

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 478**

51 Int. Cl.:

C07K 14/475 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 9/14 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.02.2014 PCT/AU2014/000114**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2014 WO14124487**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2014 E 14752057 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 2956476**

54 Título: **Moléculas de unión a ligando y usos de las mismas**

30 Prioridad:

18.02.2013 US 201361765841 P
14.03.2013 US 201361782376 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.07.2020

73 Titular/es:

VEGENICS PTY LIMITED (100.0%)
Suite 0403 Level 4, 650 Chapel Street
South Yarra, Victoria 3141, AU

72 Inventor/es:

GEROMETTA, MICHAEL y
ADAMS, TIMOTHY

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 771 478 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

Moléculas de unión a ligando y usos de las mismas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a la modulación del crecimiento de vasos, especialmente en oftalmología y oncología.

10 **Listado de secuencias**

El listado de secuencias electrónico forma parte de la descripción.

15 **Antecedentes**

Las proteínas del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por las siglas del inglés *vascular endothelial growth factor*) y sus receptores (VEGFR) desempeñan funciones importantes en la vasculogénesis, en el desarrollo de la vasculatura embrionaria a partir de células endoteliales diferenciadoras tempranas, en la angiogénesis, el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes y en la linfangiogénesis, el proceso de formación de nuevos vasos linfáticos. Las proteínas del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *platelet derived growth factor*) y sus receptores (PDGFR) participan en la regulación de la proliferación, supervivencia y migración celular de diversos tipos de células.

La disfunción del sistema regulador celular endotelial es un rasgo clave del cáncer y de diversas enfermedades asociadas a vasculogénesis, angiogénesis y linfangiogénesis anómalas.

La angiogénesis se produce en el desarrollo embrionario y en el crecimiento, reparación y regeneración de tejido normal, en el ciclo reproductor femenino, en el establecimiento y mantenimiento del embarazo, en la reparación de heridas y fracturas. Además de la angiogénesis, que tiene lugar en un individuo sano, los acontecimientos angiogénicos intervienen en diversos procesos patológicos, principalmente en el crecimiento de tumores y metástasis y otras afecciones en las que se incrementa la proliferación de vasos sanguíneos, especialmente del sistema microvascular, tales como retinopatía diabética, psoriasis y artropatías. La inhibición de la angiogénesis es útil en la prevención o alivio de estos procesos patológicos o en la disminución de su progresión.

En el documento US2006110364 de Harding et al., se desvelan vectores de virus que codifican el polipéptido de SEQ ID NO: 2 (572 restos), que es el dominio extracelular (DEC) del VEGFR3 humano fusionado con la región Fc de la IgG humana (figura 1). El polipéptido tiene una identidad de 97,1 % sobre 548 restos con la SEQ ID NO: 3 de la presente divulgación, incluso tiene la subsecuencia NDT en las posiciones 104-106 de la SEQ ID NO: 2 de la presente divulgación. Las enfermedades con (linf)angiogénesis o metástasis linfática se pueden tratar con los vectores.

Aunque las terapias dirigidas al bloqueo de la señalización VEGF/PDGF a través de sus receptores han mostrado ser prometedoras para la inhibición de la angiogénesis y el crecimiento de tumores, sigue habiendo la necesidad de compuestos y terapias nuevos o mejorados para el tratamiento de estas enfermedades.

45 **Sumario de la invención**

La presente invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se refiere a nuevas composiciones y a nuevos métodos de uso de las mismas para la inhibición de la angiogénesis aberrante, la linfangiogénesis o ambas, y para la inhibición de otros efectos del factor C de crecimiento endotelial vascular (VEGF-C) y del factor D de crecimiento endotelial vascular (VEGF-D), pudiendo unirse, cada uno de ellos, a al menos una tirosina cinasa receptora del factor de crecimiento (es decir, VEGFR-2 o VEGFR-3) y estimular su fosforilación. Las composiciones de la invención incluyen moléculas de unión a ligando que se unen a uno o a ambos de VEGF-C humano y VEGF-D humano. En algunas realizaciones, la molécula de unión a ligando comprende un polipéptido, por ejemplo, un fragmento de un dominio extracelular (DEC) de una tirosina cinasa receptora del factor de crecimiento. El fragmento puede variar desde la secuencia natural en maneras que no eliminan la unión del factor de crecimiento, y el fragmento se diseña, preferentemente, de las maneras descritas en el presente documento para mejorar sus propiedades como una sustancia terapéutica para su administración a sujetos/pacientes que lo necesiten.

La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican las moléculas de unión a ligando. Los ácidos nucleicos son útiles para expresar las moléculas peptídicas de unión a ligando y, en algunas realizaciones, también son útiles como una sustancia terapéutica para obtener la expresión de las moléculas polipeptídicas de unión a ligando *in vivo*, en una forma biológicamente activa.

La administración de las composiciones que comprenden una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento (o un polinucleótido que la codifica) a pacientes que lo necesiten, inhibe la estimulación de receptores de

VEGF del factor de crecimiento (por ejemplo, inhibe la fosforilación de los receptores) y de esta manera inhibe las respuestas biológicas mediadas a través de los receptores incluyendo, pero sin limitación, la angiogénesis mediada por VEGFR, la linfangiogénesis o ambas.

5 Los factores C y D de crecimiento endotelial vascular, VEGF-C Y D, se unen con alta afinidad a, y estimulan la fosforilación de, al menos un receptor de VEGF (o un heterodímero receptor) seleccionado de VEGFR-2 y VEGFR-3. Esta afirmación se refiere a propiedades bien conocidas de los factores de crecimiento hacia sus receptores afines, y no pretende ser una característica de por sí limitante de las moléculas de unión a ligando de la invención. Sin embargo, las moléculas de unión a ligando de la invención no solo se unen a sus factores de crecimiento diana. Una
10 molécula de unión a ligando preferida también inhibe uno o varios factores de crecimiento a los que se une para estimular la fosforilación de al menos una de (y preferentemente todas) las tirosina cinasas receptoras a las que se unen uno o varios de los factores de crecimiento. La estimulación de la fosforilación de las tirosina cinasas se mide fácilmente utilizando análisis *in vitro* basados en células y anticuerpos antifosfotirosina (dirigidos contra fosfotirosina). Dado que la fosforilación de las tirosina cinasas receptoras es una etapa inicial en la cascada de señalización, esta
15 es un indicador conveniente de si la molécula de unión a ligando es capaz de inhibir la traducción de señales mediada por factores de crecimiento que conduce a la migración celular, al crecimiento celular y a otras respuestas. Para confirmar las propiedades neutralizantes de los factores de crecimiento de las moléculas de unión a ligando de la invención se pueden utilizar diversos análisis *in vivo* y basados en células.

20 Las moléculas de unión a ligando que son "específicas" para un factor de crecimiento particular, son moléculas de unión a ligando que reconocen específicamente una forma activa del factor de crecimiento (por ejemplo, una forma que se encuentra circulando en el organismo). Preferentemente, las moléculas de unión a ligando también se unen específicamente a otras formas de los factores de crecimiento. Como ejemplo, VEGF-C (y VEGF-D) se traduce como una prepro-molécula con propéptidos extensos amino terminal y carboxilo terminal que se escinden para producir la forma "completamente procesada" de VEGF-C (o de VEGF-D) que une y estimula el VEGFR-2 y el
25 VEGFR-3. Las moléculas de unión a ligando específicas para VEGF-C (o VEGF-D) se unen a al menos la forma completamente procesada de VEGF-C (o VEGF-D), y preferentemente también se unen a formas parcialmente procesadas y a formas no procesadas.

30 En un caso descrito en el presente documento, la molécula de unión a ligando es un polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, que comprende una primera secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80 % o al menos 85 % o al menos 90 % o al menos 92 % o al menos 95 % o al menos 96 % o al menos 97 % o al menos 98 % o al menos 99 %, con la secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 47 a 115 de la SEQ ID NO: 2 o las posiciones 25 a 115 de la SEQ ID NO: 2, con la condición de que las posiciones del polipéptido
35 que corresponden a las posiciones 104 a 106 de la SEQ ID NO: 2, no sean idénticas a N-X-S o a N-X-T (representando X cualquier aminoácido), en donde el polipéptido se une a al menos un polipéptido ligando seleccionado de las familias VEGF o PDGF de factores de crecimiento, tales como VEGF-A (VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C y PDGF-D. La SEQ ID NO: 2 contiene una secuencia de aminoácidos para el VEGFR-3 humano, correspondiendo las posiciones 1 a 24 de la SEQ ID NO: 2 a un supuesto péptido señal y correspondiendo la posición 25 en adelante de la SEQ ID NO: 2, a una supuesta forma madura del receptor que carece de un supuesto péptido señal. Los segmentos anteriores de la SEQ ID NO: 2 se corresponden aproximadamente con, o incluyen, el primer dominio similar a inmunoglobulina del DEC de VEGFR-3 humano ("D1 de VEGFR-3"). Las construcciones que comprenden dominios adicionales similares a Ig de VEGFR-3 u otros receptores, unidos de una manera que da como resultado un polipéptido de unión a ligando, se contemplan de
45 manera específica y las construcciones que unen diferentes ligandos se construyen modificando los componentes receptores utilizados para producir el polipéptido de unión a ligando. En algunas variaciones, el polipéptido de unión a ligando se basa principalmente en el dominio extracelular de VEGFR-3, y en otras realizaciones, el polipéptido de unión a ligando se basa en una fusión de segmentos de otras tirosina cinasas receptoras, tales como VEGFR-1 y/o VEGFR-2 y/o PDGFR- α y/o PDGFR- β . En realizaciones basadas principalmente en VEGFR-3, el al menos un
50 ligando, es un ligando natural para VEGFR-3, tal como el polipéptido VEGF-C o VEGF-D.

En algunos casos, el polipéptido de unión a ligando comprende una segunda secuencia de aminoácidos al menos 80 % o al menos 85 % o al menos 90 % o al menos 92 % o al menos 95 % o al menos 96 % o al menos 97 % o al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 154 a 210 de la
55 SEQ ID NO: 2 o por las posiciones 248 a 314 de la SEQ ID NO: 2, en donde el resto N-terminal de la segunda secuencia de aminoácidos se conecta con el resto C-terminal de la primera secuencia de aminoácidos ya sea directamente o a través de un separador, en donde el polipéptido se une a al menos un polipéptido ligando seleccionado de las familias VEGF o PDGF de factores de crecimiento, tales como las formas humanas de VEGF-A (VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, y PDGF-D. La secuencia de aminoácidos definida por las posiciones del polipéptido que corresponden a las posiciones 154 a 210, corresponde a aproximadamente, o incluye, el segundo dominio similar a inmunoglobulina del DEC de VEGFR-3 humano ("D2 de VEGFR-3"). La secuencia de aminoácidos definida por las posiciones del polipéptido que corresponde a las posiciones 248 a 314, corresponde a aproximadamente, o incluye, el tercer dominio similar a inmunoglobulina del DEC de VEGFR-3 humano ("D3 de VEGFR-3"). Cuando la segunda secuencia de aminoácidos comprende una
65 secuencia de aminoácidos que corresponde a aproximadamente, o que incluye, el dominio D2 de VEGFR-3, se prefiere que el polipéptido de unión a ligando comprenda una tercera secuencia de aminoácidos al menos 80 % o al

menos 85 % o al menos 90 % o al menos 92 % o al menos 95 % o al menos 96 % o al menos 97 % o al menos 98 % o al menos 99 %, idéntica a la secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 248 a 314 de la SEQ ID NO: 2, en donde el resto N-terminal de la tercera secuencia de aminoácidos se conecta con el resto C-terminal de la segunda secuencia de aminoácidos ya sea directamente o a través de un separador, en donde el polipéptido se une a al menos un polipéptido ligando seleccionado de las familias VEGF o PDGF de factores de crecimiento, tales como las formas humanas de VEGF-A (VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, y PDGF-D. En otras palabras, en casos en los que el polipéptido de unión a ligando comprenda secuencias de aminoácidos que correspondan a aproximadamente, o que incluyan, los dominios D1 y D2 de VEGFR-3, se prefiere que el polipéptido de unión a ligando también comprenda una secuencia de aminoácidos que corresponda a aproximadamente, o que incluya, el dominio D3 de VEGFR-3.

En casos en los que el polipéptido de unión a ligando comprenda secuencias de aminoácidos que correspondan aproximadamente a dos o más dominios componentes de VEGFR-3, los dominios componentes se pueden conectar directamente entre sí o se pueden conectar a través de uno o más separadores. Preferentemente, los dominios componentes se conectan a través de uno o más separadores. En un caso, el separador comprende una o más secuencias peptídicas entre los dominios componentes, que tiene(n) una longitud de entre 1 y 100 aminoácidos, preferentemente 1 y 50 aminoácidos. En una realización, el separador entre dos dominios componentes consiste sustancialmente en secuencias peptídicas conectadas de manera natural con el dominio de componente en el VEGFR-3 nativo.

En casos en los que el polipéptido de unión a ligando comprenda secuencias de aminoácidos que correspondan aproximadamente a, o que incluyan, dominios componentes contiguos de VEGFR-3 (por ejemplo, D1-D2 o D1-D2-D3), los dominios componentes están conectados mediante uno o más separadores que comprenden una o más secuencias peptídicas entre los dominios componentes, que tiene(n) una longitud de entre 1 y 100 aminoácidos, preferentemente 1 y 50 aminoácidos. En un caso, el separador entre dos dominios componentes consiste sustancialmente en secuencias peptídicas que corresponden a aquellas que conectan los dominios componentes contiguos respectivos en VEGFR-3 nativo. En algunos casos, el separador entre dos dominios componentes contiguos comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 % o al menos 85 % o al menos 90 % o al menos 92 % o al menos 95 % o al menos 96 % o al menos 97 % o al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos que conecta los dominios contiguos en el VEGFR-3 nativo.

En un caso, cuando el polipéptido de unión a ligando comprende secuencias de aminoácidos que corresponden aproximadamente a, o que incluyen, los dominios D1 y D2 de VEGFR-3, los dominios componentes D1 y D2 están conectados a través de una secuencia de aminoácidos separadora que tiene una identidad de al menos 80 % o al menos 85 % o al menos 90 % o al menos 92 % o al menos 95 % o al menos 96 % o al menos 97 % o al menos 98 % o al menos 99 % con la secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 116 a 153 de la SEQ ID NO: 2. Cuando el polipéptido de unión a ligando comprende secuencias de aminoácidos que corresponden aproximadamente a, o que incluyen, los dominios D1, D2 y D3 de VEGFR-3, los dominios componentes D2 y D3 se conectan a través de una secuencia de aminoácidos separadora que tiene una identidad de al menos 80 % o al menos 85 % o al menos 90 % o al menos 92 % o al menos 95 % o al menos 96 % o al menos 97 % o al menos 98 % o al menos 99 %, con la secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 211 a 247 de la SEQ ID NO: 2.

En algunos casos, el polipéptido de unión a ligando purificado o aislado comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 % o al menos 85 % o al menos 90 % o al menos 92 % o al menos 95 % o al menos 96 % o al menos 97 % o al menos 98 % o al menos 99 %, idéntica a la secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 47 a 210 de la SEQ ID NO: 2, o las posiciones 25 a 210 de la SEQ ID NO: 2 o las posiciones 47 a 314 de la SEQ ID NO: 2, o las posiciones 25 a 314 de la SEQ ID NO: 2 o las posiciones 47 a 752 o 47 a 775 de la SEQ ID NO: 2 o las posiciones 25 a 752 o 25 a 775 de la SEQ ID NO: 2, con la condición de que las posiciones del polipéptido correspondientes a las posiciones 104 a 106 de la SEQ ID NO: 2 no sean idénticas a N-X-S o a N-X-T, en donde el polipéptido se une a al menos un polipéptido ligando seleccionado de las formas humanas de VEGF-A, VEGF-C, VEGF-C, VEGF-D y PIGF. En una variante, el aminoácido correspondiente a la posición 104 de la SEQ ID NO: 2, se deletorea y se sustituye por otro aminoácido (tal como glutamina, aspartato, glutamato, arginina y lisina). Las posiciones 47 a 210 incluyen los dos primeros dominios similares a inmunoglobulina del DEC de VEGFR-3 humano así como la secuencia del DEC de VEGFR-3 entre los dos primeros motivos similares a Ig. Las posiciones 47 a 314 incluyen los tres primeros dominios similares a inmunoglobulina del DEC de VEGFR-3 humano así como la secuencia del DEC de VEGFR-3 entre estos motivos similares a Ig.

De manera más general, un polipéptido de unión a ligando de la divulgación comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 % o al menos 85 % o al menos 90 % o al menos 92 % o al menos 95 % o al menos 96 % o al menos 97 % o al menos 98 % o al menos 99 %, idéntica a un fragmento de la secuencia de aminoácidos de VEGFR-3 expuesta en la SEQ ID NO: 2, en donde el extremo amino terminal del fragmento es cualquier aminoácido seleccionado de las posiciones 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50 de la SEQ ID NO: 2, y en donde el extremo carboxilo terminal del fragmento es cualquier aminoácido seleccionado de las posiciones 110 a 775 de la SEQ ID NO: 2 (por ejemplo, las posiciones 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775) con la condición de que las posiciones del polipéptido correspondientes

a las posiciones 104 a 106 de la SEQ ID NO: 2 no sean idénticas a N-X-S o a N-X-T. Por motivos que serán de inmediato obvios a partir de la descripción del presente documento, la variante permitida no es una variante que introduzca nuevos sequones de glucosilación que no se encuentren en el VEGFR-3 natural

5 En otro caso, la molécula de unión a ligando descrita en el presente documento es un polipéptido de unión a ligando purificado o aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos definida por las posiciones del polipéptido correspondiente a las posiciones 47 a 115 de la SEQ ID NO: 2, 47 a 210 de la SEQ ID NO: 2, 47 a 314 de la SEQ ID NO: 2, 47 a 752 o 47 a 775 de la SEQ ID NO: 2, o 25 a 752 o 25 a 775 de la SEQ ID NO: 2, con la condición de que las posiciones del polipéptido correspondientes a las posiciones 104 a 106 de la SEQ ID NO: 2 no sean idénticas a N-X-S o a N-X-T. En una variante, los aminoácidos que corresponden a la posición 104 de la SEQ ID NO: 2 se delecionan y sustituyen por otro aminoácido (tal como glutamina, aspartato, glutamato, arginina y lisina).

15 En otro caso, la molécula de unión a ligando descrita en el presente documento es un polipéptido de unión a ligando purificado o aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 80 % o al menos 85 % o al menos 90 % o al menos 92 % o al menos 95 % o al menos 96 % o al menos 97 % o al menos 98 % o al menos 99 %, con la secuencia de aminoácidos definida en las posiciones 47 a 115 de la SEQ ID NO: 2, en donde las posiciones del polipéptido que corresponden a las posiciones 104 a 106 de la SEQ ID NO: 2, son un supuesto sequón de glucosilación de VEGFR-3 y en donde dicho supuesto sequón de glucosilación se elimina de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de unión a ligando. El término "eliminado", como se utiliza en este contexto, significa una alteración de la secuencia de aminoácidos primaria en al menos una posición (por sustitución, delección o inserción) para destruir el motivo sequón N-X-T.

25 La invención también incluye construcciones multiméricas de unión a ligando que comprenden dos o más moléculas de unión a ligando como se describe en el presente documento, unidas de manera covalente o no covalente entre sí para formar una estructura dimérica o multimérica. En algunas variantes, la unión se produce entre las secuencias similares a VEGFR-3 de los polipéptidos de unión a ligando; en otras variantes, la unión se produce entre polipéptidos heterólogos unidos a una o ambas de las secuencias similares a VEGFR-3.

30 En el presente documento la referencia a una molécula de unión a ligando o a un polipéptido de unión a ligando descrito en el presente documento, incluye una referencia a variantes de los mismos, como se ha definido anteriormente, con la condición de que dichos polipéptidos o moléculas de unión a ligando (ya sean monoméricas, diméricas o de un multímero superior) contengan al menos un motivo similar a Ig similar o idéntico al motivo 1 similar a Ig de VEGFR-3 (por ejemplo, de aproximadamente 47 a 115 de la SEQ ID NO: 2), con la condición de que las posiciones del polipéptido que corresponden a las posiciones 104 a 106 de la SEQ ID NO: 2 (que representan un sequón de glucosilación ligado a N en la secuencia de VEGFR-3 nativa) no sean idénticas a N-X-S o a N-X-T.

40 En otro aspecto, en el presente documento se describe una molécula de unión a ligando que es un polipéptido de unión a ligando aislado o purificado que comprende el primer dominio similar inmunoglobulina de un polipéptido VEGFR-3 Δ N2. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "polipéptido VEGFR-3 Δ N2" se refiere a un polipéptido que tiene una identidad de al menos 95 % con la secuencia de aminoácidos que define el DEC del VEGFR-3 humano, con la condición de que la parte de la secuencia del polipéptido que corresponde al segundo supuesto sequón de glucosilación, NDT, se mute de manera que ya no se acople con el motivo SEQUÓN N-X-S/T, por ejemplo, debido a la sustitución en una de las posiciones. En algunas realizaciones, el polipéptido purificado comprende los dos primeros dominios similares a inmunoglobulina del polipéptido VEGFR-3 Δ N2, y preferentemente incluye la secuencia de VEGFR-3 entre estos dominios. En algunas realizaciones, el polipéptido purificado comprende los tres primeros dominios similares a inmunoglobulina del polipéptido VEGFR-3 Δ N2, y preferentemente incluye la secuencia de VEGFR-3 entre estos dominios.

50 En otro caso adicional, en el presente documento se describe una molécula de unión a ligando que es un polipéptido que comprende un fragmento del DEC del VEGFR-3 humano, fusionado a un compañero de fusión en donde la secuencia de aminoácidos del fragmento del DEC del VEGFR-3 se modificada a partir del VEGFR-3 natural para eliminar el segundo supuesto sequón de glucosilación ligado a N del VEGFR-3 natural, en donde el polipéptido es soluble en suero humano y se une al VEGF-C humano o al VEGF-D humano; y en donde el compañero de fusión mejora la solubilidad o la semivida en suero del fragmento del DEC (por ejemplo, en comparación con un fragmento idéntico que no esté fusionado a un compañero de fusión). En algunos casos, el compañero de fusión es un polipéptido heterólogo.

60 En algunos casos, el polipéptido de unión a ligando o la molécula de unión a ligando se une al VEGF-C humano o al VEGF-D humano. En algunos casos, el polipéptido de unión a ligando o la molécula de unión a ligando inhibe la unión de VEGF-C o VEGF-D con VEGFR-3 o inhibe la estimulación de VEGFR-3, mediada por VEGF-C o VEGF-D, en una célula que expresa en su superficie VEGFR-3. La inhibición de la estimulación se puede demostrar, por ejemplo, midiendo la fosforilación del receptor o midiendo el crecimiento celular *in vitro* o *in vivo* o midiendo *in vivo* el crecimiento de vasos u otros cambios a nivel tisular.

65 La molécula de unión a ligando une, preferentemente, el VEGF-C humano con una K_d de aproximadamente 1 nM o

menor (por ejemplo, 500 pM, 400 pM, 300 pM, 200 pM, 100 pM, 50 pM, 10 pM o menor). La molécula de unión a ligando une, preferentemente, el VEGF-D humano con una K_d de aproximadamente 5 nM o menor (por ejemplo, 2 nM, 1 nM, 500 pM, 400 pM, 300 pM, 200 pM, 100 pM, 50 pM, 10 pM o menor).

- 5 En otro caso, la molécula de unión a ligando purificada o aislada comprende los aminoácidos 22 a 290 de la SEQ ID NO: 3, los aminoácidos 23 a 290 de la SEQ ID NO: 3, los aminoácidos 23 a 537 de la SEQ ID NO: 3 o los aminoácidos 22 a 537 de la SEQ ID NO: 3. En otras variantes adicionales, la molécula comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 % o al menos 85 % o al menos 90 % o al menos 92 % o al menos 95 % o al menos 96 % o al menos 97 % o al menos 98 % o al menos 99 %, idéntica a cualquiera de las secuencias anteriores, con la condición de que la secuencia del polipéptido que corresponde con (que se alinea con) el sequon N2 de VEGFR-3 no sea una secuencia de glucosilación.

15 Como se describe en el presente documento, las moléculas de unión a ligando pueden modificarse químicamente (por ejemplo, glucosilación, pegilación, etc.) para impartir características deseadas y al mismo tiempo mantener sus propiedades de unión de factor de crecimiento específicas. Los dominios I-III de VEGFR-3 similares a Ig comprenden cinco supuestos sitios de N-glucosilación (denominados en el presente documento sequones N1, N2, N3, N4 y N5 de VEGFR-3, respectivamente). N1 corresponde a los aminoácidos 33 a 35 de la SEQ ID NO: 2; N2 corresponde a los aminoácidos 104 a 106 de la SEQ ID NO: 2; N3 corresponde a los aminoácidos 166 a 168 de la SEQ ID NO: 2; N4 corresponde a los aminoácidos 251 a 253 de la SEQ ID NO: 2 y N5 corresponde a los aminoácidos 299 a 301 de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento comprende una modificación en el sequón N2 de la molécula. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el aminoácido en la molécula de unión a ligando que corresponde a la posición 104 de la SEQ ID NO: 2 está deletado y reemplazado por otro aminoácido. Se prefieren sustituciones conservativas. En algunas realizaciones, el aminoácido que corresponde a la posición 104 de la SEQ ID NO: 2 está deletado y reemplazado por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glutamina, aspartato, glutamato, arginina y lisina. En realizaciones en las que el sequón N2 de la SEQ ID NO: 2 está modificado como se ha descrito anteriormente, los sequones N1, N3, N4 y N5 de la SEQ ID NO: 2 no están preferentemente alterados en términos de secuencia de aminoácidos.

30 Como se describe en el presente documento, las moléculas de unión a ligando se pueden conectar a un compañero de fusión ya sea directamente o mediante un enlazador. Un compañero de fusión puede ser cualquier componente heterólogo que mejore la funcionalidad de la molécula de unión a ligando. Un compañero de fusión de péptido ejemplar comprende un fragmento de dominio constante de inmunoglobulina (Fc). En algunas realizaciones, el fragmento constante de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, o al menos 85%, o al menos 90%, o al menos 92%, o al menos 95%, o al menos 96%, o al menos 97%, o al menos 98% o al menos 99% de identidad o que tiene 100% de identidad con los aminoácidos 306 a 537 de la SEQ ID NO: 3.

40 Como se describe en el presente documento, las moléculas de unión a ligando pueden modificarse químicamente, por ejemplo, para facilitar la conexión a un compañero de fusión (tal como, por ejemplo, un péptido heterólogo) o impartir características deseadas (tales como, por ejemplo, incrementar la semivida en suero, incrementar la solubilidad en un medio acuoso y permitir el direccionamiento hacia una población de células específica, por ejemplo células tumorales o células retinianas).

45 En algunas realizaciones, una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento comprende opcionalmente al menos una fracción de PEG unida a la molécula. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el PEG de aproximadamente 20 a 40 kDa se une al extremo amino terminal de la molécula de unión a ligando.

50 En algunas realizaciones, una molécula de unión a ligando como se describe en el presente documento, comprende opcionalmente un enlazador que conecta el compañero de fusión, tal como, por ejemplo, un péptido heterólogo, con el polipéptido de unión a ligando, tal como la secuencia enlazadora del factor Xa PIEGRGGGG (SEQ ID NO: 4). En otras realizaciones, la molécula de unión a ligando comprende un polipéptido en el que un aminoácido C-terminal del polipéptido de unión a ligando, se une directamente a un aminoácido N-terminal del compañero de fusión de péptido heterólogo por un enlace peptídico. En algunas realizaciones, el polipéptido de unión a ligando y el péptido heterólogo se unen (directamente o a través de un polipéptido enlazador) mediante un enlace amida para formar una sola cadena polipeptídica.

55 En algunas variantes, la molécula de unión a ligando comprende un péptido señal que dirige la secreción de la molécula desde una célula que expresa la molécula.

60 Los ácidos nucleicos (polinucleótidos) de la invención, incluyen ácidos nucleicos que codifican moléculas polipeptídicas de unión a ligando que pueden utilizarse para aplicaciones tales como genoterapia y expresión recombinante *in vitro* de moléculas polipeptídicas de unión a ligando. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos están purificados o aislados. En algunas realizaciones los polinucleótidos comprenden además una secuencia promotora conectada operativamente a una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido, en donde la secuencia promotora promueve la transcripción de la secuencia que codifica el polipéptido en una célula hospedadora. Los polinucleótidos también comprenden una secuencia de señal de poliadenilación. En algunas

variantes, el ácido nucleico tiene una secuencia nucleotídica codificante similar a la de un ácido nucleico que codifica el VEGFR-3 humano natural. Por ejemplo, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos codificante que tiene una identidad de al menos 80 % o al menos 85 % o al menos 90 % o al menos 92 % o al menos 95 % o al menos 96 % o al menos 97 % o al menos 98 % o al menos 99 %, con la secuencia de VEGFR-3 humano expuesta en la SEQ ID NO: 1 o con un fragmento de la misma. Como ejemplo, en el contexto de una secuencia de nucleótidos que codifica los aminoácidos 47 a 314 de la SEQ ID NO: 2, modificada en el secuón N2, un ácido nucleico ejemplar comprende una secuencia de nucleótidos codificante que tiene una identidad de al menos 80 % o al menos 85 % o al menos 90 % o al menos 92 % o al menos 95 % o al menos 96 % o al menos 97 % o al menos 98 % o al menos 99 %, con la secuencia VEGFR-3 humana expuesta en las posiciones 157 a 961 de la SEQ ID NO: 1, que corresponde a los codones 47 a 314.

Los vectores que comprenden polinucleótidos son también aspectos de la invención. Estos vectores pueden comprender una secuencia de control de expresión conectada operativamente a la secuencia que codifica el polipéptido. En algunas variantes, el vector se selecciona para optimizar la expresión recombinante *in vitro* en una célula hospedadora seleccionada, tal como una célula hospedadora eucariota. En algunas variantes, el vector se selecciona para el suministro *in vivo*. Por ejemplo, el vector puede seleccionarse del grupo que consiste en un vector de lentivirus, un vector vírico adenoasociado, un vector adenovírico, un vector liposómico y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el vector comprende un adenovirus deficiente en replicación, comprendiendo dicho adenovirus el polinucleótido conectado operativamente a un promotor y flanqueado por secuencias polinucleotídicas adenovíricas.

Las células hospedadoras que comprenden los polinucleótidos, los vectores y otros ácidos nucleicos, y métodos para el uso de los mismos, para expresar y aislar las moléculas de unión a ligando, son también aspectos de la invención. Específicamente se contemplan células hospedadoras eucariotas, que incluyen células de ovario de hámster chino (CHO, *Chinese Hamster Ovary*) y otras líneas celulares de mamífero que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido de unión a ligando o una molécula de unión a ligando, descritos en el presente documento. En algunas variantes, la línea celular se selecciona o diseña para introducir una glucosilación humana o similar a humana en sequones de glucosilación de polipéptidos producidos en las células.

También se contemplan métodos de producción de un polipéptido o de una molécula de unión a ligando descritos en el presente documento. (Dichos métodos también se pueden describir como usos de los polinucleótidos o células de la invención). En un caso, el método comprende cultivar una célula que se ha transformado o transfectado con un polinucleótido o vector descrito en el presente documento, en condiciones en las que se expresa el polipéptido de unión a ligando o la molécula de unión a ligando codificada por el polinucleótido. En algunas realizaciones, el método comprende además, purificar o aislar el polipéptido de unión a ligando o la molécula de unión a ligando, de la célula o del medio de cultivo de la célula. En algunas realizaciones, el método incluye además unir una o más fracciones polietilenglicol (PEG) o de otro tipo, con el polipéptido expresado y purificado/aislado.

La invención también incluye composiciones que comprenden un polipéptido, una molécula de unión a ligando o un ácido nucleico que la codifica, junto con un medio diluyente, adyuvante o transportador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición se formula para la administración local en los ojos (por ejemplo, una formulación tópica, tal como una pomada o gotas oculares, o una formulación adecuada para la inyección intravítrea). En otras realizaciones, la composición se formula para la administración local a un tumor o al órgano o tejido de cual se ha extirpado quirúrgicamente el tumor, por ejemplo, mediante inyección intravenosa o inyección directamente en el tejido afectado, o aplicación mediante un dispositivo durante la resección de un tumor.

La divulgación también incluye métodos de uso de materiales descritos en el presente documento (polipéptidos, moléculas y construcciones, polinucleótidos y vectores, células transformadas, composiciones) para inhibir el crecimiento de vasos (vasos sanguíneos y/o linfáticos) en un contexto terapéutico y profiláctico. De manera alternativa, los métodos de uso, descritos en el presente documento, se pueden caracterizar como usos de los diversos materiales para la indicación establecida. Como ejemplos de sujetos para el tratamiento se incluyen seres humanos y otros primates, ganado (por ejemplo, bovino, equino, porcino), animales de zoológico (por ejemplo, felinos, caninos, paquidermos, cérvidos) mascotas (por ejemplo, perros, gatos) y roedores.

En algunas variantes, la divulgación incluye un método de inhibición de la neovascularización en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto cualquiera de los materiales o composiciones anteriores, en una cantidad eficaz para inhibir la neovascularización en el sujeto. Como ejemplos de afecciones neovasculares patógenas se las oculares y la neovascularización tumoral.

En algunas variantes, la divulgación incluye un método de inhibición de la neovascularización retiniana en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto materiales o composiciones como se describe en el presente documento en una cantidad eficaz para inhibir la neovascularización retiniana en el sujeto. En variantes relacionadas, la divulgación incluye un método de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno ocular asociado a neovascularización retiniana, comprendiendo el método administrar al sujeto un material o composición como se describe en el presente documento y como se resume anteriormente, en una cantidad eficaz para inhibir la neovascularización retiniana en el sujeto. Por ejemplo, una composición como se describe en el presente

documento, se administra por vía local al ojo del sujeto, tal como mediante gotas oculares u otra administración tópica, por administración en la subconjuntiva (por ejemplo, inyección), por inyección intravítrea o por implante intravítreo.

- 5 Preferentemente, las composiciones se administran en el ojo de un sujeto en una cantidad y a una frecuencia de dosificación repetida y duración eficaz para inhibir VEGF-C y/o VEGF-D para la unión con, o estimulación de, VEGFR-2 y/o VEGFR-3 expresado en células y vasos oculares. Este efecto beneficioso se puede medir en términos de ralentización o detención del deterioro/progreso en afecciones oculares patológicas (tales como degeneración macular, retinopatía diabética y telangiectasia macular) o mejora de los síntomas clínicos. El efecto beneficioso también es observable en términos de control del crecimiento de vasos en el tejido diana y alrededor del mismo.

Los métodos y usos descritos en el presente documento se pueden llevar a la práctica en combinación con agentes o tratamientos terapéuticos adicionales (por ejemplo, formas de radiación) como se describe con detalle en el presente documento.

- 15 Los métodos (o usos) de la divulgación descritos en el presente documento se pueden llevar a cabo con una o más moléculas de unión a ligando, o con al menos una molécula de unión a ligando en combinación con otra sustancia terapéutica (tal como una sustancia terapéutica de tratamiento habitual del cáncer o de un trastorno del fondo de ojo). En realizaciones en donde las moléculas de unión a ligando son para el tratamiento de un trastorno de fondo de ojo, se contemplan terapias adicionales que incluyen tratamiento con láser focal (o fotocoagulación), tratamiento por dispersión láser (o fotocoagulación panretiniana) y vitrectomía. En algunos casos, los antibióticos también se administran al sujeto que recibe el tratamiento.

- 25 En realizaciones en donde las moléculas de unión a ligando descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento de cáncer, las sustancias terapéuticas de tratamiento habitual contempladas incluyen ARN antisentido, ARN de interferencia, anticuerpos biespecíficos, otros tipos de anticuerpos y moléculas pequeñas, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos que se dirigen a factores de crecimiento y/o a sus receptores. Una citocina, un agente radioterapéutico o una radioterapia también se utiliza en combinación con una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento. El agente quimioterapéutico o el agente radioterapéutico puede ser un miembro de la clase de agentes que incluyen un antimetabolito; un agente que daña ADN; una citocina o un factor de crecimiento; un fármaco que se une de manera covalente a ADN; un inhibidor de topoisomerasa; un agente antimitótico; un antibiótico antitumoral, un agente de diferenciación; un agente alquilante; un agente metilante; una hormona o antagonista de hormona; una mostaza nitrogenada; un radiosensibilizante y un fotosensibilizante. Los ejemplos específicos de estos agentes se describen en otra parte en la solicitud. Las politerapias son, preferentemente, sinérgicas, aunque no es preciso que sean así y también se considera que las terapias aditivas son aspectos de la invención.

- 40 Además de utilizarse en métodos, las moléculas de unión a ligando se pueden combinar o envasar con otras sustancias terapéuticas en kits o como monodosis. Las enfermedades neoplásicas no son las únicas enfermedades que pueden tratarse con las moléculas de unión a ligando. Las moléculas de unión a ligando se pueden utilizar como sustancias terapéuticas para cualquier enfermedad asociada a angiogénesis o linfangiogénesis aberrante.

La divulgación se describe en las siguientes realizaciones adicionales:

- 45 Un polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 95 % con la secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 47 a 115 de la SEQ ID NO: 2, con la condición de que las posiciones del polipéptido que corresponden a las posiciones 104 a 106 de la SEQ ID NO: 2, no sean idénticas a N-X-S o a N-X-T, en donde el polipéptido se une a al menos un polipéptido ligando seleccionado de las formas humanas de VEGF-C, VEGF-D y PIGF.

- 50 El polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, de conformidad con el párrafo [0048], que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 95 % con la secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 47 a 210 de la SEQ ID NO: 2, con la condición de que las posiciones del polipéptido que corresponden a las posiciones 104 a 106 de la SEQ ID NO: 2, no sean idénticas a N-X-S o a N-X-T.

- 55 El polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, de conformidad con el párrafo [0048], que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 95 % con la secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 47 a 314 de la SEQ ID NO: 2, con la condición de que las posiciones del polipéptido que corresponden a las posiciones 104 a 106 de la SEQ ID NO: 2 no sean idénticas a N-X-S o a N-X-T.

- 60 El polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, de conformidad con el párrafo [0048], que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 95 % con la secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 47 a 752 de la SEQ ID NO: 2, con la condición de que las posiciones del polipéptido que corresponden a las posiciones 104 a 106 de la SEQ ID NO: 2, no sean idénticas a N-X-S o a N-X-T.

- 65 El polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, según cualquiera de los párrafos [0048] a [0051], que conserva cuatro sitios sequón de N-glucosilación que corresponden a las posiciones 33 a 35 de la SEQ ID NO: 2,

ES 2 771 478 T3

posiciones 166 a 168 de la SEQ ID NO: 2, posiciones 251 a 253 de la SEQ ID NO: 2 y posiciones 299 a 301 de la SEQ ID NO: 2.

- 5 El polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, según el párrafo [0052], que está glucosilado en sus cuatro sitios sequón de N-glucosilación.
- El polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, según uno cualquiera de los párrafos [0048] a [0053] que es un polipéptido soluble.
- 10 El polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, según uno cualquiera de los párrafos [0048] a [0054], que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 47 a 115 de la SEQ ID NO: 2, las posiciones 47 a 210 de la SEQ ID NO: 2, las posiciones 47 a 314 de la SEC IED NO: 2 o las posiciones 47 a 752 de la SEQ ID NO: 2, con la condición de que las posiciones del polipéptido que corresponden a las posiciones 104 a 106 de la SEQ ID NO: 2 no sean idénticas a N-X-S o a N-X-T.
- 15 El polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, según uno cualquiera de los párrafos [0048] a [0055] que se une a VEGF-C humano o a VEGF-D humano.
- 20 El polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, según el párrafo [0056], que inhibe la unión de VEGF-C o VEGF-D con VEGFR-3 o que inhibe la estimulación mediada por VEGF-C o VEGF-D de VEGFR-3 en una célula que expresa VEGFR-3 en su superficie.
- 25 El polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, según uno cualquiera de los párrafos [0048] a [0057], que se une VEGF-C humano con una Kd de 1 nM o menor.
- El polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, según uno cualquiera de los párrafos [0048] a [0057], que se une VEGF-D humano con una Kd de 5 nM o menor.
- 30 El polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, según uno cualquiera de los párrafos [0048] a [0059], en donde el aminoácido en el polipéptido que corresponde a la posición 104 de la SEQ ID NO: 2 se deleciona o reemplaza por otro aminoácido.
- 35 El polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, según el párrafo [0055], en donde el aminoácido en la posición 104 de la SEQ ID NO: 2 se deleciona o reemplaza por otro aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glutamina, aspartato, glutamato, arginina y lisina.
- 40 El polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, según uno cualquiera de los párrafos [0048] a [0056], en donde el polipéptido comprende los aminoácidos 23 a 290 de la SEQ ID NO: 3.
- El polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, según uno cualquiera de los párrafos [0048] a [0062], que comprende además un péptido señal.
- 45 El polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, según uno cualquiera de los párrafos [0048] a [0063], que comprende además al menos una fracción de polietilenglicol unida al polipéptido.
- El polipéptido de unión a ligando, purificado o aislado, según el párrafo [0064], que comprende polietilenglicol de aproximadamente 20 a 40 kDa unido al extremo amino terminal del polipéptido.
- 50 Una molécula de unión a ligando que comprende el polipéptido de unión a ligando según uno cualquiera de los párrafos [0048] a [0065] conectado a un péptido heterólogo.
- La molécula de unión a ligando según el párrafo [0066], en donde el péptido heterólogo comprende un fragmento de dominio constante de inmunoglobulina.
- 55 La molécula de unión a ligando según el párrafo [0066], en donde el fragmento de dominio constante de inmunoglobulina es un fragmento de dominio constante de IgG.
- 60 La molécula de unión a ligando según el párrafo [0067], en donde el fragmento constante de inmunoglobulina comprende los aminoácidos 306 a 537 de la SEQ ID NO: 3.
- La molécula de unión a ligando según el párrafo 19, en donde la molécula de unión a ligando comprende los aminoácidos 22 a 537 de la SEQ ID NO: 3.
- 65 La molécula de unión a ligando según uno cualquiera de los párrafos [0066] a [0070], que opcionalmente comprende un enlazador que conecta el péptido heterólogo con el polipéptido de unión a ligando.

La molécula de unión a ligando según uno cualquiera de los párrafos [0066] a [0070] que comprende un polipéptido en el que un aminoácido C-terminal del polipéptido de unión a ligando está unido directamente a un aminoácido N-terminal del péptido heterólogo por un enlace peptídico.

- 5 La molécula de unión a ligando según uno cualquiera de los párrafos [0066] a [0072], que comprende además un péptido señal que dirige la secreción de la molécula desde una célula que expresa la molécula.

La molécula de unión a ligando según el párrafo [0066], en donde la molécula comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3.

- 10 La molécula de unión a ligando según uno cualquiera de los párrafos [0066] a [0070], en donde el polipéptido de unión a ligando y el péptido heterólogo están unidos por un enlace amida para formar una sola cadena polipeptídica.

- 15 El polipéptido de unión a ligando según uno cualquiera de los párrafos [0048] a [0065] o la molécula de unión a ligando según uno cualquiera de los párrafos 19 a 28, que comprende además un marcador detectable.

Un conjugado que comprende el polipéptido de unión a ligando según uno cualquiera de los párrafos 1 a 18 o la molécula de unión a ligando según uno cualquiera de los párrafos [0066] a [0075] y un agente quimioterapéutico.

- 20 Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos codificante que codifica el polipéptido de unión a ligando según uno cualquiera de los párrafos 1 a 18 o la molécula de unión a ligando según uno cualquiera de los párrafos [0066] a [0075].

- 25 El polinucleótido según el párrafo [0078], que comprende además una secuencia promotora conectada operativamente a la secuencia de nucleótidos codificante para promover la transcripción de la secuencia de nucleótidos codificante en una célula hospedadora.

Un vector que comprende el polinucleótido del párrafo [0078] o del párrafo [0079].

- 30 El vector según el párrafo [0080], que comprende además una secuencia de control de expresión conectada operativamente a la secuencia de nucleótidos codificante.

- 35 El vector según el párrafo [0080], en donde dicho vector se selecciona del grupo que consiste en un vector de lentivirus, un vector vírico adenoasociado, un vector adenovírico, un vector liposómico y combinaciones de los mismos.

- 40 El vector según el párrafo [0080], en donde dicho vector comprende un adenovirus deficiente en replicación, comprendiendo dicho adenovirus el polinucleótido conectado operativamente a un promotor y flanqueado por secuencias polinucleotídicas adenovíricas.

- Una célula o línea celular aislada, transformada o transfectada con un polinucleótido según el párrafo [0078] o [0079] o con un vector según el párrafo [0080] a [0083].

- 45 La célula o línea celular aislada según el párrafo [0084] que es una célula eucariota.

La célula o línea celular aislada según el párrafo [0084] que es una célula humana.

La célula o línea celular aislada según el párrafo [0084], que es una célula de ovario de hámster chino (CHO).

- 50 Un método para producir un polipéptido de unión a ligando, que comprende cultivar una célula, según uno cualquiera de los párrafos [0084] a [0087], en condiciones en las que se exprese el polipéptido de unión a ligando o la molécula de unión a ligando codificada por el polinucleótido.

- 55 El método según el párrafo [0088], que comprende además, purificar o aislar el polipéptido de unión a ligando o la molécula de unión a ligando, de la célula o de un medio de cultivo de la célula.

- 60 Una composición que comprende un polipéptido de unión a ligando purificado o una molécula de unión a ligando purificada, según uno cualquiera de los párrafos [0048] a [0076] y un diluyente, adyuvante, excipiente o transportador farmacéuticamente aceptable.

- Una composición que comprende un polinucleótido o vector según uno cualquiera de los párrafos [0078] a [0083] y un diluyente, adyuvante, excipiente o transportador farmacéuticamente aceptable.

- 65 La composición según el párrafo [0090] o el párrafo [0091], que se formula para administración tópica.

La composición según el párrafo [0092], que está en forma de un sólido, una pasta, una pomada, un gel, un líquido,

un aerosol, un nebulizador, un polímero, una película, una emulsión o una suspensión.

La composición según el párrafo [0090] o el párrafo [0091], que se formula para administración intravítrea.

5 Un método para inhibir la neovascularización en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición según uno cualquiera de los párrafos [0090] a [0094] en una cantidad eficaz para inhibir la neovascularización en el sujeto.

10 Un método para inhibir la neovascularización retiniana en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición según uno cualquiera de los párrafos [0090] a [0094], en una cantidad eficaz para inhibir la neovascularización retiniana en el sujeto.

15 Un método para tratar a un sujeto que tiene un trastorno ocular asociado a neovascularización retiniana, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición según uno cualquiera de los párrafos [0090] a [0095] en una cantidad eficaz para inhibir la neovascularización retiniana en el sujeto.

El uso de una composición según uno cualquiera de los párrafos [0090] a [0094] para inhibir la neovascularización, tal como neovascularización retiniana o neovascularización tumoral, en un sujeto que lo necesite.

20 El método o uso según uno cualquiera de los párrafos [0096] a [0098], en donde la composición se administra por vía local al ojo del sujeto.

El método o uso según el párrafo [0099], en donde la composición se administra por inyección intravítrea.

25 El método o uso según el párrafo [0099], en donde la composición se administra por administración tópica.

El método o uso según uno cualquiera de los párrafos [0096] a [00101], en donde la composición se administra en el ojo del sujeto en una cantidad eficaz para inhibir VEGF-C y/o VEGF-D para unirse con, o estimular, VEGFR-2 y/o VEGFR-3 expresado en las células o vasos del ojo.

30 El método o uso del párrafo [0097] o [0098], en donde el trastorno ocular se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular, retinopatía diabética y telangiectasia macular.

35 El método o uso según uno cualquiera de los párrafos [0096] a [00103], que comprende además administrar un antibiótico al sujeto.

40 El método según el párrafo [00104], en donde el antibiótico se selecciona del grupo que consiste en amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomycin, tobramicina, teicoplanina, vancomicina, azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucozaxilina, meziocilina, nafcilina, penicilina, piperacilina, ticarcilina, bacitracina, colistina, polimixina B, ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, oflazacina, trovafloxacina, mafenida, sulfacetamida, sulfametizol, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim, cotrimoxazol, demeclociclina, soxiciclina, minociclina, oxitetraciclina y tetraciclina.

45 El método o uso según el párrafo [0095] o [0098], en donde al sujeto se le ha diagnosticado un tumor y en donde la composición se administra en una cantidad eficaz para inhibir la neovascularización en el tumor.

El método o uso según el párrafo [00106], en donde la composición se administra por vía local al tumor o al órgano o al tejido del cual se ha extirpado quirúrgicamente el tumor.

50 El método o uso según el párrafo [00106], en donde la composición se administra en una cantidad eficaz para inhibir VEGF-C y/o VEGF-D en el tumor del sujeto para unirse con, o estimular, VEGFR-2 y/o VEGFR-3 expresado en células tumorales.

55 Este sumario de la invención no se pretende que sea limitante o exhaustivo, y se describen realizaciones adicionales en los dibujos y en la descripción detallada, incluyendo los ejemplos. Todas estas realizaciones son aspectos de la invención. Además, por motivos de brevedad, diversos detalles que son aplicables a múltiples realizaciones no se han repetido para cada realización. Las variantes que reflejan combinaciones y reordenaciones de las realizaciones que se describen en el presente documento, se consideran como aspectos de la invención. Además de lo anterior, la invención incluye, como un aspecto adicional, todas las realizaciones de la invención de menor alcance de cualquier manera en comparación con las variantes mencionadas anteriormente de manera específica. Por ejemplo, los aspectos descritos como un género o intervalo, cada subgénero, subintervalo o especie se contempla específicamente como una realización de la invención.

65 **Breve descripción de las figuras**

En la figura 1A se muestran los perfiles FC (farmacocinéticos) de VGX-300 y VGX-301-ΔN2 producidos por expresión transitoria en CHO. En la figura 1B se muestran los perfiles FC de VGX-300 y VGX-301-ΔN2 producidos por expresión transitoria en HEK.

En la figura 2 se demuestra que tanto VGX-300 como VGX-301-ΔN2, se unen específicamente tanto a VEGF-C como a VEGF-D.

En la figura 3 se muestra que VGX-300 bloquea la unión de VEGF-C y VEGF-D y el entrecruzamiento de a) VEGFR-2 y b) VEGFR-3.

En la figura 4 se muestra que VGX-300 y VGX-300-N2 bloquean: a) la unión de VEGF-C y b) la unión de VEGF-D y el entrecruzamiento de VEGFR-3 en un análisis Ba/F3 basado en células. Los puntos de datos representan el promedio de $n \geq 2 \pm DT$ (desviación típica).

En la figura 5 se muestra la farmacocinética y la biodistribución ocular en conejos después de la administración intravítrea.

Descripción detallada

La presente invención se basa, en parte, en investigación que demuestra que los fragmentos del DEC (dominio extracelular) de VEGFR-3 humano, que tienen una o más modificaciones en una región N-glicano del DEC, son capaces de unirse a, y neutralizar, *in vitro*, las formas humanas de VEGF-C y VEGF-D y que también son capaces de inhibir el desarrollo de vasos en modelos animales de degeneración macular relacionada con la edad.

Las tirosina cinasas receptoras del factor de crecimiento generalmente comprenden tres dominios principales: un dominio extracelular (DEC), un dominio transmembrana y un dominio intracelular. El DEC se une a ligandos, el dominio transmembrana ancla el receptor a una membrana celular y el dominio intracelular posee uno o más dominios enzimáticos de tirosina cinasa e interacciona con moléculas de transducción de señal posteriores. Los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) se unen a su ligando a través de sus DEC, que están constituidos por múltiples dominios similares a inmunoglobulina (dominios similares a Ig). Los dominios similares a Ig se identifican en el presente documento utilizando la denominación "D#". Por ejemplo, "D1" se refiere al primer dominio similar a Ig de un DEC receptor particular. "D1-3" se refiere a una construcción que contiene al menos los tres primeros dominios similares a Ig y la secuencia intermedia entre los dominios 1 y 2 y 2 y 3, de una molécula de unión a ligando particular.

El DEC completo de los VEGFR no se requiere para unión con el ligando (factor de crecimiento). El DEC de VEGFR-3 tiene seis dominios similares a Ig intactos y un dominio similar a Ig escindido – el D5 de VEGFR-3 está escindido postraduccionalmente en subunidades unidas a disulfuro abandonando VEGFR-3. Veikkola, T., et al., *Cancer Res.* 60 : 203-212 (2000). En algunas realizaciones, los fragmentos de receptor que comprenden al menos los tres primeros dominios similares a Ig para esta familia son suficientes para la unión con ligando. En los documentos WO2000/023565, WO2000/021560, WO2002/060950 y WO2005/087808 también se desvelan receptores solubles capaces de unir VEGF-C y VEGF-D, inhibiendo de esta manera la actividad o señalización de VEGF-C o VEGF-D mediante VEGFR-3. Los receptores solubles, modificados por el cambio de sequon ΔN2 y opcionalmente otras modificaciones descritas en el presente documento, se contemplan como aspectos de la invención.

En la tabla 1 se definen límites aproximados de los dominios similares a Ig para VEGFR-3 humano. Estos límites son significativos dado que los límites seleccionados se pueden utilizar para formar moléculas de unión a ligando y de esta manera pueden influir en las propiedades de unión de las construcciones resultantes.

Tabla 1: Dominios similares a inmunoglobulina de VEGFR-3 humano

	VEGFR-3 posiciones de la SEQ ID NO: 1	VEGFR-3 posiciones de la SEQ ID NO: 2
D1	158-364	47-115
D2	479-649	154-210
D3	761-961	248-314
D4	1070-1228	351-403
D5	1340-1633	441-538
D6	1739-1990	574-657
D7	2102-2275	695-752

El DEC completo se extiende a aproximadamente la posición 775 de la SEQ ID NO: 2.

Las construcciones de receptor soluble para su uso como una molécula de unión a ligando para las formas humanas de VEGF-C o VEGF-D comprenden preferentemente al menos un dominio similar a Ig de VEGFR-3 como se describe en la tabla 1, o hasta siete. Opcionalmente, la molécula de unión a ligando incluirá secuencias antes del dominio similar a Ig colocadas en el extremo más N-terminal, opcionalmente incluirá secuencias más allá de dominio similar a Ig en el extremo más C-terminal y opcionalmente también incluirá secuencias entre los dominios similares a Ig. También se contemplan variantes, por ejemplo, con una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos de un resto de aminoácido. En algunas realizaciones, la molécula de unión a ligando comprende un fragmento de VEGFR-3 humano que comprende al menos los tres primeros dominios similares a Ig de VEGFR-3

humano.

En algunos casos, la molécula de unión a ligando es un polipéptido que comprende una parte de un DEC de VEGFR-3 humano, en donde la parte se une a una o a ambas formas humanas de VEGF-C y VEGF-D, y comprende al menos el primer, segundo y tercer dominio similar a Ig del DEC de VEGFR-3, en donde la secuencia de aminoácidos del fragmento del DEC de VEGFR-3 está modificada con respecto a la forma natural de VEGFR-3 para eliminar el segundo supuesto sustrato de glucosilación ligado a N de la forma natural de VEGFR-3 y en donde el polipéptido carece de los dominios 4-7 similares a Ig de VEGFR-3 y preferentemente de cualquier dominio transmembrana y preferentemente de cualquier dominio intracelular.

En algunos casos, la molécula de unión a ligando comprende un polipéptido similar o idéntico, en cuanto a la secuencia de aminoácidos, a un polipéptido VEGFR-3 humano (SEQ ID NO: 2) o un fragmento del mismo, con la condición de que las posiciones de la molécula de unión a ligando que corresponden a las posiciones 104 a 106 del polipéptido VEGFR-3 humano expuesto en la SEQ ID NO: 2 no sean idénticas a N-X-S o a N-X-T, en donde la molécula de unión a ligando se une a uno o más factores de crecimiento seleccionados del grupo que consiste en las formas humanas de VEGF-C y VEGF-D. El fragmento comprende mínimamente la suficiente secuencia de VEGFR-3 para unirse al ligando y puede comprender al receptor completo. Se prefieren los fragmentos de DEC. Los polipéptidos preferidos tienen una secuencia de aminoácidos al menos 80 % idéntica al fragmento de unión a ligando de la misma. Son muy preferidos fragmentos que tienen un porcentaje de similitud de, por ejemplo, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 %. También se contemplan fragmentos que tienen un porcentaje de similitud de 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % y 75 %. De manera alternativa, un género de polipéptidos similar se puede definir por la capacidad de codificar polinucleótidos que se hibriden con el complemento de una secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de ADNc que codifica el receptor VEGFR-3.

El término "identidad", como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas polipeptídicas o dos o más moléculas de ácido nucleico, determinadas al comparar las secuencias. En la técnica, el término "identidad" también significa el grado de relación de secuencia de moléculas de ácido nucleico o secuencias de polipéptidos, según sea el caso, determinado por la coincidencia entre cadenas de dos o más nucleótidos o dos o más secuencias de aminoácidos. El término "identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre las más pequeñas de dos o más secuencias con separaciones de alineación (si las hay) resueltas por un modelo matemático o programa informático (es decir, "algoritmo") particular. Los algoritmos apropiados para determinar los porcentajes de identidad de la invención incluyen BLASTP y BLASTN, utilizando los parámetros predefinidos más comunes y aceptados.

También se pueden describir moléculas de unión a ligando que tienen una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de ácidos nucleicos al menos 80 % idéntica a un fragmento de la SEQ ID NO: 1 que codifica un fragmento de unión a de VEGFR-3, con la condición de que las posiciones de la molécula de unión a ligando, que corresponden a las posiciones 104 a 106 del fragmento de unión a ligando codificado de VEGFR-3, no sean idénticas a N-X-S o a N-X-T. Son muy preferidos fragmentos de ácido nucleico que tienen un porcentaje de similitud de, por ejemplo, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100%. También se contemplan fragmentos que tienen un porcentaje de similitud de 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % y 75 %. Por ejemplo, una molécula de unión a ligando preferida comprende una secuencia de aminoácidos que se une a las formas humanas de VEGF-C y/o VEGF-D y que está codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida con el complemento de la SEQ ID NO: 1 en condiciones de rigurosidad moderada o alta descritas en el presente documento.

En algunos casos, la molécula de unión a ligando comprende un polipéptido que comprende un fragmento de VEGFR-3 humano (SEQ ID NO: 2) seleccionado del grupo que consiste en las posiciones 1 a 226 o 25 a 226 de la SEQ ID NO: 2, posiciones 1 a 229 o 25 a 229 de la SEQ ID NO: 2 y posiciones 1 a 329 o 25 a 229 de la SEQ ID NO: 2, con la condición de que las posiciones 104 a 106 del fragmento de unión a ligando codificado de VEGFR-3 no sean idénticas a N-X-S o a N-X-T. En algunos casos, la molécula de unión a ligando es un polipéptido que comprende un fragmento de VEGFR-3 humano (SEQ ID NO: 2) seleccionado del grupo que consiste en las posiciones 47 a 224 de la SEQ ID NO: 2, posiciones 47 a 225 de la SEQ ID NO: 2, posiciones 47 a 226 de la SEQ ID NO: 2, posiciones 47 a 227 de la SEQ ID NO: 2, posiciones 47 a 228 de la SEQ ID NO: 2, posiciones 47 a 229 de la SEQ ID NO: 2, posiciones 47 a 230 de la SEQ ID NO: 2, posiciones 47 a 231 de la SEQ ID NO: 2, posiciones 47 a 232 de la SEQ ID NO: 2, posiciones 47 a 236 de la SEQ ID NO: 2, posiciones 47 a 240 de la SEQ ID NO: 2 y posiciones 47 a 245 de la SEQ ID NO: 2, con la condición de que las posiciones 104 a 106 del fragmento de unión a ligando codificado de VEGFR-3 no sean idénticas a N-X-S o a N-X-T. En algunos casos, la molécula de unión a ligando es un polipéptido que comprende un fragmento de VEGFR-3 humano (SEQ ID NO: 2), seleccionado del grupo que consiste en las posiciones 47 a 314 de la SEQ ID NO: 2, posiciones 47 a 210 de la SEQ ID NO: 2 y posiciones 47 a 247 de la SEQ ID NO: 2, con la condición de que las posiciones 104 a 106 del fragmento de unión a ligando codificado de VEGFR-3 no sean idénticas a N-X-S o a N-X-T.

También pueden describirse moléculas de unión a ligando que tienen una secuencia de aminoácidos que es similar o idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3. Los polipéptidos preferidos tienen una

secuencia de aminoácidos al menos 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3, con la condición de que las posiciones 80 a 82 del polipéptido expuesto en la SEQ ID NO: 3 no sean idénticas a N-X-S o a N-X-T, en donde la molécula de unión a ligando se une a uno o más factores de crecimiento seleccionados del grupo que consiste en las formas humanas de VEGF-C y VEGF-D. Son muy preferidos polipéptidos que tienen un porcentaje de similitud de, por ejemplo, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100%. También se contemplan fragmentos que tienen un porcentaje de similitud de 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % y 75 %. De manera alternativa, un género de polipéptidos similar se puede definir por la capacidad de codificar polinucleótidos que se hibriden con el complemento de una secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de ADNc que codifica el receptor VEGFR-3.

En algunos casos, la molécula de unión a ligando comprende una secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 22 a 290 de la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, la molécula de unión a ligando comprende una secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 23 a 290 de la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, la molécula de unión a ligando comprende los aminoácidos 22 a 537 de la SEQ ID NO: 3, o los aminoácidos 23 a 537 de la SEQ ID NO: 3 o los aminoácidos 1 a 537 de la SEQ ID NO: 3.

La expresión "dominio de componente", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un dominio dentro de una molécula de unión a ligando que procede o se basa en un dominio de proteína dentro de la parte extracelular de una proteína receptora. Por ejemplo, cada dominio de Ig (D1 a D7) de VEGFR-3 y de otros miembros de la familia de tirosina cinasas receptoras (tales como, por ejemplo, VEGFR-1 y VEGFR-2), constituyen dominios de componente. En el presente documento, la referencia a un dominio de componente incluye tanto el dominio natural nativo completo como también sus variantes por inserción, delección y/o sustitución que conservan sustancialmente las características funcionales del dominio intacto. Para un experto en la materia, será de inmediato obvio que se pueden obtener numerosas variantes de los dominios anteriores (por ejemplo, dominios de Ig) que conserven sustancialmente las mismas características funcionales que las del dominio natural.

Los receptores de factor de crecimiento, de los que pueden proceder las moléculas de unión a ligando, incluyen variantes de corte y empalme y variantes alélicas de origen natural. Las variantes alélicas son muy conocidas en la técnica y representan formas alternativas o una secuencia de ácido nucleico que comprende la sustitución, delección o adición de uno o más nucleótidos, pero que no dan como resultado una alteración funcional sustancial del polipéptido codificado. En la bibliografía se han notificado ejemplos de variantes alélicas de VEGFR-3, por ejemplo, en <http://www.uniprot.org/uniprot/P35916>, e incluyen las posiciones 149, 378, 494, 527 y 641 dentro del DEC. Para generar dichos polipéptidos, pueden utilizarse fácilmente métodos estándar, entre los que se incluyen la mutagénesis dirigida de polinucleótidos o la escisión enzimática específica y el ligamiento. De manera similar, se contempla el uso de compuestos peptidomiméticos o compuestos en los que uno o más restos de aminoácidos se reemplazan por un aminoácido de origen no natural o un análogo de aminoácido que conserve la actividad de unión. Preferentemente, cuando se utiliza la sustitución de aminoácidos, esta sustitución es conservativa, es decir, un aminoácido se reemplaza por otro de tamaño similar y con propiedades de carga similares. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "sustitución conservativa" indica el reemplazo de un resto de aminoácido por otro resto biológicamente similar. Como ejemplos de sustituciones conservativas se incluyen la sustitución de un resto hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina, alanina, cisteína, glicina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina, norleucina o metionina por otro, o la sustitución de un resto polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico o glutamina por asparagina y similares. Los aminoácidos hidrófilos neutros que se pueden sustituir entre sí incluyen asparagina, glutamina, serina y treonina. La expresión "sustitución conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido no sustituido.

De manera alternativa, los aminoácidos conservativos se pueden agrupar como se describe en Lehninger, (*Biochemistry*, segunda edición; Worth Publishers, Inc. NY:NY, págs. 71-77 (1975)), como se indica a continuación:

No polares (hidrófobos)

- A. Alifáticos: A, L, I, V, P
- B. Aromáticos: F, W,
- C. Con azufre: M,
- D. En el límite: G.

Polares sin carga

- A. Hidroxilo: S, T, Y,
- B. Amidas: N, Q,
- C. Sulfhidrilo: C,
- D. En el límite: G.

Con carga positiva (básicos): K, R, H.

Con carga negativa (ácidos): D, E.

Para evitar dudas, el “dominio de componente” incluye un dominio que corresponde al dominio D1 de VEGFR-3 en el que el motivo sequón N-X-S/T en la posición 104 a 106 de la SEQ ID NO: 2 se ha mutado, por ejemplo, debido a una sustitución.

5 En casos en los que la molécula de unión a ligando comprenda dominios de componente múltiples, por ejemplo, dominios de componente D1, D2 y D3 de VEGFR-3, los dominios de componente se pueden conectar directamente entre sí o se pueden conectar mediante uno o más separadores. Generalmente, el término “separador” significa una o más moléculas, por ejemplo, ácidos nucleicos o aminoácidos o fracciones no peptídicas, tales como polietilenglicol o puentes disulfuro, que se pueden insertar entre uno o más dominios de componente formando un enlace covalente. Las secuencias separadoras se pueden utilizar para proporcionar un sitio de interés conveniente entre componentes para facilitar la manipulación. También se puede proporcionar un separador para mejorar la expresión de un polipéptido de unión a ligando de una célula hospedadora, para disminuir el impedimento estérico de tal manera que el componente o grupo de componentes pueda asumir su estructura terciaria óptima y/o interactuar apropiadamente con su molécula diana. Para separadores y métodos de identificación de separadores convenientes, véase, por ejemplo, George et al. (2003) *Protein Engineering* 15: 871-879. Una secuencia separadora puede incluir uno o más aminoácidos conectados de manera natural a un componente receptor o puede ser una secuencia añadida utilizada para mejorar la expresión de los polipéptidos de unión a ligando, para proporcionar sitios de interés específicamente convenientes, para permitir que los dominios de componente formen estructuras terciarias óptimas y/o para mejorar la interacción de un componente o grupo de componentes con su molécula diana. En una realización, el separador comprende una o más secuencias peptídicas entre uno o más componentes, cuya longitud varía entre 1 a 100 aminoácidos, preferentemente entre 1 a 50 aminoácidos. En una realización preferida, el separador entre dos dominios de componente consiste sustancialmente en aminoácidos conectados de manera natural al componente receptor en el receptor natural. En el caso de una molécula de unión a ligando que comprenda dominios de componente múltiples del mismo receptor, cuyos dominios son adyacentes entre sí en el receptor nativo, tales como, por ejemplo, D1, D2 y D3 de VEGFR-3, en una realización, los dominios están conectados entre sí (por ejemplo, D1 a D2 y D2 a D3) utilizando separadores que corresponden a las secuencias enlazadoras de aminoácidos de origen natural.

En algunas variantes, cada polipéptido de unión a ligando se expresa como una fusión con una proteína compañera de fusión, tal como una región constante de inmunoglobulina y los compañeros de fusión heterólogos se enlazan para formar la molécula de unión a ligando.

Múltimeros, componentes multimerizantes, compañeros de fusión y enlazadores

35 El compañero de fusión es cualquier componente heterólogo que mejore la funcionalidad de la molécula de unión a ligando. Así, por ejemplo, un compañero de fusión puede aumentar la solubilidad, modular la eliminación, facilitar el direccionamiento de tipos de células o tejidos particulares, mejorar la actividad biológica, ayudar en la producción y/o recuperación, mejorar una propiedad farmacológica o un perfil farmacocinético (FC) del polipéptido de unión a ligando. Con respecto al mejoramiento del perfil FC, esto puede realizarse, por ejemplo, aumentando la semivida en suero, la penetrabilidad tisular, la ausencia de inmunogenicidad o estabilidad de la molécula de unión a ligando. En casos preferidos, un compañero de fusión se selecciona del grupo que consiste en un componente multimerizante, una proteína sérica o una molécula capaz de unirse a una proteína sérica.

45 Cuando el compañero de fusión es una proteína sérica o un fragmento de la misma, éste se selecciona del grupo que consiste de α -1-microglobulina, AGP-1, orosomucoide, glucoproteína ácida α -1, proteína de unión a la vitamina D (DBP, *D binding protein*), hemopexina, seroalbúmina humana (SAh), transferrina, ferritina, afamina, haptoglobina, α -fetoproteína tiroglobulina, α -2-HS-glucoproteína, β -2-glucoproteína, proteína de unión a hialuronano, sintaxina, C1R, cadena a de C1q, proteína de unión a galectin-3-Mac2, fibrinógeno, receptor de Ig polimérico (PIGR, *polimeric Ig receptor*), α -2-macroglobulina, proteína de transporte de urea, haptoglobina, IGFBP, receptores eliminadores de macrófagos, fibronectina, gaintina, Fc, α -1-antitripsina, α -1-antitripsina, antitrombina III, apolipoproteína A-1, apolipoproteína B, β -2-microglobulina, ceruloplasmina, componente de complemento C3 o C4, inhibidor de esterasa Cl, proteína reactiva con (polisacárido) C, cistatina C y proteína C. En un caso más especificado, el compañero de fusión se selecciona del grupo que consiste de α -1-microglobulina, AGP-1, orosomucoide, glucoproteína ácida α -1, proteína de unión a la vitamina D (DBP), hemopexina, seroalbúmina humana (SAh), afamina y haptoglobina. La inclusión de un componente compañero de fusión puede prolongar la semivida en suero del polipéptido de fusión de la invención cuando sea conveniente. Para ejemplos de polipéptidos de fusión de seroalbúmina, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 6 423 512, 5 876 969, 6 593 295 y 6 548 653. La SAh está muy distribuida en el organismo, particularmente en los componentes intestinales y sanguíneos, y tiene un papel importante en el mantenimiento de la osmolaridad y el volumen plasmático. Se depura lentamente en el hígado y normalmente tiene una semivida *in vivo* de 14 a 20 días en seres humanos (Waldmann et al. (1977) *Albumin, Structure Function and Uses*; Pergamon Press; págs. 255-275).

65 Cuando un compañero de fusión es una molécula capaz de unirse a una proteína sérica, la molécula puede ser una molécula pequeña sintética, un lípido o liposoma, un ácido nucleico, incluyendo un ácido nucleico sintético tal como un aptámero, un péptido o un oligosacárido. La molécula también puede ser una proteína, tal como, por ejemplo,

Fc γ R1, Fc γ R2, Fc γ R3, receptor de Ig polimérico (PIGR), ScFv y otros fragmentos de anticuerpo específicos para una proteína sérica.

5 Cuando el compañero de fusión es un componente multimerizante, este es cualquier secuencia natural o sintética o un compuesto capaz de unir operativamente una primera molécula de unión a ligando con otra molécula de unión a ligando u otro componente multimerizante de otra molécula de unión a ligando, para formar una estructura de orden superior, por ejemplo, un dímero, un trímero, etc. Los componentes multimerizantes adecuados pueden incluir una cremallera de leucina, incluyendo dominios de cremallera de leucina procedentes de c-jun o c-fos; secuencias procedentes de las regiones constantes de las cadenas ligeras kappa o lambda; secuencias sintéticas, tales como
10 motivos de hélice-bucle-hélice (Muller et al. (1998) FEBS Lett. 432: 45-49), motivos helicoidales enrollados, etc. u otros dominios multimerizantes aceptados generalmente y conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el componente de fusión comprende un dominio procedente de inmunoglobulina, por ejemplo, de las formas humanas de IgG, IgM o IgA.

15 En un aspecto, una molécula de unión a ligando, descrita en el presente documento, se produce como un multímero. Cada subunidad del multímero comprende o consiste en una molécula de unión a ligando, por ejemplo, un polipéptido de unión a ligando. Estos multímeros pueden ser homodiméricos, heterodiméricos o receptores solubles multiméricos, consistiendo los receptores multiméricos en 9 o menos subunidades, preferentemente 6 o menos subunidades, incluso más preferentemente 3 o menos subunidades y de manera mucho más preferente 2
20 subunidades. Preferentemente, estos receptores solubles multiméricos son homodímeros de moléculas de unión a ligando.

En un multímero, al menos dos subunidades están unidas operativamente entre sí. La expresión “unidas operativamente” indica que las subunidades están asociadas a través de enlace covalente y/o no covalente. Las subunidades pueden unirse de manera covalente a través de cualquier medio adecuado, tal como, mediante un reactivo reticulante o un enlazador, tal como un enlazador polipeptídico o peptídico. En otra realización, las subunidades están unidas mediante enlaces no covalentes. En algunas variantes, las dos subunidades (por ejemplo, dos polipéptidos de unión a ligando) están unidos por un enlace peptídico, ya sea directamente o a través de un “enlazador peptídico”. El enlazador peptídico puede tener una longitud de tan solo 1 a 3 restos de aminoácidos
25 (consistiendo preferentemente en aminoácidos pequeños tales como glicina, serina, treonina o alanina) o puede ser más largo, por ejemplo, puede tener una longitud de 13, 15 o 16 restos de aminoácidos, introducidos entre las subunidades. Preferentemente, el enlazador peptídico es un péptido inmunológicamente inerte. Dicho enlazador puede ser un tripéptido de la secuencia E-F-M (Glu-Phe-Met), por ejemplo, una secuencia enlazadora de 13 aminoácidos que consiste en Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met (SEQ ID NO: 7), una secuencia enlazadora de 15 aminoácidos que consiste en (G4S)₃ (SEQ ID NO: 8), una secuencia enlazadora de 16 aminoácidos que consiste en GGSGG SGGGG SGGGG S (SEQ ID NO: 9) o la región bisagra de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) humana. En algunas variantes, las dos subunidades son polipéptidos de unión a ligando que comprenden dos cadenas polipeptídicas distintas que unidas entre sí, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro u otros enlaces.
30
35
40

En algunas realizaciones, la molécula de unión a ligando está en forma de una proteína de fusión que comprende al menos dos subunidades, comprendiendo cada una de ellas un polipéptido de unión a ligando. De esta manera, la proteína de fusión se puede producir de manera recombinante, por expresión directa en una célula hospedadora de una molécula de ácido nucleico que la codifica como un solo marco abierto de lectura.
45

En algunas variantes, un polipéptido de unión a ligando se expresa como una fusión con un compañero de fusión de proteína heteróloga, tal como una región constante de inmunoglobulina y los compañeros de fusión heterólogos se unen para formar una molécula de unión de ligando multimérica. En una realización, las subunidades están unidas operativamente a un componente multimerizante. Un componente multimerizante incluye cualquier secuencia natural o sintética capaz de unir operativamente dos o más subunidades para formar una estructura de orden superior, por ejemplo, un dímero, un trímero, etc. Un componente multimerizante puede unir operativamente dos o más subunidades interactuando “directamente” con las subunidades. De manera alternativa, un componente multimerizante de una subunidad puede interactuar con otro componente multimerizante de otra subunidad, para unir operativamente las subunidades.
50
55

En una realización, las subunidades están unidas operativamente a un dominio de aminoácido adicional que proporciona la multimerización de las subunidades (en particular, los dominios adicionales comprenden cualquier región funcional proporcionada para la dimerización de las subunidades). La expresión “unidos operativamente” indica que la subunidad basada en VEGFR-3, y el dominio de aminoácido adicional, se asocian a través de enlace peptídico, ya sea directamente o mediante un “enlazador peptídico” (como se define en el presente documento) y la subunidad basada en VEGFR-3 conserva las propiedades de unión a ligando. El dominio de aminoácido adicional se puede localizar hacia la parte N-terminal (N-ter) o hacia la parte C-terminal (C-ter) desde la secuencia de la subunidad de VEGFR-3. Preferentemente, se localiza hacia la parte C terminal (es decir, alejada del primer dominio similar a inmunoglobulina (dominio Ig-I)). De esta manera, la proteína de fusión se puede producir de manera recombinante, por expresión directa en una célula hospedadora de una molécula de ácido nucleico que la codifica. En dichas realizaciones, una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento, es un multímero de
60
65

proteínas de fusión que contienen polipéptidos de unión a ligando y un componente multimerizante capaz de interactuar con el componente multimerizante presente en otra proteína de fusión para formar una estructura de orden superior, tal como un dímero. Este tipo de proteínas de fusión se pueden preparar uniendo operativamente la secuencia de la subunidad de VEGFR-3 (es decir, un polipéptido de unión a ligando) con dominios aislados de otras proteínas permitiendo la formación de dímeros, trímeros, etc. Como ejemplos de secuencias de proteína que permiten la multimerización de los polipéptidos de ligando descritos en el presente documento se incluyen, pero sin limitación, dominios aislados de proteínas tales como inmunoglobulinas, hCG (documento WO 97/30161, colágeno X (documento WO 04/33486), C4BP (documento WO 04/20639), proteínas Erb (documento WO 98/02540) o péptidos helicoidales enrollados (documento WO 01/00814).

El componente multimerizante se puede seleccionar, por ejemplo, de: (i) secuencias de aminoácidos entre 1 y aproximadamente 500 aminoácidos de longitud, (ii) cremalleras de leucina, (iii) motivos de hélice y bucle y (iv) motivos helicoidales enrollados. Cuando el componente multimerizante comprende una secuencia de aminoácidos entre 1 a aproximadamente 500 aminoácidos de longitud, la secuencia puede contener uno o más restos de cisteína capaces de formar un enlace disulfuro con un resto de cisteína correspondiente en otro polipéptido de fusión que comprende un componente multimerizante con uno o más restos de cisteína.

En un aspecto particular, los multímeros son dímeros de polipéptidos de unión a ligando en donde los polipéptidos están unidos operativamente a una inmunoglobulina o a una parte de una inmunoglobulina como el compañero de fusión, que también puede actuar como el componente multimerizante. La expresión "unidos operativamente" indica que los polipéptidos de unión a ligando y la inmunoglobulina o una parte de la misma, se asocian a través de un enlace peptídico, directamente o mediante un "enlace peptídico" (como se define en el presente documento) y se conservan las propiedades de unión a ligando de los polipéptidos de unión a ligando. En esta realización, los polipéptidos de unión a ligando están unidos operativamente a toda o a una parte de una inmunoglobulina, particularmente una inmunoglobulina humana, incluso de manera más particular a la parte Fc de una inmunoglobulina humana. Normalmente, una parte Fc de una inmunoglobulina humana contiene dos dominios de región constante (los dominios CH2 y CH3) y una región bisagra pero carece de la región variable (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 6 018 026 y 5 750 375). La inmunoglobulina se puede seleccionar de cualquiera de las clases principales de inmunoglobulinas, que incluyen IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y cualquier subclase o isotipo, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; IgA-1 e IgA-2. En una realización, la parte Fc es de IgG4 humana, que es estable en solución y tiene poca o ninguna actividad activadora de complemento. En otra realización, la parte Fc es de IgG1 humana. La parte Fc puede mutarse para impedir actividades no deseadas, tal como unión al complemento, unión a receptores de Fc o similares. La secuencia de aminoácidos procedente de la inmunoglobulina se puede unir al extremo C-terminal o N-terminal del polipéptido de unión a ligando, preferentemente a la parte C-terminal. Dichas proteínas de fusión se pueden preparar transfectando células con ADN que codifica la proteína de fusión subunidad VEGFR-3: Fc y expresando los dímeros en las mismas células. En una realización particular, los polipéptidos de unión a ligando son los mismos en cada subunidad monomérica (es decir, el dímero es un homodímero). En la técnica se conocen bien métodos para producir proteínas de fusión de inmunoglobulina tales como los descritos, por ejemplo, en Hollenbaugh y Aruffo ("Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, páginas 10.19.1-10.19.11, 1992) o en el documento WO 01/03737.

De manera alternativa, los dímeros de polipéptidos de unión a ligando de la presente invención, se pueden preparar uniendo operativamente uno de los polipéptidos de unión a ligando con la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina y uniendo operativamente el otro polipéptido de unión a ligando con la región constante de una cadena ligera de inmunoglobulina. Por ejemplo, un polipéptido de unión a ligando puede unirse operativamente a la región CH1-bisagra-CH2-CH3 de IgG1 humana y otro, o el mismo polipéptido de unión a ligando, puede unirse operativamente a la región kappa C de la cadena ligera kappa de Ig. En una realización, la cadena constante pesada es γ 4 humana, que es estable en solución y tiene poca o ninguna actividad activadora de complemento. En otra realización, la cadena constante pesada es γ 1 humana. La cadena constante pesada se puede mutar para impedir que se produzcan actividades no deseadas, tales como unión al complemento, unión a receptores de Fc o similares.

Además, si se requiere, las proteínas de fusión descritas en el presente documento pueden comprender cualquier región funcional que facilite la purificación o producción. Como ejemplos específicos de dichas secuencias de aminoácidos adicionales se incluyen una secuencia GST o una secuencia de etiqueta de His. En algunas variantes, para la formulación de una composición para su uso farmacéutico, la región que facilita la purificación se elimina.

La secuencia de aminoácidos procedente de la inmunoglobulina se puede unir al extremo C-terminal o N-terminal del polipéptido de unión a ligando, preferentemente al extremo C-terminal. Las células transfectadas con ADN que codifica la proteína de fusión de cadena ligera de inmunoglobulina y la proteína de fusión de cadena pesada de inmunoglobulina que expresan heterodímeros de cadena pesada/cadena ligera que contienen, cada una de ellas, un polipéptido de unión a ligando. Ambos polipéptidos de unión a ligando comprenden, ventajosamente, un péptido señal nativo o heterólogo cuando se sintetiza inicialmente, para promover la secreción de la célula, pero la secuencia señal se escinde después de la secreción. Se contemplan variantes de cualquiera de las realizaciones anteriores que incluyan el péptido señal. El péptido señal nativo de VEGFR-3 humano comprende los restos 1 a 24 de la SEQ ID NO: 2. En la bibliografía se describen numerosas proteínas de péptido señal distintas.

En otro aspecto particular de la presente invención, los polipéptidos de unión a ligando de los multímeros se unen mediante enlaces no covalentes. La unión no covalente de las subunidades se puede realizar mediante cualquier medio adecuado que no interfiera con su actividad biológica (es decir, su capacidad de unirse a las formas humanas de VEGF-C y/o VEGF-D). En un aspecto particular, estos multímeros son dímeros de polipéptidos de unión a ligando, en donde un polipéptido de unión a ligando está unido operativamente a un primer compuesto y otro, o el mismo polipéptido de unión a ligando, está unido operativamente a un segundo compuesto que se unirá de manera no covalente al primer compuesto. Son ejemplos de estos compuestos la biotina y la avidina. Los dímeros de polipéptidos de unión a ligando se pueden preparar uniendo operativamente una subunidad VEGFR-3 con biotina y uniendo operativamente el otro polipéptido de unión a ligando con avidina. De esta manera, se forma un receptor a través de interacciones no covalentes de biotina con avidina. Otros ejemplos incluyen subunidades de hormona proteica heterodimérica. En estas realizaciones, una construcción de ADN que codifica una proteína de unión a ligando, se fusiona a una construcción de ADN que codifica una subunidad de una hormona proteica heterodimérica, tal como la hormona del crecimiento humano, hCG, y una construcción de ADN que codifica el otro polipéptido de unión a ligando se fusiona a ADN que codifica la otra subunidad de la hormona proteica heterodimérica, tal como hCG (como se desvela en el documento US 6,193,972). Estas construcciones de ADN se expresan conjuntamente en las mismas células lo que conduce a la expresión de una molécula de unión a ligando, dado que cada una de las secuencias expresadas conjuntamente contiene una subunidad de hormona correspondiente de manera que forman un heterodímero cuando se expresan. La secuencia de aminoácidos procedente de la hormona proteica heterodimérica se puede unir al extremo C-terminal o N-terminal de los polipéptidos de unión a ligando, preferentemente al extremo C-terminal. Ventajosamente, ambas subunidades comprenden un péptido señal nativo o heterólogo cuando se sintetizan inicialmente para promover la secreción de la célula pero la secuencia señal se escinde después de la secreción.

En una realización, la molécula de unión a ligando está unida operativamente a una unidad de unión no procedente de VEGFR-3, es decir, una unidad de unión que no contiene dominios de componente procedentes de VEGFR-3. Dichas moléculas de unión a ligando quiméricas pueden comprender, por ejemplo, unidades de unión heterólogas basadas en otra tirosina cinasas receptoras. En una realización, dichas unidades de unión heterólogas se unen a al menos un polipéptido ligando seleccionado de VEGF-A (VEGF), VEGF-B, PIGF, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C y PDGF-D. En una realización preferida, dichas unidades de unión heterólogas se unen a al menos VEGF-A (VEGF).

En una realización, dichas unidades de unión heterólogas comprenden dominios de componente procedentes de VEGFR-1 o VEGFR-2 o de ambos. Como ejemplos de unidades de unión heterólogas que pueden emplearse, en combinación con las moléculas de unión a ligando de la presente invención en forma de moléculas de unión a ligando quiméricas, se incluyen las moléculas trampa de VEGF descritas, por ejemplo, en los documentos WO 2000/75319, WO 2005/000895 y WO 2006/088650. Una unidad de unión heteróloga preferida comprende el dominio 2 de Ig de VEGFR-1 (R1D2) y el dominio 3 de Ig de VEGFR-2 (R2D3), opcionalmente fusionada a una parte Fc de una inmunoglobulina. En una realización se contempla una molécula quimérica que comprende un polipéptido de unión a ligando de la presente invención unido a una parte Fc de una inmunoglobulina unida operativamente con una unidad de unión R1D2R2D3 fusionada a una parte Fc de una inmunoglobulina. Las dos unidades de unión están unidas operativamente mediante enlace disulfuro entre las dos partes Fc.

Enlazadores

Aunque los dominios similares a Ig de VEGFR-3 humano se pueden unir directamente entre sí (mediante un enlace peptídico, disulfuro u otro tipo de enlace covalente) o a dominios similares a Ig de otros receptores, las moléculas de unión a ligando descritas en el presente documento comprenden opcionalmente, además un enlazador (uno o más) que se conectan junto con dos o más unidades de unión diferentes, por ejemplo fragmentos de DEC de VEGFR-3 con otro fragmento de DEC de VEGFR-3 o incluso una copia de sí mismo. Un enlazador también puede enlazar una unidad de unión a otros sustituyentes descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un polipéptido heterólogo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el enlazador comprende un péptido que enlaza las unidades de unión para formar un solo péptido continuo que se puede expresar como una sola molécula de unión de ligando. Los enlazadores se pueden seleccionar de manera que sea menos probable que induzcan una reacción alérgica. También pueden utilizarse polisacáridos u otras fracciones para enlazar unidades de unión para formar una molécula de unión a ligando.

Se puede utilizar más de un enlazador por molécula de unión a ligando. El enlazador se puede seleccionar para dar libertad conformacional óptima (estérica) entre las diversas unidades de unión a ligando, para permitir que interactúen entre sí, si se desea, por ejemplo, para formar dímeros o para permitir que interactúen con ligandos. El enlazador puede ser lineal de manera que las unidades de unión consecutivas se enlacen en serie o el enlazador puede servir como un almacén al cual se unen diversas unidades de unión, por ejemplo, un enlazador ramificado. Un enlazador también puede tener múltiples ramificaciones, por ejemplo, como se desvela en Tam, J. Immunol. Methods 196: 17 (1996). Las unidades de unión se pueden unir entre sí o al almacén enlazador mediante grupos amino en el extremo N-terminal, grupos carboxilo en el extremo C-terminal, cadenas laterales, grupos modificados químicamente, cadenas laterales u otros medios.

Pueden diseñarse péptidos enlazadores que tengan secuencias que permitan características deseadas. Por

ejemplo, el uso de restos de glicilo permite un grado relativamente grande de libertad conformacional, mientras que una prolina tiende a tener el efecto opuesto. Los enlazadores peptídicos se pueden seleccionar de manera que obtengan estructuras secundarias y terciarias particulares, por ejemplo, hélices alfa, láminas beta o cilindros beta. La estructura cuaternaria también puede utilizarse para crear enlazadores que unan dos unidades de unión entre sí de manera no covalente. Por ejemplo, la fusión de un dominio de proteína con una cara hidrófoba en cada unidad de unión, puede permitir la unión de las dos unidades de unión por medio de la interacción entre la interacción hidrófoba de las dos moléculas. En algunas realizaciones, el enlazador puede proporcionar interacciones polares. Por ejemplo, puede utilizarse un dominio de cremallera de leucina de las proto oncoproteínas Myc y Max, respectivamente. Luscher y Larsson, *Oncogene* 18: 2955-2966 (1999). En algunas realizaciones, el enlazador permite la formación de un puente salino o enlace disulfuro. Los enlazadores pueden comprender aminoácidos no naturales así como aminoácidos naturales que no están incorporados de modo natural en un polipéptido. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un complejo de coordinación entre un metal u otro ion y diversos restos a partir de péptidos múltiples unidos de esta manera.

Se contemplan enlazadores peptídicos lineales de al menos un resto de aminoácido. En algunas realizaciones, el enlazador tiene más de 10 000 restos. En algunas realizaciones, el enlazador tiene de 1 a 10 000 restos, de 1 a 1 000 restos, de 1 a 100 restos, de 1 a 50 restos o de 1 a 10 restos. En algunas realizaciones, el enlazador peptídico lineal comprende restos con cadenas laterales relativamente inertes. Los restos de aminoácidos de enlazadores peptídicos no necesitan enlazarse por completo o de modo alguno por medio de grupos alfa-carboxilo y alfa-amino. Es decir, los péptidos pueden enlazarse por medio de grupos de cadena lateral de varios restos.

El enlazador puede verse afectado si el polipéptido o los polipéptidos con los que se fusionado pueden dimerizar entre sí o con otro polipéptido. El enlazador realiza diversas funciones. Los monómeros de receptores nativos restringidos al plano bidimensional aproximado de la membrana de la célula gozan de una concentración local relativamente alta y de la disponibilidad de correceptores (unidades de unión), aumentando la probabilidad de encontrar un compañero. Los receptores libres en solución carecen de estas ventajas y pueden recibir ayuda de un enlazador que aumente la concentración eficaz de los monómeros.

En algunas realizaciones, una molécula de unión a ligando puede comprender más de un tipo de enlazador. Los enlazadores adecuados también pueden comprender las modificaciones químicas comentadas anteriormente.

Las moléculas de unión a ligando descritas en el presente documento, pueden comprender un resto de aminoácido N-terminal adicional, preferentemente una metionina. En realidad, dependiendo del sistema y de las condiciones de expresión, los polipéptidos se pueden expresar en una célula hospedadora recombinante con una metionina inicial. Este aminoácido adicional puede conservarse después en la proteína recombinante resultante o se puede eliminar por medio de una exopeptidasa, tal como metionina aminopeptidasa, según los métodos desvelados en la bibliografía (Van Valkenburgh HA and Kahn RA, *Methods Enzymol.* (2002) 344: 186-93; Ben-Bassat A, *Bioprocess Technol.* (1991) 12: 147-59).

Sustituyentes y otras modificaciones químicas

Las moléculas de unión a ligando descritas en el presente documento están, opcionalmente, modificadas por medios químicos con diversos sustituyentes. Preferentemente, estas modificaciones no reducen sustancialmente las afinidades o especificidades de unión con el factor de crecimiento de la molécula de unión a ligando. En vez de esto, las modificaciones químicas otorgan características convenientes adicionales como se indica en el presente documento. Las modificaciones químicas pueden adquirir numerosas formas diferentes tales como péptidos heterólogos, polisacáridos, lípidos, radioisótopos, restos de aminoácidos y ácidos nucleicos no convencionales, quelatos metálicos y diversas toxinas.

Los fragmentos receptores (o "unidades de unión" o "dominios de componente") y las moléculas de unión a ligando descritas en el presente documento, se fusionan opcionalmente a compañeros de fusión heterólogos, tales como polipéptidos heterólogos para conferir diversas propiedades, por ejemplo, solubilidad aumentada, modulación de eliminación, direccionamiento a tipos de células o tejidos particulares. En algunas realizaciones, el fragmento receptor se une a un dominio Fc de IgG o de otra inmunoglobulina. En algunas realizaciones, un fragmento receptor se fusiona con la fosfatasa alcalina (FA). En el documento WO 02/060950 se encuentran métodos para producir construcciones de fusión con Fc o FA. Al fusionar el polipéptido o la molécula de unión a ligando con dominios de proteína que tienen propiedades específicas (por ejemplo, semivida, biodisponibilidad, compañeros de interacción), es posible conferir estas propiedades a la molécula de unión a ligando (por ejemplo, las moléculas son diseñadas para que tengan una distribución tisular específica o una semivida biológica específica). En algunas realizaciones, la molécula de unión a ligando incluye un correceptor y un fragmento de VEGFR.

El compañero de fusión particular (por ejemplo, polipéptido heterólogo) utilizado en una molécula de unión a ligando particular, puede influir en cuanto a si el fragmento de VEGFR-3 dimerizará o no, lo cual a su vez puede afectar a la unión con el ligando.

Para sustituyentes tales como una región Fc de IgG humana, la fusión se puede fusionar directamente a una

- molécula de unión a ligando o se puede fusionar a través de una secuencia intermedia. Por ejemplo, una bisagra de IgG humana, una región CH2 y CH3 se pueden fusionar ya sea en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de una molécula de unión a ligando para unirse a la región Fc. La construcción resultante de la fusión de Fc permite la purificación a través de una columna de afinidad de proteína A (Pierce, Rockford, Ill.). El péptido y las proteínas fusionados a una región Fc, pueden presentar una semivida sustancialmente mayor *in vivo* que su homólogo no fusionado. Una fusión a una región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido de fusión. La región Fc puede ser una región Fc natural o se puede modificar para proporcionar características superiores, por ejemplo, calidades terapéuticas, tiempo de circulación, agregación reducida.
- Los polipéptidos se pueden modificar, por ejemplo, por glucosilación, amidación, carboxilación o fosforilación o por la creación de sales de adición de ácido, amidas, ésteres, en particular ésteres C-terminales y derivados de N-acilo. Los dominios I a III similares a Ig de VEGFR-3 comprenden 5 supuestos sitios de N-glucosilación (denominados en el presente documento sequones o regiones N1, N2, N3, N4 y N5 de VEGFR-3, respectivamente). N1 corresponde a los aminoácidos 33 a 35 de la SEQ ID NO: 2; N2 corresponde a los aminoácidos 104 a 106 de la SEQ ID NO: 2; N3 corresponde a los aminoácidos 166 a 168 de la SEQ ID NO: 2; N4 corresponde a los aminoácidos 251 a 253 de la SEQ ID NO: 2 y N5 corresponde a los aminoácidos 299 a 301 de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento comprende una modificación en la región N2 de la molécula. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el aminoácido en la molécula de unión a ligando correspondiente a la posición 104 de la SEQ ID NO: 2, se deletiona y se reemplaza por otro aminoácido. Se prefieren sustituciones conservativas. En algunas realizaciones, el aminoácido correspondiente a la posición 104 de la SEQ ID NO: 2 se deletiona y se reemplaza por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en glutamina, aspartato, glutamato, arginina y lisina. En otras variantes adicionales, la posición 106 está sustituida para eliminar el sequón N2. En realizaciones en las que el sequón N2 de la SEQ ID NO: 2 se modifica como se describe anteriormente, los sequones N1, N3, N4 y N5 de la SEQ ID NO: 2 preferentemente no están modificados.
- Las proteínas también se pueden modificar para crear derivados peptídicos al formar complejos covalentes o no covalentes con otras fracciones. Se pueden preparar complejos unidos de manera covalente uniendo las fracciones químicas con grupos funcionales en las cadenas laterales de aminoácidos de los polipéptidos o en el extremo N o C-terminal.
- Los polipéptidos se pueden conjugar con un grupo indicador, incluyendo, pero sin limitación, un radiomarcador, un marcador fluorescente, una enzima (por ejemplo, que cataliza una reacción calorimétrica o fluorométrica), un sustrato, una matriz sólida o un transportador (por ejemplo, biotina o avidina). En el documento WO 98/28621, en Olofsson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95: 11709-11714 (1998), en las patentes de Estados Unidos N.º 5 512 545 y 5 474 982 y en las solicitudes de patente de Estados Unidos N.º 20020164687 y 20020164710, se describen ejemplos de análogos.
- Los restos de cisteinilo más comúnmente se hacen reaccionar con haloacetatos (y aminos correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para proporcionar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los restos de cisteinilo también se derivatizan por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β (5-imidoloil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alkilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil-2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, orcloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.
- Los restos de histidilo se derivatizan por reacción con procarbonato de dietilo a un pH de 5,5 a 7,0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo también es útil; la reacción se realiza, preferentemente, en cacodilato de sodio 0,1 M a un pH de 6,0.
- Los restos de lisinilo y amino terminales se hacen reaccionar con anhídridos de ácido succínico o carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los restos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para la derivatización de restos que contienen α -amino, incluyen imidoésteres tales como, picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilurea; 2,4-pentanodiona; y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.
- Los restos de arginilo se modifican por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, y ninhidrina. La derivatización de restos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al alto valor de pK del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como con el grupo epsilon-amino de arginina.
- La modificación específica de los restos de tirosilo de por sí se ha estudiado extensamente, con interés particular en la introducción de marcadores espectrales en los restos de tirosilo por reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. De manera más habitual, se utiliza N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Los restos de tirosilo son marcados con yodo utilizando ^{125}I o ^{131}I para preparar proteínas marcadas para su uso en radioinmunoanálisis.
- Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente por reacción con carbodiimidias (R1) tal como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida.

Además, los restos de aspartilo y glutamilo se convierten en restos de asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones amonio.

5 La derivatización con agentes bifuncionales es útil para reticular la molécula de unión a ligando a matrices de soporte insolubles en agua. Dicha derivatización también puede proporcionar el enlazador que puede conectar elementos de unión adyacentes en una molécula de unión a ligando o elementos de unión a un péptido heterólogo, por ejemplo, un fragmento Fc. Los agentes reticulantes utilizados normalmente incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales que incluyen ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(propionato de succinimidilo) y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes derivatizantes, tal como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato, proporcionan intermediarios fotoactivables que son capaces de formar reticulaciones en presencia de luz. De manera alternativa, para la inmovilización de proteínas se emplean matrices reactivas insolubles en agua tales como hidratos de carbono activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes de Estados Unidos N.º 3 969 287, 3 691 016, 4 195 128, 15 4 247 642, 4 229 537 y 4 330 440.

Los restos de glutaminilo y asparaginilo se desamidán frecuentemente a restos de glutamilo y aspartilo correspondientes. De manera alternativa, estos restos se desamidán en condiciones ligeramente ácidas. Cualquiera de estos restos se encuentra dentro del alcance de esta invención.

20 Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos de serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de lisina, arginina y cadenas laterales histidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecule Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86, 1983), acetilación de la amina N-terminal y, en algunos casos, amidación de los grupos carboxilo en el C-terminal. Estos derivados son composiciones de polipéptidos modificados químicamente en los que el polipéptido de la molécula de unión a ligando se une a un polímero. El polímero seleccionado es normalmente hidrosoluble de tal manera que la proteína a la cual se une no precipita en un ambiente acuoso, tal como un ambiente fisiológico. El polímero seleccionado habitualmente se modifica para que tenga un solo grupo reactivo, tal como un éster activo para acilación o un aldehído para alquilación, de manera que el grado de polimerización se puede controlar como se proporciona en los presentes métodos. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. En el alcance de los polímeros de polipéptidos de moléculas de unión a ligando se incluye una mezcla de polímeros. Preferentemente, para el uso terapéutico de la preparación de producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable.

35 Cada uno de los polímeros puede tener cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. Normalmente, cada uno de los polímeros tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa (el término "aproximadamente" indica que, en preparaciones de un polímero hidrosoluble, algunas moléculas pesarán más, algunas menos, que el peso molecular establecido). El peso molecular promedio de cada polímero es de entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, más preferentemente, entre aproximadamente 12 kDa y aproximadamente 40 kDa y mucho más preferentemente entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 35 kDa.

45 Como polímeros adecuados solubles en agua, o mezclas de los mismos, se incluyen, pero sin limitación, hidratos de carbono unidos a N o unidos a O, azúcares, fosfatos, hidratos de carbono; azúcares; fosfatos; polietilenglicol (PEG) (incluyendo las formas de PEG que se han utilizado para derivatizar proteínas, incluyendo mono-(C1-C10) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol); monometoxi-polietilenglicol; dextrano (tal como dextrano de peso molecular bajo, por ejemplo, de aproximadamente 6 kD), celulosa; otros polímeros basados en hidratos de carbono, poli-(N-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol) y alcohol polivinílico. En la presente invención también se incluyen moléculas reticulantes bifuncionales que se pueden utilizar para preparar multímeros unidos de manera covalente.

55 En general, la derivatización química se puede realizar en cualquier condición adecuada utilizada para hacer reaccionar una proteína con una molécula polimérica activada. Los métodos para preparar derivados químicos de polipéptidos generalmente comprenderán las etapas de: (a) hacer reaccionar el polipéptido con la molécula de polímero activada (tal como un éster reactivo o un derivado aldehído de la molécula de polímero) en condiciones por las cuales la molécula de unión a ligando se une a una o más moléculas de polímero y (b) obtener uno o varios productos de reacción. Las condiciones de reacción óptimas se determinarán en función de parámetros conocidos y del resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor es la relación de moléculas de polímero: proteína, mayor es la cantidad de molécula de polímero unida. En una realización, el derivado de polipéptido de la molécula de unión a ligando puede tener una sola fracción de molécula de polímero en el extremo amino terminal (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5 234 784).

65 Un polímero hidrosoluble particularmente preferido para su uso en el presente documento es el polietilenglicol (PEG). Como se utiliza en el presente documento, se entiende que el polietilenglicol abarca cualquiera de las formas de PEG que se pueden utilizar para derivatizar otras proteínas, tales como mono-(C1-C10) alcoxi- o ariloxi-

polietilenglicol. El PEG es un poliéter neutro lineal o ramificado, disponible en una amplia gama de pesos moleculares y es hidrosoluble y en la mayor parte de los disolventes orgánicos. El PEG es eficaz al excluir a otros polímeros o péptidos cuando está presente en agua, principalmente a través de su alta movilidad de cadena dinámica y naturaleza hidrófila, creando así una cubierta de agua o esfera de hidratación cuando se une a otras proteínas o superficies de polímeros. El PEG es no tóxico, no inmunogénico y ha sido aprobado por la *Food and Drug Administration* para consumo interno.

Cuando las proteínas o enzimas se conjugan con PEG han demostrado bioactividad, propiedades no antigénicas y velocidades de eliminación disminuidas cuando se administran en animales. F. M. Veronese et al., Preparation and Properties of Monomethoxypoly(ethylene glycol)-modified Enzymes for Therapeutic Applications, en J. M. Harris ed., *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry-Biotechnical and Biomedical Applications*, 127-36, 1992. Estos fenómenos se deben a las propiedades de exclusión del PEG al evitar el reconocimiento por el sistema inmunitario. Además, el PEG se ha utilizado ampliamente en procedimientos de modificación de superficie para disminuir la adsorción de proteínas y mejorar la compatibilidad sanguínea. S. W. Kim et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 516: 116-30 1987; Jacobs et al., *Artif. Organs* 12: 500-501, 1988; Park et al., *J. Poly. Sci. Part A* 29: 1725-31, 1991. Las superficies poliméricas hidrófobas, tales como poliuretanos y poliestireno, se pueden modificar injertando PEG (PM 3 400) y emplean como superficies no trombogénicas. Las propiedades de superficie (ángulo de contacto) pueden ser más consistente con superficies hidrófilas, debido al efecto hidratante del PEG. De manera más importante, la absorción de proteínas (albúmina y otras proteínas plasmáticas) se puede reducir en gran medida, a consecuencia de la alta movilidad de cadena, esfera de hidratación y propiedades de exclusión de proteínas del PEG.

En estudios de inmovilización de superficie, se determinó que el PEG (PM 3 400) tenía un tamaño óptimo, Park et al., *J. Biomed. Mat. Res.* 26: 739-45, 1992 mientras que el PEG (PM 5 000) era más beneficioso para disminuir la antigenicidad de proteínas (F. M. Veronese et al., en J. M. Harris, et al., *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry-Biotechnical and Biomedical Applications*, 127-36).

Los métodos para preparar moléculas de unión a ligando pegiladas generalmente comprenderán las siguiente etapas: (a) hacer reaccionar el polipéptido con polietilenglicol (tal como un éster reactivo o derivado aldehído de PEG) en condiciones por las cuales la molécula ligando se une a uno o más grupos de PEG, y (b) obtener uno o varios productos de reacción. En general, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación se determinarán en función de parámetros conocidos y del resultado deseado. Por ejemplo, cuanto más grande es la relación de PEG: proteína, mayor es el porcentaje de producto polipegilado. En algunas realizaciones, la molécula de unión a ligando tendrá una sola fracción de PEG en el extremo N-terminal. Véase la patente de Estados Unidos N.º 8 234 784. En algunas realizaciones, una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento opcionalmente comprende al menos una fracción de PEG unida a la molécula. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el PEG de aproximadamente 20 a 40 kDa se une al extremo amino terminal de la molécula de unión a ligando.

Las moléculas de unión a ligando derivatizadas desveladas en el presente documento, pueden tener actividades adicionales, actividad biológica aumentada o reducida u otras características, tales como semivida aumentada o disminuida en comparación con las moléculas no derivatizadas.

Polinucleótidos que codifican moléculas de unión a ligando y sistemas de expresión

La invención no solo comprende las moléculas de unión a ligando, unidades de unión y polipéptidos descritos en el presente documento, sino también ácidos nucleicos que codifican dichas moléculas, vectores que comprenden dichas moléculas y células hospedadoras que comprenden dichos vectores. Todos los métodos en los que se emplea cualquiera de las moléculas, unidades, polipéptidos, ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras, se consideran casos de la divulgación.

En la SEQ ID NO: 1 se expone una secuencia codificante de VEGFR-3 humano y se contemplan fragmentos de SEQ ID NO 1 (modificados en el secuón N2) como secuencias codificantes de los polipéptidos de unión a ligando descritos en el presente documento. (Por ejemplo, se contemplan fragmentos que codifican la totalidad o partes del DEC de VEGFR-3). Debido a la bien conocida degeneración del código genético, son posibles numerosas secuencias codificantes equivalentes para cualquier secuencia que codifique un polipéptido, y todos estos equivalentes se contemplan como aspectos de la invención.

Además, de la misma manera que se contempla la variante de secuencia de aminoácidos del DEC natural de VEGFR-3, como se ha descrito anteriormente, también se contempla la variante de secuencia de ácido nucleico. La variante de secuencia de ácido nucleico se puede caracterizar como porcentaje de identidad en relación a la SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, una identidad de al menos 80, 85, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %).

La variante de secuencia de nucleótidos también se puede caracterizar por la capacidad para hibridar con el complemento de una secuencia codificante preferida. Las moléculas de ácido nucleico incluyen aquellas moléculas que comprenden secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones moderadas o muy rigurosas, como se define en el presente documento, con la secuencia que codifica el DEC de la molécula de ácido nucleico expuesta

en la SEQ ID NO: 1, o de una molécula que codifica un polipéptido, cuyo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la tirosina cinasa receptora expuesta en las SEQ ID NO: 2 y 3, o de un fragmento de ácido nucleico como se describe en el presente documento, o de un fragmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido como se describe en el presente documento.

5 La expresión “condiciones muy rigurosas” se refiere a aquellas condiciones que están diseñadas para permitir la hibridación de cadenas de ADN cuyas secuencias son muy complementarias, y para excluir la hibridación de los ADN con emparejamiento significativamente erróneo. La rigurosidad de la hibridación está principalmente determinada por la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de agentes desnaturizantes, tales como formamida. Los ejemplos de “condiciones muy rigurosas” para la hibridación y el lavado son, cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a una temperatura de 65 a 68°C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M y formamida al 50 %, a 42° C. Véase Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N. Y. 1989); y Anderson et al., *Nucleic Acid Hybridization: a Practical approach*, Cap. 4, IRL Press Limited (Oxford, Inglaterra). Limited, Oxford, Inglaterra. Con el propósito de reducir la hibridación inespecífica y/o de fondo, se pueden incluir otros agentes en la hibridación y tampones de lavado. Los ejemplos son seroalbúmina bovina al 0,1 %, polivinilpirrolidona al 0,1 %, pirofosfato de sodio al 0,1 %, dodecilsulfato de sodio (NaDodSO₄ o SDS) al 0,1 %, Ficoll, solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (u otro ADN no complementario) y sulfato de dextrano, aunque también se pueden utilizar otros agentes adecuados. La concentración y tipos de estos aditivos se pueden cambiar sin que influya sustancialmente en la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Los experimentos de hibridación habitualmente se llevan a cabo a un pH de 6,8 a 7,4; no obstante, en condiciones habituales de fuerza iónica, la tasa de hibridación es casi independiente del pH. Véase Anderson et al., *Nucleic Acid Hybridization: a Practical Approach*, Cap. 4, IRL Press Limited (Oxford, Inglaterra).

25 Los factores que influyen en la estabilidad de un dúplex de ADN incluyen la composición de bases, la longitud y grado de emparejamiento erróneo de los pares de bases. Un experto en la materia puede ajustar las condiciones de hibridación para adaptar estas variables y permitir que los ADN de diferentes relaciones de secuencia formen híbridos. La temperatura de fusión de un dúplex de ADN perfectamente emparejado, se puede calcular con la siguiente ecuación:

$$30 \quad T_f(^{\circ}\text{C}) = 81,5 + 16,6(\log[\text{Na}^+]) + 0,41(\% \text{ de G+C}) - 600/N - 0,72(\% \text{ de formamida})$$

en donde N es la longitud del dúplex formado, [Na⁺] es la concentración molar del ion sodio en la solución de hibridación o de lavado, % de G+C es el porcentaje de bases (guanina + citosina) en el híbrido. Para híbridos imperfectamente emparejados, la temperatura de fusión se reduce en aproximadamente 1° C por cada 1 % de emparejamiento erróneo.

40 La expresión “condiciones moderadamente rigurosas” se refiere a condiciones en las que se puede formar un dúplex de ADN con un mayor grado de emparejamiento erróneo de pares de bases que el que se podría producir en “condiciones muy rigurosas”. Son ejemplos de “condiciones moderadamente rigurosas” habituales, cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a una temperatura de 50 a 65° C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M y formamida al 20 % a una temperatura de 37 a 50° C. Como ejemplo, una condición “moderadamente rigurosa” a una temperatura de 50°C en iones de sodio 0,015 M, permitirá un emparejamiento erróneo de aproximadamente 21 %.

45 La siguiente ecuación proporciona una buena estimación de la temperatura de fusión en NaCl* 1 M para sondas oligonucleotídicas de hasta aproximadamente 20 nt (nucleótidos):

$$50 \quad T_f = 2^{\circ} \text{ C por pares de bases A-T} + 4^{\circ} \text{ C por pares de bases G-C}$$

*La concentración de iones de sodio en sal de citrato de sodio (SCS) 6x es de 1 M. Véase Suggs et al., *Developmental Biology Using Purified Genes*, pág. 683, Brown y Fox (eds.) (1981).

55 Las condiciones de lavado de alta rigurosidad para oligonucleótidos habitualmente son a una temperatura de 0 a 5° C por debajo de la T_f del oligonucleótido en SCS 6x, SDS al 0,1 %.

60 Las diferencias en la secuencia de ácidos nucleicos pueden producir modificaciones conservativas y/o no conservativas de la secuencia de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3. La invención también se refiere a un ADN aislado y/o purificado que corresponde a, o que se hibrida en condiciones rigurosas con, cualquiera de las secuencias de ADN anteriores.

65 Una molécula de ácido nucleico que codifica todo o parte de un polipéptido de la invención, tal como una molécula de unión a ligando o una unidad de unión descrita en el presente documento, se puede preparar en una diversidad de maneras que incluyen, sin limitación, síntesis química, exploración de una biblioteca de ADNc o genómica, exploración de una biblioteca de expresión y/o amplificación por PCR de ADNc o ADN genómico. Estos y otros métodos, útiles para aislar dicho ADN, se exponen, por ejemplo, en Sambrook, et al., “*Molecular Cloning: A*

Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989), en Ausubel et al., eds., “Current Protocols in Molecular Biology”, Current Protocols Press (1994) y en Berger y Kimmel, “Methods In Enzymology: Guide To Molecular Cloning Techniques”, vol. 152, Academic Press, Inc., San Diego Calif. (1987). Las secuencias preferidas de ácido nucleico son secuencias de mamífero, tales como ser humano, rata y ratón.

5 La síntesis química de moléculas de ácido nucleico se puede llevar a cabo utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como los expuestos por Engels, et al., *Angew. Chem. Intl. Ed.*, 28: 716-734 (1989). Estos métodos incluyen, entre otros, los métodos de fosfotriéster, fosforoamidita y H-fosfonato de síntesis de ácido nucleico. Los ácidos nucleicos más largos que aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, se pueden sintetizar como varios fragmentos, teniendo cada fragmento una longitud de hasta aproximadamente 100 nucleótidos. Después, los fragmentos pueden ligarse entre sí, como se describe más adelante, para formar el ácido nucleico de longitud completa de interés. Un método preferido es la síntesis sobre polímero utilizando química estándar de fosforoamidita.

15 El término “vector” se refiere a un vehículo de amplificación, replicación y/o expresión de una molécula de ácido nucleico, con frecuencia procedente o en forma de un sistema de plásmido o ADN o ARN vírico, en donde el plásmido o ADN o ARN vírico es funcional en una célula hospedadora seleccionada, tal como células hospedadoras de bacterias, levaduras, plantas, invertebrados y/o mamíferos. El vector puede permanecer independiente del ADN genómico de la célula hospedadora o se puede integrar en su totalidad o en parte con el ADN genómico. El vector contendrá todos los elementos necesarios de manera que funcione en cualquier célula hospedadora con la que sea compatible. Estos elementos se exponen más adelante.

25 Cuando el ácido nucleico que codifica un polipéptido o un fragmento del mismo se ha aislado, preferentemente se inserta en un vector de amplificación y/o de expresión para incrementar el número de copias del gen y/o expresar el polipéptido codificado en una célula hospedadora adecuada y/o para transformar células en un organismo diana (para expresar el polipéptido *in vivo*). Numerosos vectores disponibles en el comercio son adecuados, aunque se pueden utilizar también vectores “personalizados”. El vector se selecciona para que sea funcional en una célula hospedadora o tejido hospedador particular (es decir, para la replicación y/o expresión). El polipéptido o fragmento del mismo se puede amplificar/expresar en células hospedadoras procariotas y/o eucariotas, por ejemplo, células de levadura, de insecto, (sistemas de baculovirus), de planta y de mamífero. La selección de la célula hospedadora dependerá, al menos en parte, de si el polipéptido, o fragmento del mismo, se va a glucosilar. De ser así, son preferibles las células hospedadoras de levadura, insecto o mamífero; las células de levadura y de mamífero glucosilarán el polipéptido si en la secuencia de aminoácidos hay un sitio de glucosilación.

35 Normalmente, los vectores utilizados en cualquiera de las células hospedadoras contendrán una secuencia flanqueante 5' y otros elementos reguladores tales como uno o más potenciadores, un promotor, un origen de elemento de replicación, un elemento de terminación transcripcional, una secuencia intrónica completa que contiene un sitio de corte y empalme donador y aceptor, una secuencia de péptido señal, un elemento de sitio de unión al ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región polienlazadora para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido que se va a expresar y un elemento marcador seleccionable. Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia de “etiqueta”, es decir, una secuencia de oligonucleótidos localizada en el extremo 5' o 3' de la secuencia codificante que codifica poliHis (tal como hexaHis) u otra secuencia inmunogénica pequeña. Esta etiqueta se expresará a lo largo de la proteína y puede servir como una etiqueta de afinidad para la purificación del polipéptido de la célula hospedadora. Opcionalmente, la etiqueta puede retirarse posteriormente del polipéptido purificado mediante diversos medios tales como utilizando una peptidasa seleccionada.

50 La construcción de vector/expresión opcionalmente puede contener elementos tales como una secuencia flanqueante 5', un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia marcadora seleccionable, un sitio de unión al ribosoma, una secuencia señal y una o más secuencias intrónicas. La secuencia flanqueante 5' puede ser homóloga (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula hospedadora), heteróloga (es decir, de una especie diferente de la especie o cepa de la célula hospedadora), híbrida (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes 5' de más de una fuente), sintética, o pueden ser la secuencia flanqueante 5' del polipéptido nativo. De esta manera, la fuente de la secuencia flanqueante 5' puede ser cualquier organismo procariota o eucariota unicelular, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, con la condición de que la secuencia flanqueante 5' sea funcional en la maquinaria de la célula hospedadora, y pueda activar dicha maquinaria.

60 Normalmente, un elemento de terminación de la transcripción se localiza 3' respecto al extremo de la secuencia codificante del polipéptido y sirve para finalizar la transcripción del polipéptido. Habitualmente, el elemento de terminación de la transcripción en células procariotas es un fragmento rico en G-C seguido de una secuencia poli T. Estos elementos se pueden clonar de una biblioteca, se pueden adquirir en el comercio como parte de un vector y se sintetizan fácilmente.

65 Los genes marcadores de selección codifican proteínas necesarias para la supervivencia y el crecimiento de una célula hospedadora en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección habituales codifican proteínas que: (a) confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina o

kanamicina para células hospedadoras procariotas, (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos.

El elemento de unión al ribosoma, denominado comúnmente secuencia de Shine-Dalgarno (procariotas) o secuencia de Kozak (eucariotas), es necesario iniciar la traducción de ARNm. El elemento habitualmente se localiza 3' respecto al promotor y 5' respecto a la secuencia codificante del polipéptido que se va a sintetizar. La secuencia de Shine-Dalgarno varía, aunque habitualmente es una polipurina (es decir, tiene un alto contenido de A-G). Se han identificado muchas secuencias de Shine-Dalgarno, cada una de las cuales se puede sintetizar fácilmente utilizando métodos expuestos anteriormente.

Los expertos en la técnica conocen bien todos los elementos expuestos anteriormente, así como otros útiles en la presente invención, y se describen, por ejemplo, en Sambrook, et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) y en Berger et al., eds., "Guide To Molecular Cloning Techniques", Academic Press, Inc., San Diego Calif. (1987).

Para aquellas realizaciones de la invención en donde el polipéptido recombinante se va a secretar, se incluye, preferentemente, una secuencia señal para la secreción directa desde la célula en donde se sintetiza. Normalmente, el polinucleótido que codifica la secuencia señal se coloca en el extremo 5' de la región codificante. Se han identificado muchas secuencias señal y cualquiera de estas que sea funcional en una célula o especie diana se puede utilizar junto con el transgén.

En muchos casos, la transcripción de genes se incrementa por la presencia de uno o más intrones en el vector. El intrón puede ser de origen natural, especialmente cuando el transgén es una longitud completa o un fragmento de una secuencia de ADN genómico. El intrón puede ser homólogo o heterólogo con respecto al transgén y/o al mamífero transgénico en el cual se insertará el gen. La posición del intrón con respecto a la del promotor y el transgén es importante, dado que el intrón debe transcribirse para que sea eficaz. Una posición preferida para un intrón es la posición 3' respecto al sitio de inicio de la transcripción y la posición 5' respecto a la secuencia de terminación de la transcripción poliA. Para transgenes de ADNc, un intrón se coloca en un lado o el otro (es decir, en posición 5' o 3') de la secuencia codificante del transgén. Se puede utilizar cualquier intrón de cualquier fuente, incluyendo cualquiera de los organismos víricos, procariotas y eucariotas (plantas o animales), para expresar el polipéptido, con la condición de que sea compatible con la(s) célula(s) hospedadora(s) en la(s) que se va a insertar. En el presente documento también se incluyen intrones sintéticos. Opcionalmente, se puede utilizar más de un intrón en el vector.

Los vectores ejemplares para la expresión recombinante son aquellos que son compatibles con células hospedadoras de bacterias, insectos y mamíferos. Estos vectores incluyen, entre otros, pCRII (Invitrogen Company, San Diego, Calif.), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, Calif.) y pETL (BlueBaclI; Invitrogen).

Una vez construido el vector e insertado el ácido nucleico en el sitio apropiado del vector, el vector completo se puede insertar en una célula hospedadora adecuada para la amplificación y/o expresión del polipéptido. Las células comúnmente utilizadas incluyen: células procariotas tales como bacterias gramnegativas o grampositivas, es decir, cualquier cepa de *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Salmonella* y similares; células eucariotas tales como células CHO (ovario de hámster chino), células 293 de riñón humano; células COS-7; células de insecto, tales como, Sf4, Sf5, Sf0 y Sf21 y High 5 (todas de Invitrogen Company, San Diego, Calif.); células vegetales y diversas células de levadura tales como *Saccharomyces* y *Pichia*. Cualquier célula o línea celular susceptible de transformación o de transfección procedente de cualquier organismo tal como de bacterias, levaduras, hongos, plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, células vegetales y animales, es adecuada.

La inserción (denominada también "transformación" o "transfección") del vector en la célula hospedadora seleccionada, se puede llevar a cabo utilizando métodos tales como el método de cloruro de calcio, electroporación, microinyección, lipofección o DEAE-dextrano. El método seleccionado dependerá, en parte, del tipo de célula hospedadora que se utilice. Estos métodos y otros métodos adecuados, son muy conocidos por el experto en la técnica y se exponen, por ejemplo, en Sambrook, et al., citado anteriormente.

Las células hospedadoras que contienen el vector (es decir, transformado o transfectado) se pueden cultivar utilizando medios convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica. Los medios habitualmente contendrán todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y supervivencia de las células. Los medios adecuados para cultivar células de *E. coli* son, por ejemplo, el caldo Luria (LB) y/o el caldo Terrific (TB). Los medios adecuados para cultivar células eucariotas son RPMI 1640, MEM, DMEM, pudiendo todos ellos complementarse con suero y/o factores de crecimiento, según lo requiera la línea celular particular que se vaya a cultivar. Un medio adecuado para cultivos de células de insecto es el medio de Grace complementado con yeastolato, hidrolizado de lactoalbúmina y/o suero bovino fetal, según se necesite.

Habitualmente, como un complemento, solo se añade al medio un antibiótico u otro compuesto útil para el crecimiento selectivo de las células transformadas. El compuesto a utilizar estará determinado por el elemento marcador de selección presente en el plásmido con el cual se transforma la célula hospedadora. Por ejemplo,

cuando el elemento marcador de selección es resistencia a kanamicina, el compuesto añadido al medio de cultivo será kanamicina.

5 La cantidad de polipéptido que se produce en la célula hospedadora se puede evaluar utilizando métodos convencionales conocidos en el ámbito. Estos métodos incluyen, sin limitación, análisis de transferencia Western, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, electroforesis en gel no desnaturante, separación mediante HPLC (*high performance liquid chromatography*, cromatografía de líquidos de alto rendimiento), inmunoprecipitación y/o ensayos de unión.

10 Si el polipéptido se ha diseñado para ser secretado de las células hospedadoras, la mayor parte del polipéptido se encontrará probablemente en el medio de cultivo celular. No obstante, si el polipéptido no es secretado de las células hospedadoras, estará presente en el citoplasma (para bacterias grampositivas eucariotas y células hospedadoras de insectos) o en el periplasma (para células hospedadoras de bacterias gramnegativas).

15 Para polipéptidos intracelulares, primero, las células hospedadoras se rompen mecánicamente u osmóticamente para liberar el contenido citoplásmico en la solución tampón. El polipéptido se aísla después de esta solución.

20 Para la producción con alto rendimiento y a largo plazo de un polipéptido recombinante se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de manera estable el polipéptido de interés se pueden transformar utilizando vectores de expresión que pueden contener orígenes de replicación de virus y/o elementos de expresión endógenos y un gen marcador de selección en el mismo vector o en uno distinto. Después de la introducción del vector, se puede permitir que las células crezcan durante 1 a 2 días en un medio enriquecido antes de cambiarlas a un medio selectivo. La finalidad del marcador de selección es conferir resistencia a la selección y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan con éxito las secuencias introducidas.

25 Los clones resistentes de células transformadas de modo estable se pueden hacer proliferar utilizando técnicas de cultivo de tejido apropiadas para el tipo de célula. Una línea celular sustancialmente enriquecida con estas células puede aislarse después para proporcionar una línea celular estable.

30 Un método particularmente preferido de producción de alto rendimiento de un polipéptido recombinante de la presente invención, es utilizando amplificación con dihidrofolato reductasa (DHFR) en células CHO deficientes en DHFR, utilizando niveles sucesivamente más altos de metotrexato, como se describe en el documento US 4 889 803. El polipéptido que se obtiene puede estar en una forma glucosilada.

35 La purificación del polipéptido de la solución se puede llevar a cabo utilizando una diversidad de técnicas. Si el polipéptido se ha sintetizado de manera que contiene una etiqueta tal como hexahistidina u otro péptido pequeño ya sea en su extremo carboxilo o amino terminal, esencialmente se puede purificar en un proceso de una etapa al hacer pasar la solución a través de una columna de afinidad en donde la matriz de la columna tiene una alta afinidad por la etiqueta o por el polipéptido directamente (es decir, un anticuerpo monoclonal que reconoce de modo específico al polipéptido). Por ejemplo, la polihistidina se une con gran afinidad y especificidad a níquel, y por lo

40 tanto se puede utilizar una columna de afinidad de níquel (tal como las columnas de níquel Qiagen) para la purificación del polipéptido etiquetado con His (véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds., "Current Protocols In Molecular Biology", sección 10.11.8, John Wiley & Sons, New York (1993)).

45 La fuerte afinidad de un ligando por su receptor permite la purificación por afinidad de moléculas de unión a ligando y moléculas de unión a ligando utilizando una matriz de afinidad que comprende un compañero de unión complementario. Se puede utilizar la cromatografía de afinidad, por ejemplo, utilizando ya sea compañeros de unión naturales (por ejemplo, un ligando cuando se purifica una molécula de unión a ligando con afinidad por la misma) o anticuerpos generados utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo inmunización de un ratón, conejo u otro animal con un polipéptido apropiado). Los péptidos de la presente invención se pueden utilizar para generar

50 estos anticuerpos. Pueden emplearse anticuerpos conocidos o anticuerpos contra receptores de factor de crecimiento conocidos cuando comparten un epítopo con una molécula de unión a ligando dirigida.

Además, para la purificación, se pueden utilizar otros procedimientos muy conocidos. Estos procedimientos incluyen, sin limitación, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de tamiz molecular, HPLC, electroforesis en gel

55 nativo en combinación con elución de gel e isoelectroenfoque preparativo (máquina/técnica "isoprime", Hoefer Scientific). En algunos casos, dos o más de estas técnicas se pueden combinar para obtener mayor pureza. Los métodos de purificación preferidos incluyen etiquetado con polihistidina y cromatografía de intercambio de iones en combinación con isoelectroenfoque preparativo.

60 El polipéptido encontrado en el espacio periplasmático de la bacteria o en el citoplasma de células eucariotas, el contenido del periplasma o citoplasma, incluyendo cuerpos de inclusión (bacteria) si el polipéptido procesado ha formado estos complejos, se puede extraer de la célula hospedadora utilizando cualquier técnica estándar conocida por el experto en la técnica. Por ejemplo, las células hospedadoras pueden someterse a lisis para liberar el contenido del periplasma mediante una prensa Francesa, homogeneización y/o ultrasonido. Después, el

65 homogeneizado se puede centrifugar.

Si el polipéptido ha formado cuerpos de inclusión en el periplasma, los cuerpos de inclusión con frecuencia se unen a las membranas celulares internas y/o externas y de esta manera se encontrarán principalmente en el material sedimentado después de la centrifugación. Después, el material sedimentado se puede tratar con un agente caotrópico tal como guanidina o urea para liberar, descomponer y solubilizar los cuerpos de inclusión. El polipéptido solubilizado después se puede analizar utilizando electroforesis en gel, inmunoprecipitación o técnicas similares. Si se desea aislar el polipéptido, el aislamiento se puede llevar a cabo utilizando métodos estándar tales como los expuestos más adelante y en [Marston, et al., *Meth. Enz.* 182: 264-275 (1990)].

Genoterapia

En algunas realizaciones, los polinucleótidos de la invención comprenden además secuencias adicionales para facilitar la genoterapia. En una realización, para la genoterapia, se utiliza un transgén "desnudo" que codifica una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento (es decir, un transgén sin un vector vírico, liposómico u otro vector que facilite la transfección).

Los vectores también son útiles para regímenes de tratamiento de "genoterapia", en donde un polinucleótido que codifica un polipéptido o una molécula de unión a ligando se introduce en un sujeto que necesite inhibir la neovascularización, en una forma que hace que las células presentes en el sujeto expresen *in vivo* la molécula de unión a ligando de la invención. En el presente documento también son aplicables aspectos de genoterapia que se describen en la publicación de patente de Estados Unidos N.º 2002/0151680 y en el documento WO 01/62942.

Para introducir en el hospedador un polinucleótido que codifica una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento, se puede utilizar cualquier vector adecuado. Como ejemplos de vectores que se han descrito en la bibliografía se incluyen vectores retrovíricos deficientes en replicación, incluyendo, sin limitación, vectores de lentivirus (Kim et al., *J. Virol.*, 72(1): 811-816, 1998; Kingsman & Johnson, *Scrip Magazine*, Octubre, 1998, págs. 43-46); vectores víricos adenoasociados (AAV) (patente de Estados Unidos N.º 5 474 935; 5 139 941; 5 622 856; 5 658 776; 5 773 289; 5 789 390; 5 834 441; 5 863 541; 5 851 521; 5 252 479; Gnatenko et al., *J. Invest. Med.*, 45: 87-98, 1997); vectores adenovíricos (AV) (patentes de Estados Unidos N.º 5 792 453; 5 824 544; 5 707 618; 5 693 509; 5 670 488; 5 585 362; Quantin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2581-2584, 1992; Stratford Perricadet et al., *J. Clin. Invest.*, 90: 626-630, 1992; y Rosenfeld et al., *Cell*, 68: 143-155, 1992); un vector vírico adenoasociado adenovírico quimérico (patente de Estados Unidos N.º 5 856 152) o un virus de la variolovacuna o de herpesvirus (patente de Estados Unidos N.º 5 879 934; 5 849 571; 5 830 727; 5 661 033; 5 328 688); transferencia de genes mediada por lipofectina (BRL); vectores liposómicos (patente de Estados Unidos N.º 5 631 237, liposomas que comprenden proteínas del virus de Sendai); y combinaciones de los mismos.

Otros mecanismos de suministro no vírico contemplados incluyen, pero sin limitación, precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973; Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7: 2745-2752, 1987; Rippe et al., *Mol. Cell Biol.*, 10: 689-695, 1990), DEAE-dextrano (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5: 1188-1190, 1985), electroporación (Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6: 716-718, 1986; Potter et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81: 7161-7165, 1984), microinyección directa (Harland y Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101: 1094-1099, 1985.), liposomas cargados con ADN (Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721: 185-190, 1982; Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3348-3352, 1979; Felgner, *Sci Am.* 276(6): 102-6, 1997; Felgner, *Hum Gene Ther.* 7(15): 1791-3, 1996), sonication de células (Fechheimer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8463-8467, 1987), bombardeo de genes utilizando microproyectiles de alta velocidad (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 9568-9572, 1990) y transfección mediada por receptor (Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432, 1987; Wu y Wu, *Biochemistry*, 27:887-892, 1988; Wu y Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993).

La construcción de expresión (o, en realidad, una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento) puede estar atrapada en un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana de bicapa fosfolipídica y un medio acuoso interior. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos experimentan autorreordenación antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh y Bachhawat, en: *Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands*, Wu G, Wu C ed., New York: Marcel Dekker, págs. 87-104, 1991). La adición de ADN a liposomas catiónicos provoca una transición topológica de liposomas a glóbulos condensados líquidos-cristalinos ópticamente birrefringentes (Radler et al., *Science*, 275(5301): 810-4, 1997). Estos complejos de ADN-lípidos son posibles vectores no víricos para su uso en genoterapia y suministro.

El suministro de ácido nucleico mediado por liposomas y la expresión *in vitro* de ADN extraño, han sido satisfactorios. En la presente invención también se contemplan diversos enfoques comerciales que implican la tecnología de "lipofección". En ciertas realizaciones de la invención, el liposoma puede formar un complejo con un virus hemaglutinante (HVJ). Se ha demostrado que esto facilita la fusión con la membrana celular y promueve la entrada en la célula de ADN encapsulado en liposomas (Kaneda et al., *Science*, 243: 375-378, 1989). En otras realizaciones, el liposoma puede formar un complejo o emplearse junto con proteínas cromosómicas nucleares que no son histonas (HMG-1) (Kato et al., *J. Biol. Chem.* 266: 3361-3364, 1991). En realizaciones adicionales, el liposoma puede formar un complejo o emplearse junto con HVJ y HMG-1. En estas construcciones de expresión se han utilizado con éxito la

transferencia y expresión de ácido nucleico *in vitro* e *in vivo* y de esta manera son aplicables para la presente invención.

Otra realización de la invención para la transferencia de una construcción de expresión de ADN desnudo en células puede implicar el bombardeo de partículas. Este método depende de la capacidad de acelerar microproyectiles recubiertos con ADN a una alta velocidad permitiéndoles perforar las membranas celulares y entrar en las células sin destruirlas (Klein et al., Nature, 327: 70-73, 1987). Se han desarrollado diversos dispositivos para acelerar partículas pequeñas. Uno de estos dispositivos se basa en una descarga de alto voltaje para generar una corriente eléctrica que a su vez proporciona la fuerza impulsora (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 87: 9568-9572, 1990). Los microproyectiles utilizados han consistido en sustancias biológicamente inertes, tales como perlas de tungsteno o de oro.

En realizaciones que emplean un vector vírico, los polinucleótidos preferidos aún incluyen un promotor y una secuencia de poliadenilación adecuados, como se describe anteriormente. Además, será evidente que en estas realizaciones el polinucleótido incluye además secuencias polinucleotídicas del vector (por ejemplo, secuencias polinucleotídicas adenovíricas) conectadas operativamente a la secuencia que codifica un polipéptido de la invención.

Usos terapéuticos de las moléculas de unión a ligando

Los polipéptidos y las moléculas de unión a ligando descritos en el presente documento, así como los polinucleótidos y vectores que los codifican, son útiles para inhibir procesos celulares que son mediados a través de factores de crecimiento endoteliales que inducen transducción de señal a través de VEGFR-2 o VEGFR-3 y tienen indicaciones para la profilaxis o terapia de trastornos asociados a angiogénesis y/o linfangiogénesis aberrantes (por ejemplo, diversos trastornos oculares y cáncer) que se estimulan por las acciones de estos factores de crecimiento en estos receptores. Los polipéptidos y las moléculas de unión a ligando descritos en el presente documento, y los polinucleótidos y vectores que los codifican, son terapéuticamente útiles para tratar o impedir cualquier enfermedad o afección que mejore, disminuya, inhiba o impida por la retirada, inhibición o reducción de VEGF-C y/o VEGF-D. Una lista no exhaustiva de afecciones específicas mejoradas por la inhibición o reducción de VEGF-C y/o VEGF-D (y en particular al menos VEGF-C) incluye: afecciones clínicas que se caracterizan por proliferación excesiva de células endoteliales vasculares, permeabilidad vascular, edema o inflamación tal como edema cerebral asociado a daño, ictus o tumor; edema asociado a trastornos inflamatorios tales como psoriasis o artritis, incluyendo artritis reumatoide; asma; edema generalizado asociado a quemaduras, ascitis y derrame pleural asociado a tumores, inflamación o traumatismo; inflamación crónica de las vías respiratorias; síndrome de filtración capilar; septicemia; enfermedad renal asociada a aumento de filtración de proteínas; y trastornos oculares, tales como degeneración macular y retinopatía diabética relacionadas con la edad.

Aunque por brevedad, a continuación se describen muchos de los métodos con respecto a composiciones que comprenden una molécula de unión a ligando, deberá entenderse que la práctica de la invención se contempla con cualquiera de las construcciones descritas en el presente documento (polipéptidos, moléculas y construcciones de unión a ligando así como polinucleótidos que los codifican, dímeros u otros multímeros, etc.).

Un uso terapéutico ejemplar es un método para inhibir la neovascularización en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento, en una cantidad eficaz para inhibir la neovascularización en el sujeto. En algunas realizaciones, la neovascularización comprende neovascularización coroidea o retiniana. En algunas realizaciones la neovascularización es neovascularización tumoral que se produce en cánceres malignos y otros tumores.

En otro caso, en el presente documento se describe un método de profilaxis o terapia para un trastorno ocular asociado a neovascularización, que comprende administrar a un sujeto que necesite profilaxis o terapia para el trastorno ocular, una composición que comprende una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento.

En otro caso, en el presente documento se describe un método de profilaxis o terapia para un trastorno ocular que produce edema retiniano, que comprende administrar a un sujeto que necesite profilaxis o terapia para el trastorno o enfermedad ocular, una composición que comprende una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento.

Como ejemplos de trastornos oculares que pueden tratarse se incluyen neovascularización coroidea, edema macular diabético, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética proliferativa, oclusión de la vena retiniana y neovascularización de la córnea/rechazo de trasplante. Preferentemente, la cantidad de molécula de unión a ligando empleada es eficaz para inhibir la unión del ligando VEGF-C y/o VEGF-D con VEGFR-3 (y, preferentemente, también con VEGFR-2) o el efecto estimulador de VEGF-C y/o VEGF-D sobre VEGFR-3 (y, preferentemente, también sobre VEGFR-2).

En una realización, el trastorno ocular es degeneración macular relacionada con la edad. Son ejemplos de degeneración macular relacionada con la edad, la degeneración macular no neovascular (conocida también como "seca") y neovascular (conocida también como "húmeda"). En una realización preferida, el trastorno ocular es

degeneración macular húmeda relacionada con la edad. El tratamiento o la prevención de la degeneración macular húmeda relacionada con la edad también abarca tratar o evitar la neovascularización coroidea o el desprendimiento epitelial pigmentario.

- 5 En una realización, el trastorno ocular es vasculopatía coroidea polipoidea. La vasculopatía coroidea polipoidea se caracteriza por una lesión desde la red vascular coroidea interna de los vasos que terminan en una protuberancia aneurismática o en una proyección exterior (Ciardella et al. (2004) *Surv Ophthalmol.* 49: 25-37).

- 10 En una realización, el trastorno ocular es una afección asociada a neovascularización coroidea. Como ejemplos de afecciones asociadas a neovascularización coroidea se incluyen una afección degenerativa, inflamatoria, traumática o idiopática. El tratamiento o la prevención de un trastorno degenerativo asociado a neovascularización coroidea también abarca el tratamiento o la prevención de un trastorno heredodegenerativo. Como ejemplos de trastornos heredodegenerativos se incluyen distrofia macular viteliforme, fondo flavimaculatus y cabeza del nervio óptico con drusas. Como ejemplos de afecciones degenerativas asociadas a neovascularización coroidea se incluyen degeneración miópica o estrías angioides. El tratamiento o la prevención de un trastorno inflamatorio asociado a neovascularización coroidea también incluye el tratamiento o la prevención del síndrome de histoplasmosis ocular, coroiditis multifocal, coroiditis serpigínea, toxoplasmosis, toxocariasis, rubéola, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada, síndrome de Behcet u oftalmia simpática. El tratamiento o la prevención de trastornos traumáticos asociados a neovascularización coroidea también abarca el tratamiento a la prevención de rotura coroidea o una afección traumática causada por fotocoagulación intensa.

En una realización, el trastorno ocular es retinopatía hipertensiva.

- 25 En una realización, el trastorno ocular es retinopatía diabética. La retinopatía diabética puede ser retinopatía diabética no proliferativa o proliferativa. Como ejemplos de retinopatía diabética no proliferativa se incluyen edema macular e isquemia macular.

En una realización, el trastorno ocular es retinopatía de células falciformes.

- 30 En una realización, el trastorno ocular es una afección asociada a neovascularización retiniana periférica. Como ejemplos de afecciones asociadas a neovascularización retiniana periférica se incluyen enfermedad vascular isquémica, enfermedad inflamatoria con posible isquemia, incontinencia pigmentaria, retinitis pigmentaria, retinosquiasis o desprendimiento de retina crónico.

- 35 Como ejemplos de enfermedad vascular isquémica se incluyen retinopatía diabética proliferativa, oclusión de la rama venosa retiniana, oclusión de la rama arterial retiniana, fístula carótido-carvenosa, hemoglobinopatía falciforme, hemoglobinopatía no falciforme, síndrome de IRVAN (trastorno vasculítico retiniano caracterizado por vasculitis retiniana idiopática, un aneurisma y neurorretinitis), embolia retiniana, retinopatía de la premadurez, vitreorretinopatía exudativa familiar, síndrome de hiperviscosidad, síndrome del arco aórtico o enfermedad de Eales.

- 40 Como ejemplos de hemoglobinopatía falciforme se incluyen hemoglobinopatía SS y hemoglobinopatía SC. Como ejemplos de hemoglobinopatía no falciforme se incluyen hemoglobinopatía AC y hemoglobinopatía AS. Como ejemplos de síndrome de hiperviscosidad se incluyen leucemia, macroglobulinemia de Waldenström, mieloma múltiple, policitemia o trastorno mieloproliferativo.

- 45 El tratamiento o la prevención de una enfermedad inflamatoria con posible isquemia también abarca o la prevención de vasculitis retiniana asociada con enfermedad sistémica, vasculitis retiniana asociada con un agente infeccioso, uveítis o retinopatía en perdigonada. Como ejemplos de enfermedades sistémicas se incluyen lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Behcet, enfermedad de intestino inflamatorio, sarcoidosis, esclerosis múltiple, granulomatosis de Wegener y poliarteritis nodosa. Como ejemplos de agentes infecciosos se incluyen un agente bacteriano que es el agente causante de la sífilis, tuberculosis, enfermedad de Lyme o enfermedad por arañazo de gato, un virus tal como herpesvirus o un parásito tal como *Toxocara canis* o *Toxoplasma gondii*. Como ejemplos de uveítis se incluyen uveítis intermedia (pars planitis) o síndrome de uveítis de Fuchs.

- 55 En una realización, el trastorno ocular es retinopatía de la premadurez. La retinopatía de la premadurez puede producirse por un crecimiento anómalo de vasos sanguíneos en el lecho vascular que da soporte a la retina en desarrollo (Pollan C (2009) *Neonatal Netw.* 28: 93-101).

- 60 En una realización, el trastorno ocular es enfermedad oclusiva venosa. Como ejemplos de enfermedad oclusiva venosa se incluyen oclusión de la rama venosa retiniana y oclusión de la vena retiniana central. Una oclusión de la rama venosa retiniana puede ser un bloqueo de la parte de la circulación que drena la retina de sangre. El bloqueo puede provocar retropresión en los capilares, lo que conduce a hemorragias y también a filtración de líquido y otros constituyentes de la sangre.

- 65 En una realización, el trastorno ocular es enfermedad oclusiva arterial. Como ejemplos de enfermedad oclusiva arterial se incluyen oclusión de la rama arterial retiniana, oclusión de la arteria retiniana central y síndrome isquémico ocular. Una oclusión de la rama arterial retiniana (ORAR) puede producirse cuando una de las ramas del suministro

arterial a la retina se ocluye.

En una realización, el trastorno ocular es coriorretinopatía serosa central (CSC). En una realización, la CSC se caracteriza por filtración de líquido en la macula central.

5 En una realización, el trastorno ocular es edema macular cistoide (EMC). En una realización, el EMC afecta a la retina central o a la macula. En otra realización, el EMC se presenta después de cirugía de cataratas.

10 En una realización, el trastorno ocular es telangiectasia retiniana. En una realización, la telangiectasia retiniana se caracteriza por dilatación y tortuosidad de los vasos de la retina y formación de aneurismas múltiples. La JXT (por siglas del inglés *juxtafoveal telangiectasia*, telangiectasia yuxtafoveolar) idiopática, los aneurismas miliares de Leber y la enfermedad de Coats son tres tipos de telangiectasia retiniana.

15 En una realización, el trastorno ocular es macroaneurisma arterial.

En una realización, el trastorno ocular es angiomatosis retiniana. En una realización, la angiomatosis retiniana se produce cuando los vasos oculares forman angiomas múltiples.

20 En una realización, el trastorno ocular es retinopatía inducida por radiación (RIPR). En una realización, la RIPR puede presentar síntomas tales como edema macular y retinopatía no proliferativa y proliferativa.

En una realización, el trastorno ocular es rubeosis iridis. En otra realización, la rubeosis iridis se produce por la formación de glaucoma neovascular. En otra realización, la rubeosis iridis se produce por retinopatía diabética, oclusión de la vena retiniana central, síndrome isquémico ocular o desprendimiento retiniano crónico.

25 En una realización, el trastorno ocular es un neoplasma. Como ejemplos de neoplasmas se incluyen un tumor en el párpado, un tumor en la conjuntiva, un tumor coroideo, un tumor en el iris, un tumor en el nervio óptico, un tumor retiniano, un tumor intraocular infiltrado o un tumor orbital. Como ejemplos de un tumor en el párpado se incluyen carcinoma de células basales, carcinoma escamoso, carcinoma sebáceo, melanoma maligno, hemangioma capilar, hidrocistoma, queratosis nevoide o seborreica. Como ejemplos de tumor en la conjuntiva se incluyen sarcoma de Kaposi de la conjuntiva, carcinoma escamoso, neoplasia intraepitelial de la conjuntiva, dermoide epibulbar, linfoma de la conjuntiva, melanoma, pingüecula o pterigio. Como ejemplos de un tumor coroideo se incluyen nevus coroideo, hemangioma coroideo, tumor coroideo metastásico, osteoma coroideo, melanoma coroideo, melanoma del cuerpo ciliar o nevus de Ota. Como ejemplos de un tumor en el iris se incluyen metástasis uveal anterior, quiste en el iris, melanocitoma del iris, melanoma del iris o quiste perlado del iris. Como ejemplos de un tumor en el nervio óptico se incluyen melanocitoma del nervio óptico, meningioma de la vaina del nervio óptico, melanoma coroideo que afecta el nervio óptico o metástasis circumpapilar con neuropatía óptica. Como ejemplos de un tumor retiniano se incluyen hipertrofia del epitelio pigmentario retiniano (EPR), adenoma del EPR, carcinoma del EPR, retinoblastoma, hamartoma del EPR y angioma de von Hippel. Como ejemplos de un tumor intraocular infiltrante se incluyen leucemia linfocítica crónica, coroidopatía infiltrante o linfoma intraocular. Como ejemplos de un tumor orbital se incluyen carcinoma quístico adenoide de la glándula lagrimal, hemangioma cavernoso orbitario, linfangioma de la órbita, mucocel orbitario, pseudotumor orbitario, rabdomyosarcoma orbitario, hemangioma periocular de la infancia o pseudotumor orbitario esclerosante.

45 En un aspecto adicional, la divulgación presenta un método de tratamiento de una lesión ocular, que comprende administrar por vía local, a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento, de manera que la lesión ocular disminuya o mejore. Preferentemente, la lesión ocular es lesión en la córnea o en la conjuntiva y el método de tratamiento reduce la angiogénesis e inflamación asociada a la lesión ocular. En algunas realizaciones el método es útil para tratar una lesión aguda y subaguda en la

50 lesión en la córnea o en la conjuntiva. La lesión aguda en la córnea se puede tratar a las 24 horas de presentación e incluye lesión en la córnea o en la conjuntiva causada por un objeto penetrante, un cuerpo extraño o una lesión por sustancias químicas o quemaduras. Una lesión subaguda puede tratarse hasta dos semanas después de producirse la lesión y puede incluir las lesiones enumeradas anteriormente así como etiologías infecciosas. En algunas realizaciones, la lesión ocular se produce por traumatismo, por ejemplo, lesiones quirúrgicas, quemaduras químicas,

55 trasplante de córnea, enfermedades infecciosas o inflamatorias.

La duración del tratamiento variará según la lesión, pero la duración del tratamiento puede ser corta, por ejemplo, de hasta un mes y puede incluir un período de observación de 3 a 6 meses durante el cual se puede proporcionar tratamiento nuevamente. La administración también puede incluir un segundo agente, tal como un agente inmunosupresor, por ejemplo uno o más de un corticosteroide, dexametasona o ciclosporina A. La administración local incluye, por ejemplo, la administración de la molécula de unión a ligando en gotas oculares aplicadas a los ojos, o inyección subconjuntival en los ojos.

60 En un caso adicional, en el presente documento se describe un método de curación de una lesión ocular, que comprende administrar por vía local a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento, de manera que se cure la lesión ocular.

En un caso adicional, en el presente documento se describe un método para reducir o disminuir la angiogénesis asociada a lesión ocular, que comprende administrar por vía local a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento, de manera que la angiogénesis asociada a la lesión ocular se reduzca o disminuya.

En un caso adicional, en el presente documento se describe un método para reducir o disminuir la inflamación asociada a una lesión ocular, que comprende administrar por vía local a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento, de manera que la inflamación asociada a la lesión ocular se reduzca o disminuya.

En un caso adicional, en el presente documento se describe un método de administración de una molécula de unión a ligando de la presente invención para el tratamiento de la angiogénesis y/o inflamación asociada a lesión o infección ocular, que comprende la administración local de gotas oculares que comprenden una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento, o la administración subconjuntival por inyección o implantación.

En un caso adicional, en el presente documento se describe un método para ampliar la supervivencia de un injerto de córnea después de un trasplante de córnea en un paciente, administrando al paciente una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que contiene una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento (en donde la angiogénesis y/o linfangiogénesis se suprime en la córnea del paciente).

Los estudios de respuesta a la dosis permiten determinar exactamente la cantidad adecuada de molécula de unión a ligando que se debe emplear. Las cantidades eficaces se pueden calcular, por ejemplo, a partir de mediciones de la afinidad de unión de un polipéptido para un receptor diana, de la cantidad de receptor presente en las células diana, del volumen de dilución esperado (por ejemplo, peso del paciente y volumen de sangre para realizaciones *in vivo*) y de las velocidades de eliminación del polipéptido. Por ejemplo, la bibliografía existente respecto a la dosificación de anticuerpos conocidos de VEGF-C también proporciona una orientación para la dosificación de las moléculas de unión a ligando que se describen en el presente documento. La bibliografía que describe la dosificación de Aflibercept (Regeneron), una trampa de ligando basada en VEGFR-1/VEGFR-2, también puede utilizarse para proporcionar una orientación para la dosificación de moléculas terapéuticas descritas en el presente documento.

En algunos casos, cuando la molécula de unión a ligando se va a administrar por inyección intravítrea, ésta se administra a una concentración de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 4 mg por ojo (o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 3 mg, o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 4 mg, o de aproximadamente 3 mg a aproximadamente 4 mg, o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2 mg por ojo). En algunos casos, la molécula de unión a ligando se administra a una concentración de aproximadamente 1 mg, o aproximadamente 2 mg, o aproximadamente 3 mg, o aproximadamente 4 mg, o aproximadamente 5 mg o aproximadamente 6 mg por ojo. En algunas realizaciones, la molécula de unión a ligando está presente en cualquiera de las concentraciones enumeradas anteriormente a un volumen de 10 μ l, 15 μ l, 20 μ l, 25 μ l, 30 μ l, 35 μ l, 40 μ l, 45 μ l, 50 μ l, 60 μ l, 70 μ l, 80 μ l, 90 μ l, 95 μ l, o 100 μ l. En algunos casos, la molécula de unión a ligando se administra a una concentración de aproximadamente 2 a 4 mg/50 μ l.

La molécula de unión a ligando descrita en el presente documento se puede administrar estrictamente como un tratamiento profiláctico para impedir la neovascularización en sujetos en riesgo de desarrollar una enfermedad ocular asociada a neovascularización (por ejemplo, retinopatía diabética, degeneración macular) o como un tratamiento terapéutico a sujetos que padecen la enfermedad ocular, con el propósito de inhibir la neovascularización en el ojo de un sujeto que lo necesite.

Los sujetos en riesgo de desarrollar retinopatía diabética o degeneración macular, incluyen sujetos mayores de cincuenta años; sujetos que padecen artritis reumatoide, sujetos con diabetes, sujetos con anomalías tiroideas, sujetos con asma, sujetos con cataratas, sujetos con glaucoma, sujetos con lupus, sujetos con presión sanguínea alta y sujetos con desprendimiento de la retina. Otros factores de riesgo incluyen la genética, la alimentación, el hábito de fumar y escasa exposición lumínica.

En algunos casos, en el presente documento se describe un método de selección de un régimen terapéutico para un sujeto que lo necesite que comprende explorar a un sujeto para analizar uno o más síntomas de un trastorno ocular asociado a neovascularización de la retina y prescribir la administración al sujeto de una composición que comprende una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento. En otro caso, en el presente documento se describe un método de tratamiento de un sujeto que padece un trastorno ocular asociado a neovascularización de la retina que comprende identificar a un sujeto que tiene uno o más síntomas del trastorno ocular y administrar al sujeto una composición que comprende una molécula de unión a ligando. Los síntomas asociados a un trastorno ocular asociados a neovascularización de la retina incluyen, pero sin limitación, visión borrosa y pérdida de visión lenta con el tiempo, partículas pequeñas flotando en el ojo, sombras o zonas con pérdida de visión, visión distorsionada y ceguera nocturna.

En algunos casos, los métodos descritos en el presente documento comprenden además la prescripción (o

administración) de un régimen de referencia para el tratamiento de la xeroftalmia. En el contexto de los métodos descritos en el presente documento, un tratamiento “de referencia” se refiere a un tratamiento que generalmente está aceptado por los médicos para un determinado tipo de pacientes en quienes diagnosticados con un tipo de dolencia. Para la retinopatía diabética y la degeneración macular, por ejemplo, un aspecto de la invención es mejorar la terapia de referencia con co-terapia con una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento que inhibe la neovascularización de la retina. Como ejemplos de terapias de referencia para la retinopatía diabética y degeneración macular se incluyen, pero sin limitación, higiene palpebral, antibióticos tópicos (incluyendo, pero sin limitación, pomadas de eritromicina o bacitracina), tetraciclinas orales (tetraciclina, doxiciclina o minociclina), compuestos antiinflamatorios (incluyendo, pero sin limitación, ciclosporina), corticosteroides, fotocoagulación láser y terapia fotodinámica.

También se contemplan métodos de tratamiento de un sujeto mamífero con un trastorno ocular asociado a neovascularización de la retina que no responden adecuadamente a un régimen de referencia para el tratamiento del trastorno ocular, que comprenden administrar al sujeto una molécula de unión a ligando en una cantidad eficaz para tratar el trastorno.

El sujeto mamífero es, preferentemente, un ser humano. También se contempla la práctica de los métodos de la divulgación en otros sujetos mamíferos, especialmente mamíferos que se utilizan habitualmente como modelos para demostrar la eficacia terapéutica en seres humanos (por ejemplo, primates, porcinos, caninos o lagomorfos).

Politerapia y agentes activos adicionales

La politerapia y las realizaciones profilácticas de la divulgación, incluyen productos y métodos. Como ejemplos de compuestos que pueden administrarse en combinación con una o más de las moléculas de unión a ligando descritas en el presente documento se incluyen, pero sin limitación, los compuestos proporcionados a continuación en la tabla 2.

Producto	Diana del mecanismo de acción	Comentarios
Inhibidores de VEGF-A		
KH902	Inhibidor de VEGF-A	Proteína de fusión recombinante VEGF-receptor-Fc con dominio de unión a ligando tomado de VEGFR-1 y VEGFR-2 que se une a todas las isoformas de VEGF-A y PlGF pero <u>no</u> a las de VEGF-C o D
VEGF-A DARPIn (AGN-150998)	Inhibidor de VEGF-A	Procedente de la proteína anquirina con unión selectiva a VEGF-A y no a otros miembros de la familia VEGF.
ESBA1008	Fragmento de anticuerpo monocatenario contra VEGF-A	
Ranibizumab (Lucentis ^{MR})	Fragmento de anticuerpo monoclonal (Fab)	Derivado del mismo anticuerpo de ratón original que <u>bevacizumab</u> (Avastin ^{MR})
Anti-Pericito (inhibidores de PDGF-B)		
E10030 (Fovista ^{MR})	Aptámero de anti-PDGF	Las dianas de pericito actúan como mediadoras en la resistencia a la terapia con anti-VEGF-A
Inhibidores de cinasa de múltiples dianas		
Vatalanib (PTK787/PTK/ZK)	Inhibidor de tirosina cinasa	
AL-39324	Inhibidor de tirosina cinasa	Inyectable
Pazopanib	Inhibidor de tirosina cinasa	TKI de VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-2, PDGFR-a/b y cKit. Aplicación tópica de de gotas oculares
TG100801	Inhibidor de tirosina cinasa	Profrámaco que inhibe los receptores de VEGF, PDGF, FGF y la familia Src de cinasas. Administración tópica
Escualamina	Molécula pequeña de aminosterol que se une a calmodulina	Se une a calmodulina e impide la modulación de VEGF, PDGF y bFGF.
Inhibidores de la ruta de mTOR		
Sirolimus (DE-109)	Inhibidor de mTOR	Agente antiproliferativo e inmunosupresor de acción amplia
Sirolimus	inhibidor de mTOR	
PF-655 (REDD14P)	ARNip sintético para RTP801 (regulador de mTOR)	El estrés inducido por el inhibidor de mTOR que estabiliza el complejo inhibidor TSC1-TSC2 y que mejora la muerte celular dependiente de estrés oxidativo

(continuación)

Producto	Diana del mecanismo de acción	Comentarios
Palomid529	Inhibidor de TORC1/TORC2 de molécula pequeña (ruta mTOR)	
Agentes que alteran el flujo vascular		
Zybrestat	AFV (agente que altera el flujo vascular) e inhibidor de cadherina 5	
Fosbretabulina (fosfato de combrestatina A4)	agente que altera el flujo (AFV)	
Agentes antiinflamatorios		
Corticosteroides		
Posurdex/SK-0503	Corticosteroide e inhibidor de VEGF-A	
Iluvien (acetónido de fluocinolona)	Corticosteroide (inserto intravítreo)	
IBI-20089	Triamcinolona de liberación lenta	
Inhibidores del complemento		
LFG316	Anti-C5 (ruta del complemento)	Dirige selectivamente la inflamación asociada a la DMRE
ARC1905	Aptámero anti-C5	
AL-78898A (POT-4)	Péptido cíclico anti-C3	Se dirige a C3 en la ruta del complemento
“Otros” agente antiinflamatorios		
Humira (adalimumab)	mAb anti-TNF	
Agentes diana diversos		
iSONEP	mAb anti-S1P	El mAb se dirige al lípido esfingosina-1-fosfato
Ocriplasmina	Forma truncada de serina proteasa plasmina humana	Aprobado para el tratamiento de adhesión vítreomacular sintomática
Volociximab	Ab quimérico contra integrina $\alpha 5\beta 1$	Bloquea la unión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ con fibronectina implicada en la estabilización vascular
hl-con1	Factor antitislular	Proteína quimérica, homodimérica, similar a IgG, compuesta por un dominio V11a de factor mutante fusionado a una región efectora (IgG Fc). El mutante fV11 se une al factor tislular que se expresa en la superficie luminal de células patológicas que incluyen lesiones por DMRE, activación de la destrucción inmunitaria de células diana h1-con1 mediante funciones efectoras
ORA102	Diana desconocida	
Genoterapia		
rAAV.sFlt-1	Suministro de gen adenovirico de la forma soluble de VEGFR-1	Genoterapia suministrada por vía subretiniana. Solo ligandos “trampa” de VEGFR-1 (VEGF-A, VEGF-B, PlGF).
adPEDF	Suministro de gen adenovirico del factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF)	El PEDF es antiangiogénico (inhibe la proliferación, la migración y la permeabilidad de EC inducida por VEGF).
RetinoStat	Suministro lentivirico de angiostatina y endostatina	La angiostatina (fragmento de plasmina) y la endostatina (fragmento C-terminal de colágeno tipo XVIII) son inhibidores endógenos de la angiogénesis
AAV2-sFLT01	Suministro de gen adenovirico de la forma soluble de VEGFR-1	Genoterapia suministrada por vía intravítrea. Solo ligandos “trampa” de VEGFR-1 (VEGF-A, VEGF-B, PlGF)
Antisentido y ARNsi		
GS-101	Antisentido dirigido a IRS-1	Aplicación tópica de antisentido al Sustrato-1-Receptor de Insulina
Bevasiranib	ARNip dirigido a VEGF	
AGN211745	ARNip dirigido a VEGFR-1	

Las moléculas de unión a ligando se pueden administrar en combinación con uno o más compuestos activos o

terapias adicionales que incluyen una segunda molécula trampa receptora, un agente citotóxico, cirugía, dispositivos de catéter y radiación. Como ejemplos de productos de combinación se incluyen dos o más agentes formulados como una sola composición o envasados conjuntamente en composiciones distintas, por ejemplo, como un envase o kit monodoso. Como ejemplos de métodos de combinación se incluyen la prescripción de la administración, o
 5 administración de dos o más agentes de manera simultánea o al mismo tiempo o de manera escalonada (es decir, secuencialmente).

La expresión “agente citotóxico”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o que provoca su destrucción. La expresión pretende incluir isótopos radioactivos
 10 (por ejemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o sus fragmentos.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Como ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (Cytosan^{MR});
 15 sulfonatos de alquilo tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; mostazas nitrógenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estrainustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex,
 20 zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como amcitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxilfluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiofanol, mepitiofanol, testolactona; antisuiprarrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico, amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina, demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglucido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK^{MR}; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosido (“Ara-C”);
 35 ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo paclitaxel (Taxol^{MR}, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (Taxotere^{MR}, Aventis Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatina y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinóico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas sobre tumores tales como anti-estrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4-(5)-imidazoles inhibidores de aromataza, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY 117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.
 45

Un “agente inhibidor de crecimiento”, cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto o a una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa ya sea *in vitro* o *in vivo*. Los
 50 ejemplos de agentes inhibidores de crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar diferente de la fase S), tales como agentes que inducen la interrupción de las fases G1 y M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), Taxol^{MR} e inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Estos agentes que interrumpen la fase G1 también llegarán a interrumpir la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona,
 55 dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C.

Productos inhibidores de VEGF-A (VEGF)

En algunos casos, los métodos descritos en el presente documento comprenden, opcionalmente, administrar una
 60 sustancia activa terapéutica para inhibir la unión de VEGF-A con uno o más de sus receptores, especialmente VEGFR-2. Un producto inhibidor de VEGF-A se puede administrar en combinación con una o más de las moléculas de unión a ligando descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el producto inhibidor de VEGF-A y la molécula de unión a ligando se coadministran en una sola composición. En otros casos, el producto inhibidor de VEGF-A se administra como una composición distinta de la molécula de unión a ligando.
 65

En una realización, el producto inhibidor de VEGF-A se selecciona de ranibizumab, bevacizumab, aflibercept, proteína

de fusión de receptor de VEGF-Fc KH902, anticuerpo 2C3, ORA102, pegaptanib, bevasiranib, SIRNA-027, decursina, decursinol, picropodofilina, guggulsterona, PLG101, eicosanoide LXA4, PTK787, pazopanib, axitinib, CDDO-Me, CDDO-Imm, shikonina, beta-hidroxiisovalerilshikonina, EYE001, gangliósido GM3, anticuerpo DC101, anticuerpo Mab25, anticuerpo Mab73, anticuerpo 4A5, anticuerpo 4E10, anticuerpo 5F12, anticuerpo VA01, anticuerpo BL2, proteína relacionada con VEGF, sFLT01, sFLT02, péptido B3, TG100801, sorafenib, o anticuerpo G6-31, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de cualquiera de los productos mencionados anteriormente.

Las secuencias de ADNc y de aminoácidos del DEC de VEGFR-2 humano se exponen en las SEQ ID NOS: 5 y 6, respectivamente. El "producto inhibidor de VEGF-A" puede ser cualquier molécula que actúe con especificidad por reducir las interacciones de tipo VEGF-A/VEGFR-2, por ejemplo, bloqueando la unión de VEGF-A con VEGFR-2 o reduciendo la expresión de VEGFR-2. El término "VEGF-A", como se utiliza en el presente documento, se refiere al factor de crecimiento endotelial vascular que induce angiogénesis o un proceso angiogénico e incluye los diversos subtipos de VEGF que surgen, por ejemplo, por corte y empalme alternativo del gen de VEGF-A incluyendo VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ y VEGF₁₈₉ que inducen angiogénesis o un proceso angiogénico. El término "VEGF" se puede utilizar para referirse a un polipéptido "VEGF" o a un gen o ácido nucleico que codifica "VEGF".

La expresión "producto inhibidor de VEGF-A" se refiere a un agente que reduce o inhibe, parcial o completamente, la actividad o producción de VEGF-A. Un producto inhibidor de VEGF-A puede reducir o inhibir, directa o indirectamente, la actividad o producción de un VEGF-A específico, tal como VEGF₁₆₅. Además, los "productos inhibidores de VEGF-A" incluyen agentes que actúan sobre un ligando de VEGF-A o su receptor afín, de manera que reducen o inhiben una señal receptora asociada a VEGF-A. Los ejemplos de "productos inhibidores de VEGF-A" incluyen moléculas antisentido, ribozimas o ARNi que tiene como objetivo un ácido nucleico de VEGF-A; aptámeros de VEGF-A; anticuerpos contra VEGF-A; señuelos del receptor de VEGF soluble que impiden la unión de un VEGF-A con su receptor afín; moléculas antisentido, ribozimas, o ARNi que tiene como objetivo un ácido nucleico del receptor de VEGF-A afín (VEGFR-1 y/o VEGFR-2); aptámeros de VEGFR-1 y VEGFR-2 o anticuerpos contra VEGFR-1 y VEGFR-2; e inhibidores de tirosina cinasa de VEGFR-1 y/o VEGFR-2.

El inhibidor de VEGF-A puede ser un polipéptido que comprende un fragmento del DEC de VEGFR-2 soluble (aminoácidos 20 a 764 de SEQ ID NO: 6) que se une a VEGF; un fragmento del DEC de VEGFR-1 soluble, una trampa de ligando basada en VEGFR-1/VEGFR-2 soluble tal como Aflibercept (Regeneron); polinucleótidos antisentido de VEGFR-2 o ARN de interferencia pequeño (ARNip); anticuerpos anti-VEGFR-2; un polipéptido inhibidor de VEGFR-2 que comprende un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo anti-VEGFR-2 que inhibe la unión entre VEGFR-2 y VEGF; un aptámero que inhibe la unión entre VEGFR-2 y VEGF-A. En algunas variantes, la trampa ligando basada en VEGFR-2 comprende un proteína de fusión que comprende el fragmento de polipéptido VEGFR-2 soluble fusionado a un fragmento de región constante de inmunoglobulina (Fc). En algunas realizaciones, un fragmento de polipéptido VEGFR-2 se fusiona con la fosfatasa alcalina (FA). En el documento WO 02/060950 se encuentran métodos de preparación de construcciones de fusión con la región Fc o con la FA.

Se han descrito diversos anticuerpos contra VEGF-A, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 8 349 322; 8 236 312; 8 216 571; 8 101 177; 8 092 797; 8 088 375; 8 034 905; 5 730 977; 6 342 219, 6 524 583, 6 451 764, 6 448 077, 6 416 758, 6 342 221 y las publicaciones PCT WO 96/30046, WO 97/44453 y WO 98/45331. Como ejemplos de anticuerpos contra VEGF-A se incluyen Bevacizumab (Avastin^{MR}) y Ranibizumab (Lucentis^{MR}). En algunos casos, una o más moléculas de unión a ligando descritas en el presente documento se administran en combinación con bevacizumab. En algunas realizaciones, una o más moléculas de unión a ligando descritas en el presente documento se administran en combinación con ranibizumab.

En algunas realizaciones, el inhibidor de VEGF-A es EYE001 (anteriormente denominado NX1838) que es un aptámero PEGilado modificado que se une con afinidad alta y específica a la isoforma de VEGF humano soluble principal (véanse las patentes de Estados Unidos N.º 6 011 020; 6 051 698 y 6 147 204). El aptámero se une e inactiva VEGF de una manera similar a la de un anticuerpo de alta afinidad dirigido a VEGF. Otro aptámero de VEGF útil es EYE001 en su forma no pegilada.

En un caso preferido, una o más moléculas de unión a ligando descritas en el presente documento se administran en combinación con aflibercept (Eylea^{MR}) (Holash et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 11393-11398, 2002.).

Se han descrito diversos anticuerpos contra VEGFR-2 véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 6 334 339 y las publicaciones de patente de Estados Unidos N.º 2002/0064528, 2005/0214860 y 2005/0234225. Los anticuerpos son útiles para modular interacciones de tipo VEGFR-2/VEGF debido a la capacidad para generar fácilmente anticuerpos con especificidad relativa y debido a las constantes mejoras tecnológicas en cuanto a adoptar anticuerpos para la terapia en seres humanos. Por tanto, la divulgación contempla el uso de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos quiméricos, anticuerpos bifuncionales/biespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos y anticuerpos con injerte en la región determinante de la complementariedad (CDR, *complementary determining region*), incluyendo compuestos que incluyen secuencias de CDR que reconocen específicamente un polipéptido de la invención) específicos para VEGFR-2. Los anticuerpos humanos también pueden producirse utilizando diversas técnicas conocidas en la materia, que incluyen bibliotecas de presentación de fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol.

Biol., 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991)]. De manera similar, pueden producirse anticuerpos humanos introduciendo locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones, en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Después de la exposición, se observa producción de anticuerpos humanos, muy parecida a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la redistribución de genes, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N.º 5 545 807; 5 545 806; 5 569 825; 5 625 126; 5 633 425; 5 661 016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995).

Productos inhibidores de PDGF

En algunos casos, los métodos descritos en el presente documento comprenden, opcionalmente, administrar una sustancia activa terapéutica para inhibir la unión de PDGF con uno o más de sus receptores. Un producto inhibidor de PDGF, se puede administrar en combinación con una o más de las moléculas de unión a ligando descritas en el presente documento. En algunos casos, el producto inhibidor de PDGF y la molécula de unión a ligando se coadministran en una sola composición. En otros casos, el producto inhibidor de PDGF se administra como una composición distinta de la molécula de unión a ligando.

El término "PDGF" se refiere a un factor de crecimiento derivado de plaquetas que regula el crecimiento o la división celular. Como se utiliza en el presente documento, el término "PDGF" incluye los diversos subtipos de PDGF que incluyen PDGF-B, PDGF-A, PDGF-C, PDGF-D, formas variantes de los mismos y formas dimerizadas de los mismos, incluyendo PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC y PDGF-DD. Los factores de crecimiento derivados de plaquetas incluyen homo- o heterodímeros de cadena A (PDGF-A) y de cadena B (PDGF-B) que ejercen su acción mediante la unión con, y dimerización de, dos receptores de la superficie celular del factor de crecimiento derivado de plaquetas de tirosina cinasa receptoras relacionadas (es decir, los PDGFR), PDGFR- α y PDGFR- β . Además, para los complejos de PDGFR, se han identificado dos ligados adicionales activados por proteasa, PDGF-C y PDGF-D (Li et al., (2000) *Nat. Cell. Biol* 2: 302-9; Bergsten et al., (2001) *Nat. Cell. Biol* 3: 512-6; y Uutele et al., (2001) *Circulation* 103: 2242-47). Debido a las diferentes especificidades de unión a ligando de los PDGFR, se sabe que PDGFR- α/α se une a PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB y PDGF-CC; PDGFR- β/β se une a PDGF-BB y PDGF-DD; mientras que PDGFR- α/β se une a PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC y PDGF-DD (Betsholtz et al., (2001) *BioEssays* 23: 494-507). Como se utiliza en el presente documento, el término "PDGF" también se refiere a aquellos miembros de la clase de factores de crecimiento que inducen la síntesis de ADN y la mitogénesis a través de la unión y activación de un PDGFR sobre un tipo de célula sensible. Los PDGF pueden efectuar, por ejemplo: migración celular dirigida (quimiotaxia) y activación celular; activación de fosfolipasa; aumento de la renovación de fosfatidilinositol y del metabolismo de prostaglandina; estimulación de la síntesis tanto de colágeno como de colagenasa por células sensibles; alteración de las actividades metabólicas celulares, que incluyen síntesis de la matriz, producción de citocinas y captación de lipoproteínas; inducción, indirectamente, de una respuesta proliferativa en células que carecen de receptores de PDGF; y una fuerte actividad vasoconstrictora. El término "PDGF" se puede utilizar para referirse a un polipéptido de "PDGF", a un gen o ácido nucleico que codifica el "PDGF" o a una forma dimerizada del mismo.

La expresión "producto inhibidor de PDGF" se refiere a un agente que reduce o inhibe, ya sea parcial o completamente, la actividad o producción de un PDGF. Un producto inhibidor de PDGF puede reducir o inhibir directa o indirectamente la actividad o producción de un PDGF específico tal como PDGF-B. Además, los "productos inhibidores de PDGF" incluyen agentes que actúan sobre un ligando de PDGF o su receptor afín de manera que reducen o inhiben señal receptora asociada a PDGF. Los ejemplos de "productos inhibidores de PDGF" incluyen moléculas antisentido, ribozimas o ARNi que se dirigen a ácido nucleico de PDGF; aptámeros de PDGF, anticuerpos de PDGF contra el propio PDGF o su receptor, o señuelos receptores de PDGF solubles que impiden la unión de un PDGF con su receptor afín; moléculas antisentido, ribozimas o ARNi que se dirigen a ácido nucleico receptor de PDGF (PDGFR) afín; aptámeros de PDGFR o anticuerpos contra PDGFR que se unen a un receptor PDGFR afín e inhibidores de tirosina cinasa de PDGFR.

En una realización, el producto inhibidor de PDGF se selecciona de: un compuesto de fórmula A, B, C, D o E como se describe y define en el documento US 2012/0100136, anticuerpo p1B3, CDP860, IMC-3G3, anticuerpo 162.62, anticuerpo 163.31, anticuerpo 169.14, anticuerpo 169.31, anticuerpo α R1, anticuerpo 2A1E2, anticuerpo M4TS.11, anticuerpo M4TS.22, anticuerpo Hyb 120.1.2.1.2, anticuerpo Hyb 121.6.1.1.1, anticuerpo Hyb 127.5.7.3.1, anticuerpo Hyb 127.8.2.2.2, anticuerpo Hyb 1.6.1, anticuerpo Hyb 1.11.1, anticuerpo Hyb 1.17.1, anticuerpo Hyb 1.18.1, anticuerpo Hyb 1.19.1, anticuerpo Hyb 1.23.1, anticuerpo Hyb 1.24, anticuerpo Hyb 1.25, anticuerpo Hyb 1.29, anticuerpo Hyb 1.33, anticuerpo Hyb 1.38, anticuerpo Hyb 1.39, anticuerpo Hyb 1.40, anticuerpo Hyb 1.45, anticuerpo Hyb 1.46, anticuerpo Hyb 1.48, anticuerpo Hyb 1.49, anticuerpo Hyb 1.51, anticuerpo Hyb 6.4.1, anticuerpo F3, anticuerpo F3 humanizado, anticuerpo C1, anticuerpo C1 humanizado, anticuerpo 6.4, anticuerpo anti IgG de chivo mPDGF-C, anticuerpo C3.1, anticuerpo monoclonal PDGFR-B1, anticuerpo monoclonal PDGFR-B2, anticuerpo monoclonal 6D11, anticuerpo monoclonal Sis 1, anticuerpo monoclonal PR7212, anticuerpo monoclonal PR292, anticuerpo monoclonal HYB 9610, anticuerpo monoclonal HYB 9611, anticuerpo monoclonal HYB 9612, o anticuerpo

monoclonal HYB 9613, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de uno cualquiera de los productos mencionados anteriormente.

5 En un caso preferido, una o más moléculas de unión a ligando descritas en el presente documento se administran en combinación con un anticuerpo contra PDGFR-beta (tal como el desarrollado por Regeneron Inc. para indicaciones oculares) o un aptámero anti-PDGF (tal como E10030 desarrollado por Ophthotech Inc. para indicaciones oculares).

10 También se contemplan fragmentos de anticuerpo, por ejemplo un producto inhibidor de VEGF-A y PGDF, que incluye Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv. La expresión "específico para", cuando se utiliza para describir anticuerpos de la invención, indica que las regiones variables de los anticuerpos de la invención reconocen y se unen al polipéptido de interés exclusivamente (es decir, son capaces de distinguir los polipéptidos de interés de otros polipéptidos conocidos de la misma familia gracias a las diferencias de afinidad de unión medibles pese a la posible existencia de identidad, homología o similitud de secuencia localizada entre miembros de la familia). Se entenderá que los anticuerpos específicos también pueden interactuar con otras proteínas (por ejemplo, proteína A de *S. aureus* u otros anticuerpos en técnicas de ELISA) a través de interacciones con secuencias fuera de la región variable de los anticuerpos, y en particular, en la región constante de la molécula. Los análisis de exploración para determinar la especificidad de unión de un anticuerpo de la invención son muy conocidos y se llevan a la práctica habitualmente en el ámbito. Para una extensa discusión de estos análisis véase Harlow et al. (Eds), *Antibodies A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988), capítulo 6. Los anticuerpos de la invención se pueden producir utilizando cualquiera de los métodos bien conocidos y llevados a la práctica habitualmente en el ámbito.

25 En otro caso, los métodos descritos en el presente documento comprenden opcionalmente administrar al sujeto una molécula de ácido nucleico antisentido (por ejemplo, antisentido para VEGFR-2). Las moléculas de ácido nucleico antisentido para una proteína particular (por ejemplo, VEGFR-2) son terapéuticamente útiles para inhibir la traducción de los ARNm que codifican esa proteína (por ejemplo, VEGFR-2) en donde el objetivo terapéutico implica un deseo de eliminar la presencia de la proteína o regular por disminución sus niveles. El ARN antisentido de VEGFR-2, por ejemplo, puede ser útil como un agente antagonizante de VEGFR-2 en el tratamiento de enfermedades, por ejemplo, enfermedades inflamatorias, en las que interviene VEGFR-2 como un agente etiológico.

30 Un ácido nucleico antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico "en sentido" que codifica una proteína (por ejemplo complementaria a la cadena codificante de una molécula de ADNc bicatenario o complementaria a una secuencia de ARNm). (Véase, por ejemplo, la secuencia de ADNc para VEGFR-3 de SEQ ID NO: 1). En Lima et al., (*J Biol Chem*; 272: 626-38. 1997) y Kurreck et al., (*Nucleic Acids Res.*; 30: 1911-8. 2002), se describen métodos para diseñar y optimizar nucleótidos antisentido. En casos específicos, se proporcionan moléculas de ácido nucleico antisentido que comprenden una secuencia complementaria a al menos aproximadamente 10, 25, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos o a una cadena codificante de proteína completa (por ejemplo, VEGFR-2) o solo a una parte de la misma. También se contemplan moléculas de ácido nucleico que codifican fragmentos, homólogos, derivados y análogos de una proteína (por ejemplo, VEGFR-2) o ácidos nucleicos antisentido complementarios a una secuencia de ácido nucleico de una proteína (VEGFR-2).

40 En una realización, una molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido con respecto a una "región codificante" de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, tal como, por ejemplo, VEGFR-2. La expresión "región codificante" se refiere a la región de la secuencia de nucleótidos que comprende codones que se traducen en restos de aminoácidos. En otra realización, la molécula de ácido nucleico antisentido es antisentido con respecto a una "región concedente" de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína, tal como, por ejemplo VEGFR-2. La expresión "región concedente" se refiere a secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificante que no se traduce en aminoácidos (es decir, también denominadas regiones 5' y 3' no traducidas).

50 Los ácidos nucleicos antisentido de la divulgación se pueden diseñar según las reglas de emparejamiento de bases de Watson y Crick o de Hoogsteen. La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria a toda la región codificante de ARNm para proteínas, pero más preferentemente es un oligonucleótido que es antisentido con respecto a solo una parte de la región codificante o no codificante de ARNm de proteínas. Un oligonucleótido antisentido puede tener una longitud, por ejemplo, de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos. Un ácido nucleico antisentido de la divulgación se puede construir utilizando síntesis química o reacciones de ligamiento enzimático utilizando procedimientos conocidos en el ámbito. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) se puede sintetizar químicamente utilizando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados de manera diversa diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y en sentido (por ejemplo se pueden utilizar derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina).

60 Como ejemplos de nucleótidos modificados que pueden utilizarse para generar el ácido nucleico antisentido se incluyen: 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-

isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina. De manera alternativa, el ácido nucleico antisentido se puede producir biológicamente utilizando un vector de expresión en el que el ácido nucleico se ha subclonado en orientación antisentido.

Habitualmente, las moléculas de ácido nucleico antisentido se administran a un sujeto o se generan *in situ* de tal manera que se hibridan, o se unen, con ARNm celular y/o ADN genómico que codifica una proteína (por ejemplo, VEGFR-2) para así inhibir la expresión de la proteína (por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción). La hibridación puede ser por complementariedad nucleotídica convencional para formar un dúplex estable o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se une a dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la hélice doble.

En otro caso adicional, el ARN de proteína se puede utilizar para la inducción de interferencia por ARN (iARN), utilizando secuencias de ARN bicatenario (ARNbc) (Fire et al, *Nature* 391: 806-811. 1998) o de ARN interferencia pequeño (ARNip) (Yu et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 6047-52, 2002). La "iARN" es el proceso mediante el cual el ARNbc induce la degradación, dependiente de homología, de ARNm complementario. En un caso, una molécula de ácido nucleico de la divulgación se hibrida mediante emparejamiento de bases complementarias con un ácido ribonucleico "en sentido" de la divulgación para formar el ARN bicatenario. Se proporcionan moléculas de ácido nucleico de ARNbc antisentido y en sentido que corresponden a al menos aproximadamente 20, 25, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos o a una cadena codificante de una proteína completa (por ejemplo, VEGFR-2) o a solo una parte de la misma. En una realización alternativa, los ARNip tienen una longitud de 30 nucleótidos o menor, y más preferentemente de 21 a 23 nucleótidos, con extremos salientes característicos en 3' de 2 a 3 nucleótidos, que se generan por escisión con ribonucleasa III de ARNbc más largos. Véase, por ejemplo, Tuschl T. (*Nat Biotechnol* 20: 446-48. 2002). En la publicación de patente de Estados Unidos N.º 2004/0023390 se describe la preparación y uso de compuestos para la iARN.

La transcripción intracelular de moléculas pequeñas de ARN se puede realizar clonando los moldes de ARNip en unidades de transcripción de ARN polimerasa III (Pol III) que normalmente codifican ARN nuclear pequeño (ARNnp) U6 o RNasa P ARN H1 humana. Se pueden utilizar dos enfoques para expresar los ARNip: en una realización, las cadenas en sentido y antisentido que constituyen el dúplex de ARNip se transcriben con promotores individuales (Lee, et al *Nat. Biotechnol* 20, 500-505. 2002); en una realización alternativa, los ARNip se expresan como estructuras de ARN de horquilla de tallo-bucle que dan lugar a los ARNip después de procesamiento intracelular (Brummelkamp et al. *Science* 296: 550-553. 2002).

El ARNbc/ARNip se administra más comúnmente emparejando cadenas de ARN en sentido y antisentido *in vitro* antes de su suministro al organismo. En un caso alternativo, la iARN puede llevarse a cabo administrando ácidos nucleicos en sentido y antisentido de la divulgación en la misma solución sin emparejar antes de la administración e incluso se puede realizar administrando los ácidos nucleicos en vehículos distintos en un intervalo de tiempo muy corto. También se contemplan moléculas de ácido nucleico que codifican fragmentos, homólogos, derivados y análogos de una proteína (tal como, por ejemplo, VEGFR-2) o ácidos nucleicos antisentido complementarios a una secuencia de ácido nucleico de mVEGFR-2.

Los aptámeros son otro método basado en ácido nucleico para interferir con la interacción del receptor y su ligando afín, tal como, por ejemplo, un VEGFR-2 con VEGF-A y un PDGFR con PGDF. Los aptámeros son moléculas de ADN o ARN que se han seleccionado de grupos aleatorios en función de su capacidad para unirse a otras moléculas. Se han seleccionado aptámeros que se unen a ácido nucleico, proteínas, compuestos orgánicos pequeños e incluso organismos completos. Los expertos en la materia conocen métodos y composiciones para identificar y producir aptámeros y se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N.º 5 840 867 y 5 582 981.

Los avances recientes en el campo de las ciencias combinatorias, han identificado secuencias de polímeros cortas con alta afinidad y especificidad por una diana determinada. Por ejemplo, se ha utilizado la tecnología SELEX para identificar aptámeros de ADN y ARN con propiedades de unión que rivalizan con anticuerpos de mamífero, el campo de la inmunología ha generado y aislado anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen a una gran cantidad de compuestos y la presentación de fagos se ha utilizado para descubrir nuevas secuencias peptídicas con propiedades de unión muy favorables. Basándose en el éxito de estas técnicas de evolución molecular, sin duda se podrán crear moléculas que se unan a cualquier molécula diana. Con frecuencia interviene una estructura de bucle que proporciona los atributos de unión deseados como ocurre en el caso de: aptámeros que con frecuencia utilizan bucles de horquilla creados a partir de regiones cortas sin emparejamiento de bases complementarias, anticuerpos obtenidos de manera natural que utilizan ordenación combinatoria de regiones hipervariables en bucle y nuevas bibliotecas de presentación de fagos que utilizan péptidos cíclicos que han demostrado resultados mejorados cuando se comparan con los resultados de presentación de fagos con péptidos lineales. Por tanto, se han generado pruebas suficientes que sugieren que pueden crearse e identificarse ligandos de alta afinidad mediante técnicas combinatorias de evolución molecular. Para la presente divulgación, pueden utilizarse técnicas de evolución molecular para aislar moléculas de unión a ligando específicas para los ligandos descritos en el presente documento. Para mayor información respecto a los aptámeros véase, de manera general Gold, L., Singer, B., He, Y. Y., Brody. E., "Aptamers As Therapeutic And

Diagnostic Agents”, J. Biotechnol. 74: 5-13 (2000). En la patente de Estados Unidos N.º 6 699 843 pueden encontrarse técnicas relevantes de generación de aptámeros.

En algunas realizaciones, al aptámero puede generarse preparando una biblioteca de ácidos nucleicos; poniendo en contacto la biblioteca de ácidos nucleicos con un factor de crecimiento, en donde los ácidos nucleicos con mayor afinidad de unión por el factor de crecimiento (en relación a otros ácidos nucleicos de la biblioteca) se seleccionan y amplifican para proporcionar una mezcla de ácidos nucleicos rica en ácidos nucleicos con afinidad y especificidad relativamente mayor por la unión con el factor de crecimiento. Los procesos se pueden repetir y los ácidos nucleicos seleccionados mutados, se vuelven a explorar, identificando así un aptámero de factor de crecimiento.

En otra variante adicional, el producto inhibidor de VEGF-A comprende un fragmento del DEC soluble de VEGFR-1 que se une a VEGF e inhibe la unión de VEGF con VEGFR-2. El ADNc y las secuencias de aminoácidos de VEGFR-1 se exponen en las SEQ ID NO: 10 y 11. En la publicación de patente de Estados Unidos N.º 2006/0030000 y en la publicación de patente internacional N.º WO 2005/087808 se describen ejemplos de fragmentos del DEC de VEGFR-1.

Agentes antiinflamatorios

En otro caso, los métodos descritos en el presente documento comprenden, opcionalmente, administrar uno o más agentes antiinflamatorios al sujeto. En algunos casos, el agente antiinflamatorio y la molécula de unión a ligando se coadministran en una sola composición. En otros casos, el agente antiinflamatorio se administra como una composición distinta de la molécula de unión a ligando. Específicamente, se contemplan combinaciones que implican una molécula de unión a ligando, un producto inhibidor de VEGF-A y un agente antiinflamatorio. Como se utiliza en el presente documento, la expresión “agente antiinflamatorio” se refiere, en general, a cualquier agente que reduzca la inflamación o hinchazón en un sujeto. En el presente documento se mencionan diversos ejemplos de agentes antiinflamatorios, pero se apreciará que pueden existir otros agentes antiinflamatorios adecuados que no se mencionan específicamente en el presente documento, pero que se incluyen en la presente divulgación.

En una variante, el agente antiinflamatorio es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Como ejemplos de fármacos AINE se incluyen, pero sin limitación, aspirina, Sulfasalazine^{MR}, Asacol^{MR}, Dipendtum^{MR}, Pentasa^{MR}, Anaprox^{MR}, Anaprox DS^{MR} (naproxen de sodio); Ansaid^{MR} (flurbiprofeno); Arthrotec^{MR} (diclofenaco de sodio + misoprostilo); Cataflam^{MR}/Voltaren^{MR} (diclofenaco de potasio); Clinoril^{MR} (sulindaco); Daipro^{MR} (oxaprozina); Disalcid^{MR} (salsalato); Dolobid^{MR} (diflunisal); EC Naprosyn^{MR} (naproxen de sodio); Feldene^{MR} (piroxicam); Indocin^{MR} Indocin SR^{MR} (indometacina); Lodine^{MR}, Lodine XL^{MR} (etodolaco); Motrin^{MR} (ibuprofeno); Naprelan^{MR} (naproxeno); Naprosyn^{MR} (naproxeno); Orudis^{MR}, (ketoprofeno); Oruvail^{MR} (ketoprofeno); Relafen^{MR} (nabumetona); Tolectin^{MR}, (tolmetina de sodio); Trilisate^{MR} (trisalicylate de magnesio y colina); inhibidores de Cox-1; inhibidores de Cox-2 tal como Vioxx^{MR} (rofecoxib); Arcoxia^{MR} (etoricoxib), Celebrex^{MR} (celecoxib); Mobic^{MR} (meloxicam); Bextra^{MR} (valdecoxib), Dinastat^{MR} (paracoxib sódico); Prexige^{MR} (lumiracoxib), y nambumetona. Como fármacos AINE adicionales adecuados se incluyen, pero sin limitación, los siguientes: ácido 5-aminosalicílico (5-ASA, mesalamina, lesalazina), ácido ε-acetamidocaproico, S-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxi-butírico, amixetrina, anitrazafeno, antrafenina, bendazaco, lisinato de bendazaco, bencidamina, beprozina, broperamol, bucoloma, bufezolaco, ciproquazona, cloximato, dazidamina, deboxamet, detomidina, difenpiramida, difenpiramida, difisalamina, ditazol, emorfazona, mesilato de fanetizol, fenflumizol, floctafenina, flumizol, flunixin, fluproquazona, fopirtolina, fosfosal, guaimesal, guaiazoleno, isonixim, clohidrato de lefetamina, leflunomida, lofemizol, lotifazol, clonixinato de lisina, meseclazona, nabumetona, nictindol, nimesulida, orgoteina, orpanoxina, oxaceprolm, oxapadol, parnilina, perisoxal, citrato de perisoxal, pifoxima, piroxeno, pirazolaco, pirfenidona, proquazona, proxazol, tielavin B, tiflamizol, timegadina, tolectina, tolpadol, triptamida y los designados con números de código de compañía tales como 480156S, AA861, AD1590, AFP802, AFP860, A177B, APSO4, AU8001, BPPC, BW54OC, CHINOIN 127, CN100, EB382, EL508, F1044, FK-506, GV3658, ITF182, KCNTE16090, KME4, LA2851, MR714, MR897, MY309, ONO3144, PR823, PV102, PV108, R830, RS2131, SCR152, SH440, SIR133, SPAS510, SQ27239, ST281, SY6001, TA60, TAI-901 (ácido 4-benzoil-1-indancarboxílico), TVX2706, U60257, UR2301 y WI41770.

En otra variante, el agente antiinflamatorio comprende un compuesto que inhibe la interacción de citocinas inflamatorias con sus receptores. Como ejemplos de inhibidores de citocina, útiles en combinación con los agentes de unión específicos de la invención, se incluyen, por ejemplo, antagonistas (tales como anticuerpos) de TGF-α (por ejemplo, Remicade), así como antagonistas (tales como anticuerpos) dirigidos contra interleucinas involucradas en inflamación. Dichas interleucinas se describen en el presente documento y preferentemente incluyen, pero sin limitación, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, e IL-18. Véase Feghali, et al., *Frontiers in Biosci.*, 2: 12-26 (1997).

En otra variante, el agente antiinflamatorio es un corticosteroide. Como ejemplos de corticosteroides se incluyen, pero sin limitación, diacetato de diflorasona, propionato de clobetasol, propionato de halobetasol, betametasona, dipropionato de betametasona, budesonida, cortisona, dexametasona, fluciclonida, halcinonida, desoximetasona, triamcinolona, propionato de fluticasona, acetónido de fluciclonolona, furandrenolida, furoato de mometasona, betametasona, propionato de fluticasona, acetónido de fluciclonolona, dipropionato de acloetasoma, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona, desonida e hidrocortisona.

En otra variante, el agente antiinflamatorio es ciclosporina.

Antibióticos

5 En otro caso, los métodos descritos en el presente documento comprenden, opcionalmente además, administrar un antibiótico al sujeto. En algunos casos, el antibiótico y la molécula de unión a ligando se coadministran en una sola composición. En otros casos, el antibiótico se administra como una composición distinta de la molécula de unión a ligando. Como ejemplos de antibióticos se incluyen, pero sin limitación, tetraciclina, aminoglucósidos, penicilinas, cefalosporinas, fármacos de sulfonamida, cloranfenicol, succinato de sodio, eritromicina, vancomicina, lincomicina, clindamicina, nistatina, anfotericina B, amantidina, idoxuridina, ácido p-aminosalicílico, isoniazida, rifampina, actinomicina D, mitramicina, daunomicina, adriamicina, bleomicina, vinblastina, vincristina, procarbazina y carboxamida imidazol.

Inhibidores de tirosina cinasa

15 En otro caso, los métodos descritos en el presente documento comprenden, opcionalmente además, administrar un inhibidor de tirosina cinasa que inhibe la actividad de EGFR-2 y/o VEGFR-3.

Como ejemplos de inhibidores de tirosina cinasa, para su uso en los métodos descritos en el presente documento, se incluyen, pero sin limitación, AEE788 (TKI, VEGFR-2, EGFR: Novartis); ZD6474 (TKI, VEGFR-1, -2,-3, EGFR: Zactima: AstraZeneca); AZD2171 (TKI, VEGFR-1, -2: AstraZeneca); SU 11248 (TKI, VEGFR-1, -2, PDGFR: Sunitinib: Pfizer); AG13925 (TKI, VEGFR-1, -2: Pfizer); AG013736 (TKI, VEGFR-1, -2: Pfizer); CEP-7055 (TKI, VEGFR-1, -2, -3: Cephalon); CP-547,632 (TKI, VEGFR-1, -2: Pfizer); GW7S6024 (TKL VEGFR-1, -2, -3: GlaxoSmithKline); GW786034 (TKI, VEGFR-1, -2, -3: GlaxoSmithKline); sorafenib (TKI, Bay 43-9006, VEGFR-1, -2, PDGFR: Bayer/Onyx); SU4312 (TKI, VEGFR-2, PDGFR: Pfizer); AMG706 (TKI, VEGFR-1, -2, -3: Amgen); XL647 (TKI, EGFR, HER2, VEGFR, ErbB4: Exelixis); XL999 (TKI, FGFR, VEGFR, PDGFR, Flt-3: Exelixis); PKC412 (TKI, KIT, PDGFR, PKC, FLT3, VEGFR-2: Novartis); AEE788 (TKI, EGFR, VEGFR2, VEGFR-1: Novartis); OSI-030 (TKI, c-kit, VEGFR: OSI Pharmaceuticals); OSI-817 (TKI c-kit, VEGFR: OSI Pharmaceuticals); DMPQ (TKI, ERGF, PDGFR, ErbB2, p56, pK, pK); MLN518 (TKI, Flt3, PDGFR, c-KIT (T53518: Millennium Pharmaceuticals); lestaurinib (TKI, FLT3, CEP-701, Cephalon); ZD 1839 (TKI, EGFR: gefitinib, Iressa: AstraZeneca); OSI-774 (TKI, EGFR: Erlotinib: Tarceva: OSI Pharmaceuticals); lapatinib (TKI, ErbB-2, EGFR y GD-2016: Tykerb: GlaxoSmithKline).

En algunos casos, los métodos descritos en el presente documento comprenden además administrar al sujeto un inhibidor de tirosina cinasa que inhiba la angiogénesis. A continuación, en la tabla 2, se proporcionan ejemplos de inhibidores antiangiogénicos de tirosina cinasa y sus dianas.

Agente	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	PDGFR	EGFR	Otras dianas
Vandetanib		•			•	RET
Sunitinib	•	•	•	•		KIT, FLT3, RET
Axitinib	•	•	•			
Sorafenib	•	•	•	•		KIT, RAF, FLT3
Vatslanib	•	•	•	•		KIT
Cediranib	•	•	•	•		KIT
Molesanib	•	•	•	•		KIT, RET
Pazopanib	•	•	•	•		KIT
BIBF 1120		•		•		FGFR

Abreviaturas: FGFR, receptor del factor de crecimiento similar a fibroblastos; FLT3, tirosina cinasa 3 similar a FMS; KIT, receptor del factor de células madre; RET, receptor del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial; VEGFR, receptor del factor de crecimiento endotelial vascular.

Las moléculas de unión a ligando se pueden administrar en combinación con más de uno de los compuestos activos o terapias. En una realización, una molécula de unión a ligando de la presente invención se administra en combinación con un producto inhibidor de PDGF y un producto inhibidor de VEGF-A. Por ejemplo, una molécula de unión a ligando (tal como una que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3) se puede administrar en combinación con: (i) Aflibercept (Eylea^{MR}) y (ii) un anticuerpo contra PDGF (tal como el desarrollado por Regeneron Inc. para indicaciones oculares) o un aptámero de PDGF (tal como E10030 (Fovista^{MR}) desarrollado por Ophthotech Inc. para indicaciones oculares).

Administración de la politerapia

La politerapia con uno o más de los agentes activos adicionales descritos en el presente documento, se puede realizar administrando a un sujeto una sola composición o formulación farmacológica que incluya la molécula de unión a ligando y uno o más agentes activos adicionales, o administrando al sujeto dos (o más) composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, en donde una composición incluye una molécula de unión a ligando y la otra incluye un agente activo adicional.

De manera alternativa, la politerapia empleando una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento puede preceder o seguir a un tratamiento con un segundo agente por intervalos que varían desde minutos hasta semanas. En casos en donde el segundo agente y la molécula de unión a ligando se administran por separado, generalmente uno garantizará que no transcurra un período de tiempo significativo entre los momentos de cada suministro, de manera que el agente y la molécula de unión a ligando puedan continuar ejerciendo un efecto ventajosamente combinado. En dichos casos, se contempla que ambas modalidades puedan administrarse al cabo de aproximadamente 12 a 24 horas entre sí y, más preferentemente, al cabo de aproximadamente 6 a 12 horas entre sí, con un tiempo de retraso de solo aproximadamente 12 horas como más preferido. En algunas situaciones, para el tratamiento, puede ser deseable ampliar significativamente el período de tiempo, sin embargo, entre las administraciones respectivas, transcurren varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8). Específicamente se contemplan tratamientos repetidos con uno o ambos agentes.

Formulaciones y transportadores farmacéuticamente aceptables

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de unión a ligando de la invención. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más moléculas de unión a ligando y un transportador farmacéuticamente aceptable. En una realización, estas composiciones comprenden una o más moléculas de unión a ligando y opcionalmente uno o más agentes activos adicionales (en el caso de una politerapia). En una realización, dichas composiciones comprenden una o más moléculas de unión a ligando y opcionalmente uno o más agentes activos seleccionados de un producto inhibidor de PDGF y un producto inhibidor de VEGF-A. En otro caso, se administra una composición que comprende una o más moléculas de unión a ligando de la invención y otra composición que comprende un producto inhibidor de PDGF o un producto inhibidor de VEGF-A.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o que se incluye en la farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida de manera general para uso en animales, más particularmente en seres humanos. El término "transportador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra la sustancia terapéutica. Dichos transportadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Como excipientes farmacéuticos adecuados se incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, greda, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. Si se desea, la composición, también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes, emulsionantes o tamponantes para ajustar el pH.

Las composiciones pueden estar en forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, granulados, geles que incluyen hidrogeles, pastas, pomadas, cremas, dispositivos de suministro, formulaciones de liberación sostenida, supositorios, inyectables, implantes, pulverizaciones, gotas, aerosoles y similares. Las composiciones que comprenden una molécula de unión a ligando, uno o más agentes activos adicionales, o ambas cosas, se pueden formular según la práctica farmacéutica convencional (véase, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, (20ª ed.) ed. A. R. Gennaro, 2000 Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, Pa. y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds., J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-2002, Marcel Dekker, Nueva York). En "Remington's Pharmaceutical Sciences", E. W. Martin describe ejemplos de transportadores farmacéuticos adecuados.

La administración de composiciones puede ser mediante cualquier medio adecuado que dé como resultado una cantidad de molécula de unión a ligando y/o agentes activos adicionales que sean eficaces para el tratamiento o prevención de la enfermedad o trastorno particular. Por ejemplo, cada molécula de unión a ligando se puede mezclar con una sustancia transportadora adecuada y generalmente está presente en una cantidad de 1 a 95 % en peso del peso total de la composición. La composición se puede proporcionar en una forma de dosificación que sea adecuada para administración oftálmica, oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, subcutánea), rectal, transdérmica, nasal o por inhalación. En una realización, la composición está en una forma que es adecuada para la inyección directamente en el ojo.

Las moléculas de unión a ligando de la invención y, cuando están presentes en politerapia, el uno o más agentes activos adicionales, se pueden formular como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales formadas con grupos amino libres tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con grupos carboxilo libres tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, hierro, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

Las moléculas de unión a ligando y los agentes activos adicionales de la presente invención pueden poseer un grupo funcional suficientemente básico que puede reaccionar con cualquiera de diversos ácidos inorgánicos y orgánicos para formar una sal farmacéuticamente aceptable. Como bien se sabe en la técnica, una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable se forma a partir de un ácido farmacéuticamente aceptable. Dichas sales incluyen las sales farmacéuticamente aceptables enumeradas en Journal of Pharmaceutical Science, 66. 2-19

(1997) y en The Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection, and Use. P. H. Stahl and C. G. Wermuth (ED.s), Verlag, Zurich (Suiza) 2002.

5 Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, disulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metansulfonato, etansulfonato, bencensulfonato, p-toluensulfonato, canforsulfonato, pamoato, fenilacetato, trifluoroacetato, aerilato, clorobenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, metilbenzoato, o-acetoxibenzoato, naftalen-2-benzoato, isobutirato, fenilbutirato, α -hidroxibutirato, butino-1,4-
10 dicarboxilato, hexino-1,4-dicarboxilato, caprato, caprilato, cinamato, glicolato, heptanoato, hipurato, malato, hidroximaleato, malonato, mandelato, mesilato, nicotinato, ftalato, tereftalato, propiolato, propionato, fenilpropionato, sebacato, suberato, p-bromobencensulfonato, clorobencensulfonato, etilsulfonato, 2-hidroxietilsulfonato, metilsulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, naftalen-1,5-sulfonato, xilensulfonato y tartarato.

15 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" también se refiere a una sal de una molécula de unión a ligando y de un agente activo adicional que tiene un grupo funcional ácido, tal como un grupo funcional ácido carboxílico, y una base. Las bases adecuadas incluyen, pero sin limitación, hidróxidos de metales alcalinos tales como hidróxidos de sodio, de potasio y de litio; hidróxidos de metal alcalinotérreo tales como calcio y magnesio; hidróxidos de otros metales tales como aluminio y zinc; amoníaco y aminas orgánicas tales como mono-, di- o tri-alquilaminas no
20 sustituidas o sustituidas con hidroxilo, diciclohexilamina; tributilamina; piridina; N-metil-N-etilamina; dietilamina; trietilamina; mono-, bis- o tris-(2-OH-alquilaminas inferiores) tales como mono-, bis- o tris-(2-hidroxietil)amina, 2-hidroxi-terbutilamina o tris(hidroximetil)metilamina, N,N-di-alquilo inferior-N(hidroxil-alquilo inferior)-aminas tales como N,N-dimetil-N-2-hidroxietil)amina o tri-(2-hidroxietil)amina; N-metil-D-glucamina; y aminoácidos tales como arginina, lisina y similares. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" también incluye un hidrato de un compuesto de la
25 invención.

En aspecto útil, las composiciones se administran por vía parenteral (por ejemplo mediante administración intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intraocular, intravitreal, retrobulbar, subconjuntival, subtenoniana o
30 inyección subcutánea o implante) o por vía sistémica. Las formulaciones para administración parenteral o sistémica incluyen soluciones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Se pueden utilizar diversos transportadores acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina y similares. Como ejemplos de otros vehículos adecuados se incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, gelatina, hidrogeles, naftaleno hidrogenados y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Estas formulaciones también pueden
35 contener sustancias auxiliares tales como agentes conservantes, humectantes, tamponantes, emulsionantes y/o dispersantes. Para controlar la liberación de los principios activos puede utilizarse polímero de láctida biodegradable, biocompatible, copolímero de láctida/glicólida o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno.

De manera alternativa, las composiciones se pueden administrar por ingestión oral. Las composiciones destinadas para uso oral se pueden preparar en forma sólida o líquida, según cualquier método conocido en el ámbito para la
40 elaboración de composiciones farmacéuticas.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. Generalmente, estas preparaciones farmacéuticas contienen principios activos mezclados con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Estos incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, celulosa, almidón, fosfato de calcio, fosfato de sodio, caolín y similares. También pueden utilizarse agentes aglutinantes, tamponantes y/o lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio). Adicionalmente pueden prepararse comprimidos y píldoras con recubrimientos entéricos. Opcionalmente, las composiciones pueden contener agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes para proporcionar una preparación más agradable al paladar.
50

Las formas de dosificación sólida pueden ser útiles para el tratamiento de trastornos oculares. Las composiciones útiles para uso ocular incluyen comprimidos que comprenden una o más moléculas de unión a ligando mezcladas con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o materiales de relleno (por ejemplo, sacarosa y sorbitol) inertes, agentes lubricantes, emolientes y antiadhesivos (por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de zinc, ácido esteárico, sílices, aceites vegetales hidrogenados o talco).
55

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar por vía intraocular, por inyección intravítrea en el ojo así como mediante inyección subconjuntival y subtenoniana. Otras vías de administración incluyen la administración transesclerótica, retrobulbar, intraperitoneal, intramuscular e intravenosa. De manera alternativa, las composiciones se pueden administrar utilizando un dispositivo suministrador de fármacos o un implante intraocular.
60

Las formas de dosificación líquida para administración oral pueden incluir las formas farmacéuticamente aceptables de emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y cápsulas de gelatina suave. Estas formas pueden contener diluyentes inertes utilizados habitualmente en el ámbito tales como un medio acuoso u oleaginoso y también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, emulsionantes y de suspensión.
65

En algunos casos, las composiciones también se pueden administrar por vía tópica, por ejemplo, mediante un parche o por aplicación directa a una región, tal como la epidermis o el ojo, susceptible de padecer, o de estar afectada, por un trastorno neovascular, o por iontoforesis.

5 En caso de politerapias de la presente invención, las moléculas de unión a ligando y uno o más agentes activos adicionales se pueden mezclar en un comprimido u otro vehículo o pueden estar divididos. En un ejemplo, la molécula de unión a ligando está dentro del comprimido y un agente activo adicional está en el exterior, de manera que una parte sustancial del agente activo adicional se libera antes de la liberación de la molécula de unión a ligando dentro del comprimido.

10 En una realización, las composiciones que comprenden una molécula de unión a ligando (y opcionalmente uno o más agentes activos adicionales) pueden comprender uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización, dichos excipientes incluyen, pero sin limitación, agentes tamponantes, tensioactivos no iónicos, conservantes, agentes de tonicidad, aminoácidos, azúcares y agentes ajustadores de pH. Los agentes tamponantes adecuados incluyen, pero sin limitación, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico y acetato de sodio. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen, pero sin limitación, ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán tal como polisorbato 20 y polisorbato 80. Los conservantes adecuados incluyen, pero sin limitación, alcohol bencílico. Los agentes de tonicidad adecuados incluyen, pero sin limitación, cloruro de sodio, manitol y sorbitol. Los azúcares adecuados incluyen, pero sin limitación, α , α -trehalosa deshidratada. Los aminoácidos adecuados incluyen, pero sin limitación, glicina e histidina. Los agentes ajustadores de pH adecuados incluyen, pero sin limitación, ácido clorhídrico, ácido acético e hidróxido de sodio. En una realización, el agente o agentes ajustadores de pH están presentes en una cantidad eficaz para proporcionar un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, de aproximadamente 4 a aproximadamente 7, de aproximadamente 5 a aproximadamente 6, de aproximadamente 6 a aproximadamente 7 o de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. En una realización, una composición que comprende una molécula de unión a ligando no comprende un conservante. En otra realización, una composición que comprende una molécula de unión a ligando no comprende un agente antimicrobiano. En otra realización, una composición que comprende una molécula de unión a ligando no comprende un bacteriostático.

25 En una realización, una composición que comprende una molécula de unión a ligando (y opcionalmente uno o más agentes activos adicionales) está en forma de una solución acuosa que es adecuada para inyección. En una realización, una composición comprende una molécula de unión a ligando, un agente tamponante, un agente ajustador de pH y agua para inyección. En otra realización, una composición comprende una molécula de unión a ligando, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, cloruro de sodio, ácido clorhídrico e hidróxido de sodio. En otra realización, una composición comprende una molécula de unión a ligando, fosfato, (por ejemplo, fosfato de sodio monobásico), trehalosa, cloruro de sodio y polisorbato.

30 En un entorno ocular, las composiciones acuosas útiles para la práctica de los métodos de la divulgación, tienen un pH y una osmolalidad compatibles desde el punto de vista oftálmico. Uno o más agentes ajustadores de pH y/o agentes tamponantes, aceptables desde el punto de vista oftálmico, se pueden incluir en una composición de la invención, que incluye ácidos tales como los ácidos acético, bórico, láctico, fosfórico y clorhídrico; bases tales como hidróxido de sodio, fosfato de sodio, borato de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio y lactato de sodio; y tampones tales como citrato/dextrosa, bicarbonato de sodio y cloruro de amonio. Dichos ácidos, bases y tampones se incluyen en una cantidad necesaria para mantener el pH de la composición en un intervalo aceptable desde el punto de vista oftálmico. En la composición puede incluirse una o más sales aceptables desde el punto de vista oftálmico en una cantidad suficiente para llevar la osmolalidad de la composición a un intervalo aceptable desde el punto de vista oftálmico. Dichas sales incluyen las sales que tienen cationes de sodio, potasio o amonio y aniones de cloruro, citrato, ascorbato, borato, fosfato, bicarbonato, sulfato, tiosulfato o bisulfito.

45 En algunas realizaciones, la composición que comprende una molécula de unión a ligando de la presente invención, se formula para su suministro al ojo de un sujeto. Los expertos en la técnica conocen transportadores oftálmicos adecuados y todos estos transportadores convencionales se pueden utilizar en la presente invención. Los compuestos ejemplares incorporados para facilitar y acelerar el suministro transdérmico de composiciones tópicas en tejidos oculares y anexiales incluyen, pero sin limitación, alcohol (etanol, propanol y nonanol), alcohol graso (alcohol laurílico), ácido graso (ácido valérico, ácido caproico y ácido cáprico), éster de ácido graso (miristato de isopropilo y N-hexanoato de isopropilo), éster de alquilo (acetato de etilo y acetato de butilo), poliol (propilenglicol, propanodiona y hexanotriol), sulfóxido (sulfóxido de dimetilo y sulfóxido de decilmotilo), amida (urea, dimetilacetamida y derivados de pirrolidona), tensioactivos (laurilsulfato de sodio, bromuro de cetiltrimetilamonio, polaxámeros, espans, tweens, sales biliares y lecitina), terpeno (d-limoneno, alfaterpeneol, 1,8-cineol y mentona) y alcanona (N-heptano y N-nonano). Además, las composiciones administradas por vía tópica comprenden agentes moduladores de molécula de adhesión de superficie que incluyen, pero sin limitación, un antagonista de cadherina, un antagonista de selectina y un antagonista de integrina. De esta manera, un transportador particular puede estar en forma de una solución o dispersión, pomada, crema, gel oftálmico estéril. También se incluyen, como transportadores oftálmicos adecuados, polímeros de liberación lenta, por ejemplo polímeros "Ocusert", polímeros "Hydron", etc.

65 Como ejemplos de mejoradores de viscosidad oftálmicos que se pueden utilizar en la presente formulación se

incluyen: carboximetilcelulosa de sodio; metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa; hidroxipropilmetilcelulosa; hidroxietilcelulosa; polietilenglicol 300; polietilenglicol 400; alcohol polivinílico y povidona.

5 Algunos productos naturales, tales como Veegum, alginatos, goma xantana, gelatina, goma arábica y goma de tragacanto, también se pueden utilizar para aumentar la viscosidad de las soluciones oftálmicas.

10 Una tonicidad es importante debido a que las gotas oculares hipotónicas provocan un edema de la córnea y las gotas oculares hipertónicas provocan deformación de la córnea. La tonicidad ideal es de aproximadamente 300 mOsM. La tonicidad se puede obtener por métodos descritos en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, conocidos por los versados en el ámbito.

15 También pueden utilizarse estabilizantes tales como, por ejemplo, agentes quelantes, por ejemplo EDTA. También pueden utilizarse antioxidantes, por ejemplo, bisulfito de sodio, tiosulfito de sodio, 8-hidroxiquinolina o ácido ascórbico. Normalmente, la esterilidad la mantendrán conservantes oftálmicos convencionales, por ejemplo clorobutanol, cloruro de benzalconio, cloruro de cetilpiridinio, sales fenilmercuricas, timerosal, etc., para formulaciones acuosas y se utilizarán en cantidades que no sean tóxicas y que generalmente varían de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,1% en peso de la solución acuosa. Los conservantes convencionales para cremas incluyen metil y propilparabenos. Las bases habituales de las pomadas incluyen vaselina blanca y aceite mineral o vaselina líquida. No obstante, se prefieren transportadores acuosos conservados.

20 Las soluciones pueden suministrarse manualmente al ojo en forma de dosificación adecuada, por ejemplo, gotas oculares (colirios) o pueden suministrarse con un aparato de microgotas o pulverizador adecuado que normalmente proporciona una dosis medida de medicamento. Como ejemplos de transportadores oftálmicos adecuados se incluyen soluciones acuosas sustancialmente isotónicas, estériles que contienen cantidades minoritarias, es decir, de menos de aproximadamente 5% en peso de hidroxipropilmetilcelulosa, alcohol polivinílico, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, glicerina y EDTA. Preferentemente, las soluciones se conservan a un pH sustancialmente neutro e isotónico con cantidades apropiadas de tampones convencionales, por ejemplo fosfato, borato, acetato o tris.

25

En algunas realizaciones, al transportador oftalmológico se le añaden mejoradores de penetración.

30 La cantidad de molécula de unión a ligando que será eficaz para el uso terapéutico al cual está destinado se puede determinar por técnicas clínicas estándar basándose en la presente descripción. Además, opcionalmente pueden emplearse análisis *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La cantidad de molécula de unión a ligando que se mezcla con los materiales transportadores para producir una sola dosificación única pueden variar dependiendo del mamífero que se vaya a tratar y del modo de administración particular.

35

La dosificación de la molécula de unión a ligando puede depender de diversos factores, entre ellos se incluyen, la gravedad de la afección, de si la afección se va a tratar o a prevenir y de la edad, peso y salud de la persona que se va a tratar. De manera adicional, la información farmacogenómica (el efecto del genotipo sobre el perfil farmacocinético, farmacodinámico o de eficacia, de una sustancia terapéutica) acerca de un paciente particular puede influir en la dosificación utilizada. Además, las dosificaciones individuales exactas se pueden ajustar en cierta medida dependiendo de diversos factores entre los que se incluyen las politerapias específicas que se administren, el tiempo de administración, la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la velocidad de excreción, la enfermedad particular que se vaya a tratar (por ejemplo, el trastorno ocular particular que se vaya a tratar), la gravedad del trastorno y el lugar anatómico del trastorno neovascular. Cabe esperar algunas variaciones en la dosificación.

40

45

50 Generalmente, cuando un mamífero recibe administración por vía oral, la dosificación de una molécula de unión a ligando de la presente invención normalmente es de 0,001 mg/kg/día a 100 mg/kg/día, de 0,01 mg/kg/día a 50 mg/kg/día o de 0,1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día. Generalmente, cuando un ser humano recibe administración por vía oral, la dosificación de un antagonista de la presente invención normalmente es de 0,001 mg a 300 mg al día, de 1 mg a 200 mg al día o de 5 mg a 50 mg al día. Pueden ser necesarias dosificaciones de hasta 200 mg al día.

55 Para la administración de un antagonista de la presente invención por inyección parenteral, la dosificación normalmente es de 0,1 mg a 250 mg al día, de 1 mg a 20 mg al día o de 3 mg a 5 mg al día. Las inyecciones se pueden suministrar hasta cuatro veces al día.

60 Generalmente, cuando se administra por vía oral o parenteral, la dosificación de una molécula de unión a ligando para su uso en la presente invención normalmente es de 0,1 mg a 1 500 mg al día o de 0,5 mg a 10 mg al día o de 0,5 mg a 5 mg al día. Se puede administrar una dosificación de hasta 3 000 mg al día.

65 Cuando un ser humano recibe administración oftalmológica, por ejemplo, por vía intravítrea, la dosificación de una molécula de unión a ligando por ojo y administración normalmente está en un intervalo de 0,003 mg, 0,03 mg, 0,3 mg, 0,1 mg o de 0,5 mg a 5,0 mg, 4 mg, 3 mg, 2 mg o 1 mg o de 0,5 mg a 1,0 mg. La dosificación de una molécula de unión a ligando normalmente está en el intervalo de 0,003 mg a 5,0 mg por ojo por administración, o de 0,03 mg a 4,0 mg por ojo por administración, o de 0,1 mg a 4,0 mg por ojo por administración, o de 0,03 mg a 3,0 mg por ojo por administración, o de 0,1 mg a 3,0 mg por ojo por administración, o de 0,1 mg a 1,0 mg por ojo por

administración, o de 0,5 a 4,0 mg por ojo por administración, o de 0,5 mg a 3,0 mg por ojo por administración, o de 0,5 mg a 2,0 mg por ojo por administración, o de 1,0 mg a 4,0 mg por ojo por administración, o de 1,0 mg a 3,0 mg por ojo por administración, o de 1,0 mg a 2,0 mg por ojo por administración. En algunas realizaciones, la molécula de unión a ligando se administra a una concentración de aproximadamente 1 mg, o aproximadamente 2 mg, o aproximadamente 3 mg, o aproximadamente 4 mg, o aproximadamente 5 mg, o aproximadamente 6 mg por ojo por administración. En algunas realizaciones, la molécula de unión a ligando, está presente a cualquiera de las concentraciones enumeradas anteriormente en un volumen de 10 μ l, 15 μ l, 20 μ l, 25 μ l, 30 μ l, 35 μ l, 40 μ l, 45 μ l, 50 μ l, 60 μ l, 70 μ l, 80 μ l, 90 μ l, 95 μ l o 100 μ l. En algunas realizaciones, la molécula de unión a ligando se administra a una concentración de aproximadamente 2 a 4 mg/50 μ l. El volumen de dosificación puede variar de 0,01 ml a 0,2 ml administrado por ojo, o de 0,03 ml a 0,15 ml administrado por ojo, o de 0,05 ml a 0,10 ml administrado por ojo.

En algunas realizaciones, cuando la molécula de unión a ligando se administra mediante inyección intravítrea, esta se administra a una concentración de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 4 mg por ojo (o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 3 mg, o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 4 mg, o de aproximadamente 3 mg a aproximadamente 4 mg, o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2 mg por ojo). En algunas realizaciones, la molécula de unión a ligando se administra a una concentración de aproximadamente 1 mg, o aproximadamente 2 mg, o aproximadamente 3 mg, o aproximadamente 4 mg, o aproximadamente 5 mg, o aproximadamente 6 mg por ojo. En algunas realizaciones, la molécula de unión a ligando está presente en cualquiera de las concentraciones enumeradas anteriormente en un volumen de 10 μ l, 15 μ l, 20 μ l, 25 μ l, 30 μ l, 35 μ l, 40 μ l, 45 μ l, 50 μ l, 60 μ l, 70 μ l, 80 μ l, 90 μ l, 95 μ l o 100 μ l. En algunas realizaciones, la molécula de unión a ligando se administra a una concentración de aproximadamente 2 a 4 mg/50 μ l.

Generalmente, los intervalos de dosificación adecuados para administración intravenosa generalmente son de aproximadamente 50 a 5000 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Los intervalos de dosificación adecuada para administración intranasal generalmente son de aproximadamente 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de respuesta a dosis obtenidas de sistemas de ensayo *in vitro* o de modelos animales.

Para administración sistémica, una dosis terapéuticamente eficaz se puede calcular inicialmente a partir de análisis *in vitro*. Por ejemplo, una dosis se puede formular en modelos animales para obtener un intervalo de concentración circulante que incluye la CI_{50} , determinada en el cultivo celular. Esta información se puede utilizar para determinar con mayor precisión dosis útiles en seres humanos. Las dosificaciones iniciales también se pueden calcular a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, de modelos animales, utilizando técnicas muy conocidas en el ámbito. Basándose en datos obtenidos en animales, un experto habitual en la materia puede optimizar fácilmente la administración en seres humanos.

La cantidad e intervalo de dosificación se puede ajustar individualmente para proporcionar concentraciones en plasma de los compuestos que sean suficientes para conservar el efecto terapéutico. En casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz de los compuestos puede no relacionarse con la concentración plasmática. Un experto en la materia sin excesiva experimentación, podrá optimizar dosificaciones locales terapéuticamente eficaces.

La cantidad de compuesto administrada dependerá, por supuesto, del sujeto que se vaya a tratar, del peso del sujeto, de la gravedad de la enfermedad, de la forma de administración y del criterio del médico que realiza la prescripción. La terapia se puede repetir de manera intermitente mientras los síntomas sean detectables o incluso cuando ya no sean detectables. La terapia se puede proporcionar sola o combinada con otros fármacos.

La administración de la molécula de unión a ligando y, cuando está presente en politerapias, un agente adicional, puede darse independientemente de una a cuatro veces al día o de una a cuatro veces al mes o de una a seis veces al año o una vez cada dos, tres, cuatro o cinco años. La administración puede durar un día o un mes, dos meses, tres meses, seis meses, un año, dos años, tres años e incluso toda la vida del paciente. En una realización, la administración se realiza una vez al mes durante tres meses. La administración crónica, prolongada, se indicará en muchos casos. La dosificación se puede administrar como una monodosis o dividida en dosis múltiples. En general, la dosificación deseada se debe administrar a intervalos establecidos durante un período prolongado, habitualmente al menos durante varias semanas o meses, aunque pueden ser necesarios periodos de administración más prolongados de varios meses o años.

Además de tratar trastornos preexistentes, las composiciones se pueden administrar de manera profiláctica para evitar o frenar la aparición de estos trastornos. En aplicaciones profilácticas, la composición se puede administrar a un paciente susceptible o que de otra manera se encuentra en riesgo de padecer un trastorno particular, tal como un trastorno ocular.

Vías de administración

La composición que contiene la molécula de unión a ligando descrita en el presente documento se puede administrar a un paciente mediante diversos medios que dependen, en parte, del tipo de agente que se va a

administrar y de los antecedentes, factores de riesgo y síntomas del paciente. Las vías de administración adecuadas para los métodos de la divulgación incluyen administración tanto sistémica como local. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "administración sistémica" significa un modo de administración que da como resultado el suministro de una composición farmacéutica prácticamente a todo el cuerpo del paciente. Como

5 ejemplos de modos de administración sistémica se incluyen, sin limitación, inyección intravenosa y administración oral. La expresión "administración local", como se utiliza en el presente documento, significa un modo de administración que da como resultado una composición significativamente más farmacéutica que se suministra a los ojos y alrededor de los mismos (o a un tumor u otro tejido diana) en comparación con regiones distales de los ojos (o tumor u otro tejido diana).

10 Las vías de administración sistémicas y locales útiles en los métodos de la divulgación abarcan, sin limitación, sonda oral; inyección intravenosa; inyección intraperitoneal, inyección intramuscular; inyección subcutánea, difusión transdérmica y electroforesis; gotas y cremas tópicas oculares; inyección periocular e intraocular que incluye inyección en la subconjuntiva, dispositivos de suministro de liberación extendida que incluyen dispositivos de liberación extendida implantados localmente; e implantes intraoculares y perioculares que incluyen implantes bioerosionables y basados en depósitos.

15 Por tanto, en un caso, un método para tratar un trastorno ocular asociado a neovascularización de la retina se lleva a la práctica mediante administración local de la molécula de unión a ligando a un sujeto. Por ejemplo, en algunos casos, una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión a ligando se administra por vía tópica o por inyección local (por ejemplo, por inyección intraocular, por ejemplo intravítrea) o se libera desde un implante intraocular o periocular tal como un implante bioerosionable o basado en un depósito. Preferentemente, la composición se administra en una cantidad eficaz para inhibir VEGF-C y/o VEGF-D en el ojo del sujeto impidiendo que se produzca la unión con, o la estimulación de, VEGFR-2 y/o VEGFR-3, expresado en células o en vasos del

20 ojo.

25 En el caso de politerapias, la administración de la molécula de unión a ligando y el agente adicional puede ser secuencial o simultánea en tiempo. Cuando se administran secuencialmente, la administración de cada uno de ellos puede realizarse por la misma vía o por una vía una diferente. En una realización, un agente adicional (por ejemplo, un producto inhibidor de VEGF-A o PDGF) se administra a los 90 días, 30 días, 10 días, 5 días, 24 horas, 1 hora, 30 minutos, 10 minutos, 5 minutos o 1 minuto de la administración de una molécula de unión a ligando. Cuando el agente adicional se administra antes de la molécula de unión a ligando, la molécula de unión a ligando se administra en un tiempo y en una cantidad tal que la cantidad total de agente adicional y de la molécula de unión a ligando es eficaz para tratar o prevenir la indicación diana, por ejemplo, trastorno ocular. Cuando la molécula de unión a ligando se administra antes del agente adicional, el agente adicional se administra en un tiempo y en una cantidad tal que la cantidad total de agente adicional y la molécula de unión a ligando es eficaz para tratar o prevenir la indicación diana, por ejemplo, un trastorno ocular.

30

35

40 Las composiciones farmacéuticas según la invención, se pueden formular para liberar la molécula de unión a ligando y, opcionalmente, el agente adicional en una politerapia de manera sustancialmente inmediata después de la administración o a cualquier período de tiempo predeterminado después de la administración, utilizando formulaciones de liberación controlada. Por ejemplo, se puede proporcionar una composición farmacéutica en forma de liberación sostenida. El uso de composiciones de liberación inmediata o sostenida depende de la naturaleza de la afección que vaya a tratarse. Si la afección consiste de un trastorno agudo, el tratamiento con una forma de liberación inmediata se puede utilizar con respecto a una composición de liberación prolongada. Para ciertos tratamientos preventivos o de largo plazo, también puede ser apropiada una composición liberada sostenida.

45

50 La administración de la molécula de unión a ligando o tanto la molécula de unión a ligando como uno o más agentes adicionales en formulaciones de liberación controlada, puede ser útil cuando la molécula de unión a ligando, sola o en combinación, tiene: (i) un índice terapéutico estrecho (por ejemplo, la diferencia entre la concentración en plasma que produce efectos secundarios dañinos o reacciones tóxicas y la concentración en plasma que conduce a un efecto terapéutico es pequeña; generalmente, el índice terapéutico, IT, se define como la relación de la mediana de la dosis letal (DL_{50}) respecto a la mediana de la dosis eficaz (DE_{50})); (ii) una ventana de absorción estrecha en el tubo gastrointestinal, o (iii) una semivida biológica corta de manera que se requiere dosificación frecuente durante un

55 día para sostener la concentración plasmática a un nivel terapéutico.

Se pueden seguir muchas estrategias para obtener la liberación controlada en la cual la velocidad de liberación supera a la velocidad de degradación o metabolismo de los componentes activos. Por ejemplo, se puede obtener liberación controlada mediante la selección apropiada de parámetros de formulación e ingredientes que incluyen, por ejemplo, composiciones de liberación controlada y recubrimientos, apropiados. Los ejemplos incluyen composiciones de comprimidos o cápsulas unitarias sencillas o múltiples, soluciones oleaginosas, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microsferas, nanopartículas, parches y liposomas. En el campo técnico se conocen bien métodos para preparar estas formulaciones de liberación sostenida o controlada.

60

65 La molécula de unión a ligando y, si está presente, un agente adicional, también se pueden suministrar utilizando un dispositivo de suministro de fármacos, tal como un implante. Como se utiliza en el presente documento, el término

"implante" se refiere a cualquier material que no se desplaza de modo significativo desde el lugar de inserción después de la implantación. Un implante puede ser biodegradable, no biodegradable o estar constituido por materiales biodegradables y no biodegradables. Si se desea, un implante no biodegradable puede incluir un depósito rellenable. Los implantes útiles en los métodos de la divulgación incluyen, por ejemplo, parches, partículas, 5 láminas, placas, microcápsulas y similares, y puede tener cualquier forma y tamaño compatible con el lugar de inserción seleccionado el cual puede ser, sin limitación, la cámara posterior, la cámara anterior, la supracoroides o la subconjuntiva. Se entiende que un implante útil en la invención generalmente libera la composición farmacéutica implantada en una dosificación eficaz al ojo del paciente durante un periodo de tiempo prolongado.

10 En el campo técnico se conocen diversos implantes oculares y formulaciones de liberación prolongada que son adecuados para la liberación ocular, como se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N.º 5 869 079 y 5 443 505. Los dispositivos de suministro de fármaco ocular se pueden insertar en una cámara del ojo, tal como la cámara anterior o posterior o se pueden implantar dentro o sobre la esclerótica, en el espacio coroides, o en una región avascularizada exterior al humor vítreo. En una realización, el implante se puede colocar 15 sobre una región avascular, tal como sobre la esclerótica de manera que permita la difusión transesclerótica de las moléculas de unión a ligando y de cualquier agente adicional al lugar de tratamiento deseado, por ejemplo, el espacio intraocular y la macula del ojo. Además, el lugar de difusión transesclerótico puede estar cerca de un lugar de neovascularización, tal como un lugar proximal a la macula. Se describen dispositivos de suministro de fármaco adecuados, por ejemplo, en las publicaciones de Estados Unidos N.º 2008/0286334; 2008/0145406; 2007/0184089; 2006/0233860; 2005/0244500; 2005/0244471 y 2005/0244462 y en las patentes de Estados Unidos N.º 6 808 719 y 5 322 691.

En otras realizaciones, una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento se aplica al ojo mediante liposomas. En otra realización adicional, la molécula de unión a ligando está incluida en un dispositivo de liberación 25 continuada o selectiva, por ejemplo, membranas tales como, pero sin limitación, las empleadas en el sistema Ocuser^{MR} (Alza Corp., Palo Alto, Calif.). Como una realización adicional, la molécula de unión a ligando está incluida en, transportada por, o unida a, lentes que se colocan en el ojo. En otra realización adicional, la molécula de unión a ligando está incluida en un hisopo o esponja que se puede aplicar a la superficie ocular. Otra realización de la presente invención implica la molécula de unión a ligando incluida en un pulverizador líquido que se puede aplicar a 30 la superficie ocular.

En una realización, el implante comprende una molécula de unión a ligando y opcionalmente, si está presente, un agente adicional disperso en una matriz polimérica biodegradable. La matriz puede comprender PLGA (copolímero de ácido poliláctico-ácido poliglicólico), un polímero con caperuza de éster en el extremo, un polímero con caperuza 35 de ácido en el extremo o una mezcla de los mismos. En otra realización, el implante comprende una molécula de unión a ligando y opcionalmente, si está presente, un agente adicional, un tensioactivo y un compuesto lipófilo. El compuesto lipófilo puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 80 a 99 % en peso del implante. Los compuestos lipófilos adecuados incluyen, pero sin limitación, palmitoestearato de glicerilo, monoestearato de dietilenglicol, monoestearato de propilenglicol, monoestearato de glicerilo, monolinoleato de glicerilo, monooleato de glicerilo, monopalmitato de glicerilo, monolaurato de glicerilo, dilaurato de glicerilo, monomiristato de glicerilo, 40 dimiristato de glicerilo, monopalmitato de glicerilo, dipalmitato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, diesterato de glicerilo, monooleato de glicerilo, dioleato de glicerilo, monolinoleato de glicerilo, dilinoleato de glicerilo, monoaraquidato de glicerilo, diaraquidato de glicerilo, monobehenato de glicerilo, dibehenato de glicerilo y mezclas de los mismos. En otra realización, el implante comprende una molécula de unión a ligando y opcionalmente, si está 45 presente, un agente adicional incluido en una funda hueca. La molécula de unión a ligando y opcionalmente, si está presente, un agente adicional, se suministran al ojo insertando la funda en el ojo, liberando el implante desde la funda al interior del ojo y después retirando la funda del ojo. En la publicación de Estados Unidos N.º 2005/0244462 se describe un ejemplo de este dispositivo de suministro.

50 En una realización, el implante es un dispositivo de inserto ocular flexible adaptado para la liberación sostenida controlada al ojo, de una molécula de unión a ligando y opcionalmente, si está presente, un agente adicional. En una realización, el dispositivo incluye un cuerpo alargado de un material polimérico en forma de una varilla o tubo que contiene una molécula de unión a ligando y opcionalmente, si está presente, un agente adicional y con al menos dos proyecciones de anclaje que se extienden radialmente hacia fuera desde el cuerpo. El dispositivo puede tener una 55 longitud de al menos 8 mm y el diámetro de su parte de cuerpo que incluye las proyecciones no supera 1,9 mm. El mecanismo de liberación sostenida puede ser, por ejemplo, mediante difusión o por ósmosis o bioerosión. El dispositivo de inserto se puede insertar en el fondo superior o inferior del ojo de manera que sea independiente del movimiento del ojo gracias a la anatomía del fondo. Las proyecciones pueden tener diversas formas tales como, por ejemplo, refuerzos, roscados de tornillo, hoyuelos o salientes, segmentos en forma de cono truncado o segmentos 60 trenzados de bobinado. En una realización adicional, el material polimérico para el cuerpo se selecciona como uno el cual se expande en un ambiente líquido. Por tanto, se puede utilizar un dispositivo de un tamaño inicial más pequeño. El dispositivo de inserto puede tener un tamaño y una configuración de manera que, después de la inserción en el fondo superior o inferior, el dispositivo permanece fuera del campo de visión de manera que queda bien sujeto en su lugar y es imperceptible por un receptor durante un periodo de uso prolongado. El dispositivo se puede sujetar en el fondo superior o inferior durante 7 a 14 días o durante un periodo más largo. En la patente de 65 Estados Unidos N.º 5 322 691 se describe un ejemplo de este dispositivo.

En otro caso, un método para inhibir la neovascularización en un sujeto a quien se le ha diagnosticado un tumor, se realiza mediante administración local de la molécula de unión a ligando al sujeto. Por ejemplo, en algunos casos, las composiciones farmacéuticas que comprenden la molécula de unión a ligando, se administran por vía local al tumor o al órgano o tejido del cual se ha extirpado quirúrgicamente el tumor. En dichas realizaciones, la composición se administra preferentemente en una cantidad eficaz para inhibir la neovascularización en el tumor.

En casos en donde la molécula de unión a ligando es una molécula de ácido nucleico, la administración de una composición farmacéutica que contiene la molécula de ácido nucleico se puede llevar a cabo utilizando uno de numerosos métodos bien conocidos en el ámbito de genoterapia. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, transformación con lentivirus, transformación con adenovirus, transformación con citomegalovirus, microinyección y electroporación.

Kits y dosis unitarias

La divulgación también se refiere a kits que comprenden una o más composiciones farmacéuticas e instrucciones para su uso. Una molécula de unión a ligando puede envasarse o formularse junto con otra molécula de unión a ligando u otra sustancia terapéutica descrita en el presente documento, por ejemplo, en un kit o envase o dosis unitaria, para permitir la coadministración; estos dos componentes se pueden formular juntos (es decir, mezclados) o en composiciones distintas (es decir, no mezclados) y en cantidades de dosificación individuales. Cada una de las composiciones del kit puede estar dentro de un recipiente. En algunos casos, los dos componentes del kit/dosis unitaria se envasan con instrucciones para administrar los dos compuestos a un sujeto humano para el tratamiento de uno de los trastornos y enfermedades que se describen en el presente documento.

Los kits pueden comprender un recipiente. El recipiente se puede utilizar para separar componentes e incluye, por ejemplo, un frasco dividido o una lámina de aluminio dividida. Las composiciones separadas también pueden estar incluidas, si se desea, en un recipiente sencillo, no dividido. Los kits también comprenden indicaciones para la administración de los componentes. Los kits son particularmente ventajosos cuando se administran componentes separados en formas de dosificación diferentes, cuando se administran a niveles de dosificación diferentes o cuando se desea la titulación de los antagonistas individuales.

En caso de conflicto, prevalecerá la presente solicitud, incluyendo cualquier definición en la misma.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Fragmentos de DEC de proteínas de VEGFR

Se realizaron experimentos para caracterizar fragmentos y variantes y fusiones de VEGFR-3 y/o VEGFR-2 y/o VEGFR-1 que fueran eficaces para unirse a ligandos diana, tales como VEGF-C y/o VEGF-D y/o VEGF-A. Véanse las publicaciones de patentes internacionales N.º: WO 2005/087808, WO 2005/000895, WO 2006/088650, WO 2006/099154, WO 2004/106378, WO 2005/123104 y la patente de estados Unidos N.º 7 855 178. Estos estudios demuestran que los DEC de estos receptores pueden estar truncados y también que los dominios de receptores diferentes se pueden recombinar para formar moléculas de unión a ligando.

Ejemplo 2 - Generación de la molécula de unión a ligando VGX-301-AN2

Se preparó una molécula de unión a ligando que comprendía los dominios I a III similares a Ig de VEGFR-3 (denominada en el presente documento "VGX-300") como se describe en Makinen et al., Nat. Med., 7:199-205, 2001.

Un rasgo clave de la molécula VGX-300 es que contiene 12 sitios de glucosilación; 2 x 6 posibles sitios de glucosilación unidos a N, 5 sobre cada fragmento receptor (los dominios I, II y III similares a Ig de VEGFR-3) y uno sobre cada cadena gamma de la región Fc. No hay pruebas de glucosilación unida a O.

Las características de glucosilación pueden tener un efecto sobre el PF aunque los glucanos de Fc tienen poco efecto sobre el PF (Jones et al, Glycobiology, 17(5), 2007, págs. 529-540). Resumiendo, el receptor de asialoglucoproteína se une a las estructuras de glucano unidas N de tipo complejo en las que dos o más ácidos siálicos están ausentes, en donde los restos galactosa (Gal) subyacentes se convierten en sacáridos terminales. Además, el receptor de manosa (Man) reconoce glucanos de manosa superior unidos a N y restos de N-acetilglucosamina terminales (tGlnNAc). Ambos receptores pueden provocar la eliminación metabólica rápida de las proteínas.

Para identificar cuáles eran los sitios de glucosilación importantes para la actividad del producto, se llevó a cabo una deleción secuencial de cada uno de los supuestos cinco sitios unidos a N. Se utilizaron cinco pares de cebadores para introducir mutaciones únicas dentro de la región codificante VGX-300 para destruir la unión consenso de cada uno de los cinco glucanos unidos a N (N-Q).

Los pares de cebadores utilizados son los siguientes:

- 5 N1 en sentido: 5' GACCCCCCGACCTTGCAGATCACGGAGGAGTCACAC 3' (SEQ ID NO: 12)
 N1 antisentido: 5' GTGTGACTCCTCCGTGATCTGCAAGGTCGGGGGGGTC 3' (SEQ ID NO: 13)
 N2 en sentido: 5' CTGCACGAGGTACATGCCAGGACACAGGCAGCTACGTC 3' (SEQ ID NO: 14)
 N2 antisentido: 5' GACGTAGCTGCCTGTGTCCCTGGGCATGTACCTCGTGCAG 3' (SEQ ID NO: 15)
 N3 en sentido: 5' GTCCATCCCCGGCCTCCAAGTCACGCTGCGCTCGC 3' (SEQ ID NO: 16)
 N3 antiantisentido: 5' GCGAGCGCAGCGTACTTGGAGGCCGGGGATGGAC 3' (SEQ ID NO: 17)
 10 N4 en sentido: 5' GGGAGAAGCTGGTCTCCAGTGCACCGTGTGGGCTGA 3' (SEQ ID NO: 18)
 N4 antisentido: 5' TCAGCCCACACGGTGCCTGGAGGACCAGCTTCTCCC 3' (SEQ ID NO: 19)
 N5 en sentido: 5' AGCATCCTGACCATCCACCAGGTCAGCCAGCACGACCT 3' (SEQ ID NO: 20)
 N5 antisentido: 5' AGGTCGTGCTGGCTGACCTGGTGGATGGTCAGGATGCT 3' (SEQ ID NO: 21)

- 15 La presencia de mutaciones se confirmó por secuenciación, después de lo cual los vectores plasmídicos se transfectaron transitoriamente en células 293T (HEK). Las muestras de cultivo se analizaron por transferencia Western. Después, construcciones viables progresaron a células 293F (HEK) adaptadas para suspensión transitoria y los sobrenadantes se purificaron por cromatografía ProSepA y filtración en gel, para realizar adicionalmente un ensayo mediante análisis de inmunoadsorción enzimática (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) y
 20 bioanálisis BaF/3 para determinar el rendimiento y la actividad. En la tabla 3 a continuación se resumen datos de expresión y actividad de cada mutante resultante.

Tabla 3

Mutante	Perfil de filtración en gel	Rendimiento	Actividad	
			ELISA	BaF/3
Original	Monómero evidente, algún agregado	Regular	Referencia	Referencia
ΔN1	Monómero evidente, algún sustancial	Malo	≥1 log menor que el original	≥1 log menor que el original
ΔN2	Monómero evidente, algún agregado	Regular	Comparable con el original	Comparable con el original
ΔN3	Agregación intensa	Malo	≥1 log menor que el original	≥1 log menor que el original
ΔN4	Algún monómero evidente, agregado significativo	Malo	≥1 log menor que el original	≥1 log menor que el original
ΔN5	Algún monómero evidente, agregado significativo	Malo	≥1 log menor que el original	≥1 log menor que el original

- 25 En la tabla 3 se muestra que únicamente el mutante N2 (denominado en el presente documento "VGX-301-ΔN2") presenta características favorables de expresión y actividad en relación con la molécula original (es decir, VGX-300). VGX-301-ΔN2 y VGX-300 original se produjeron en células CHO y HEK mediante expresión transitoria y la farmacocinética (FC) de cada molécula se examinó de la siguiente manera. En cada experimento, se asignaron ratas Sprague-Dawley a cualquiera de los grupos de 2, 3 o 5 por compuesto. En cada grupo, las ratas recibieron una sola
 30 dosis de VGX-300 o VGX-301-ΔN2 mediante administración intravenosa como una inyección en embolada a una concentración en dosis de 1 mg/kg. El día -1 (antes de la dosis), se extrajeron muestras de sangre intermedias por punción lateral en la vena de la cola y, después de la dosis, hasta un total de 12 puntos de tiempo con una variación de 5 minutos a 14 días después del tratamiento inicial. Se prepararon muestras de suero de cada muestra de sangre y se analizaron utilizando un ensayo ELISA de captura de ligando VEGF-C cuantitativa para determinar la
 35 concentración circulante de cada compuesto. Los resultados de estos análisis se utilizaron después para calcular los parámetros farmacocinéticos. En la siguiente tabla 4 se proporcionan los datos FC de VGX-300 y VGX-3001-ΔN2.

Tabla 4

Compuesto	Dosis (mg/kg)	ABC _{0-última/dosis} (h*ng/ml)	C _{máx} (ng/ml)	T _{1/2} (el) (h)
Expresión transitoria de CHO (Experimento 1)				
VGX-300	1	15,115	5,702	16,9
VGX-300-ΔN2	1	23,236	12,076	22,6
Expresión transitoria de CHO (Experimento 2)				
VGX-300	1	35,310	16,000	46
VGX-300-ΔN2	1	55,071	20,000	42
Expresión transitoria de HEK				
VGX-300	1	18,738	8,500	6,4
VGX-300-ΔN2	1	90,750	13,250	15,3

Las curvas FC proporcionadas en la figura 1 y los datos de la tabla 4, muestran que VGX-301-ΔN2 puede tener un efecto beneficioso sobre la FC en comparación con VGX-300 producida en el mismo sistema de expresión.

5 **Ejemplo 3 - VGX-301-ΔN2 se une a VEGF-C y a VEGF-D**

Para determinar la especificidad de unión de VGX-300 y VGX-301-ΔN2 con VEGF-C y VEGF-D, placas de ELISA se recubrieron previamente con VEGF-C y VEGF-D (2 μg/ml) y ambos factores se utilizaron como antígenos de captura. Se aplicaron concentraciones en aumento de VGX-300 o de VGX-301-ΔN2 (de 0 a 10 μg/ml) a las placas y se detectaron con anticuerpo de conejo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante utilizando un kit de sustrato de tetrametilbenzidina. Los resultados indican que tanto VGX-300 como VGX-301-ΔN2 se unen tanto a VEGF-C como a VEGF-D. Véase la figura 2. Sorprendentemente, VGX-301-ΔN2 demostró tener una unión más fuerte a ambos ligandos en comparación con VGX-300.

15 **Ejemplo 4 – Afinidad de unión de VGX-300 y VGX-301-ΔN2**

La unión de VEGF-C y VEGF-D a VGX-300 o VGX-301-ΔN2 se analizó por resonancia de plasmón superficial (RPS) realizada utilizando el biodetector ProteOn XPR36 (Bio-Rad). VGX-300 o VGX-301-ΔN2 se capturaron sobre proteína G' inmovilizada sobre una microplaca detectora GLM y se midió la afinidad de la molécula por VEGF-C o VEGF-D. Los resultados del experimento de afinidad se proporcionan a continuación en la tabla 5.

Tabla 5

	VEGF-C Humano		
	$k_a(M^{-1}s^{-1}) \times 10^6$	$K_d(s^{-1}) \times 10^{-5}$	$K_D(pM)$
VGX-300	$2,18 \pm 0,05$	$1,11 \pm 0,12$	$5,1 \pm 0,6$
VGX-301-ΔN2	$2,79 \pm 0,04$	$1,03 \pm 0,08$	$3,7 \pm 0,3$
	VEGF-D Humano		
	$k_a(M^{-1}s^{-1}) \times 10^6$	$K_d(s^{-1}) \times 10^{-5}$	$K_D(pM)$
VGX-300	$4,9 \pm 0,1$	$3,23 \pm 0,16$	625 ± 21
VGX-301-ΔN2	$5,7 \pm 0,1$	$3,88 \pm 0,03$	677 ± 12

Los datos presentados en la tabla 5 anterior, muestran que las muestras de VGX-300 y VGX-301-ΔN2 se unen a las formas humanas de VEGF-C y VEGF-D con afinidades casi idénticas, mostrando ambas moléculas una unión más fuerte a VEGF-C que a VEGF-D.

Ejemplo 5 - VGX-301-ΔN2 bloquea la unión con VEGF-C y VEGF-D y el entrecruzamiento de VEGFR-3

Para evaluar la capacidad de los ligandos de la familia del VEGF para unirse y entrecruzarse con VEGFR-2 y VEGFR-3, se han desarrollado análisis basados en células. Estos bioanálisis se han empleado para estudiar la actividad neutralizante de VGX-300 y VGX-301-ΔN2. La línea celular del bioanálisis consistió en la línea celular pro-B dependiente de IL-3 de ratón, Ba/F3, transfectada de manera estable con un receptor quimérico que consistía en el DEC de VEGFR-2 o VEGFR-3, fusionado en marco a los dominios transmembrana e intracelular del receptor de eritropoyetina de ratón (como se describe en el ejemplo 5 del documento WO 2005/087808). En ausencia de IL-3, estas células sobreviven y proliferan únicamente en presencia de factores de crecimiento capaces de unirse y entrecruzarse con el DEC del VEGFR respectivo.

Resumiendo, células Ba/F3 transfectadas con VEGFR-2 o VEGFR-3 (10 000 células/pocillo; placa de 96 pocillos) se cultivaron en medio complementado con VEGF-C o VEGF-D en presencia de concentraciones en aumento de VGX-300 o VGX-301-ΔN2 (de 0 a 100 μg/ml) durante 48 horas a 37° C. La proliferación celular se midió utilizando el reactivo WST 1; las células se incubaron durante 4 horas a 37° C con WST-1 y la absorbancia se midió a 450 nm (n = 3; barras de error = error estándar de la media, EEM).

Los resultados indican que VGX-300 neutralizó la actividad de VEGF-C y VEGF-D, como se demuestra por la inhibición de respuesta a la dosis de VEGF-C y VEGF-D en los bioanálisis de VEGFR-2 y VEGFR-3 en Ba/F3. VGX-300 mostró una fuerza aumentada en neutralizar VEGF-C en comparación con VEGF-D en los análisis tanto de VEGF-2 como de VEGF-3. Véanse las figuras 3 y 4.

El análisis de VGX-301-ΔN2 demostró que esta molécula también era capaz de bloquear la unión tanto de VEGF-C como de VEGF-D con VEGFR-3. La actividad neutralizante de VGX-301-ΔN2 fue ligeramente más fuerte que la de VGX-300. Véase la figura 4. La tabla 6 muestra la unión (CI₅₀) de VGX-300 y VGX-301-ΔN2 con VEGF-C y VEGF-D en el bioanálisis de VEGFR-3 en Ba/F3.

55 Tabla 6

	VGX-300, CI ₅₀	VGX-301-ΔN2 CI ₅₀
Ligando VEGF-D, 300 ng/ml	544,9	251,7

(continuación)

	VGX-300, Cl ₅₀	VGX-301-ΔN2 Cl ₅₀
Ligando VEGF-C, 5 ng/ml	6,8	4,5

Ejemplo 6 – Distribución ocular y farmacocinética de VGX-300 y VGX-301-ΔN2 después de la administración intravítrea

5 Este estudio se llevó a cabo para investigar la distribución ocular y farmacocinética de VGX-300, VGX-301-ΔN2 y Aflibercept (EYLEA) después de una sola dosis intravítrea a conejos pigmentados.

10 El diseño del estudio consistió en 3 grupos de 8 conejos hembra asignados por grupo. Los animales recibieron en los ojos una administración de 500 μg de VGX-300, VGX-301-ΔN2 o Aflibercept radiomarcados mediante una inyección intravítrea embolada de 50 μl.

Grupo	Número de hembras	Formulación	Vía de dosis	Nivel de dosis diana	Volumen de dosis diana (μl/ ojo)	Muestras recogidas
1	8	[¹²⁵ I]VGX-300	IVT	500 μg	50	Sangre y tejidos oculares
2	8	[¹²⁵ I]Aflibercept	IVT	500 μg	50	Sangre y tejidos oculares
3	8	[¹²⁵ I]VGX-301-ΔN2	IVT	500 μg	50	Sangre y tejidos oculares

15 Después de 1, 12, 24, 72, 168, 366, 504 y 672 horas de la administración de la dosis, se sacrificó un animal por grupo. La sangre, procesada a suero, y los tejidos oculares seleccionados, se recogieron en cada punto de tiempo y la concentración de radioactividad se determinó por radioanálisis. Los tejidos oculares recogidos incluyeron humor acuoso, coroides, córnea, cuerpo ciliar e iris (CCI), cristalino, nervio óptico, retina, epitelio pigmentario retiniano (EPR), esclerótica, retículo trabecular y humor vítreo. En la figura 5 se muestra la media de concentraciones de radioactividad en diversos tejidos y suero con respecto al periodo de tiempo controlado.

20 Los artículos de ensayo, [¹²⁵I]VGX-300, [¹²⁵I]Aflibercept (EYLEA) y [¹²⁵I]VGX-301-ΔN2, se toleran bien, son estables en el humor vítreo y presentan exposición prolongada a tejidos oculares tanto en el segmento posterior como en el segmento anterior. Aunque hubo diferencias en la exposición sérica de [¹²⁵I]VGX-300 y [¹²⁵I]VGX-301-ΔN2 después de la administración intravítrea, tanto [¹²⁵I]VGX-300 como [¹²⁵I]VGX-301-ΔN2 tuvieron solo exposición sistémica menor en comparación con la de Aflibercept (EYLEA), probablemente como resultado de la eliminación por medio de absorción en la coroides y también por el flujo de salida de humor acuoso. La FC y biodistribución de [¹²⁵I]VGX-300 y [¹²⁵I]VGX-301-ΔN2 observadas en este estudio, fueron similares para ambos compuestos y comparables con la de [¹²⁵I]Aflibercept (EYLEA).

Ejemplo 7- Modelo de retinopatía de la premadurez (RDP)

El siguiente ejemplo es un análisis ejemplar para evaluar la capacidad de VGX-300 y VGX-301-ΔN2 para inhibir la aparición de neovascularización retiniana utilizando el modelo RDP. En este modelo, ratones de 7 días de vida (D7) se expusieron a hiperoxia (75 % de oxígeno) durante 5 días (hasta el día, D12). Después de la exposición hiperóxica, ratones de 2 días de vida, D2 regresaron a normoxia y recibieron una administración mediante inyección intravítrea de anticuerpo control de isotipo humano, VGX-300, VGX-301-ΔN2, Eylea (VEGF-Trap), VGX-300 + Eylea o VGX-301-ΔN2 + Eylea. Después, todos los ratones se instalaron en condiciones normóxicas durante 5 días antes de sacrificio el D17, se realizó la enucleación y la fijación en formalina/PBS al 10 %/. En cada grupo, los vasos se cuantificaron utilizando los métodos de tinción con H&E y/o IHC (inmunohistoquímica).

Ejemplo 8 - Neovascularización coroidea (NVC) inducida por láser de argón

45 En este modelo de degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), la NVC se induce por rotura, inducida por láser de argón, de la membrana de Bruch en ratones el día 0 (3 quemaduras por ratón). Se estudiaron grupos de 10 ratones y el tratamiento se administró semanalmente (el día 0 y el día 7) mediante inyecciones intravítreas de anticuerpo control de isotipo humano, VGX-301-ΔN2, VGX-300, Eylea (VEGF-Trap), VGX-301-ΔN2 + Eylea o VGX-300 + Eylea. El día 14 los animales se sacrificaron, se prepararon montajes planos coroideos y se tiñeron con ICAM-2 para visualizar la neovascularización por microscopía de fluorescencia.

50 Se contempla que VGX-301-ΔN2, como agente único, inhibirá de modo significativo la neovascularización coroidea en un modelo de ratón de DMRE neovascular, comparable con el efecto demostrado por Eylea^{MR}.

Ejemplo 9 - Efecto inhibidor de moléculas de unión a ligando sobre el crecimiento y la metástasis tumoral mediado por VEGF-C

Para demostrar la capacidad de una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento para inhibir el crecimiento y/o la metástasis tumoral, se puede emplear cualquier modelo de tumor aceptado. Como ejemplos de modelos se incluyen animales predispuestos a desarrollar diversos tipos de cánceres, animales inyectados con tumores o células tumorales o líneas celulares tumorales de la misma especie o de una diferente, que incluyen opcionalmente células transformadas para sobreexpresar de manera recombinante uno o más factores de crecimiento, tales como VEGF-C o VEGF-D. Para proporcionar un modelo de tumores *in vivo* en los que sean detectables múltiples factores de crecimiento, es posible transformar líneas celulares tumorales con ADN exógeno para producir la expresión de múltiples factores de crecimiento.

Una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento se puede administrar directamente, por ejemplo, en forma de proteína, por transfusión i.v. o por microbombas implantadas, o en forma de ácido nucleico como parte de un régimen de genoterapia. Preferentemente, los sujetos se agrupan por sexo, peso, edad y antecedentes médicos para ayudar a minimizar variaciones entre los sujetos.

La eficacia se mide por una disminución en el tumor, tamaño (volumen) y peso. También se puede examinar la naturaleza del efecto sobre el tamaño del tumor, la propagación (metástasis) y número de tumores. Por ejemplo, se pueden utilizar marcadores celulares específicos para mostrar el efecto sobre la angiogénesis en relación con la linfangiogénesis, una construcción que se une a VEGF-A que se espera que tenga un mayor efecto sobre la primera y una construcción que se une a VEGF-C que se espera que tenga un efecto mayor sobre esta última. Los animales pueden analizarse en su totalidad con respecto al tiempo de supervivencia y cambios de peso. Los tumores y especímenes se examinan en busca de pruebas de angiogénesis, linfangiogénesis y/o necrosis.

Como sujetos para determinar la capacidad de una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento para inhibir o impedir el crecimiento de tumores se pueden utilizar ratones SCID. La molécula de unión a ligando utilizada en la terapia generalmente se selecciona de manera que se une a un ligando de factor de crecimiento expresado por la célula tumoral, especialmente factores de crecimiento que sobreexpresa la célula tumoral en relación con células no neoplásicas en el sujeto. En el modelo SCID, las células tumorales, por ejemplo, células MCF-7, pueden transfectarse con un virus que codifica un factor de crecimiento en particular, bajo el control de un promotor u otra secuencia de control de expresión que proporciona la sobreexpresión del factor de crecimiento como se describe en el documento WO 02/060950. De manera alternativa, se pueden emplear otras líneas celulares, por ejemplo, HT-1080, como se describe en la patente de Estados Unidos N° 6 375 929. Se pueden transfectar células tumorales con tantos ligandos de factor de crecimiento como se deseen sobreexpresar, o se puede seleccionar una línea celular tumoral que ya sobreexpresa o más ligandos de factor de crecimiento de interés. A un grupo de sujetos se le implanta células que se han transfectado de manera simulada, es decir, con un vector que carece de un inserto de ligando de factor de crecimiento.

Ya sea antes, a la vez o después de la implantación del tumor de las células descritas anteriormente, los sujetos se tratan con una molécula de unión a ligando particular. Existen numerosas maneras diferentes de administrar la molécula de unión a ligando. Se puede emplear genoterapia *in vivo* y/o *ex vivo*. Por ejemplo, las células se pueden transfectar con un adenovirus, u otro vector, que codifique la molécula de unión a ligando y se implanta con las células tumorales que expresan uno o más factores de crecimiento, las células transfectadas con la molécula de unión a ligando pueden ser las mismas que las transformadas con uno o más factores de crecimiento (o que ya sobreexpresan uno o más de los factores de crecimiento). En algunas realizaciones, un adenovirus que codifica la molécula de unión a ligando se inyecta *in vivo*, por ejemplo, por vía intravenosa. En algunas realizaciones, propia la molécula de unión a ligando (por ejemplo, en forma de proteína) se administra ya sea de modo sistémico o local, por ejemplo, utilizando una microbomba. Cuando se somete a ensayo la eficacia de una construcción de unión particular, normalmente se emplea al menos un control. Por ejemplo, en el caso de un tratamiento basado en vector, se emplea un vector con un inserto vacío o LacZ, o el inserto puede ser una molécula de unión a ligando que comprende un DEC completo de VEGFR-3 capaz de unirse a VEGF-C o VEGF-D, de tal manera que, si fuera necesario, un control puede emplear más de una construcción de DEC (por ejemplo, para la unión de múltiples ligandos si se emplean construcciones de unión con afinidades múltiples de unión a ligando).

A. Procedimientos Ejemplares

Preparación de Vectores de Expresión Plasmídicos, Transfección de Células y análisis y ensayos de las mismas

En un plásmido pEBS7, se introduce un ADNc que codifica VEGF-C O VEGF-D, o combinaciones de los mismos (Peterson y Legerski, *Gene*, 107:279-84, 1991). Este mismo vector se puede utilizar para la expresión de la molécula de unión a ligando.

El subclón MCF-7S1 de la línea celular de carcinoma mamario MCF-7 humano se transfecta con el ADN plasmídico por electroporación y se seleccionan grupos de células estables y se cultivan como se ha descrito anteriormente (Egeblad y Jaattela, *Int. J. Cancer*, 86: 617-25, 2000). Las células se marcan metabólicamente en MEM sin metionina ni cisteína (Gibco) complementado con [³⁵S]-metionina y [³⁵S]-cisteína 100 µCi/ml (Redivue Pro-Mix, Amersham Pharmacia Biotech). Los factores de crecimiento marcados se inmunoprecipitan del medio acondicionado

utilizando anticuerpos contra uno o más de los factores de crecimiento expresados. Los inmunocomplejos y los complejos de unión se precipitan utilizando proteína A y Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech), se lavan dos veces en BSA al 0,5 %, Tween 20 al 0,02 % en PBS y una vez en PBS y se analizan con SDS-PAGE en condiciones reductoras.

5

Preparación de los Sujetos y Tratamiento

En placas de 24 pocillos, se siembran células (20000/pocillo) por cuadruplicado, se someten a tripsinización sobre placas duplicadas después de 1, 4, 6 u 8 días y se cuentan utilizando un hemocitómetro. Después de 4 y 6 días se proporciona medio reciente. Para el análisis de tumorigénesis, cultivos de subconfluencia, se recogen por tripsinización, se lavan dos veces y se inoculan 10^7 células en PBS en el pániculo adiposo de la segunda glándula mamaria (axilar) de ratonas SCID ooferoctomizadas, que presentan gránulos subcutáneos de liberación lenta de 60 días que contienen 0,72 mg de 17β -estradiol (Innovative Research of America). La ooferoctomía y la implantación de los gránulos se realiza de 4 a 8 días antes de la inoculación de las células tumorales.

15

El ADNc que codifica una o más de las construcciones de unión se subclona en el plásmido pAdBgIII y el adenovirus se produce como se ha descrito anteriormente (Laitinen et al., Hum. Gene Ther., 9:1481-6, 1988). Una o más de las moléculas de unión a ligando o un adenovirus de control LacZ (Laitinen et al., Hum. Gene Ther., 9: 1481-6, 1998) adenovirus, 10^9 ufp/ratón se inyectan por vía intravenosa en ratonas SCID 3 horas antes de la inoculación de células tumorales.

20

Análisis de Eficacia del Tratamiento

La longitud y anchura del tumor se miden dos veces por semana de manera oculta, y el volumen tumoral se calcula como la longitud x anchura x profundidad x 0.5, suponiendo que el tumor es un hemi-elipsoide y que la profundidad es la misma que la anchura (Benz, et al., Breast Cancer Res. Treat., 24:85-95, 1993).

25

Los tumores son extraen, se fijan en paraformaldehído al 4 % (pH 7,0) durante 24 horas y se introducen en parafina. Se tiñen secciones (de 7 μ m) con inmunotinción con anticuerpos monoclonales, por ejemplo, PECAM.1 (Pharmingen), VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 (Kubo et al., Blood. 96: 546-553, 2000) o PCNA (Zymed Laboratories), PDGFR- α , PDGFR- β o anticuerpos policlonales contra LYVE-1 (Banerji et al., J. Cell Biol, 144: 789-801, 1999), VEGF-C (Joukov et al., EMBO J., 16:3898-911, 1997), laminina según protocolos publicados (Partanen et al., Cancer, 86: 2406-12, 1999) o cualquiera de los factores de crecimiento. El promedio del número de los recipientes positivos a PECAM-1 se determina a partir de tres áreas (ampliación 60x) de la más alta densidad vascular (puntos calientes vasculares) en una sección. Todos los análisis histológicos se realizan con ocultación utilizando muestras de tumor.

30

35

Tres semanas después de la inyección de las construcciones de adenovirus y/o terapia con proteína, cuatro ratones de cada grupo se narcotizaron, la piel ventral se abre y se inyectan en el tumor algunos microlitros de colorante azul de Evan al 3 % (Sigma) en PBS. El drenaje de colorante desde el tumor se verifica macroscópicamente.

40

También se generaron imágenes y se controló la sangre y las proteínas sanguíneas para proporcionar una indicación de la salud de los sujetos y del grado de vasculatura tumoral.

Ejemplo 10 - Efectos de la evolución tumoral en sujetos utilizando una terapia combinada de una molécula de unión a ligando y un agente quimioterapéutico

45

Este estudio se llevó a cabo para analizar la eficacia de utilizar una molécula de unión a ligando descrita en el presente documento, en combinación con otras terapias contra el cáncer. Estas terapias incluyen quimioterapia, radioterapia y terapia antisentido, interferencia de ARN y anticuerpos monoclonales dirigidos contra dianas de cáncer. El efecto combinatorio puede ser aditivo, pero preferentemente es sinérgico en sus efectos contra el cáncer, por ejemplo, prevención, supresión, regresión y eliminación de cánceres, prolongación de la vida y/o reducción de efectos secundarios.

50

Los sujetos se dividen en grupos, en donde un grupo recibe un agente quimioterapéutico, un grupo recibe una molécula de unión a ligando y un grupo recibe tanto un agente quimioterapéutico como una molécula de unión a ligando a intervalos periódicos regulares, por ejemplo, cada día, semana o mes. En estudios realizados en seres humanos, generalmente los sujetos se agrupan por sexo, peso, edad y antecedentes médicos para ayudar a minimizar las variaciones entre sujetos. Idealmente, a los sujetos se les había diagnosticado el mismo tipo de cáncer. En sujetos humanos o no humanos se puede realizar un seguimiento de la evolución midiendo el tamaño del tumor, la metástasis, el aumento/pérdida de peso, la vascularización en los tumores y el recuento leucocitario.

60

Las biopsias de tumores se toman a intervalos regulares antes y después de iniciar el tratamiento. Por ejemplo, se toman biopsias justo antes del tratamiento, al cabo de una semana, y después a intervalos de un mes, posteriormente o cuando sea posible, por ejemplo, a medida que se extirpan los tumores. Las biopsias se examinan para detectar marcadores celulares, así como la morfología general de las células y tejidos para evaluar la eficacia

65

del tratamiento. Además, o como alternativa, se pueden emplear técnicas de generación de imágenes.

5 Para estudios en animales no humanos, se puede emplear un control adicional con placebo. Los estudios en animales, realizados según las directrices de los NIH (*National Institutes of Health*), también ofrecen la ventaja de la inserción de una población de células de cáncer relativamente uniforme y de tumores que producen selectivamente en exceso uno o más factores de crecimiento dirigidos por la molécula de unión a ligando.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión a ligando que comprende un polipéptido de unión a ligando fusionado a un fragmento de dominio constante de inmunoglobulina, comprendiendo el polipéptido de unión a ligando la secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 25-314 de SEQ ID NO: 2, con la condición de que las posiciones del polipéptido que corresponden a las posiciones 104-106 de la SEQ ID NO: 2 no sean idénticas a N-X-S o N-X-T, en donde la molécula de unión a ligando se une e inhibe VEGF-C humano y VEGF-D humano; y en donde el polipéptido de unión a ligando conserva cuatro sitios de N-glicosilación en el secúon correspondientes a las posiciones 33-35 de SEQ ID NO: 2, posiciones 166-168 de SEQ ID NO: 2, posiciones 251 -253 de SEQ ID NO: 2, y posiciones 299-301 de SEQ ID NO: 2 y está glicosilada en dichos cuatro sitios de N-glicosilación N; y en donde la molécula de unión a ligando es soluble.
2. La molécula de unión a ligando según la reivindicación 1, en donde la molécula de unión a ligando consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3.
3. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos codificante que codifica el polipéptido de unión a ligando según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
4. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 3.
5. Una célula o línea celular aislada transformada o transfectada con un polinucleótido según la reivindicación 3 o con un vector según la reivindicación 4.
6. Un método para producir una molécula de unión a ligando, que comprende cultivar una célula según la reivindicación 5, en condiciones en las que se exprese la molécula de unión a ligando codificada por el polinucleótido, y opcionalmente purificar o la molécula de unión a ligando de la célula o de un medio de cultivo de la célula.
7. Una composición que comprende:
- (i) una molécula de unión a ligando según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o un polinucleótido o vector según la reivindicación 3 o la reivindicación 4; y
 - (ii) un diluyente, adyuvante, excipiente o transportador farmacéuticamente aceptable.
8. Una composición según la reivindicación 7 para su uso en terapia.
9. La composición según la reivindicación 8, para su uso en el tratamiento o en la prevención de una enfermedad o afección que se atenúa, mejora, inhibe o impide mediante la eliminación, inhibición o reducción de VEGF-C y/o VEGF-D, seleccionada de:
- Neovascularización coroidea;
 - Edema macular diabético;
 - Degeneración macular relacionada con la edad;
 - Retinopatía diabética proliferativa;
 - Neovascularización corneal/rechazo de trasplante; y
 - Degeneración macular húmeda relacionada con la edad.

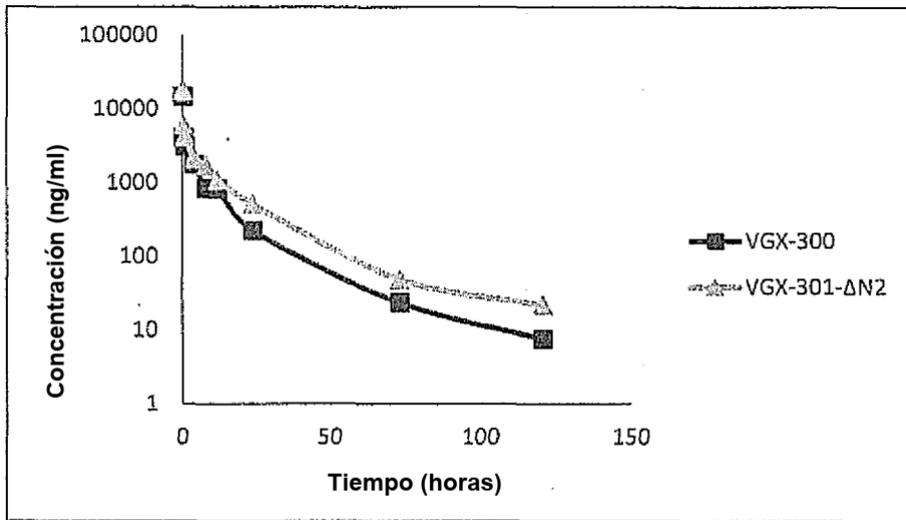


Figura 1a:

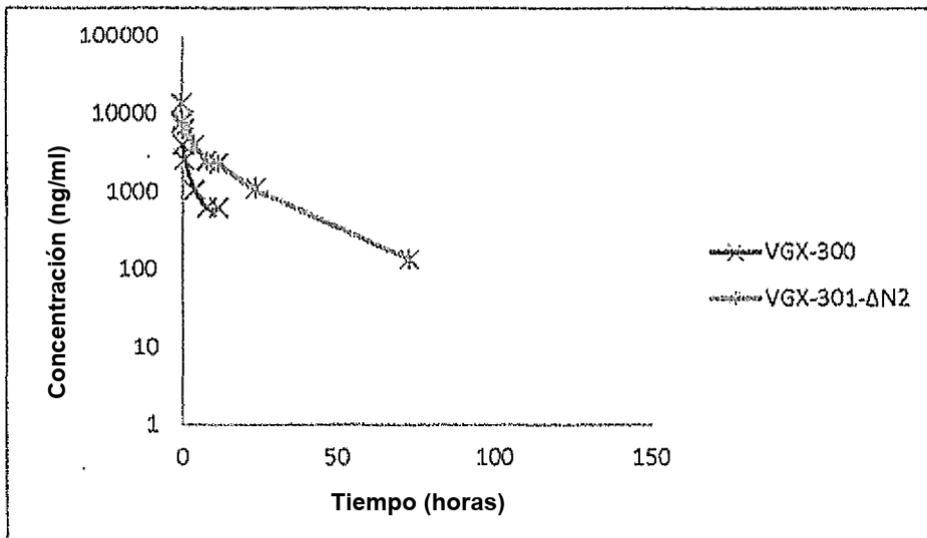
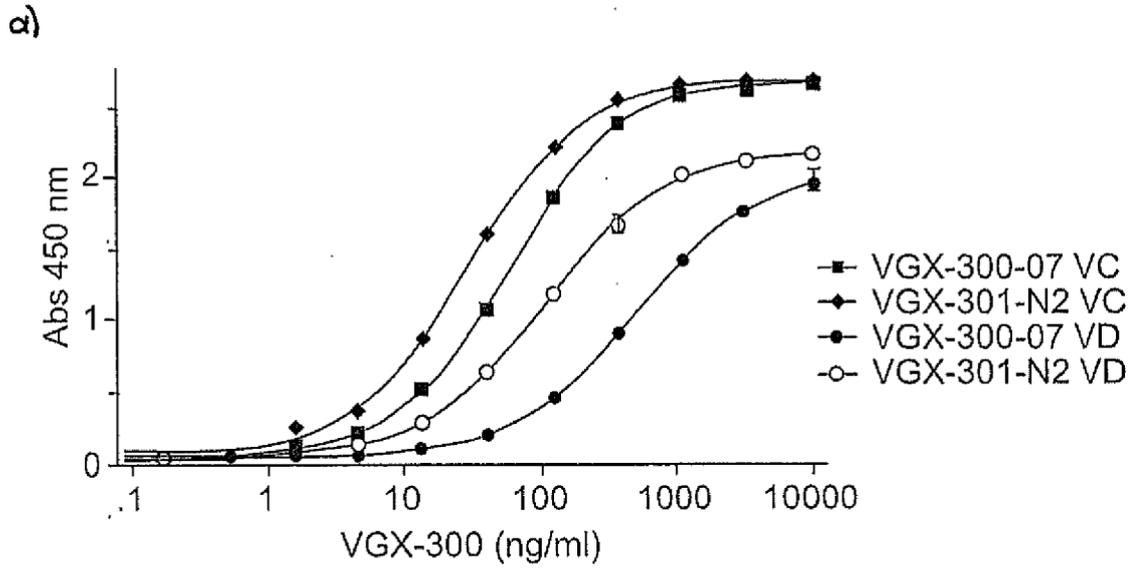


Figura 1b:

Figura 1



b)

	VGX-300-07 VC	VGX-301-N2 VC	VGX-300-07 VD	VGX-301-N2 VD
SUPERIOR	0,06295	0,08009	0,04496	0,04462
INFERIOR	2,660	2,677	2,062	2,178
LOGCE50	1,764	1,469	2,703	2,021
PENDIENTE	1,091	1,057	0,9355	0,9812
CE50	58,05	29,45	504,5	105,0
INTERVALO	2,597	2,597	2,017	2,133

Figura 2

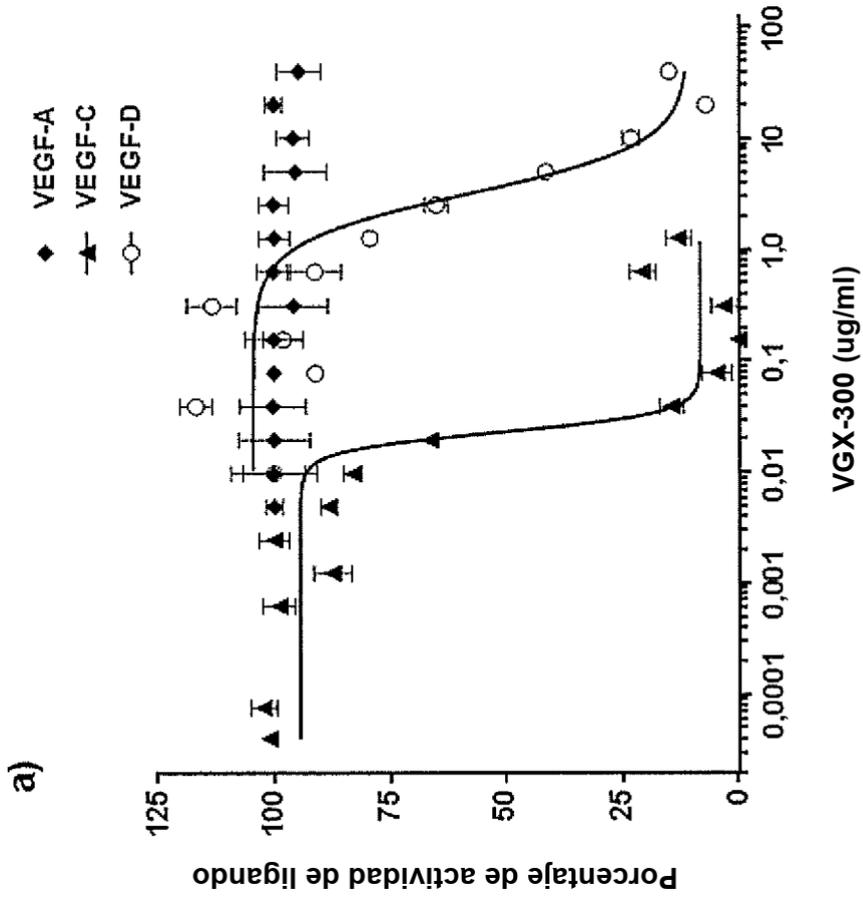


Figura 3

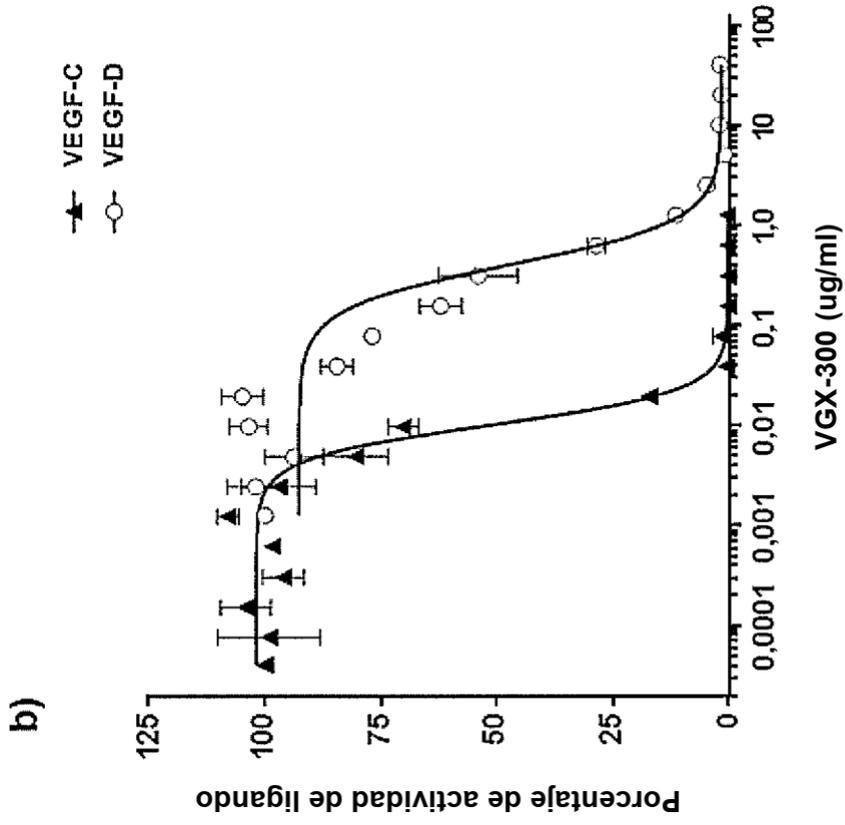


Figura 3 (continuación)

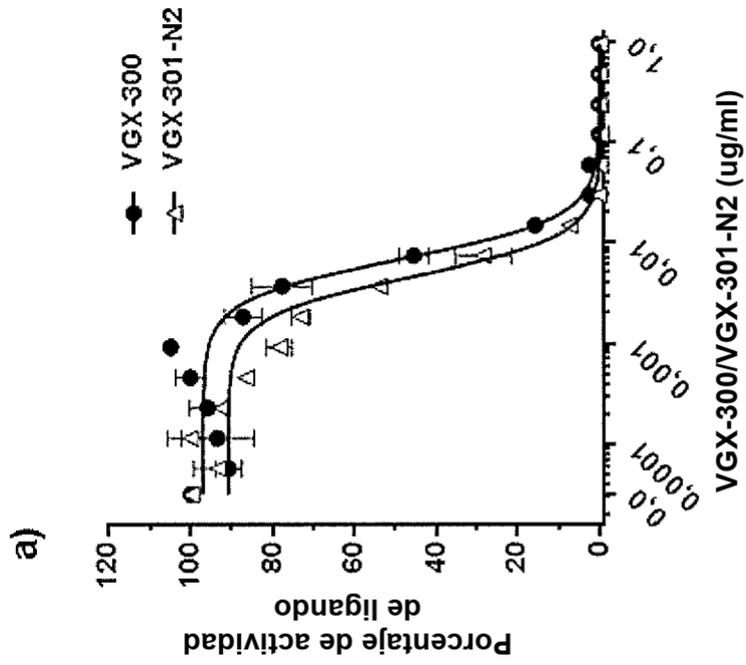


Figura 4

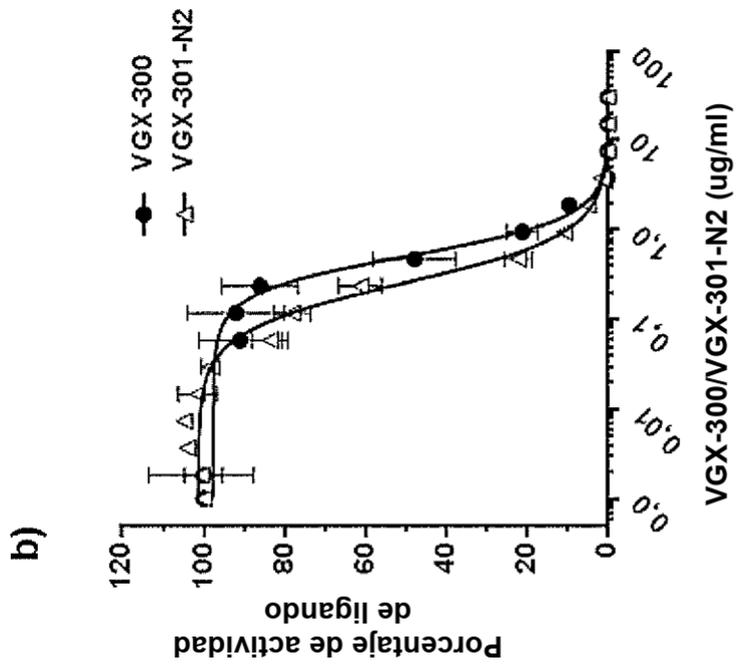


Figura 4 (continuación)

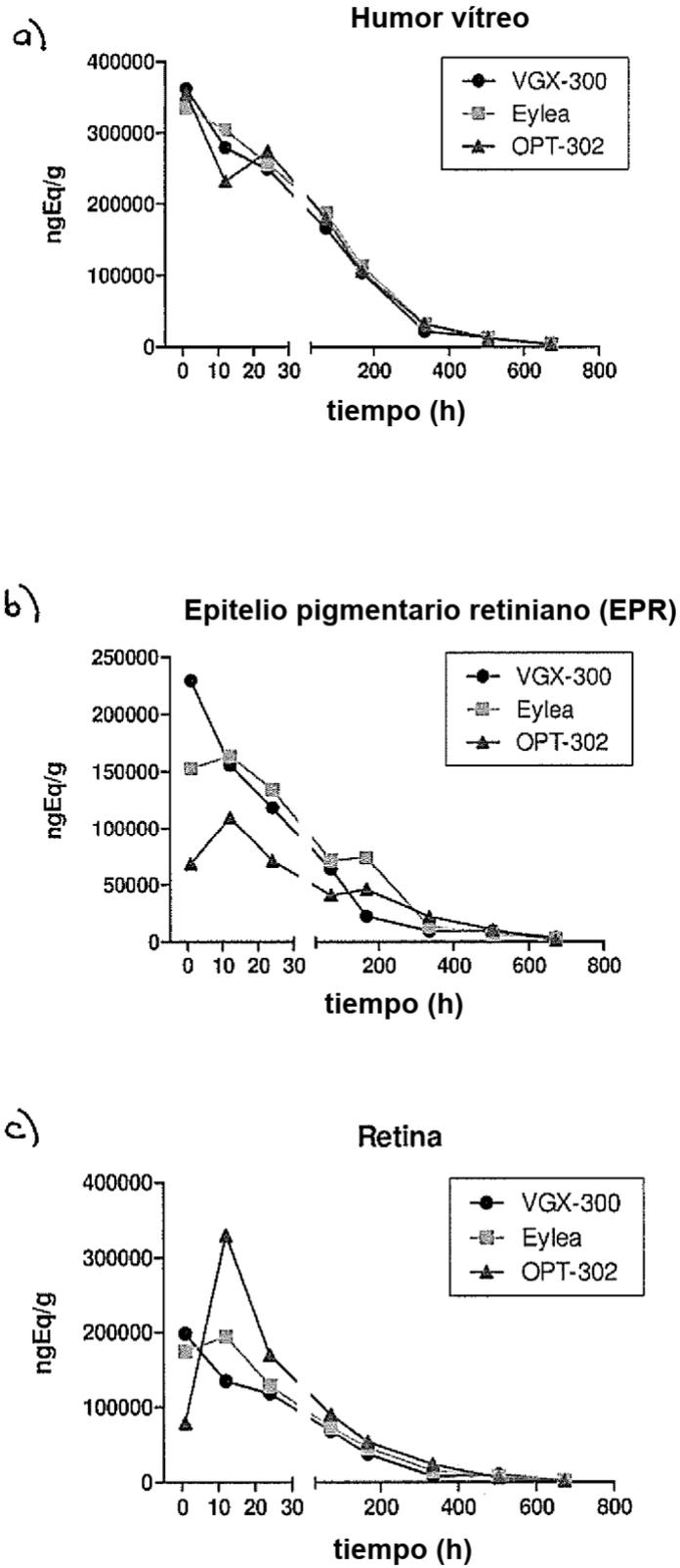


Figura 5

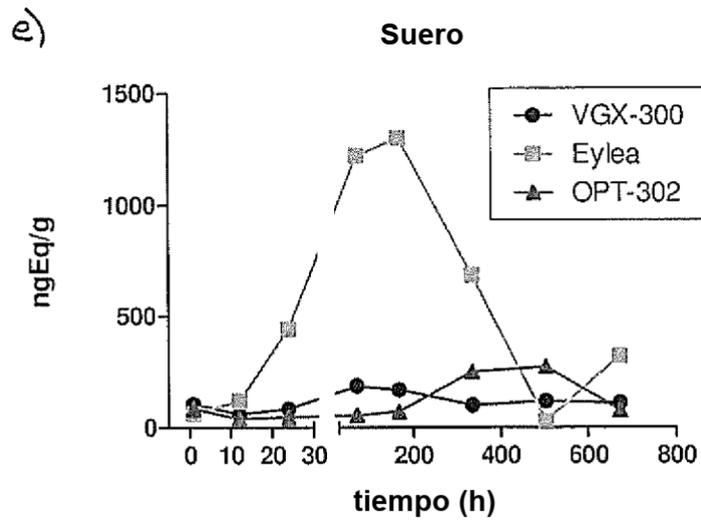
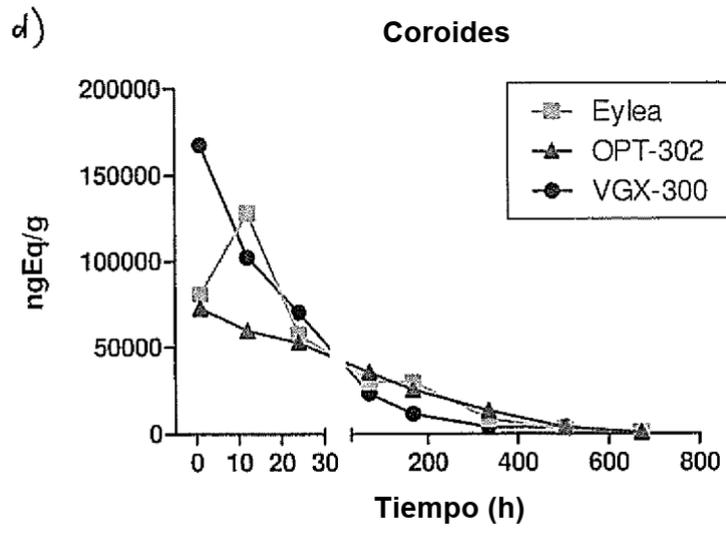


Figura 5 (continuación)