bevacizumab o aflibercept. En algunas realizaciones, el paciente es resistente a una dosis de terapia con ranizumab. En algunas realizaciones, el paciente es resistente a una dosis de terapia con bevacizumab. En algunas realizaciones, el paciente es resistente a una dosis de terapia con aflibercept. En algunas realizaciones, el paciente es resistente a una dosis de terapia con pegaptanib.

Estas y otras realizaciones se describen con mayor detalle a continuación.

15 Breve descripción de las figuras

Estas y otras características se describirán a continuación con referencia a los dibujos resumidos a continuación. Estos dibujos y la descripción asociada se proporcionan para ilustrar una o más realizaciones y no limitan el alcance de la invención.

La figura 1 ilustra un ejemplo de inyección de un fármaco por medio de jeringa directamente en el humor vítreo del ojo.

La figura 2a muestra el grosor central de la retina en pacientes humanos, resistentes a terapia con LUCENTIS® y/o AVASTIN®, después de recibir 1,0 mg de una composición según la invención que comprende los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 3. La composición se disolvió en PBS y se administró mediante inyección intravítrea en un volumen de 50 µl.

La figura 2b muestra el grosor central de la retina en pacientes humanos, resistentes a terapia con LUCENTIS® y/o AVASTIN®, después de recibir 2,0 mg de una composición según la invención que comprende los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 3. La composición se disolvió en PBS y se administró mediante inyección intravítrea en un volumen de 50 µl.

La figura 3a muestra el grosor central de la retina en pacientes humanos, resistentes a terapia con LUCENTIS® y/o AVASTIN®, después de recibir mediante inyección en el vítreo 3,0 mg de una composición según la invención que comprende los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 3. La composición se disolvió en PBS y se administró mediante inyección intravítrea en un volumen de 50 µl.

La figura 3b muestra el grosor central de la retina en pacientes humanos, resistentes a terapia con LUCENTIS® y/o AVASTIN®, después de recibir mediante inyección en el vítreo 4,2 mg de una composición según la invención que comprende los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 3. La composición se disolvió en PBS y se administró mediante inyección intravítrea en un volumen de 50 µl.

La figura 4 ilustra la duración del efecto del tratamiento de una realización de ejemplo de las composiciones divulgadas en el presente documento en comparación con ranibizumab (comercialmente disponible como LUCENTIS®).

Descripción detallada de la invención

Factor de crecimiento endotelial vascular

La angiogénesis, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente y la exudación de los vasos aumentada son procesos clave en varios estados patológicos, que incluyen crecimiento tumoral y enfermedades del ojo, en particular neovascularización ocular y enfermedades isquémicas retinianas tales como degeneración macular asociada a la edad o edema macular diabético (Carmeliet, P., Nature 438, 932-936, 2005). Los factores de crecimiento endotelial vascular estimulan la angiogénesis y la linfangiogénesis activando las tirosina cinasas del receptor de VEGF (VEGFR) en células endoteliales (Ferrara, N., Gerber, H. P. y LeCouter, J., Nature Med. 9, 669-676, 2003).

La familia de VEGF de mamíferos consiste en cinco glicoproteínas denominadas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGFD (también denominada FIGF) y factor de crecimiento placentario (PlGF, también denominado PGF). La VEGF-A ha mostrado ser una diana eficaz para la terapia antiangiogénica (Ellis, L. M. y Hicklin, D. J., Nature Rev. Cancer 8, 579-591, 2008). Los ligandos de VEGF-A se unen a y activan tres tirosina cinasas receptoras de tipo III estructuralmente similares, designadas VEGFR-1 (también denominada FLT1), VEGFR-2 (también denominada KDR) y VEGFR-3 (también denominada FLT4). Los ligandos de VEGF tienen especificidades de unión distintivas para cada uno de estos receptores de tirosina cinasa, que contribuyen a su diversidad de funciones. En respuesta a

la unión del ligando, las tirosina cinasas VEGFR activan una red de distintas rutas de señalización en el sentido de 3'. VEGFR-1 y VEGFR-2 se encuentran principalmente en el endotelio vascular mientras que VEGFR-3 se encuentra mayormente en el endotelio linfático. Todos estos receptores tienen un dominio extracelular, una única región transmembrana y una secuencia consenso de tirosina cinasa interrumpida por un dominio de inserción de cinasa. Más recientemente, se mostró que la neuropilina (NRP-1), originalmente identificada como un receptor para la familia de semaforina/colapsina de mediadores de guía neuronal, actúa como un receptor específico de isoforma para VEGF-A.

Se sabe que diversas isoformas de VEGF-A se generan mediante corte y empalme alternativo de ocho exones dentro del gen de VEGF-A. Todas las isoformas contienen exones 1-5 y el exón terminal, exón 8. Los exones 6 y 7, que codifican para dominios de unión a heparina, puede incluirse o excluirse. Esto da lugar a una familia de proteínas denominada según su número de aminoácido: VEGF-A165, VEGF-A121, VEGF-A189, y así sucesivamente. Sin embargo, el exón 8, contiene dos sitios de corte y empalme en 3' en las secuencias de nucleótidos, que pueden usarse por la célula para generar dos familias de isoformas con longitud idéntica, pero que difieren en las secuencias de aminoácidos del extremo C-terminal (Varey, A.H.R. *et al.*, British J. Cancer 98, 1366-1379, 2008). VEGF-Axxx ("xxx" indica el número de aminoácido de la proteína madura), la familia proangiogénica de isoformas, se genera mediante el uso de la secuencia más próxima al exón 8 (que da como resultado la inclusión del exón 8a). Las isoformas antiangiogénicas de 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 el corte y empalme fuera del exón 8a y la producción de secuencias de ARNm que codifican para la familia de VEGF-Axxx b. VEGF-A165 es la isoforma proangiogénica 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 mostró que tenía efectos antiangiogénicos (Varey *et al.*, citado anteriormente; Konopatskaya, O. *et al.*, Molecular Vision 12, 626-632, 2006). Es una forma inhibidora endógena de VEGF-A, que disminuye la proliferación inducida de 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 rutas de señalización en el sentido de 3'.

Proteínas de unión recombinantes

En el uso de la invención, ha de administrarse una proteína de unión que comprende un dominio de unión que comprende un dominio de repeticiones de anquirina diseñado tal como se define adicionalmente en las reivindicaciones. Los ejemplos de tales dominios de repeticiones de anquirina diseñados se describen en la patente estadounidense n.º 7.417.130 y la patente estadounidense n.º 8.110.653, incorporándose los contenidos completos de ambas en el presente documento por referencia. Esas patentes contienen además una descripción general de características, técnicas y aplicaciones de proteína de repetición.

El término "proteínas de repetición" se refiere a una proteína que comprende uno o más dominios de repetición. En una realización, cada una de las proteínas de repetición comprende hasta cuatro dominios de repetición. En otra realización, cada una de las proteínas de repetición comprende hasta dos dominios de repetición. En otra realización, cada una de las proteínas de repetición comprende sólo un dominio de repetición. La proteína de repetición también puede comprender dominios de proteína adicionales no repetidos, 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 las unidades estructurales tienen el mismo pliegue, y se apilan fuertemente para crear, por ejemplo, una estructura de superhelicoidal que tiene un núcleo hidrófobo unido.

El término "proteína de repetición diseñada" y "dominio de repetición diseñado" se refieren a una proteína de repetición o un dominio de repetición, respectivamente, obtenido como resultado del procedimiento de la invención explicado en la patente estadounidense n.º 7.417.130 y la patente estadounidense n.º 8.110.653. Las proteínas de repetición diseñadas y los dominios de repetición diseñados son sintéticos y no de la naturaleza. Son proteínas o dominios artificiales, respectivamente, obtenidos mediante la expresión de ácidos nucleicos diseñados correspondientemente.

La VEGF-A de mamíferos existe como dos familias de isoformas de corte y empalme alternativas: (i) las isoformas proangiogénicas "VEGF-Axxx" generadas mediante corte y empalme proximal del exón 8 y (ii) las isoformas antiangiogénicas "VEGF-Axxx b" generadas mediante corte y empalme distal del exón 8. En una realización, el dominio de unión según la invención es específico para la VEGF-Axxx proangiogénica de perro, conejo, mono u origen humano. En otra realización, el dominio de unión según la invención es específico para la VEGF-Axxx proangiogénica de origen humano. En otra realización, el dominio de unión según la invención es específico para el VEGF-A165 humano.

El término "proteína" se refiere a un polipéptido, en el que al menos parte del polipéptido tiene, o es capaz de adquirir, una disposición tridimensional definida formando estructuras secundarias, terciarias o cuaternarias dentro

de y/o entre su(s) cadena(s) de polipéptidos. Si una proteína comprende dos o más polipéptidos, las cadenas de polipéptidos individuales pueden unirse de manera covalente o no covalente, por ejemplo mediante un enlace disulfuro entre dos polipéptidos. Una parte de una proteína, que individualmente tiene, o es capaz de adquirir una disposición tridimensional definida formando estructuras secundarias o terciarias, se denomina "dominio de proteína". Tales dominios de proteína son bien conocidos por el experto habitual en la técnica.

El término "recombinante" tal como se usa en proteína recombinante, dominio de proteína recombinante y similares, significa que los polipéptidos se producen mediante el uso de tecnologías de ADN recombinante bien conocidas por el experto habitual en la técnica relevante. Por ejemplo, una molécula de ADN recombinante (por ejemplo producida mediante síntesis génica) que codifica para un polipéptido puede clonarse en un plásmido de expresión bacteriano (por ejemplo pQE30, Qiagen). Cuando un plásmido de expresión recombinante construido de este tipo 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 la que la secuencia de aminoácidos es útil para la purificación, la detección o el direccionamiento del polipéptido/proteína, o en la que la secuencia de aminoácidos mejora el comportamiento fisicoquímico del polipéptido/proteína, o en la que la secuencia de aminoácidos presenta una función efectora. Las etiquetas de polipéptido, los restos y/o los dominios individuales de una proteína de unión pueden conectarse entre sí directamente o a través de ligadores polipeptídicos. Todas estas etiquetas de polipéptido son bien conocidas en la técnica y se encuentran completamente disponibles para el experto en la técnica. Los ejemplos de etiquetas de polipéptido son secuencias de polipéptidos pequeñas, por ejemplo, etiquetas de His, myc, FLAG o Strep, o restos tales como enzimas (por ejemplo, enzimas como fosfatasa alcalina), que permiten la detección del polipéptido/proteína, o restos que pueden usarse para direccionamiento (tales como inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas) y/o como moléculas efectoras.

El término "ligador polipeptídico" se refiere a una secuencia de aminoácidos, que es capaz de unir, por ejemplo, dos dominios de proteínas, una etiqueta de polipéptido y un dominio de proteína, un dominio de proteína y un resto no polipeptídico tal como polietilenglicol o dos etiquetas de secuencia. Dichos dominios, etiquetas, restos no polipeptídicos y ligadores adicionales son conocidos para el experto habitual en la técnica relevante. Se proporciona una lista de ejemplos en la patente estadounidense n.º 7.417.130 y la patente estadounidense n.º 8.110.653. Los ejemplos de tales ligadores son ligadores de glicina-serina y ligadores de prolina-treonina de longitudes variables. En una realización, los ligadores tienen una longitud de entre 2 y 24 aminoácidos; en otra realización, los ligadores tienen una longitud de entre 2 y 16 aminoácidos.

El término "polipéptido" se refiere a una molécula que consiste en una o más cadenas de múltiples, es decir dos o más, aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos. En una realización, un polipéptido consiste en más de ocho aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos.

El término "resto polimérico" se refiere a o bien un resto polimérico proteico o bien un resto polimérico no proteico. En una realización, un "resto polimérico proteico" es un polipéptido que no forma una estructura terciaria estable mientras no forme más del 10% (o no más del 5%, no más del 2%, no más del 1%, y no más de cualquier cantidad detectable, tal como se determina mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC)) de oligómeros o agregados cuando se almacenan a una concentración de aproximadamente 0,1 mM en PBS a TA (temperatura ambiente) durante un mes. Tales restos poliméricos proteicos circulan 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. En una realización, el peso molecular aparente de los restos poliméricos proteicos determinado mediante SEC es 1,5x, 2x o 2,5x mayor que su peso molecular efectivo calculado a partir de su secuencia de aminoácidos. En una realización, los pesos moleculares aparentes de los restos poliméricos no proteicos determinados mediante SEC son 2x, 4x o 8x mayores que su peso molecular efectivo calculado a partir de su composición molecular. En una realización, más del 50%, el 70% o incluso el 90% de los aminoácidos del resto polimérico proteico no forma estructuras secundarias estables a una concentración de aproximadamente 0,1 mM en PBS a TA tal como se determina mediante mediciones de dicroísmo circular (CD). En una realización, el polímero proteico muestra un espectro de CD en el UV cercano típico de una conformación de enrollamiento aleatoria. Tales análisis de CD son bien conocidos para el experto en la técnica. Además, pueden usarse restos poliméricos proteicos que comprenden más de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 u 800 aminoácidos.

Los ejemplos de restos poliméricos proteicos son polipéptidos de XTEN® (una marca comercial registrada de Amunix; documento WO 07/103515), o polipéptidos que comprenden residuos de prolina, alanina y serina tal como se describe en el documento WO 08/155134. Tales restos poliméricos proteicos pueden unirse de manera covalente a, por ejemplo, un dominio de unión de la invención mediante la generación de polipéptidos de fusión genéticos usando tecnologías de clonación de ADN convencionales, seguido por su expresión y purificación convencionales. Los ejemplos de proteínas de unión que comprenden un dominio de repetición de unión de VEGF-Axxx y un resto polimérico proteico de este tipo se muestran en SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:4. Las posiciones de aminoácido desde 1 hasta 159 de SEQ ID NO:1 corresponden al dominio de repetición y la posición de aminoácido de 161 a 1025 de SEQ ID NO:1 corresponde al resto polimérico proteico. Las posiciones de aminoácido desde 1 hasta 126 de SEQ ID

NO:4 corresponden al dominio de repetición y las posiciones de aminoácido de 131 a 640 de SEQ ID NO:4 corresponden al resto polimérico proteico.

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

En una realización, el resto polimérico se conecta por un ligador polipeptídico a un dominio de unión. Los ejemplos de tales ligadores polipeptídicos son los aminoácidos de 1 a 8 de SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9.

Los ejemplos de restos poliméricos no proteicos son hidroxietilalmidón (HES), polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquileño. El término “pegilado” significa que un resto de PEG se une de manera covalente 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 de Cys C-terminal útil para la unión de un resto polimérico no proteico son SEQ ID NO:2, 3, 5, 6 y 7. En algunas realizaciones, PEG, si se usa, puede estar en una disposición o bien lineal o bien ramificada.

En una realización específica, un resto de PEG o cualquier otro polímero no proteico puede, por ejemplo, acoplarse a un tiol de cisteína a través de un ligador de maleimida con la cisteína, acoplándose a través de un ligador peptídico al extremo N- o C-terminal de un dominio de unión tal como se describe en el presente documento (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, en una realización, uno o más restos poliméricos tal como se describe adicionalmente a continuación. En una realización, la proteína de unión comprende hasta cuatro dominios de unión. En una realización, la proteína de unión comprende hasta dos dominios de unión. En otra realización, la proteína de unión sólo tiene un dominio de unión. Además, esa proteína de unión puede comprender dominios de proteína adicionales que no son dominios de unión, restos de multimerización, etiquetas de polipéptido, ligadores polipeptídicos y/o un único residuo de Cys. Los ejemplos de restos de multimerización son regiones constantes de 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 tales polipéptidos. El único residuo de Cys puede usarse para conjugar otros restos con el polipéptido, por ejemplo, usando la química de la maleimida bien conocida por el experto en la técnica.

En una realización, la proteína de unión comprende hasta cuatro restos poliméricos. En otra realización, la proteína de unión comprende hasta dos restos poliméricos. En otra realización, la proteína de unión sólo tiene un resto polimérico.

En una realización, la proteína de unión tiene un peso molecular aparente de aproximadamente 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 45 kDa, 50 kDa, 55 kDa, 60 kDa, 65 kDa, 70 kDa, 75 kDa, 80 kDa, 85 kDa, 90 kDa, 95 kDa, 100 kDa, 200 kDa, 300 kDa, 400 kDa, 500 kDa, 600 kDa, 700 kDa, 800 kDa, 900 kDa o 1.000 kDa cuando se analiza a una concentración de 0,1 mM en PBS a TA mediante SEC usando proteínas globulares como patrones de peso molecular. En una realización, la proteína de unión tiene un peso molecular aparente de 34 kDa.

Los expertos en la técnica apreciarán el significado de diversos términos de grado usados en el presente documento. Por ejemplo, tal como se usa en el presente documento en el contexto de referencia a una cantidad (por ejemplo, “aproximadamente 10 kDa”), el término “aproximadamente” representa una cantidad cercana a y que incluye la cantidad indicada que aún realiza una función deseada o logra un resultado deseado, por ejemplo “aproximadamente 10 kDa” puede incluir 10 kDa y cantidades cercanas a 10 kDa que aún realizan una función deseada o logran un resultado deseado. Por ejemplo, el término “aproximadamente” puede referirse a una cantidad que está dentro del 10% o menos de, dentro del 5% o menos de, dentro del 0,1% o menos de, o dentro del 0,01% o menos de la cantidad indicada.

El término “dominio de unión” significa un dominio de proteína que muestra el mismo “pliegue” (disposición tridimensional) que un armazón proteínico y que tiene una propiedad predeterminada, tal como se define a continuación. Un dominio de unión de este tipo puede obtenerse mediante técnicas de ingeniería de proteínas racionales, o más comúnmente, combinatorias, habilidades que son bien conocidas en la técnica (Skerra, 2000, citado anteriormente; Binz *et al.*, 2005, citado anteriormente). Por ejemplo, un dominio de unión que tiene una propiedad predeterminada puede obtenerse mediante un método que comprende las etapas de (a) proporcionar una colección diversa de dominios de proteína que muestran el mismo pliegue que un armazón proteínico tal como se define adicionalmente a continuación; y (b) detectar la colección diversa y/o seleccionar a partir de la colección diversa para obtener al menos un dominio de proteína que tiene la propiedad predeterminada. La colección diversa de dominios de proteína puede proporcionarse mediante varios métodos según el sistema de detección y/o selección que va a usarse, y puede comprender el uso de métodos bien conocidos por el experto en la técnica, tal como visualización de fagos o visualización de ribosomas.

El término “armazón proteínico” significa una proteína con áreas superficiales expuestas en la que inserciones, sustituciones o deleciones de aminoácidos son altamente tolerables. Los ejemplos de armazones proteínicos 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, proteínas de repeticiones de anquirina u otras proteínas de repetición y fibronectina humana. Los armazones proteínicos son conocidos para el experto en la técnica (Binz *et al.*, 2005, citado anteriormente.; Binz *et al.*, 2004, citado anteriormente.).

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 propiedades adicionales relacionadas. Dependiendo del tipo de propiedad deseada, un experto habitual será capaz de identificar el formato y las etapas necesarias para realizar la detección y/o selección de un dominio de unión con la propiedad deseada. Preferiblemente, la propiedad predeterminada es unión a una diana.

En una realización, el dominio de unión de la invención no comprende un pliegue de inmunoglobulina como está presente en anticuerpos y/o el dominio de fibronectina de tipo III. Un pliegue de inmunoglobulina es un pliegue de proteínas all- β común que consiste en un emparejado de 2 capas de aproximadamente 7 hebras β antiparalelas dispuestas en dos láminas β . Los pliegues de inmunoglobulina son bien conocidos para el experto en la técnica. Por ejemplo, tales dominios de unión que comprenden un pliegue de inmunoglobulina se describen en el documento WO 07/080392 o el documento WO 08/097497.

En otra realización, el dominio de unión de la invención no comprende un dominio similar a inmunoglobulina tal como se encuentra en VEGFR-1 o VEGFR-2. Tales dominios de unión se describen en el documento WO 00/075319.

En una realización, el dominio de unión comprende entre 70 aminoácidos y 300 aminoácidos; en otra realización, la unión comprende entre 100 aminoácidos y 200 aminoácidos.

En una realización, el dominio de unión está exento de un residuo de Cys libre. Un residuo de Cys libre no está implicado en la formación de un enlace disulfuro. En otra realización, el dominio de unión está libre de cualquier residuo de Cys.

En una realización, las proteínas de unión de la invención pueden expresarse 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 ordenada localmente de un polipéptido, formado mediante interacciones tridimensionales entre dos o más segmentos de estructura secundaria que están cerca el uno del otro a lo largo de la cadena del polipéptido. Una unidad estructural de este tipo muestra un motivo estructural. El término “motivo estructural” se refiere a una disposición tridimensional de elementos de la estructura secundaria presentes en al menos una unidad estructural. Los motivos estructurales son bien conocidos para el experto en la técnica. Las unidades estructurales solas no son capaces de 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 unidades vecinas que da como resultado 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 que se producen de manera natural, en las que las “unidades de repetición” se encuentran en múltiples copias, y que muestran una topología de pliegue definida común a todos los motivos que determinan el pliegue de la proteína. Los 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 de tetratricopéptido, unidades de repetición de HEAT, y unidades de repetición variantes ricas en leucina. Las proteínas que se producen de manera natural que contienen dos o más de tales unidades de repetición se denominan “proteínas de repetición que se producen de manera natural”. Las secuencias de aminoácidos de las unidades de repetición individuales de una proteína de repetición pueden tener un número de mutaciones, sustituciones, adiciones y/o deleciones significativo cuando se comparan entre sí, mientras que aún retienen sustancialmente el patrón general, o motivo, de las unidades de repetición.

El término “motivo de secuencia de repetición” se refiere a una secuencia de aminoácidos, que se deduce de una o más unidades de repetición. En una realización, las unidades de repetición son de dominios de repetición que tienen especificidad de unión para la misma diana.

El término “topología de pliegue” se refiere a la estructura terciaria de las unidades de repetición. La topología de pliegue se determinará mediante 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 polipéptidos/bucles 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 proteínas de repetición diseñadas, hay al menos 2 unidades de repetición, pero

habitualmente de aproximadamente 2 unidades de repetición a 6 unidades de repetición, pero también puede haber 6 o más unidades de repetición o 20 o más unidades de repetición. En la mayoría de los casos, las unidades de repetición mostrarán un alto grado de identidad de secuencia (mismos residuos de aminoácido en las posiciones correspondientes) o similitud de secuencia (residuos de aminoácido que son diferentes, pero que tienen propiedades fisicoquímicas similares), y algunos de los residuos de aminoácido pueden ser residuos clave que están fuertemente conservados en las diferentes unidades de repetición encontradas en proteínas que se producen de manera natural. Sin embargo, será posible un alto grado de variabilidad de secuencia mediante inserciones y/o deleciones y/o sustituciones de aminoácidos entre las diferentes unidades de repetición encontradas en proteínas que se producen de manera natural siempre que se mantenga la topología de pliegue común.

Los métodos para determinar directamente la topología de pliegue de proteínas de repetición mediante medios fisicoquímicos tales como cristalografía de rayos X, RMN o espectroscopía de CD, son bien conocidos para el experto habitual en la técnica. Los métodos 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 para el médico en la técnica. 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 que se producen de manera 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 que se producen de manera natural, por ejemplo la familia de proteínas de repetición de armadillo o proteínas de repeticiones de anquirina.

Los “módulos de repetición” pueden comprender posiciones con residuos de aminoácido presentes en todas las copas de los módulos de repetición correspondientes (“posiciones fijas”) y posiciones con residuos de aminoácido distintos o “aleatorizados” (“posiciones aleatorizadas”).

El término “módulo de ocupación” se refiere a un polipéptido fusionado al módulo de repetición del extremo N- o C-terminal de un dominio de repetición, en el que el módulo de ocupación forma interacciones terciarias estrechas con el módulo de repetición proporcionando así una ocupación que protege el núcleo hidrófobo del módulo de repetición en el lado que no está en contacto con el módulo de repetición consecutivo del disolvente. El módulo de ocupación de extremos N- y/o C-terminal puede ser, o puede derivarse de, una unidad de ocupación u otro dominio encontrado en una proteína de repetición que se produce de manera natural adyacente a una unidad de repetición. El término “unidad de ocupación” se refiere a un polipéptido plegado que se produce de manera natural, en la que el polipéptido define una unidad estructural particular que se fusiona de manera terminal con el extremo N- o C-terminal a una unidad de repetición, en la que el polipéptido forma interacciones terciarias estrechas con la unidad de repetición proporcionando así una ocupación que protege el núcleo hidrófobo de la unidad de repetición en un lado del disolvente. Tales unidades de ocupación pueden tener similitudes de secuencia con respecto al motivo de secuencia de repetición. Los módulos de ocupación y repeticiones de ocupación se describen en la patente estadounidense n.º 7.417.130 y la patente estadounidense n.º 8.110.653. Por ejemplo, el módulo de ocupación de extremos N-terminal de SEQ ID NO: 2 está codificado por los aminoácidos desde la posición 1 hasta la 32. También se prefiere que un módulo de ocupación de extremos N-terminal de este tipo 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 una proteína, un hidrato de carbono, o cualquier otra molécula que se produce de manera natural, incluyendo cualquier parte de tal 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 no natural. Preferiblemente, la diana es un polipéptido que se produce de manera natural o no natural o un polipéptido que contiene modificaciones químicas, por ejemplo modificadas mediante fosforilación, acetilación o metilación natural o no natural. La diana es VEGF-Axxx o VEGFR-2.

El término “secuencia consenso” se refiere a una secuencia de aminoácidos, en la que la secuencia consenso se obtiene mediante alineación estructural y/o de secuencia de múltiples unidades de repetición. Usando dos o más unidades de repetición alineadas estructurales y/o de secuencia, y permitiendo huecos en la alineación, es posible determinar el residuo de aminoácido más frecuente en cada posición. La secuencia consenso es esa secuencia que comprende los aminoácidos que están representados de manera más frecuente en cada posición. En el caso de que dos o más aminoácidos se representen por encima del promedio en una única posición, la secuencia consenso puede incluir un subconjunto de esos aminoácidos. Las 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 consenso y los métodos para determinarlas son bien conocidos para el experto en la técnica.

Un “residuo de aminoácido consenso” es el aminoácido encontrado en una determinada posición en una secuencia consenso. Si dos o más, por ejemplo tres, cuatro o cinco, residuos de aminoácido se encuentran con una

probabilidad similar en las dos o más unidades de repetición, el aminoácido consenso puede ser uno de los aminoácidos encontrados de manera más frecuente o una combinación de los dos o más residuos de aminoácido.

En una realización, también pueden usarse proteínas de unión o dominios de unión que no se producen de manera natural.

El término “que no se produce de manera natural” significa sintético o no de la naturaleza, por ejemplo, fabricado por una persona. El término “proteína de unión que no se produce de manera natural” o “dominio de unión que no se produce de manera natural” significa que la proteína de unión o el dominio de unión es sintético (es decir producido mediante síntesis química a partir de aminoácidos) o recombinante y no de la naturaleza. “Proteína de unión que no se produce de manera natural” o “dominio de unión que no se produce de manera natural” es una proteína o un dominio artificial, respectivamente, obtenido mediante la expresión de ácidos nucleicos diseñados de manera correspondiente. Preferiblemente, 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 la proteína de unión o el 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 para el experto en la técnica.

Un dominio de unión puede inhibir la unión de VEGF-Axxx a VEGFR-2 mediante la unión a VEGF-Axxx de una manera que la constante de disociación aparente (K_d) entre VEGF-Axxx y VEGFR-2 se aumente más de 10^2 veces. En otras realizaciones, la constante de disociación se aumenta más de 10^3 veces, más de 10^4 veces, más de 10^5 veces o más de 10^5 veces. La K_d para la interacción del dominio de unión con respecto a o bien VEGF-Axxx o bien VEGFR-2 está por debajo de 10^7 M, por debajo de 10^8 M, o por debajo de 10^9 M, por debajo de 10^{10} M, o por debajo de 10^{11} M. Los métodos para determinar constantes de disociación de interacciones proteína-proteína, tales como tecnologías basadas en resonancia de plasmón superficial (SPR), son bien conocidos para el experto en la técnica.

El dominio de unión se une a VEGF-Axxx. En una realización, el dominio de unión se une a VEGF-A165 humano. En otras realizaciones, puede unirse a otras isoformas de VEGF-A.

En una realización, la proteína de unión y/o el dominio de unión no pierden su estructura tridimensional original tras la incubación en PBS que contiene ditioneitol (DTT) 100 mM durante 1 ó 10 horas a 37°C. “PBS”, tal como se usa en el presente documento, significa una disolución 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.

En una realización, la proteína de unión comprende un dominio de unión que inhibe la unión de VEGF-Axxx a VEGFR-2 y tiene la temperatura de desnaturalización de punto medio y propiedades de no agregación tal como se definió anteriormente, en la que la proteína de unión inhibe el brote de esferoides de HUVEC con un valor de CI_{50} por debajo de 100 nM.

El término “HUVEC” significa células endoteliales de la vena umbilical humana, que pueden aislarse a partir de la vena umbilical humana normal y que son responsables de la estimulación de VEGF-A.

Los ensayos para medir el brote de esferoides de HUVEC son bien conocidos para el experto en la técnica.

Un valor de CI_{50} es la concentración de una sustancia, tal como una proteína de unión o un dominio de unión, que se requiere para la inhibición del 50% *in vitro* de un parámetro determinado experimentalmente, tal como la brotación de esferoides de HUVEC. Los valores de CI_{50} pueden determinarse fácilmente por el experto en la técnica (Korff T. y Augustin H.G., J. Cell Biol. 143(5), 1341-52, 1998).

En una realización, la proteína de unión y/o el dominio de unión inhibe el brote de esferoides de HUVEC con un valor de CI_{50} por debajo de 10 nM, por debajo de 1 nM, por debajo de 0,1 nM o por debajo de 0,05 nM.

En otra realización, puede usarse una proteína de unión monomérica y/o un dominio de unión que inhibe el brote de esferoides de HUVEC con un valor de CI_{50} menor que el valor de CI_{50} correspondiente de ranibizumab, bevacizumab, aflibercept o pegaptanib.

En una realización, la K_d para la interacción de un dominio de unión a VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF o PDGF está por encima de 1 nM, por encima de 10 nM, por encima de 10^2 nM, por encima de 10^3 nM o por encima de 10^4 nM.

En una realización, VEGF-Axxx es o bien VEGF-A 164 de perro o bien VEGF-A 165 de simio o bien VEGF-A165 humano, y VEGF-Axxxb es o bien VEGF-A 164b de perro o bien VEGF-A165b de simio o bien VEGF-A165b humano.

Otra realización es una proteína de unión recombinante que comprende un dominio de unión, en la que el dominio

de unión inhibe la unión de VEGF-Axxx a VEGFR-2 y en la que el dominio de unión es un dominio de repetición o un dominio de repetición diseñado. Un dominio de repetición de este tipo puede comprender uno, dos, tres o más módulos de repetición internos que participarán en la unión a VEGF-Axxx. En una realización, un dominio de repetición de este tipo comprende un módulo de ocupación de extremos N-terminal, de dos a cuatro módulos de repetición internos y un módulo de ocupación de extremos C-terminal. En una realización, el dominio de unión es un dominio de repeticiones de anquirina o un dominio de repeticiones de anquirina diseñado.

En una realización, la proteína de unión comprende un dominio de unión tal como se describe en el presente documento, conjugado con un resto de polietilenglicol (PEG). En una realización, el resto de PEG se acopla a un único residuo de Cys del dominio de unión. El residuo de Cys puede introducirse de manera genética en el extremo C-terminal del dominio de unión. Entonces, el resto de PEG puede acoplarse mediante medios químicos, por ejemplo, usando la química de la maleimida bien conocida para el experto en la técnica.

Otra realización es una proteína de unión recombinante tal como se definió anteriormente que comprende al menos un dominio de repetición con especificidad de unión para VEGF-Axxx, en la que el dominio de repetición compite por la unión a VEGF-Axxx con un dominio de repetición seleccionado del grupo de los dominios de repetición de SEQ ID NO:1 a 7. En una realización, el dominio de repetición compite por la unión a VEGF-Axxx con el dominio de repetición de SEQ ID NO:1 ó 3. En otra realización, el dominio de repetición compite por la unión a VEGF-Axxx con el dominio de repetición de SEQ ID NO:3.

El término “competir por la unión” significa la incapacidad de dos dominios de unión diferentes de la invención para unirse simultáneamente a la misma diana, mientras que ambos son capaces de unirse a la misma diana de manera individual. Por tanto, tales dos dominios de unión compiten por la unión a la diana. Los métodos, tales como mediciones de ELISA de competición o de SPR de competición (por ejemplo usando el instrumento Proteon de BioRad), para determinar si dos dominios de unión compiten por la unión a una diana son bien conocidos para el médico en la técnica.

Una proteína de unión recombinante que compite por la unión a VEGF-Axxx con una proteína de repetición seleccionada puede identificarse mediante métodos bien conocidos para el experto en la técnica, tal como un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) de competición.

Otra realización 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 SEQ ID NO:1 a 7. En una realización, el dominio de repetición se selecciona de los dominios de repetición de SEQ ID NO:2 ó 3. En otra realización, el dominio de repetición es el dominio de repetición de SEQ ID NO:3.

Uno o más restos de polietilenglicol pueden unirse en diferentes posiciones en la proteína de unión, y tal unión puede lograrse mediante la reacción con aminas, tioles u otros grupos reactivos adecuados. La unión de restos de polietilenglicol (pegilación) puede estar dirigida al sitio, en la que un grupo reactivo adecuado se introduce en la proteína para crear un sitio en el que preferentemente se produce la pegilación, o está presente originalmente 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 que se encuentra 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, la proteína de unión se modifica de manera que tenga un residuo de cisteína en una posición deseada, permitiendo la pegilación dirigida al sitio en la cisteína, por ejemplo mediante la reacción con un derivado de polietilenglicol que porta una función de maleimida. El resto de polietilenglicol puede variar ampliamente en peso molecular (es decir desde aproximadamente 1 kDa hasta aproximadamente 100 kDa) y puede ser ramificado o lineal. En una realización, el polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 kDa; en otra realización, el polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 40 kDa, de aproximadamente 15 kDa a aproximadamente 30 kDa, o de aproximadamente 20 kDa. Los ejemplos de tales proteínas de unión y métodos para sintetizarlas se proporcionan en el documento WO 2011/135067, incorporándose los contenidos completos de los mismos en el presente documento por referencia.

En una realización, puede usarse una proteína recombinante que comprende un dominio de unión tal como se describe en el presente documento, en la que la proteína recombinante se conjuga en el tiol de su cisteína del extremo C-terminal con un PEG acoplado a maleimida, tal como α -[3-(3-maleimido-1-oxopropil)amino]propil- ω -metoxi-polióxietileno (NOF, Sunbright ME-200MA (20kD) o Sunbright ME-400MA (40kD)). En una realización, puede usarse una proteína de unión recombinante que comprende un dominio de unión tal como se describe en el presente documento, en la que el dominio de unión se conjuga en su extremo C-terminal a través de un enlace peptídico con SEQ ID NO:8, que a su vez se conjuga en el tiol de la cisteína del extremo C-terminal con un PEG acoplado a maleimida, tal como α -[3-(3-maleimido-1-oxopropil)amino]propil- ω -metoxi-polióxietileno (NOF, Sunbright ME-200MA (20kD) o Sunbright ME-400MA (40kD)).

En algunas realizaciones, el tiol de la cisteína del extremo C-terminal puede conjugarse con un PEG acoplado a disulfuro de piridilo, un PEG acoplado a vinilsulfona o un PEG acoplado a través de otro reactivo de tiol.

En algunas realizaciones, el PEG y el compuesto de unión apropiado tienen un peso molecular de al menos aproximadamente 2 kD, 5 kD, 10 kD, 20 kD, 30 kD, 40 kD, 50 kD, 70 kD o 100 kD. En una realización, el PEG acoplado a maleimida tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 2 kD, 5 kD, 10 kD, 20 kD, 30 kD, 40 kD, 50 kD, 70 kD o 100 kD.

5 En determinadas realizaciones, el α -[3-(3-maleimido-1-oxopropil)amino]propil- ω -metoxi-polioxi-etileno tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 20 kD o al menos aproximadamente 40 kD.

10 En algunas realizaciones, una proteína de unión recombinante puede conjugarse en un grupo amino del extremo N-terminal con un compuesto de unión que contiene PEG adecuado. En tales realizaciones, los reactivos de PEG-etileno, NHS-ésteres de PEG, NHS-carbonato de PEG, carbonatos de PEG-p-nitrofenilo, reactivos de PEG-triazina, y similares pueden conjugarse en el extremo N-terminal de una proteína de unión adecuada descrita en el presente documento.

15 En una realización adicional, la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican para las proteínas de unión recombinantes particulares. Además, se considera un vector que comprende la molécula de ácido nucleico.

Además, se considera 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 para las proteínas de unión recombinantes particulares, y opcionalmente un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Formulación

25 Los portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables son conocidos para el experto en la técnica y se explican en más detalle a continuación. Aún más, se considera una composición diagnóstica que comprende una o más de las proteínas de unión recombinantes mencionadas anteriormente, en particular proteínas de unión que comprenden dominios de repetición.

30 Una composición farmacéutica comprende proteínas de unión tal como se describió anteriormente y un portador, excipiente o estabilizador farmacéuticamente aceptable (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed.). Los portadores, excipientes o estabilizadores adecuados conocidos por el experto son solución salina, disolución de Ringer, disolución de dextrosa, disolución de Hank, aceites fijos, oleato de etilo, dextrosa al 5% en solución salina, sustancias que potencian la isotonicidad y estabilidad química, tampones y conservantes. Otros portadores adecuados incluyen cualquier portador que no induce por sí mismo la producción de anticuerpos nocivos 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 de combinación, que comprende un agente activo adicional, tal como un agente antineoplásico o un agente antiangiogénico (por ejemplo VEGF-Axxx humana; preferiblemente, VEGF-A165b humano).

40 En una realización, una formulación comprende proteínas de unión tal como se describió anteriormente y un detergente tal como detergente no iónico, que incluye, pero no se limita a, polisorbato 20 (por ejemplo aproximadamente el 0,04%), un tampón tal como histidina, fosfato o ácido láctico y un azúcar tal como sacarosa o trehalosa. La formulación también puede comprender PBS.

Las formulaciones que van a usarse para administración *in vivo* deben ser asépticas o estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

50 Segundo uso médico

En una realización, el uso de la invención comprende la inhibición de la unión entre VEGF-Axxx y VEGFR-2 administrando a un paciente que necesita tal inhibición, a una frecuencia de entre cada 8 semanas y cada 16 semanas, una dosis de 2 mg a 4 mg de una proteína de unión recombinante que comprende un dominio de repetición de anquirina, en la que el dominio de repetición de anquirina se selecciona del grupo que consiste en los dominios de repetición de anquirina de SEQ ID NO:1 a 7. En algunas realizaciones, el dominio de repetición de anquirina se selecciona del grupo que consiste en los dominios de repetición de anquirina de SEQ ID NO:1 a 5. En algunas realizaciones, el dominio de repetición de anquirina se selecciona del grupo que consiste en los dominios de repetición de anquirina de SEQ ID NO:2 ó 3. El uso es un tratamiento de determinados estados oculares, que incluyen los relacionados con retinopatía isquémica, retinopatía neovascular, o tanto retinopatía isquémica como retinopatía neovascular. Algunos estados relacionados con retinopatía isquémica, que pueden tratarse tal como se divulga en el presente documento, son edema macular diabético, oclusión venosa central y oclusión venosa de rama. Algunos estados relacionados con retinopatía neovascular, que pueden tratarse tal como se divulga en el presente documento, pueden incluir retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular exudativa asociada a la edad, miopía patológica, neovascularización coroidea, de secundaria a histoplasmosis, neovascularización coroidea polipoidal y proliferación angiomas retiniana. El uso es para el tratamiento de

degeneración macular asociada a la edad, edema macular diabético, miopía patológica, oclusión venosa retiniana de rama y oclusión venosa retiniana central. El uso es para el tratamiento de pacientes que tienen las enfermedades enumeradas anteriormente que son resistentes a las terapias anti-VEGF existentes, tal como se define en las reivindicaciones.

5 “Tratar”, tal como se usa en el presente documento, significa lidiar de manera médica. Incluye, por ejemplo, administrar la proteína de unión recombinante de la invención para evitar la aparición de DMAE así como para aliviar su gravedad.

10 En una realización, la proteína de unión se administra cada 8 semanas. En otra realización, la proteína de unión se administra cada 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, 12 semanas, 13 semanas, 14 semanas, 15 semanas o 16 semanas. En una realización, la proteína de unión se administra cada 8 semanas a 10 semanas, cada 10 semanas a 12 semanas, cada 12 semanas a 14 semanas, o cada 14 semanas a 16 semanas. En otra
15 realización, la proteína de unión se administra cada 4 semanas a 12 semanas, o cada 8 semanas a 12 semanas, o cada 12 semanas a 16 semanas. En algunas realizaciones, la proteína se administra a una o más de las frecuencias descritas anteriormente durante el resto de la vida del paciente.

La degeneración macular resulta del crecimiento neovascular del vaso coroideo debajo de la mácula. Existen dos
20 tipos de degeneración macular avanzada: exudativa y atrófica. Si bien la degeneración macular exudativa sólo comprende el 15% de todas las degeneraciones maculares, casi toda la degeneración macular exudativa conduce a ceguera. Una vez que un ojo se ve afectado por degeneración macular exudativa, el estado casi siempre afecta al otro ojo. La degeneración macular exudativa y atrófica a menudo se denominan degeneración macular asociada a la edad o degeneración macular “húmeda” asociada a la edad como las enfermedades que se encuentran principalmente en personas de edad avanzada.

25 Tal como se usa en el presente documento, “resistente a terapia anti-VEGF” se refiere a la incapacidad para lograr una respuesta fisiológica satisfactoria con terapia anti-VEGF conocida, concretamente terapia con ranibizumab, bevacizumab, aflibercept o pegaptanib. Tales pacientes tienen una disminución de menos del 20% en el grosor central de la retina anómalo (área de 1 mm² central de la mácula) después de 3 inyecciones intravítreas de
30 ranibizumab, bevacizumab o aflibercept (o 3 inyecciones intravítreas de una combinación de cualquier de las siguientes terapias anteriores). En una realización, un paciente que es resistente a terapia anti-VEGF experimenta un empeoramiento continuo de la visión a pesar de la terapia con ranibizumab, bevacizumab, aflibercept o pegaptanib. En otra realización, un paciente que es resistente a terapia anti-VEGF experimenta un engrosamiento de la retina a pesar de la terapia con ranibizumab, bevacizumab, aflibercept o pegaptanib. En algunas realizaciones,
35 los pacientes resistentes a terapia anti-VEGF demuestran una mejora anatómica insignificante a pesar de recibir terapia con ranibizumab, bevacizumab, aflibercept o pegaptanib.

En algunas realizaciones, las proteínas de unión se administran por vía intravítrea a una dosis de entre 0,1 mg y 10 mg de proteínas de unión por inyección, entre 0,3 mg y 6 mg de proteínas de unión por inyección, o entre 1 mg y 4
40 mg por inyección. En algunas realizaciones, las proteínas de unión se administran a una dosis que contiene entre 0,5 mg y 5 mg de proteínas de unión por inyección, entre 1,0 mg y 4,0 mg de proteínas de unión por inyección, entre 2,0 mg y 4,0 mg de proteínas de unión por inyección. En una realización, las proteínas de unión se administran a una dosis de 2 mg de proteínas de unión por inyección. En otra realización, las proteínas se administran a una dosis de 3 mg de proteínas de unión por inyección.

45 Según algunas realizaciones, un paciente que recibe inyecciones de proteínas de unión recombinantes divulgadas en el presente documento cada cuatro semanas a dieciséis semanas puede mostrar una reducción del 20% o superior en el grosor central de la retina anómalo con respecto al nivel inicial. Según algunas realizaciones, un paciente que recibe inyecciones de proteínas de unión recombinantes divulgadas en el presente documento cada
50 ocho semanas a doce semanas puede mostrar una reducción del 20% o superior en el grosor central de la retina anómalo con respecto al nivel inicial. Según algunas realizaciones, un paciente que recibe inyecciones de proteínas de unión recombinantes divulgadas en el presente documento puede mostrar una reducción del 30% o superior en el grosor central de la retina anómalo con respecto al nivel inicial. Según aún otras realizaciones, un paciente que recibe inyecciones de proteínas de unión recombinantes divulgadas en el presente documento puede mostrar una
55 reducción del 40% o superior en el grosor central de la retina anómalo con respecto al nivel inicial.

Según algunas realizaciones, un paciente, que es resistente a tratamientos anti-VEGF tales como anibizumab, bevacizumab, aflibercept o pegaptanib, después de recibir una o más inyecciones de proteínas de unión divulgadas en el presente documento puede mostrar una reducción de aproximadamente el 20% o superior en el grosor central
60 de la retina anómalo con respecto al nivel inicial. Según algunas realizaciones, un paciente después de recibir una o más inyecciones de proteínas de unión divulgadas en el presente documento puede mostrar una reducción de aproximadamente el 30% o superior en el grosor central de la retina anómala con respecto al nivel inicial. Según aún otras realizaciones, un paciente después de recibir, una o más inyecciones de proteínas de unión divulgadas en el presente documento puede mostrar una reducción de menos del 40% o superior en el grosor central de la retina
65 anómalo con respecto al nivel inicial.

Por ejemplo, un uso para un tratamiento de un estado ocular, tal como degeneración macular asociada a la edad, puede incluir una inyección intravítrea de una proteína de unión recombinante en una cantidad en el intervalo de 0,5 mg a 5 mg de una vez cada doce semanas a una vez cada dieciséis semanas. La proteína de unión recombinante puede incluir un dominio de repeticiones de anquirina, en la que el dominio de repeticiones de anquirina se selecciona del grupo que consiste en los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 3.

En otro ejemplo, un uso para el tratamiento de degeneración macular asociada a la edad en un paciente que es resistente a un tratamiento anti-VEGF tal como ranibizumab, bevacizumab, o ranibizumab y bevacizumab, puede incluir una inyección intravítrea de una proteína de unión recombinante en una cantidad en el intervalo de 0,5 mg a 5 mg. La proteína de unión recombinante puede incluir un dominio de repeticiones de anquirina, en la que el dominio de repeticiones de anquirina se selecciona del grupo que consiste en los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 3. En un ejemplo de este tipo, un paciente que recibe tal inyección o inyecciones puede experimentar más que una disminución del 20% en el grosor central de la retina anómalo después de recibir una o más inyecciones. En algunas realizaciones, un paciente que recibe tal inyección o inyecciones no experimenta un engrosamiento de la retina después de recibir una o más inyecciones.

En otro ejemplo, un uso para el tratamiento de edema macular diabético en un paciente que es resistente a un tratamiento anti-VEGF tal como ranibizumab, bevacizumab, o ranibizumab y bevacizumab, puede incluir una inyección intravítrea de una proteína de unión recombinante en una cantidad en el intervalo de 0,5 mg a 5 mg. La proteína de unión recombinante puede incluir un dominio de repeticiones de anquirina, en la que el dominio de repeticiones de anquirina se selecciona del grupo que consiste en los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 3. En un ejemplo de este tipo, un paciente que recibe tal inyección o inyecciones puede experimentar más que una disminución del 20% en el grosor central de la retina anómalo después de recibir una o más inyecciones. En algunas realizaciones, un paciente que recibe tal inyección o inyecciones no experimenta un engrosamiento de la retina después de recibir una o más inyecciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Tratamiento de pacientes resistentes a tratamientos existentes

Se trataron varios pacientes que padecen degeneración macular asociada a la edad que eran resistentes a terapia con ranibizumab (LUCENTIS®) o bevacizumab (AVASTIN®) a través de la inyección de una composición según la invención que comprende los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 3. Se disolvieron todas las composiciones en PBS y se administraron a través de inyección intravítrea en un volumen de 50 µl a 70 µl.

Tres pacientes recibieron inyecciones de 1,0 mg de la composición disuelta en PBS y administrada a través de inyección intravítrea en un volumen de 50 µl, los grosores de la retina de los pacientes que recibieron las inyecciones a lo largo del tiempo se muestran en la figura 2a. Se determinaron los grosores de la retina de los pacientes usando tomografía de coherencia óptica de dominio espectral ("OCT"). Estos pacientes eran resistentes a las terapias con VEGF existentes.

Tal como se ilustra en la figura 2a, los pacientes A y C mostraron de manera sorprendente una reducción acumulativa en el grosor central de la retina con respecto al nivel inicial después de recibir una inyección de una composición que incluía 1,0 mg de proteínas de unión recombinantes que incluyen los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 3, a lo largo de un periodo de tiempo de ocho semanas. Tal como se observa en la figura, los pacientes A, B y C mostraron de manera sorprendente una reducción acumulativa en el grosor central de la retina con respecto al nivel inicial después de recibir una inyección de una composición que incluía proteínas de unión recombinantes que incluyen los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 3, a lo largo de un periodo de tiempo de dos semanas.

Seis pacientes recibieron inyecciones de 2,0 mg de la composición disuelta en PBS y administrada a través de inyección intravítrea en un volumen de 50 µl, los grosores de la retina de los pacientes que recibieron las inyecciones a lo largo del tiempo se muestran en la figura 2b. Se determinaron los grosores de la retina de los pacientes usando OCT. Estos pacientes eran resistentes a las terapias con VEGF existentes.

Tal como se ilustra en la figura 2b, los pacientes D, E, F, G, H e I mostraron de manera sorprendente una reducción acumulativa en el grosor central de la retina con respecto al nivel inicial después de recibir una inyección de una composición que incluía 2,0 mg de proteínas de unión recombinantes que incluyen los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 3, a lo largo de un periodo de tiempo de ocho semanas.

Seis pacientes recibieron inyecciones de 3,0 mg de la composición disuelta en PBS y administrada a través de inyección intravítrea en un volumen de 50 µl, los grosores de la retina de los pacientes que recibieron las inyecciones a lo largo del tiempo se muestran en la figura 3a. Se determinaron los grosores de la retina de los pacientes usando OCT. Estos pacientes eran resistentes a las terapias con VEGF existentes.

Tal como se ilustra en la figura 3a, los pacientes J, K, M, N y O mostraron de manera sorprendente una reducción acumulativa en el grosor central de la retina con respecto al nivel inicial después de recibir una inyección de una composición que incluía 3,0 mg de proteínas de unión recombinantes que incluyen los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 3, a lo largo de un periodo de tiempo de ocho semanas. Tal como se observa en la figura, los pacientes J, K, L, M, N y O mostraron de manera sorprendente una reducción acumulativa en el grosor central de la retina con respecto al nivel inicial después de recibir una inyección de una composición que incluía proteínas de unión recombinantes que incluyen los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 3, a lo largo de un periodo de tiempo de cuatro semanas.

Nueve pacientes recibieron inyecciones de 4,2 mg de la composición disuelta en PBS y administrada a través de inyección intravítrea en un volumen de 50 μ l, los grosores de la retina de los pacientes que recibieron las inyecciones a lo largo del tiempo se muestran en la figura 3b. Se determinaron los grosores de la retina de los pacientes usando OCT. Estos pacientes eran resistentes a las terapias con VEGF existentes.

Tal como se ilustra en la figura 3b, los pacientes S, U y V mostraron de manera sorprendente una reducción acumulativa en el grosor central de la retina con respecto al nivel inicial después de recibir una inyección de una composición que incluía 4,2 mg de proteínas de unión recombinantes que incluyen los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 3, a lo largo de un periodo de tiempo de dieciséis semanas. Tal como se observa en la figura, los pacientes S, U, V y X mostraron de manera sorprendente una reducción acumulativa en el grosor central de la retina con respecto al nivel inicial después de recibir una inyección de una composición según la invención que incluía 4,2 mg de proteínas de unión recombinantes que incluyen los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 3, a lo largo de un periodo de tiempo de doce semanas. Tal como se observa en la figura, los pacientes P, S, U, V y X mostraron de manera sorprendente una reducción acumulativa en el grosor central de la retina con respecto al nivel inicial después de recibir una inyección de una composición que incluía 4,2 mg proteínas de unión recombinantes que incluyen los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 3, a lo largo de un periodo de tiempo de ocho semanas.

Ejemplo 2

Duración del efecto del tratamiento

La figura 4 es un diagrama que describe que la afinidad de unión y la semivida vítrea definen la duración del efecto de un inhibidor de VEGF. La figura describe la semivida y la duración del efecto del tratamiento de dos concentraciones de dosificación diferentes de proteínas de unión recombinantes según la divulgación en el presente documento (denominadas "DARPin") en comparación con ranibizumab (LUCENTIS®). Tal como se ilustra en la figura 4, ambas dosificaciones DARPin muestran una semivida más larga y una duración más larga del efecto del tratamiento en comparación con ranibizumab.

Lista de secuencias

<110> Allergan, Inc.

<120> MÉTODO DE TRATAMIENTO DE DMAE EN PACIENTES RESISTENTES A TERAPIA ANTI-VEGF

<130> 19087 AP

<150> Documento US 61/643.878

<151> 07-05-2012

<150> Documento US 61/728.017

<151> 19-11-2012

<150> Documento US 61/731.238

<151> 29-11-2012

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1025

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 753 135 T3

<223> Proteína de repeticiones de anquirina

<400> 1

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

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

Phe Asp Trp Met Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala His Glu Gly
35 40 45

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

Ala Thr Asp Val Ser Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Asp
65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr 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

Leu Gly Arg Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp
115 120 125

5

ES 2 753 135 T3

Val	Asn	Ala	Gln	Asp	Lys	Phe	Gly	Lys	Thr	Ala	Phe	Asp	Ile	Ser	Ile
130						135					140				
Asp	Asn	Gly	Asn	Glu	Asp	Leu	Ala	Glu	Ile	Leu	Gln	Lys	Ala	Ala	Ser
145					150					155					160
Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Thr	Glu	Glu	Gly	Thr	Ser	Glu
				165					170					175	
Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu
			180					185					190		
Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Thr	Glu	Glu
		195					200					205			
Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr
	210					215					220				
Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro
225					230					235					240
Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro
				245					250					255	
Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro	Gly	Ser	Pro	Ala
			260					265					270		
Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Thr	Glu	Glu	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro
		275					280					285			
Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro
	290					295					300				
Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Pro	Ala
305					310					315					320
Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Thr	Glu	Glu	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu
				325					330					335	
Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro
			340					345					350		
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				

ES 2 753 135 T3

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
405 410 415

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
420 425 430

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
435 440 445

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu
450 455 460

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly
465 470 475 480

Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
485 490 495

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
500 505 510

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
515 520 525

Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
530 535 540

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
545 550 555 560

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
565 570 575

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
580 585 590

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
595 600 605

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
610 615 620

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro

ES 2 753 135 T3

625		630		635		640
Gly Thr Ser Glu	Ser Ala Thr Pro Glu	Ser Gly Pro Gly Thr	Ser Thr			
	645	650	655			
Glu Pro Ser Glu	Gly Ser Ala Pro Gly	Thr Ser Glu Ser Ala	Thr Pro			
	660	665	670			
Glu Ser Gly Pro	Gly Ser Pro Ala Gly	Ser Pro Thr Ser Thr	Glu Glu			
	675	680	685			
Gly Ser Pro Ala	Gly Ser Pro Thr Ser Thr	Glu Glu Gly Ser	Pro Ala			
	690	695	700			
Gly Ser Pro Thr	Ser Thr Glu Glu Gly	Thr Ser Glu Ser	Ala Thr Pro			
	705	710	715			720
Glu Ser Gly Pro	Gly Thr Ser Thr Glu	Pro Ser Glu Gly	Ser Ala Pro			
	725	730	735			
Gly Thr Ser Glu	Ser Ala Thr Pro Glu	Ser Gly Pro Gly	Ser Glu Pro			
	740	745	750			
Ala Thr Ser Gly	Ser Glu Thr Pro Gly	Thr Ser Glu Ser	Ala Thr Pro			
	755	760	765			
Glu Ser Gly Pro	Gly Ser Glu Pro Ala	Thr Ser Gly Ser	Glu Thr Pro			
	770	775	780			
Gly Thr Ser Glu	Ser Ala Thr Pro Glu	Ser Gly Pro Gly	Thr Ser Thr			
	785	790	795			800
Glu Pro Ser Glu	Gly Ser Ala Pro Gly	Ser Pro Ala Gly	Ser Pro Thr			
	805	810	815			
Ser Thr Glu Glu	Gly Thr Ser Glu	Ser Ala Thr Pro	Glu Ser Gly Pro			
	820	825	830			
Gly Ser Glu Pro	Ala Thr Ser Gly	Ser Glu Thr Pro	Gly Thr Ser Glu			
	835	840	845			
Ser Ala Thr Pro	Glu Ser Gly Pro	Gly Ser Pro Ala	Gly Ser Pro Thr			
	850	855	860			
Ser Thr Glu Glu	Gly Ser Pro Ala	Gly Ser Pro Thr	Ser Thr Glu Glu			
	865	870	875			880

ES 2 753 135 T3

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu
885 890 895

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
900 905 910

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
915 920 925

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro
930 935 940

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
945 950 955 960

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
965 970 975

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro
980 985 990

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
995 1000 1005

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala
1010 1015 1020

Pro Gly
1025

<210> 2

<211> 168

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de repeticiones de anquirina

<400> 2

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

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

Phe Asp Trp Met Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala His Glu Gly
35 40 45

His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn

ES 2 753 135 T3

50

55

60

Ala Thr Asp Val Ser Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Asp
65 70 75 80

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

Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp
115 120 125

Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile
130 135 140

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

<210> 3

<211> 135

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de repeticiones de anquirina

<400> 3

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

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

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

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

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

ES 2 753 135 T3

Asn Ala Gln Asp Lys 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 Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Cys
130 135

<210> 4

<211> 540

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de repeticiones de anquirina

<400> 4

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

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

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

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

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

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

Asn Ala Gln Asp Lys 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

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

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

ES 2 753 135 T3

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

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

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

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

Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser
225 230 235 240

Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro
245 250 255

Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser
260 265 270

Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala
275 280 285

Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro
290 295 300

Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser
305 310 315 320

Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro
325 330 335

Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser
340 345 350

Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala
355 360 365

Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro
370 375 380

Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser
385 390 395 400

Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro
405 410 415

ES 2 753 135 T3

Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser
420 425 430

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
485 490 495

Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala Ala Ser
500 505 510

Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Ala
515 520 525

Pro Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser
530 535 540

<210> 5

<211> 135

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de repeticiones de anquirina

<400> 5

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

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

Ser Asp Phe Lys Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ser Gln Gly
35 40 45

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

Ala Tyr Asp Met Leu Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asp Leu
65 70 75 80

ES 2 753 135 T3

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

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

<210> 6

<211> 130

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Proteína de repeticiones de anquirina

<400> 6

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

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

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

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

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

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

Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Arg 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 Ser Gly
115 120 125

Ser Cys
130

15 <210> 7

<211> 168

<212> PRT

ES 2 753 135 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de repeticiones de anquirina

5

<400> 7

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

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

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
50 55 60

Ala Glu Asp Phe Ala Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ser Asn
65 70 75 80

Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr 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

Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp
115 120 125

Val Asn Thr Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile
130 135 140

Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala Gly
145 150 155 160

Ser Pro Ser Thr Ala Asp Gly Cys
165

10

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Ligador polipeptídico

<400> 8

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Cys
1 5

20

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

5

<220>

<223> Ligador polipeptídico

10

<400> 9

Gly Ser Pro Ser Thr Ala Asp Gly Cys
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Proteína de unión recombinante que comprende un dominio de repeticiones de anquirina, en la que el dominio de anquirina se une a VEGF-Axxx con una Kd por debajo de 10^7 M, para su uso en un método de inhibición de la unión entre VEGF-Axxx y VEGFR-2, en la que dicha proteína de unión recombinante ha de administrarse a un paciente que necesita tal inhibición a una frecuencia de entre 8 semanas y 16 semanas, a una dosis de 1 mg a 4 mg, en la que el uso es para tratar degeneración macular asociada a la edad, edema macular diabético, miopía patológica, oclusión venosa retiniana de rama u oclusión venosa retiniana central en un paciente que tiene ese estado, en la que el paciente es resistente a terapia con ranibizumab, bevacizumab, aflibercept o pegaptanib.
2. Proteína de unión recombinante para su uso según la reivindicación 1, en la que la proteína de unión comprende además un resto de polietilenglicol de al menos 5 kDa de peso molecular, preferiblemente en la que el módulo de ocupación de extremos N-terminal del dominio de repeticiones de anquirina comprende un residuo de Asp en la posición 5.
3. Proteína de unión recombinante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el dominio de repeticiones de anquirina compite por la unión a VEGF-Axxx con los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO:1 ó 3.
4. Proteína de unión recombinante para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el dominio de repeticiones de anquirina se selecciona del grupo que consiste en los dominios de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 1 a 7.
5. Proteína de unión recombinante para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la proteína de unión inhibe la unión de VEGF-Axxx a VEGFR-1.
6. Proteína de unión recombinante para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el dominio de repeticiones de anquirina se conjuga en su extremo C-terminal por medio de un enlace peptídico con un ligador polipeptídico y un residuo de Cys C-terminal, en la que el tior de la Cys C-terminal se conjuga además con un polietilenglicol acoplado a maleimida y en la que el polietilenglicol acoplado a maleimida es preferiblemente α -[3-(3-maleimido-1-oxopropil)amino]propil- ω -metoxi-polióxietileno.
7. Proteína de unión recombinante para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la proteína de unión es una proteína de repeticiones de anquirina seleccionada del grupo que consiste en las proteínas de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO: 2, 3, 5, 6 ó 7.
8. Proteína de unión recombinante para su uso según la reivindicación 6, en la que el resto de polietilenglicol tiene un peso molecular de 20 kDa.
9. Proteína de unión recombinante para su uso según la reivindicación 1, en la que la proteína de unión comprende la proteína de repeticiones de anquirina de SEQ ID NO:3 en la que el tior de la Cys C-terminal de la proteína de repeticiones de anquirina se conjuga además con un polietilenglicol acoplado a maleimida.
10. Proteína de unión recombinante para su uso según la reivindicación 9, en la que el 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.
11. Proteína de unión recombinante para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la proteína de unión se administra con un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable, en la que el portador es preferiblemente PBS.
12. Proteína de unión recombinante para su uso según la reivindicación 11, en la que la proteína de unión ha de administrarse mediante inyección intravítrea.
13. Proteína de unión recombinante para su uso según la reivindicación 1, en la que el paciente tiene una disminución de menos del 20% en el área de 1 mm² central de la mácula después de 3 inyecciones intravítreas de ranibizumab, bevacizumab, aflibercept o pegaptanib.

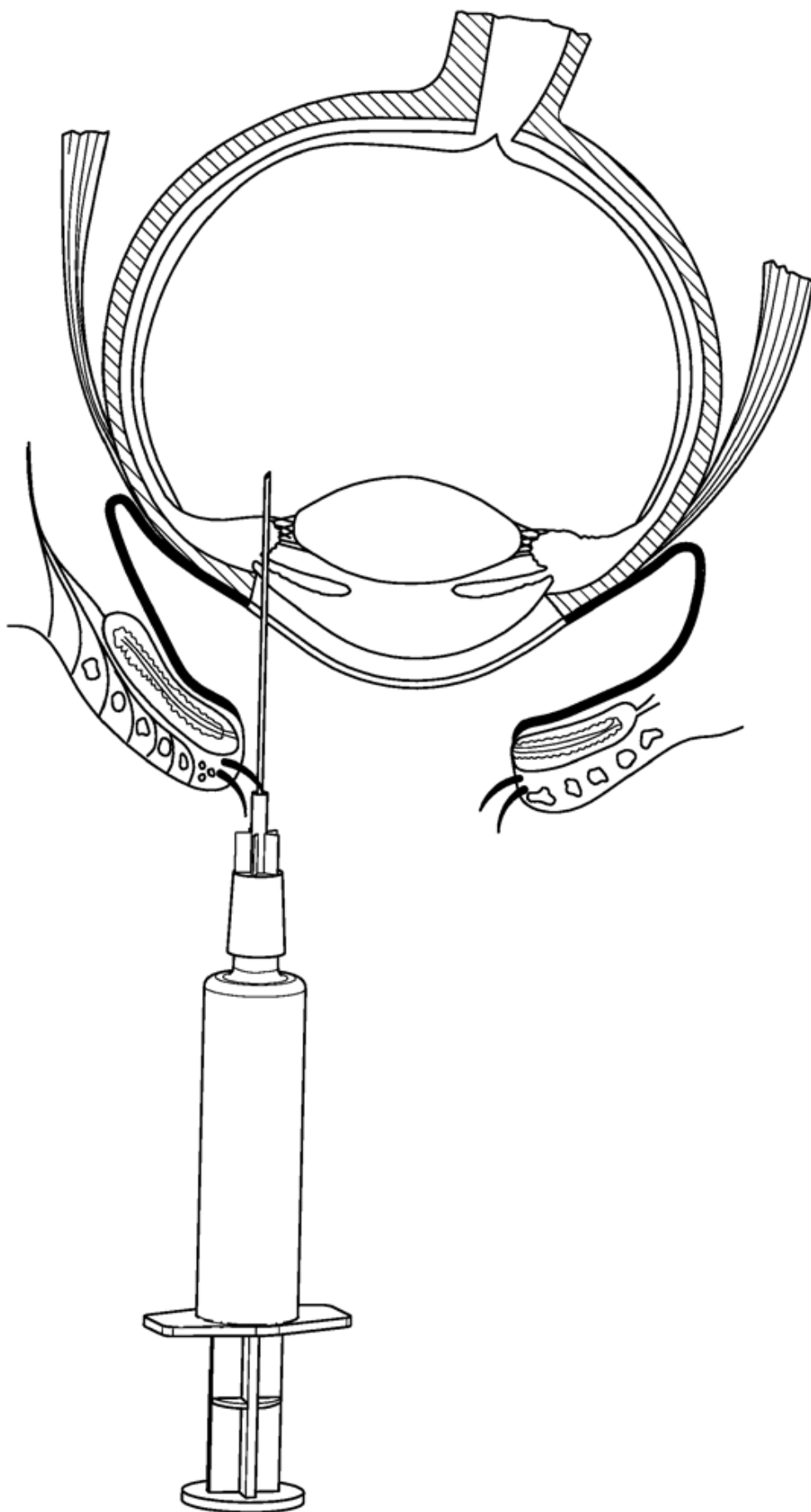


FIG. 1

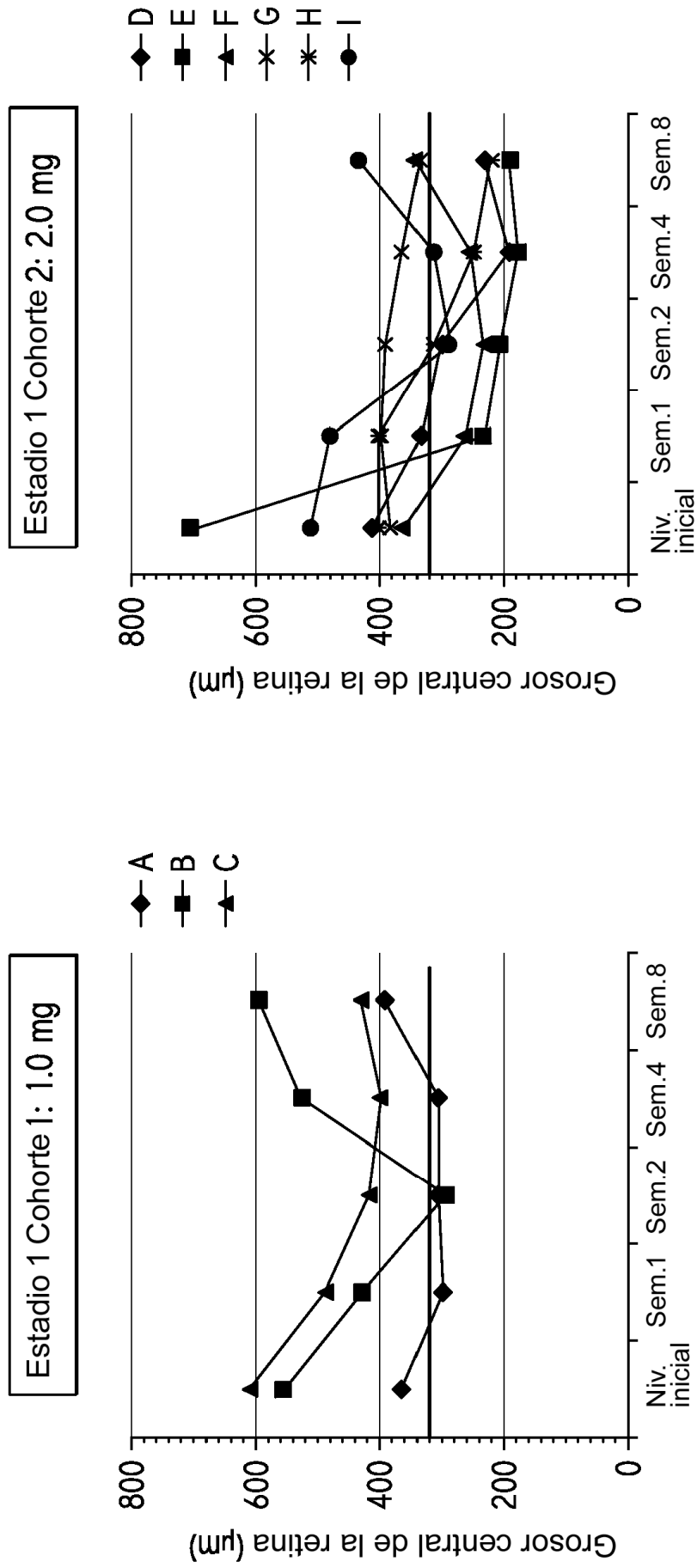


FIG. 2A

FIG. 2B

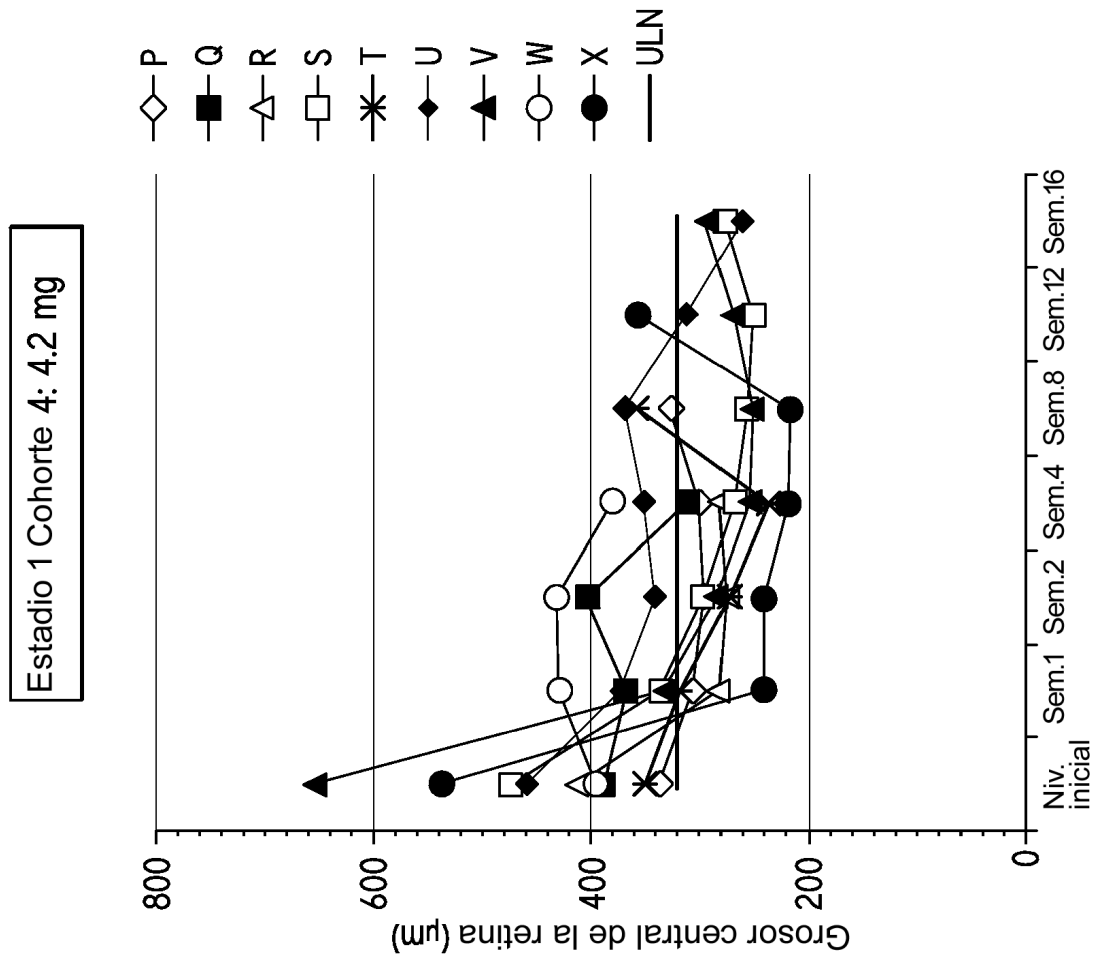


FIG. 3B

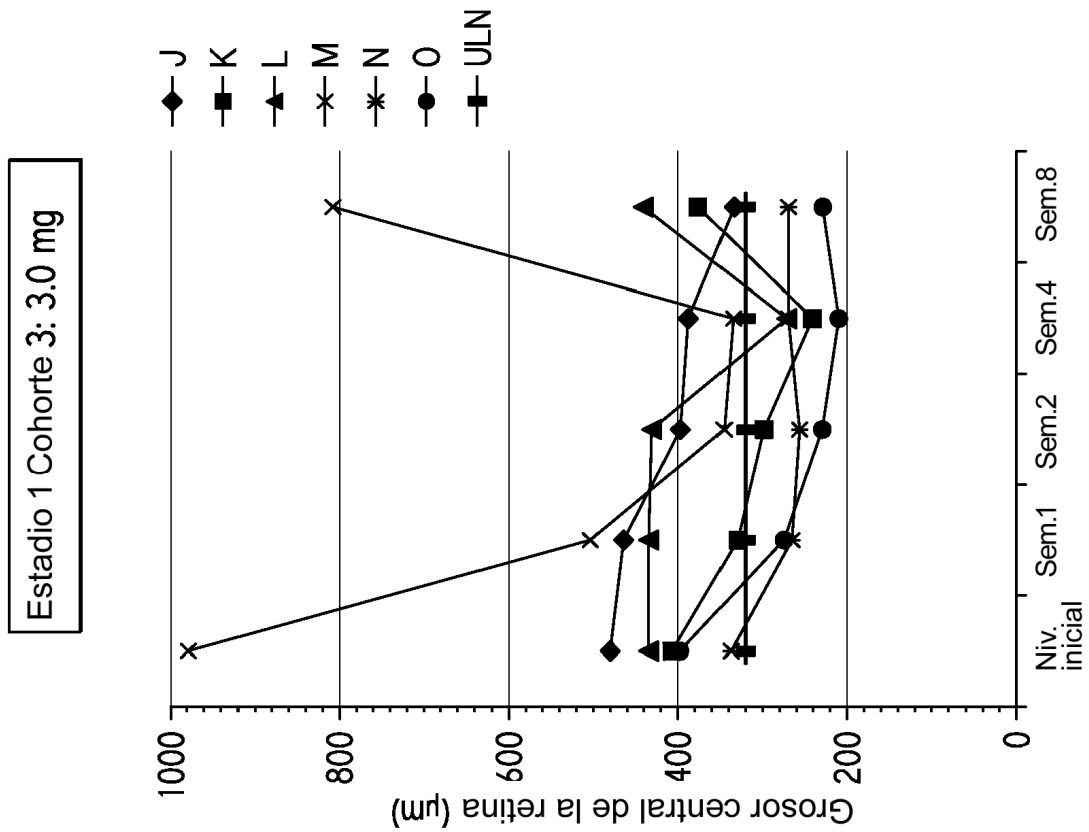


FIG. 3A

Duración del efecto del tratamiento:
Dependiente de la semivida vítrea y la afinidad de unión a VEGF

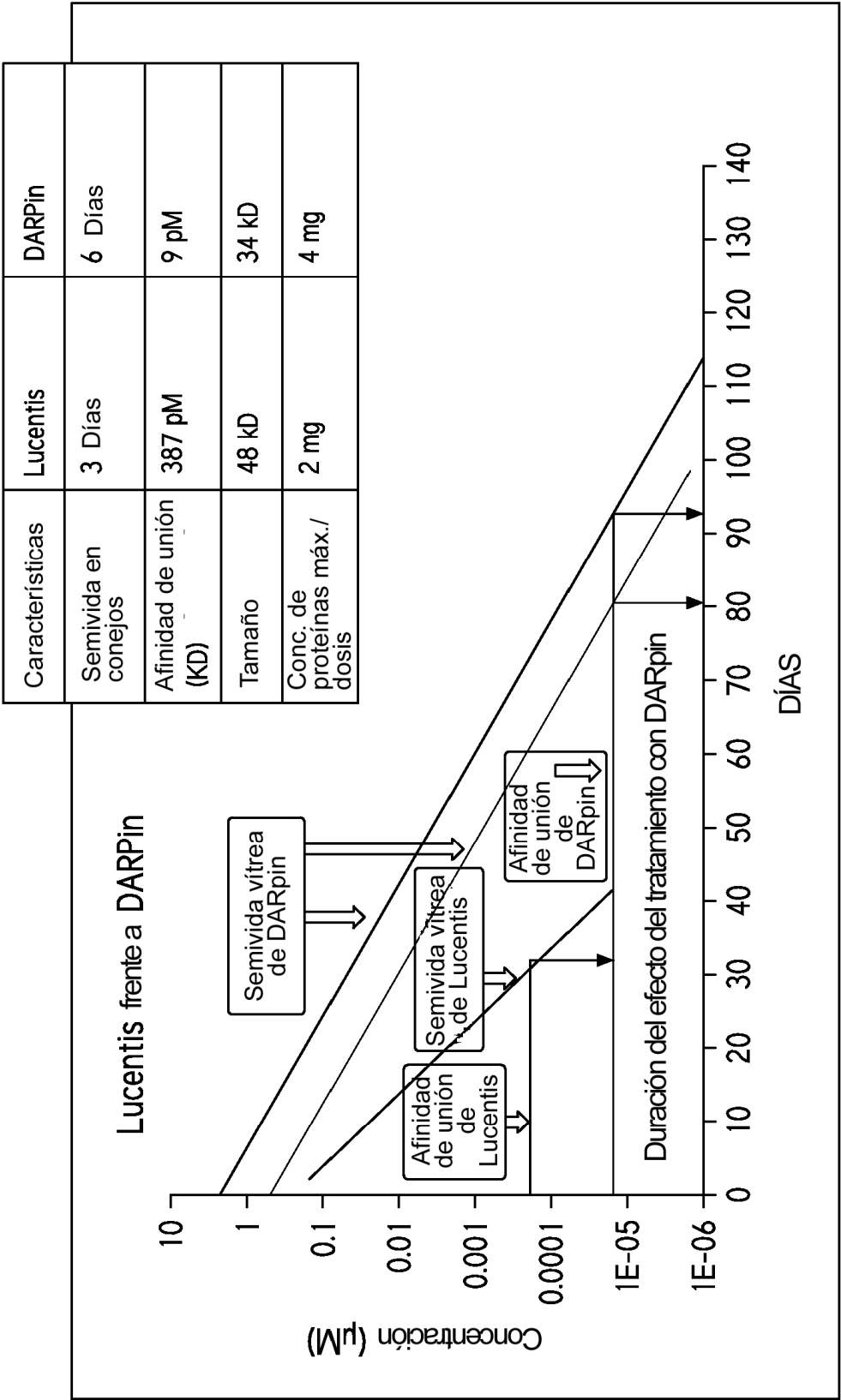


FIG. 4