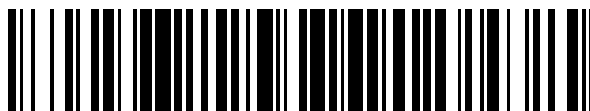


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 901**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2016 PCT/IB2016/053794**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2017 WO17001990**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2016 E 16817337 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3313426**

54 Título: **Proteínas de fusión para la inhibición de angiogénesis**

30 Prioridad:

**28.06.2015 US 201562185716 P**

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

**04.12.2020**

73 Titular/es:

**ALLGENESIS BIOTHERAPEUTICS INC. (100.0%)  
7F.1 No.760 Sec.4 Bade Rd. Songshan Dist.  
Taipei City 105, TW**

72 Inventor/es:

**WU, PEI-TZU;  
SHIU, JIA-HAU;  
CHERUKURY, MADHU;  
NGUYEN, TAN y  
ZEN, KEVIN**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 797 901 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión para la inhibición de angiogénesis

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

**[0001]** La presente invención se refiere a un producto biológico que inhibe la angiogénesis. En particular, la presente invención se refiere a proteínas de fusión que inhiben las vías activadas por el factor angiogénico, las composiciones de estas proteínas de fusión, así como los métodos para producir y usar las mismas.

10

REFERENCIA A UNA LISTA DE SECUENCIAS PRESENTADA COMO ARCHIVO DE TEXTO A TRAVÉS DE LA WEB DE EFS

15

**[0002]** La copia oficial de la lista de secuencias se envía electrónicamente a través de la Web de EFS como una lista de secuencias con formato ASCII con un archivo llamado 479685SEQLIST.TXT, creado el 17 de junio de 2016 y que tiene un tamaño de 37 kb, y se presenta simultáneamente con la especificación. La lista de secuencias contenida en este documento con formato ASCII es parte de la especificación y se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

20

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

25

**[0003]** La angiogénesis es el proceso de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente. Desempeña un papel importante en varios procesos fisiológicos, incluido el desarrollo embrionario, así como la reparación de tejidos y heridas (Folkman J et al., *Angiogenic factors*. *Science* 1987; 235:442-7). Los pasos fisiológicos de la angiogénesis están bien caracterizados e implican la proteólisis de la matriz extracelular, la proliferación, la migración y el ensamblaje de las células endoteliales en un canal tubular, reclutamiento y diferenciación de células murales y producción de matriz extracelular (Carmeliet P et al., *Nature* 2011; 473:298-307). La angiogénesis patológica puede ocurrir en la formación de tumores, trastornos oculares (p. ej., retinopatía diabética, edema macular diabético o degeneración macular), artritis, psoriasis, enfermedades fibróticas, enfermedades inflamatorias y arteriosclerosis (Polverini P.J. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995; 6 (3): 230-47).

30

35

**[0004]** La angiogénesis patológica es más heterogénea y caótica, y a menudo demuestra una organización de vasos tortuosa, huecos hipóxicos de varios tamaños, paredes y revestimientos de vasos desiguales e imperfectos, y perfusión ineficaz (Jain RK., *Nat Med*. 2003; 9(6): 685-93). Estas características distintivas de la formación de nuevos vasos sanguíneos en las enfermedades han convertido en un desafío la focalización terapéutica de la angiogénesis. Aunque las terapias anti-VEGF como Lucentis®, Eylea® o el uso fuera de etiqueta de Avastin® generalmente pueden estabilizar o mejorar la función visual, pueden desarrollarse cicatrices subretinianas (fibrosis) en aproximadamente la mitad de todos los ojos tratados dentro de los dos años posteriores al tratamiento anti-VEGF y se ha identificado como una causa de resultados no exitosos (Daniel E et al., *Ophthalmology*. 2014;121(3):656-66). Es probable que muchos de los jugadores críticos en la fibrosis sub-retiniana sean los factores de crecimiento y las proteínas matricelulares que están involucradas en el proceso fibrótico (proliferación celular, migración y remodelación de ECM). A pesar de su complejidad, con nuestro conocimiento creciente del proceso angiogénico, el desarrollo de fármacos antiangiogénicos sigue siendo un área de gran interés.

40

45

**[0005]** Actualmente, se han identificado muchos actores clave en el proceso de neovascularización, y la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) tiene un papel predominante. La familia humana VEGF consta de 6 miembros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y factor de crecimiento placentario (PlGF). Además, se generan múltiples isoformas de VEGF-A, VEGF-B y PlGF a través del empalme de ARN alternativo (Sullivan et al., *MAbs*, 2002, 2 (2): 165-75). VEGF-A es el factor primario involucrado con la angiogénesis; se une tanto a VEGFR-1 como a VEGFR-2. La estrategia de inhibir la angiogénesis mediante la obstrucción de la señalización de VEGF-A ha establecido terapias exitosas para el tratamiento de cánceres específicos, así como enfermedades neovasculares e isquémicas de la retina. (Major et al., *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 283 (1): 402-10; Willet et al., *Nat. Med.* 2004, 10: 145-7; Papadopoulos et al., *Angiogenesis*, 2012, 15 (2): 171-85; Aiello et al., *PNAS*, 1995, 92: 10457-61).

50

55

**[0006]** Otros factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas incluyen factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento transformantes beta (TGF- $\beta$ ), factores de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento nervioso (NGF), factor inducido por hipoxia (HIF), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factores de crecimiento de hepatocitos/factor de dispersión (HGF/SF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interleucina 17 (IL-17), interleucina 18 (IL-18), interleucina 20 (IL-20), interleucina 23 (IL-23), quimioatrayentes como el ligando con motivo C-C (CCL28, CCL21) y el ligando con motivo C-X-C (CXCL1, CXCL5), el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y las proteínas de la superficie de las células inmunes como los grupos de diferenciación (CD). Se informa que estos factores están sobreexpresados y juegan un papel clave en las enfermedades relacionadas con la angiogénesis (Elshabrawy et al., *Angiogenesis* (2015) 18: 433-448; Brian P. Eliceiri, *Circ Res*. 2001 7 de diciembre; 89 (12): 1104-10). La focalización a estos factores para reducir su activación de la ruta corriente abajo puede disminuir las enfermedades relacionadas con la angiogénesis.

65

**[0007]** También se encuentra que las integrinas, una familia de receptores de la superficie celular, se sobreexpresan en la superficie de las células endoteliales y se cree que facilitan el crecimiento y la supervivencia de los vasos recién formados durante la angiogénesis. Las integrinas son receptores heterodiméricos de la superficie celular que interactúan con las proteínas de la matriz extracelular y son fundamentales para muchos procesos biológicos. La expresión de las integrinas en varios tipos de células están involucradas en la progresión tumoral, y su capacidad de cruzarse con los receptores del factor de crecimiento lo ha convertido en dianas terapéuticas atractivas. (Staunton DE, et al., *Adv Immunol.* 2006; 91:111-57; Avraamidas, C. J., et al., *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 604-617.) En particular, la integrina  $\alpha v\beta 3$  está regulada positivamente tanto en células tumorales como en células endoteliales angiogénicas, y es importante para la migración de células tumorales, angiogénesis y señalización de células desreguladas. Por lo tanto, los antagonistas de la integrina  $\alpha v\beta 3$  se estudian intensamente por sus propiedades antiangiogénicas y antitumorales (Desgrosellier JS et al., *Nat Rev Cancer.* 2010 10: 9-22).

**[0008]** Las desintegrinas son los péptidos que se encuentran en el veneno de serpiente de la familia de las víboras e inhiben principalmente la función de las integrinas asociadas a  $\beta 1$  y  $\beta 3$ . Primero se identificaron como inhibidores de la integrina  $\alpha II\beta 3$  y posteriormente se unió con alta afinidad a otras integrinas, bloqueando la interacción de las integrinas con las proteínas que contienen RGD. Contienen 47 a 84 aminoácidos con aproximadamente 4 a 7 enlaces disulfuro y llevan el mismo motivo RGD (McLane MA, et al., *Proc Soc Exp Biol Med* 1998 219: 109-1 19; Niewiarowski S, et al., *Semin Hematol* 1994 31: 289-300; Calvete JJ., *Curr Pharm Des,* 2005 11:829-835; Blobel CP et al., *Curr Opin Cell Biol* 1992 4: 760-765). La secuencia RGD conservada en la familia de desintegrina juega el papel más importante en el reconocimiento de las integrinas. Se descubrió que las desintegrinas interactúan con ocho de veinticuatro integrinas e inhiben la adhesión celular, la migración y la angiogénesis mediadas por integrinas (McLane MA, et al., *Front Biosci.* 2008 13: 6617-6637; Swenson S, et al., *Curr Pharm Des,* 2007 13: 2860-2871). Los estudios en animales mostraron que las desintegrinas apuntaban al endotelio neovascular y los tumores metastásicos, lo que indica su posible uso en la terapia contra el cáncer. La unión específica de las proteínas que contienen RGD a la integrina es una función tanto de la conformación como de la secuencia local que rodea el motivo RGD. Muchos estudios han demostrado que los residuos que flanquean el motivo RGD de las proteínas que contienen RGD afectan sus especificidades y afinidades de unión a las integrinas (Scarborough RM et al., *J Biol Chem* 1993 268: 1058-1065; Rahman S et al., *Biochem J* 1998) 335: 247-257).

**[0009]** La angiogénesis es un proceso biológico complejo que involucra varios factores de crecimiento y receptores de señalización, y dirigir moléculas individuales en la cascada de señalización puede no proporcionar un tratamiento clínico efectivo para la angiogénesis no controlada en enfermedades como el cáncer. Por lo tanto, existe una creciente necesidad de desarrollar terapias innovadoras capaces de unir varios factores angiogénicos clave de manera cooperativa para inhibir efectivamente la angiogénesis y la progresión de la enfermedad.

#### BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

**[0010]** La invención proporcionada en el presente documento describe polipéptidos para unirse específicamente a múltiples objetivos para antagonizar varios factores angiogénicos. La invención también proporciona proteínas de fusión que inhiben una ruta de integrina selectiva y otras rutas angiogénicas. La invención proporciona además composiciones que tienen estas proteínas de fusión. La invención proporciona además composiciones que tienen un vector que comprende un ácido nucleico que codifica las proteínas de fusión. La invención describe además métodos para producir y usar estas proteínas de fusión para el tratamiento o prevención de enfermedades angiogénicas, enfermedades oculares, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades fibróticas y/o cáncer.

**[0011]** De acuerdo con la presente invención, una proteína de fusión que comprende desintegrina, uniéndose a  $\alpha v\beta 3$  o  $\alpha 5\beta 1$  o sus fragmentos de unión a integrina, otros péptidos de unión a proteína que se unen a un factor angiogénico, en donde el factor angiogénico comprende Angiopoyetina (ANG), efrina (Eph), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), neuropilina (NRP), activadores de plasminógeno, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento tumoral beta (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), cadherina endotelial vascular (VE-cadherina), factores de crecimiento epidérmico (EGFs), factores de crecimiento de nervios (NGF), factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factores de crecimiento de hepatocitos/factor de dispersión (HGF/SF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interleucina 17 (IL-17), Interleucina 18 (IL-18), interleucina 20 (IL-20), interleucina 23 (IL-23), quimioatrayentes como el ligando de motivo C-C (CCL28, CCL21), el ligando de motivo C-X-C (CXCL1, CXCL5), inhibidor de la migración de macrófagos Factor (MIF), proteína de la superficie de la célula inmune, como los grupos de diferenciación (CD), y sus receptores.

**[0012]** Según un aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión que comprende un péptido de unión a integrina que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, o secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, otros péptidos de unión a proteínas que comprenden dominios

extracelulares de receptores VEGF y un dominio Fc, en donde el péptido de unión a integrina tiene al menos una mutación en o adyacente a un motivo RGD.

5 **[0013]** Según otro aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión que comprende un péptido de unión a integrina que incluye desintegrina y sus fragmentos de unión a integrina, otro péptido de unión a proteína que comprende dominios extracelulares de receptores VEGF y un dominio Fc, en donde el péptido de unión a integrina comprende al menos una mutación en o adyacente al motivo RGD. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende el péptido de unión a integrina, el dominio Fc y el otro péptido de unión a proteína desde el extremo C al extremo N. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende el péptido de unión a integrina, el dominio Fc y el otro péptido de unión a proteína desde el extremo N al extremo C. En otras realizaciones de la proteína de fusión, el péptido de unión a integrina tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7.

15 **[0014]** De acuerdo con otras realizaciones, la invención también proporciona una proteína de fusión que comprende un péptido de unión a integrina que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con al menos una mutación en o adyacente al motivo RGD, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, una subregión constante humana o humanizada que comprende un dominio CH<sub>2</sub> de inmunoglobulina y un dominio CH<sub>3</sub>, y otro péptido de unión a proteínas que tiene un tipo similar a dominio Ig D2 de un VEGFR1 y un dominio similar a Ig D3 de un VEGFR2. En una realización adicional de la proteína de fusión, el péptido de unión a integrina tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2.

25 **[0015]** De acuerdo con un aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de la invención descrita en el presente documento.

30 **[0016]** De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un dímero de proteínas de fusión de la invención descrita aquí.

35 **[0017]** De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un método para producir una proteína de fusión de la invención, que comprende cultivar una célula huésped transfectada con un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de la invención, en una condición que produce la proteína de fusión y recupera la fusión proteína producida por la célula huésped.

40 **[0018]** De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad angiogénica que comprende administrar una cantidad eficaz de la proteína de fusión a un sujeto que la necesita. En algunas realizaciones, la enfermedad angiogénica comprende artritis reumatoide, artritis inflamatoria, osteoartritis, cáncer ocular y sistémico, metástasis e invasión relacionadas con tumores, enfermedades fibróticas sistémicas que incluyen fibrosis pulmonar idiopática (FPI), esteatohepatitis no alcohólica (NASH) o fibrosis hepática, nefropatía diabética y/o fibrosis renal, fibrosis dérmica o queloide, cicatrización de heridas, cardio-fibrosis y accidente cerebrovascular inducido por isquemia; enfermedad ocular caracterizada por neovascularización o isquemia (como la neovascularización coroidea), uveítis, retinitis pigmentosa, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), retinopatía diabética y edema macular diabético (EMD), oclusión venosa retiniana central y ramificada (CRVO y BRVO), retinopatía humana de prematuridad (ROP), vasculopatía coroidea polipoidal (PCV), adhesión vitreomacular sintomática y glaucoma. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de la invención comprende una secuencia enlazadora entre el péptido de unión a integrina y el otro péptido de unión a proteína. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de la invención comprende la secuencia del péptido señal corriente arriba del otro dominio de unión.

45 **[0019]** De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una proteína de fusión de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 **[0020]** De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido dirigido a múltiples factores angiogénicos que comprende: un péptido de unión a integrina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 7, o secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7; otro péptido de unión a proteínas seleccionado de un grupo que consiste en dominios extracelulares de receptores VEGF, anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo anti-PDGF y sus fragmentos; y un dominio Fc; en donde el péptido de unión a integrina comprende al menos una mutación en o adyacente al motivo RGD.

55 **[0021]** En algunas realizaciones, los dominios extracelulares de los receptores de VEGF en el polipéptido de la invención comprenden los dominios de tipo Ig D1-D7 de los receptores de VEGF. En algunas realizaciones, los dominios extracelulares de los receptores de VEGF en el polipéptido de la invención comprenden: i) el dominio similar a Ig 2 (D2) de un VEGFR1 y un dominio similar a Ig 3 (D3) de un VEGFR2; ii) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; o iii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, los dominios extracelulares de los receptores PDGF en el polipéptido de la invención comprenden los dominios similares a Ig 1-5 de los receptores PDGF. En algunas realizaciones, los dominios

extracelulares de los receptores PDGF en el polipéptido de la invención comprenden: i) los dominios similares a Ig 1-3 de un PDGFRP $\beta$ ; ii) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; o iii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, el polipéptido de la invención comprende además un conector Gly-Ser (GS) o Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (G<sub>9</sub>) entre el dominio Fc y el péptido de unión a integrina o los dominios extracelulares de los receptores VEGF o PDGF.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0022]** Los anteriores y otros objetos, aspectos, características y ventajas de las realizaciones ejemplares se harán más evidentes y pueden entenderse mejor haciendo referencia a la siguiente descripción tomada junto con los dibujos adjuntos.

La Figura 1 es un esquema que ilustra la composición de una proteína de fusión ejemplar de acuerdo con una realización de la invención.

La Figura 2 es un esquema que ilustra la proteína de fusión 1 purificada analizada por SDS-PAGE.

La Figura 3 es un esquema que ilustra un ensayo de unión de ligando de VEGF.

La Figura 4 es un esquema que ilustra un ensayo de unión competitiva  $\alpha v \beta 3$ .

La Figura 5 es un esquema que ilustra la proliferación de HUVEC inducida por VEGF.

La Figura 6 es un esquema que ilustra la inhibición de la adhesión celular CHO- $\alpha v \beta 3$ .

Las Figuras 7A-G es un esquema que ilustra el efecto inhibitorio de la formación de tubos por Proteínas de Fusión.

Las Figuras 8A-D proporcionan una realización que muestra la inhibición de la respuesta a la dosis de la fuga inducida por VEGF en conejos con cinturón holandés por proteínas de fusión.

Las Figuras 9A-C proporcionan una realización que muestra la reducción del tamaño de la lesión en la neovascularización coroidea inducida por láser (CNV) en ratas por Proteínas de Fusión. Una flecha (T) indica la ubicación de la lesión láser.

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

**[0023]** A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por una persona experta en la técnica a la que pertenece esta invención.

**[0024]** Como se usa en este documento, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, p. ej., la referencia a "un dominio de unión" incluye una pluralidad de dominios de unión y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la materia.

**[0025]** Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" y "proteína" se pueden usar indistintamente para referirse a una cadena larga de péptidos que tiene una secuencia de aminoácidos de la proteína nativa o la secuencia de aminoácidos con una o más mutaciones tales como delección, adiciones, y/o sustituciones de uno o más residuos de aminoácidos.

**[0026]** Una "proteína de fusión" se refiere a una proteína que tiene dos o más porciones unidas covalentemente, donde cada una de las porciones se deriva de proteínas diferentes.

**[0027]** La presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende un péptido de unión a integrina seleccionado de un grupo que consiste en desintegrina (véanse las Patentes de los Estados Unidos Núms. 7,943,728 y la Solicitud PCT Núm. PCT/US 15/46322 para la descripción de secuencias de aminoácidos, anticuerpo anti-integrina  $\alpha v \beta 3$  (véanse las Patentes de Estados Unidos N° 6,160,099 y 8,350,010 para la descripción de secuencias de aminoácidos, anticuerpo anti-integrina  $\alpha 5 \beta 1$ , fibronectina (véase la publicación de EE.UU. n° 2015/0218251 para la descripción de secuencias de aminoácidos, isoforma de integrina de focalización  $\alpha v \beta 3$  o  $\alpha 5 \beta 1$  y sus fragmentos de unión a integrina, a otro péptido de unión a proteína dirigido a un factor angiogénico y un dominio Fc, en donde x es 1, 3, 5, 6 u 8.

**[0028]** El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, pretende referirse a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras interconectadas por enlaces disulfuro. Una cadena pesada de longitud completa incluye un dominio de región variable, VH, y tres dominios de región constante, CH1, CH2 y CH3. El dominio VH está en el extremo amino del polipéptido, y el dominio CH3 está en el extremo carboxilo. Una cadena ligera de longitud completa incluye un dominio de región

variable, VL, y un dominio de región constante, CL. Un fragmento de unión a antígeno (Fab) está compuesto por una cadena ligera y el CH1 y regiones variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un fragmento Fab' contiene una cadena ligera y una cadena pesada que contiene más de la región constante, entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se puede formar un enlace disulfuro entre cadenas entre dos cadenas pesadas para formar diacuerpos. Una región de fragmento variable (Fv) comprende las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, pero carece de las regiones constantes. Los fragmentos de cadena única (scFv) son moléculas Fv en las que las regiones variables de la cadena pesada y ligera se han conectado mediante un conector flexible para formar una cadena de polipéptidos única que forma una región de unión a antígeno. Los anticuerpos de cadena sencilla se discuten en detalle en WO88/01649 y la patente de EE.UU. N<sup>os</sup> 4,946,778 y 5,260,203. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye una molécula de inmunoglobulina con dos cadenas L de longitud completa y dos cadenas H de longitud completa, y fragmentos de las mismas, tales como un fragmento de unión a antígeno (Fab), una región Fv, un scFv, etc.

**[0029]** El término "dominio Fc" se refiere a una molécula o secuencia que comprende la secuencia de una porción de un anticuerpo que no se une al antígeno, ya sea en forma monomérica o multimérica. La fuente de inmunoglobulina original de un Fc es preferiblemente de origen humano y puede ser de cualquier isotipo, p. ej., IgG, IgA, IgM, IgE o IgD. Un Fc de longitud completa consta de las siguientes regiones de cadena pesada de Ig: CH1, CH2 y CH3, en donde las regiones CH1 y CH<sub>2</sub> están típicamente conectadas por una región de bisagra flexible.

**[0030]** La presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende un péptido de unión a integrina que incluye desintegrina y sus fragmentos de unión a integrina, otro péptido de unión a proteína que comprende dominios extracelulares del receptor VEGF y un dominio Fc, en donde el péptido de unión a integrina comprende al menos una mutación en o adyacente al motivo RGD. De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, la desintegrina y sus fragmentos de unión a integrina tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, o secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.

**[0031]** Como se usa en este documento, "desintegrina" se refiere a una clase de proteínas o polipéptidos ricos en cisteína que son potentes ligandos solubles de integrinas. El motivo RGD es un tri-péptido (Arg-Gly-Asp) conservado en la mayoría de las desintegrinas monoméricas y está ubicado en un bucle de unión a integrina. Las desintegrinas descritas en el presente documento están aisladas del veneno de serpiente o derivadas de formas de tipo salvaje y tienen al menos una mutación en o adyacente a un motivo RGD para unirse selectivamente o dirigirse a diversas isoformas de integrina. El término "adyacente a un motivo RGD" como se usa en el presente documento significa cualquier mutación que ocurre en cualquier residuo de aminoácido dentro de 15-20 aminoácidos del motivo RGD en una secuencia de péptido o polipéptido dada.

**[0032]** También se contemplan otras variantes de secuencia de aminoácidos de la desintegrina. Por ejemplo, la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de una desintegrina pueden mejorarse alterando la secuencia de aminoácidos que codifica la proteína. Los mutantes de desintegrina pueden prepararse introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o introduciendo modificación por síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen mutaciones tales como deleciones, inserciones y/o sustituciones dentro de la secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de la desintegrina. Se puede hacer una combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar al constructo de aminoácidos final de la desintegrina, siempre que el constructo final posea las características deseadas tales como la unión a un miembro de la superfamilia de integrina y/o inhibir la ruta activada por integrina.

**[0033]** Modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas de las proteínas o los polipéptidos se logran seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, p. ej., como una lámina o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral.

**[0034]** Un método útil para identificar ciertos residuos o regiones de la proteína de fusión que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis se conoce como "mutagénesis de exploración de alanina" como se describe en Science, 1989, 244: 1081-1085. Por ejemplo, se identifica un residuo o grupo de residuos diana (p. ej., residuos cargados como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (lo más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el compañero de unión diana. Esas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones luego se refinan mediante la introducción de otras variantes u otras en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación per se no tiene que estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se puede realizar mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las variantes de polipéptidos de fusión expresadas se seleccionan para la actividad deseada. Por ejemplo, se pueden agregar enlace(s) de cisteína a la proteína de fusión o componentes de proteína para mejorar su estabilidad.

**[0035]** Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan mutantes de desintegrina que pueden ser un componente de cualquier proteína de fusión descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la desintegrina comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de desintegrinas seleccionadas de un grupo que consiste en Rodostomina (SEQ ID NO: 1), Triflavina (SEQ ID NO: 3), Equistatina (SEQ ID NO: 4), Trimucrina (SEQ ID NO: 5), Elegantina (SEQ ID NO: 6) y Trigramina (SEQ ID NO: 7). En algunas realizaciones, una desintegrina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una mutación en o adyacente al motivo RGD de Rodostomina (SEQ ID NO: 1), Triflavina (SEQ ID NO: 3), Equistatina (SEQ ID NO: 4), Trimucrina (SEQ ID NO: 5), Elegantina (SEQ ID NO: 6) o Trigramina (SEQ ID NO: 7). En algunas realizaciones, la desintegrina comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un mutante de desintegrina (SEQ ID NO: 2). El Xaa en SEQ ID NO: 2 indica varias posiciones que pueden modificarse mediante inserción, sustitución o delección para producir variantes de secuencia de aminoácidos que son diferentes de la forma de desintegrina de tipo salvaje. De acuerdo con algunos ejemplos, el Xaa en la posición 50 de la SEQ ID NO: 2 que corresponde a la glicina (Gly) en el motivo RGD de Rodostomina de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) puede sustituirse con aminoácidos naturales distintos de la glicina para generar mutantes Rodostomina. En otros ejemplos, uno o más Xaa en la SEQ ID NO: 2 también pueden sustituirse con aminoácidos naturales distintos de los encontrados originalmente en las posiciones correspondientes de Rodostomina de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) para generar diversos mutantes de Rodostomina. Se observa además que los mutantes de desintegrina no se limitan a incluir solo una mutación única en cualquier Xaa en SEQ ID NO: 2, mutaciones múltiples que ocurren en varias ubicaciones de Xaa en SEQ ID NO: 2 o ubicaciones correspondientes en otras secuencias consenso de desintegrina (tal como SEQ ID NOs: 3-7) también pueden estar abarcadas por el alcance de la invención.

**[0036]** Aunque las variantes de desintegrinas se discuten principalmente con referencia a las secuencias de aminoácidos discutidas anteriormente, las secuencias de polipéptidos o la secuencia de nucleótidos que codifican el veneno de serpiente como Albolabrina, Aplagina, Basilicina, Batroxostatina, Bitistatina, Cereberina, Cerastina, Crotatroxina, Durisina, Flavoridina, Flavostatina, Halisina, Halistatina, Jararacina, Jarastatina, Kistrina, Laquesina, Lutosina, Molosina, Salmosina, Saxatilina, Tergeminina, Trimestatino, Trimutasa, Usuristatino, Viridiano y sus mutantes que tienen al menos una mutación o adyacente al motivo RGD también pueden estar abarcados por el alcance de la presente invención.

**[0037]** Sin limitarse a la teoría, se contempla en este documento que las desintegrinas inhiben la ruta activada por la integrina uniéndose a un miembro de la superfamilia de integrina para bloquear su interacción con un receptor de integrina multivalente. En algunos aspectos, la desintegrina se une a un miembro de la superfamilia de integrina que incluye pero no se limita a las isoformas de integrina  $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta\delta$ ,  $\alpha 5\beta 1$  y/o  $\alpha\text{v}\text{IIb}\beta 3$ .

**[0038]** Según la presente invención, el otro péptido de unión a proteínas de la proteína de fusión puede ser una proteína receptora que se une a una diana seleccionada del grupo que consiste en un antígeno tumoral, un miembro de la superfamilia del receptor de TNF, un miembro de la familia Hedgehog, un receptor de tirosina quinasa, una molécula relacionada con proteoglicanos, un miembro de la superfamilia TGF-beta, una molécula relacionada con Wnt y una diana de angiogénesis.

**[0039]** De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el otro péptido de unión a proteínas puede unirse específicamente a un diana de angiogénesis que incluye, pero sin limitación, angiopoyetina (ANG), efrina (Eph), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), neuropilina (NRP), activadores de plasminógeno, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento tumoral beta (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), cadherina endotelial vascular (VE-cadherina) y sus receptores. Por lo tanto, de acuerdo con las realizaciones de la invención, el otro péptido de unión a proteínas puede incluir porciones extracelulares de una proteína receptora que se une y antagoniza la diana de angiogénesis. En otras realizaciones, el otro péptido de unión a proteínas puede unirse a porciones extracelulares de receptores de factor angiogénico.

**[0040]** En algunas realizaciones, el otro péptido de unión a proteínas puede ser un anticuerpo anti-VEGF (véase el documento WO2015/200905 para la descripción de su secuencia de aminoácidos, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad) que se une al ligando de VEGF o un anticuerpo anti-VEGFR1 o anti-VEGFR2 (véase la Pat. de EE.UU. N° 5,874,542 para la descripción de su secuencia de aminoácidos, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad) que se une al receptor VEGF. En otras realizaciones, el otro péptido de unión a proteínas también puede ser un anticuerpo anti-PDGF (véase la Patente de Estados Unidos N° 5,094,941 para la descripción de su secuencia de aminoácidos, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad) que se une al ligando PDGF o un anticuerpo beta anti-PDGF (véase la Patente de Estados Unidos N° 9,265,827 para la descripción de su secuencia de aminoácidos, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad para todos los fines) que se une al receptor PDGF.

**[0041]** En ciertas realizaciones, el otro péptido de unión a proteínas se une al mismo VEGF como cualquiera de los receptores de VEGF (VEGFR): VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3. En algunas realizaciones, el otro péptido de unión a proteínas comprende al menos una porción extracelular de un VEGFR de cualquiera de los VEGFR descritos en este documento. Por ejemplo, el otro péptido de unión a proteínas comprende al menos una porción extracelular de

VEGFR1 o una porción extracelular de VEGFR2. En otro ejemplo, el otro péptido de unión a proteínas comprende una porción extracelular de VEGFR1 tal como el dominio 2 similar a Ig (D2) y una porción extracelular de VEGFR2 tal como el dominio 3 similar a Ig (D3). En algún aspecto, el otro péptido de unión a proteínas comprende una porción extracelular de un VEGFR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una porción extracelular de un VEGFR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algún aspecto, el otro péptido de unión a proteínas comprende una fusión de porciones extracelulares de VEGFR1 y VEGFR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos con al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10.

**[0042]** En otras realizaciones, el otro péptido de unión a proteínas se une al mismo PDGF que cualquiera de los receptores de PDGF (PDGFR): PDGFR- $\alpha$  y PDGFR- $\beta$ . En algunas realizaciones, el otro péptido de unión a proteínas comprende al menos una porción extracelular de un PDGFR de cualquiera de los PDGFR descritos en este documento. Por ejemplo, el otro péptido de unión a proteínas comprende al menos una porción extracelular de PDGFR- $\alpha$  o una porción extracelular de PDGFR- $\beta$ . En otro ejemplo, el otro péptido de unión a proteínas comprende una porción extracelular de PDGFR- $\beta$  tal como el dominio similar a Ig 1 - 3. En algún aspecto, el otro péptido de unión a proteínas comprende una porción extracelular de un PDGFR que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos con al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11.

**[0043]** De acuerdo con otras realizaciones, la invención también proporciona una proteína de fusión que comprende un péptido de unión a integrina que incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con al menos una mutación en o adyacente al motivo RGD, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, una subregión constante humana o humanizada que comprende un dominio CH<sub>2</sub> de inmunoglobulina y un dominio CH<sub>3</sub>, y otro péptido de unión a proteínas que tiene un tipo similar a Ig D2 de un VEGFR1 y un D3 similar a Ig de un VEGFR2. En una realización adicional de la proteína de fusión, el péptido de unión a integrina tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2.

**[0044]** El término "porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a un polipéptido de referencia o secuencia de ácido nucleico se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos o nucleótidos en el polipéptido de referencia o secuencia de ácido nucleico, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos se puede lograr de varias maneras que están dentro de la habilidad en la técnica, p. ej., utilizando programas de computadora disponibles al público, p. ej., como los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., Eds., 1987), e incluyen el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la máxima alineación en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Para los fines del presente documento, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada se calcula de la siguiente manera: 100 veces la fracción X/Y, donde X es el número de puntuación de residuos de aminoácidos como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencia en la alineación de ese programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A.

**[0045]** La presente invención proporciona una proteína de fusión dimérica que comprende dos proteínas de fusión, en donde cada proteína de fusión comprende cualquier proteína de fusión descrita aquí. En una realización, la proteína de fusión dimérica comprende dos proteínas de fusión idénticas. En otra realización, la proteína de fusión dimérica puede comprender dos proteínas de fusión diferentes. Las proteínas de fusión descritas en el presente documento pueden formar multímeros de dos o más proteínas de fusión idénticas o formar proteínas de fusión heterólogas a través de un dominio de multimerización que incluye una subregión constante de un anticuerpo humano o humanizado. En algunas realizaciones, la subregión constante de un anticuerpo humano o humanizado se selecciona del grupo que consiste en una región IgG Fc, región IgA Fc, región IgM Fc, región IgD Fc y región IgE Fc. En la realización adicional, la subregión constante de un anticuerpo humano o humanizado se selecciona del grupo que consiste en una región IgG1 Fc, región IgG2 Fc, región IgG3 Fc y región IgG4 Fc. En algún aspecto, la subregión comprende una región CH<sub>2</sub> y una región CH<sub>3</sub> de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Las secuencias de aminoácidos que codifican las inmunoglobulinas que comprenden regiones Fc son bien conocidas en la técnica.

**[0046]** Los componentes de la proteína de fusión se pueden conectar directamente entre sí o mediante conectores. Generalmente, el término "enlazador" significa una o más moléculas, p. ej., ácidos nucleicos, aminoácidos o restos no peptídicos que pueden insertarse entre uno o más dominios componentes. Por ejemplo, los enlazadores pueden usarse para proporcionar un sitio de interés deseable entre los componentes para facilitar la manipulación. También se puede proporcionar un conector para mejorar la expresión de la proteína de fusión de una célula huésped, para disminuir el impedimento estérico de manera que el componente pueda asumir su estructura terciaria óptima y/o



interactuar apropiadamente con su molécula diana. Una secuencia enlazadora puede incluir uno o más aminoácidos conectados naturalmente a un componente receptor, o puede ser una secuencia añadida utilizada para mejorar la expresión de la proteína de fusión, para proporcionar sitios de interés específicamente deseados, para permitir que los dominios componentes formen estructuras terciarias óptimas y/o para mejorar la interacción de un componente con su molécula diana.

**[0047]** Preferiblemente, el conector aumenta la flexibilidad de los componentes de la proteína de fusión sin interferir con la estructura de cada componente funcional dentro de la proteína de fusión. En algunas realizaciones, el resto conector es un conector peptídico con una longitud de 2 a 100 aminoácidos. Los enlazadores ejemplares incluyen péptidos lineales que tienen al menos dos residuos de aminoácidos tales como el enlazador Gly-Gly, Gly-Ala-Gly, Gly-Pro-Ala, Gly (G)<sub>n</sub> y Gly-Ser (GS). El enlazador GS descrito en este documento incluye, entre otros, (GS)<sub>n</sub>, (GSGSG)<sub>n</sub>, (G<sub>2</sub>S)<sub>n</sub>, G<sub>2</sub>S<sub>2</sub>G, (G<sub>2</sub>SG)<sub>n</sub>, (G<sub>3</sub>S)<sub>n</sub>, (G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>, (GGSGG)<sub>n</sub>Gn y GSG<sub>4</sub>SG<sub>4</sub>SG, en donde n es 1 o más. Un ejemplo del enlazador (G)<sub>n</sub> incluye un enlazador G<sub>9</sub>. Los péptidos lineales adecuados incluyen poliglicina, poliserina, poliprolina, polialanina y oligopéptidos que consisten en residuos de aminoácidos alanilo y/o serinilo y/o prolinilo y/o glicililo. Los restos enlazadores pueden usarse para unir cualquiera de los componentes de las proteínas de fusión descritas en este documento. En algunas realizaciones, se usa un conector entre una porción extracelular de una proteína receptora y una subregión constante de una inmunoglobulina. En otras realizaciones, se usa un conector entre desintegrina o su variante y una subregión constante de una inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, la proteína de fusión comprende un conector entre una porción extracelular de una proteína receptora y desintegrina o su variante, y un conector entre desintegrina o su variante y una subregión constante de una inmunoglobulina. Como se realiza en la presente invención, una proteína de fusión puede comprender al menos un enlazador pero no más de cuatro enlazadores.

**[0048]** La proteína de fusión descrita en el presente documento puede o no comprender un péptido señal que funciona para secretar la proteína de fusión de una célula huésped. Una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido señal puede unirse operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende un péptido señal. En alguna realización, la proteína de fusión no comprende un péptido señal.

**[0049]** Además, las proteínas de fusión descritas en la presente invención pueden comprender formas modificadas de los péptidos de unión a proteínas. Por ejemplo, los componentes de proteína de fusión pueden tener modificaciones posteriores a la traducción, que incluyen, por ejemplo, glucosilación, sialilación, acetilación y fosforilación a cualquiera de los péptidos de unión a proteínas.

**[0050]** Aunque las realizaciones se describen generalmente con referencia a dos péptidos de unión a proteínas incluidos en la proteína de fusión, la invención también contempla una proteína de fusión que incorpora más de dos péptidos de unión a proteínas para proporcionar cualquier efecto adicional o sinérgico en términos de inhibición del proceso de angiogénesis. Por ejemplo, puede haber un péptido de unión a proteínas adicional que se una a otras dianas de angiogénesis o que actúe como antagonistas del factor angiogénico para unirse a los dos péptidos de unión a proteínas existentes.

**[0051]** La presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de la invención descrita aquí. La invención proporciona además un método para producir una proteína de fusión descrita aquí. El método implica cultivar una célula huésped transfectada con un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de la invención y recuperar la proteína de fusión producida por la célula huésped en condiciones adecuadas.

**[0052]** El término "polinucleótido" o "ácido nucleico" como se usa en el presente documento se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por lo tanto, este término incluye, entre otros, ADN o ARN monocatenario, bicatenario o multcatenario, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina o pirimidina u otras bases de nucleótidos naturales, modificadas químicamente o bioquímicamente, no naturales o derivatizadas.

**[0053]** Las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una proteína de fusión o un componente de una proteína de fusión pueden estar en forma de ARN, como ARNm, ARNhn, ARNt o cualquier otra forma, o en forma de ADN, que incluye, entre otros, ADNc y ADN genómico obtenido por clonación o producido sintéticamente, o cualquier combinación de los mismos. El ADN puede ser de triple cadena, de doble cadena o de cadena sencilla, o cualquier combinación de los mismos. Cualquier porción de al menos una cadena del ADN o ARN puede ser la cadena codificante, conocida como la cadena sentido, o puede ser la cadena no codificante, también conocida como la cadena antisentido. Los ácidos nucleicos aislados que codifican una proteína de fusión o un componente de proteína de fusión pueden prepararse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos y mutagénesis en casete de una variante anterior preparada o una versión no variante de la proteína de fusión o componente de proteína de fusión. Ver *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook et al., 4<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor, N.Y. 2012) y *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds., 2003).

**[0054]** Un "vector" se refiere a un plásmido recombinante que comprende un ácido nucleico para ser entregado en una célula huésped, in vitro o in vivo.

**[0055]** La presente invención contempla el uso de un vehículo de suministro de ácido nucleico para la introducción de una o más secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de fusión o un componente de proteína de fusión en una célula para la expresión de dicha proteína. Ejemplos de vehículos de suministro de ácido nucleico son liposomas, polímeros biocompatibles, que incluyen polímeros naturales y polímeros sintéticos; lipoproteínas; polipéptidos; polisacáridos; lipopolisacáridos; sobres virales artificiales; partículas de metal; y bacterias, virus, tales como baculovirus, adenovirus y retrovirus, bacteriófagos, cósmidos, plásmidos, vectores fúngicos y otros vehículos recombinantes típicamente utilizados en la técnica que se han descrito en una variedad de huéspedes eucariotas y procariotas. En algunas realizaciones, el vehículo de suministro de ácido nucleico es un vector de expresión tal como un plásmido. El vector puede incluir cualquier elemento para establecer una función convencional de un vector de expresión (p. ej., un promotor, elemento de unión al ribosoma, terminador, potenciador, marcador de selección) y un origen de replicación. El promotor puede ser un promotor constitutivo, inducible o represible. En la técnica se conocen varios vectores de expresión capaces de suministrar ácidos nucleicos a una célula y pueden usarse en la presente memoria para la producción de una proteína de fusión o componente de proteína de fusión en la célula. Las proteínas de fusión expresadas o los componentes de proteínas de fusión se pueden cosechar de las células y purificar de acuerdo con técnicas convencionales conocidas en la técnica y como se describe en el presente documento.

**[0056]** En el presente documento se proporcionan células huésped que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión descrita en el presente documento. Los ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión o componentes de proteínas de fusión (p. ej., una porción extracelular de un receptor de factor angiogénico, una desintegrina o su variante y/o una subregión constante de una inmunoglobulina) pueden proporcionarse a una célula diana por cualquier medio conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica una proteína de interés está en un vector de expresión tal como un plásmido. En otras realizaciones, el ácido nucleico que codifica una proteína de interés está en un vector viral y el vector ha sido empaquetado, entonces los viriones pueden usarse para infectar células. Se sabe que los procedimientos de transfección y transformación se usan apropiadamente para introducir un ácido nucleico que codifica una proteína de interés en una célula diana. Las formulaciones que utilizan polímeros, liposomas o nanoesferas se pueden usar para administrar ácidos nucleicos que codifican una proteína de interés. Las células que se transforman o transfectan con construcciones recombinantes de acuerdo con la invención pueden ser cualquiera que sea conveniente para un experto en la técnica. Los tipos de células ejemplares que pueden usarse incluyen células de bacterias, levaduras, hongos, insectos, plantas y mamíferos. En algunas realizaciones, las células transformadas o transfectadas pueden proporcionarse a una célula o huésped de mamífero. Las células adecuadas para el suministro a una célula o huésped de mamífero incluyen cualquier tipo de célula de mamífero de cualquier origen, tumor o línea celular.

**[0057]** Las células utilizadas para producir las proteínas de fusión o los componentes de la proteína de fusión de la invención se cultivan en medios conocidos por los expertos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Un medio dado generalmente se complementa, según sea necesario, con hormonas y/u otros factores de crecimiento, DHFR, sales, tampones, nucleósidos, antibióticos, oligoelementos y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario también puede incluirse en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las que se usaron previamente con la célula seleccionada para la expresión, y serán evidentes para un experto en la materia.

**[0058]** Las proteínas pueden purificarse e identificarse usando métodos comúnmente conocidos tales como fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico; precipitación de etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatofocalización; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, p. ej., Sephadex G-75; resinas de afinidad hidrofóbica, afinidad de ligando usando un compañero de unión adecuado inmovilizado en una matriz, centrifugación, ensayo de inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), BIAcore, ensayo de transferencia Western, secuenciación de aminoácidos y ácidos nucleicos, y actividad biológica. En algunas realizaciones, la proteína de fusión se expresa en células huésped y se purifica a partir de la misma usando una combinación de una o más técnicas de purificación estándar, que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de afinidad de proteína A, cromatografía de afinidad de proteína G, intercambio de tampón, cromatografía de exclusión molecular, ultrafiltración y diálisis. En consecuencia, la proteína de fusión recuperada es sustancialmente pura. En una realización adicional, la proteína de fusión recuperada es al menos cualquiera de 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% puro.

**[0059]** Las proteínas de fusión o los componentes de la proteína de fusión descritos en este documento pueden caracterizarse o evaluarse para actividades biológicas que incluyen, pero no se limitan a, afinidad con un compañero de unión a la diana, unión competitiva, actividad inhibitoria, inhibición de la proliferación celular, inhibición del crecimiento tumoral e inhibición de angiogénesis. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión o los componentes de la proteína de fusión descritos aquí pueden evaluarse para determinar la actividad biológica in vitro e in vivo. En la técnica se conocen muchos métodos para evaluar la afinidad de unión y se pueden usar para identificar las afinidades de unión de las proteínas de fusión o los componentes de la proteína de fusión a un compañero de unión. Las

afinidades de unión se pueden expresar como valores de constante de disociación (Kd) o valores de concentración efectiva media máxima (CE<sub>50</sub>).

**[0060]** En cualquiera de las realizaciones de la presente memoria, una proteína de fusión tiene una CE<sub>50</sub> menor o igual a 1  $\mu$ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM o 0,001 nM para la inhibición de una actividad (p. ej., inhibición de actividad del factor angiogénico y/o actividad de la integrina). En cualquiera de las realizaciones de la presente memoria, una proteína de fusión tiene una Kd para un compañero de unión (factor angiogénico y/o integrina) de menos de aproximadamente 1,0 mM, 500  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, 50 pM, 10 pM o 5 pM, incluidos los valores entre estos números.

**[0061]** La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión que comprende un péptido de unión a integrina seleccionado de un grupo que consiste en desintegrina, anticuerpo anti-integrina  $\alpha$ v $\beta$ x, anticuerpo anti-integrina  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, integrina dirigida a fibronectina  $\alpha$ v $\beta$ x o  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 y sus fragmentos de unión a integrina, otro péptido de unión a proteína dirigido a un factor angiogénico y un dominio Fc, en donde x es 1, 3, 5, 6 u 8. Las composiciones de la invención comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de fusión.

**[0062]** El término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad de un compuesto terapéuticamente activo necesaria para provocar el efecto biológico o clínico deseado. De acuerdo con las realizaciones de la invención, "una cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Se puede administrar una cantidad terapéuticamente efectiva en una o más administraciones. En términos de un estado de enfermedad, una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad suficiente para mejorar, estabilizar o retrasar el desarrollo de una enfermedad. De acuerdo con realizaciones específicas de la invención, una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad de una proteína de fusión necesaria para tratar o prevenir un trastorno caracterizado por angiogénesis anormal, tal como una enfermedad caracterizada por neovascularización, permeabilidad vascular, edema, inflamación, retinopatías, fibrosis o cáncer.

**[0063]** En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión comprende una proteína de fusión formulada en un tampón a una concentración de proteína de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 40 a aproximadamente 80 mg/ml, tal como aproximadamente 40, 50, 60, 70 u 80 mg/ml, lo más preferiblemente aproximadamente 40  $\pm$  aproximadamente 5 mg/ml. En otras realizaciones preferidas, la proteína de fusión se formula en un tampón a una concentración de proteína de más de aproximadamente 40 mg/ml.

**[0064]** En realizaciones particulares, el tampón es un tampón fosfato con un pH de aproximadamente 6,5 a 8, más preferiblemente de aproximadamente 7 a 7,5, incluso más preferiblemente de aproximadamente 7,2. El tampón fosfato comprende aproximadamente 5 a 20 mM de fosfato de sodio, tal como 5, 10, 15 o 20 mM de fosfato de sodio, más preferiblemente aproximadamente 10 mM de fosfato de sodio; aproximadamente 20 a 60 mM de cloruro de sodio, más preferiblemente aproximadamente 40 mM de cloruro de sodio; aproximadamente 1 a 10% en peso por volumen (p/v) de sacarosa, más preferiblemente aproximadamente 5% p/v de sacarosa; y aproximadamente 0,01 a 0,05% p/v de un tensioactivo, más preferiblemente aproximadamente 0,03% p/v de polisorbato 20.

**[0065]** En otras realizaciones particulares, el tampón es un tampón de histidina con un pH de aproximadamente 5 a 8, más preferiblemente aproximadamente 6 a 7, lo más preferiblemente aproximadamente 6,8. El tampón de histidina comprende histidina de aproximadamente 10 a 50 mM, tal como histidina 10, 20, 30, 40 o 50 mM, más preferiblemente histidina aproximadamente 25 mM; aproximadamente 10 a 30 mM de cloruro de sodio, tal como 10, 20 o 30 mM de cloruro de sodio, más preferiblemente aproximadamente 20 mM de cloruro de sodio; aproximadamente 1 a 10% p/v de sacarosa, tal como 1, 2, 4, 6, 8 o 10% p/v de sacarosa, más preferiblemente aproximadamente 6% p/v de sacarosa; y aproximadamente 0,01 a 0,05% p/v de un tensioactivo, más preferiblemente aproximadamente 0,03% p/v de polisorbato 20.

**[0066]** La presente invención también se refiere a un uso de la composición según la presente invención para tratar o prevenir una enfermedad asociada a la integrina en un individuo o un sujeto. Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, entre otros, animales domesticados (p. ej., vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (p. ej., primates humanos y no humanos como monos), conejos y roedores (p. ej., ratones y ratas). En algunas realizaciones, un método para tratar o prevenir uno o más aspectos o síntomas de una enfermedad comprende administrar una cantidad efectiva de una composición que comprende la proteína de fusión a un individuo.

**[0067]** Los métodos descritos en este documento pueden usarse para el tratamiento de una variedad de enfermedades, que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad inflamatoria, enfermedad ocular, enfermedad autoinmune o cáncer. En algunas realizaciones, la enfermedad a tratar incluye, pero no se limita a, artritis reumatoide, artritis inflamatoria, osteoartritis, cáncer, fibrosis, retinitis pigmentosa, uveítis (como uveítis anterior o posterior y enfermedad ocular caracterizada por neovascularización o isquemia (como la neovascularización coroidea, retinopatía diabética, edema macular diabético, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), oclusión venosa retiniana, vascularización coroidea polipoidal).

[0068] Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un individuo por cualquier vía, que incluye, pero no se limita a, intravenosa, intraperitoneal, ocular, intraarterial, intrapulmonar, oral, inhalación, intravesicular, intramuscular, intratraqueal, subcutánea, intratecal, transdérmica, transpleural, intraarterial, tópica, inhalatoria, mucosa, subcutánea, transdérmica, gastrointestinal, intraarticular, intracisternal, intraventricular, intracraneal, intrauretral, intrahepática e intratumoral. En algunas realizaciones, las composiciones se administran sistémicamente (p. ej., por inyección intravenosa). En algunas realizaciones, las composiciones se administran localmente (p. ej., por inyección intraarterial o intraocular).

[0069] En algunas realizaciones, las composiciones se administran directamente al ojo o al tejido ocular. En algunas realizaciones, las composiciones se administran tópicamente al ojo, p. ej., en gotas para los ojos. En algunas realizaciones, las composiciones se administran mediante inyección al ojo (inyección intraocular) o a los tejidos asociados con el ojo. Las composiciones pueden administrarse, p. ej., mediante inyección intraocular, inyección periocular, inyección subretiniana, inyección intravítrea, inyección supercoroidal, inyección trans-septal, inyección subescleral, inyección intracoroidal, inyección intracameral, inyección subconjuntival, inyección sub-tenon, inyección retrobulbar, inyección peribulbar o entrega yuxtapalpebral posterior. Estos métodos son conocidos en la técnica. Las composiciones pueden administrarse, p. ej., en el humor vítreo, acuoso, esclera, conjuntiva, el área entre la esclerótica y la conjuntiva, los tejidos de la retina coroides, la mácula u otra área en el ojo de un individuo o cerca de él.

[0070] La cantidad efectiva óptima de las composiciones puede determinarse empíricamente y dependerá del tipo y la gravedad de la enfermedad, la vía de administración, la progresión de la enfermedad y la salud, la masa y el área corporal del individuo. Dichas determinaciones están dentro de la habilidad de alguien en la técnica. Las composiciones que comprenden una proteína de fusión también se pueden administrar seis veces a la semana, cinco veces a la semana, cuatro veces a la semana, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada seis meses, una vez cada nueve meses o una vez al año.

[0071] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento se puede usar en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen ahora.

[0072] La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos, que se proporcionan con fines de demostración en lugar de limitación.

### **Ejemplo 1: Producción de proteínas mutantes de rodostomina**

#### Método de expresión de desintegrina

[0073] Se usaron técnicas de reacción en cadena de la polimerasa de extensión solapada (PCR) para crear construcciones mutantes de Rodostomina (Rho). El kit de expresión y el vector de transferencia de levadura, pPICZaA, se compraron de Invitrogen. Las construcciones mutantes genéticas se crearon amplificando por PCR la secuencia del gen usando un cebador sentido que contiene una secuencia complementaria al mutante del gen más un sitio de reconocimiento EcoR1 y seis residuos de histidina para facilitar la purificación, y el cebador antisentido diseñado para contener un sitio de reconocimiento Sac II y TTA para el codón. El producto de PCR se purificó y luego se clonó en los sitios EcoR1 y Sac II del vector de recombinación de levadura, pPICZaA. El plásmido recombinante se transformó en la célula DH5a competente de E. coli, y las colonias se seleccionaron por placa de agar con caldo Luria bajo en sal (LB, 1% de triptona, 0,5% de extracto de levadura, 0,5% de NaCl y 1,5% de agar a pH 7,0) y 25 µg/ml del antibiótico Zeocin. Se seleccionó una única colonia para amplificar el plásmido para la secuenciación. Después de que los clones habían sido confirmados por secuenciación de ADN, se prepararon 10 µg del plásmido y luego se linealizaron mediante digestión con la enzima SacI. La construcción linealizada se transformó en la cepa Pichia X33 usando un kit (Pichia EasyComp; Invitrogen), y las colonias se seleccionaron por placa de agar usando YPDS (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de glucosa, 2% de agar y 1 M Sorbitol) y 100 µg/ml de zeocina. El análisis de PCR se utilizó para analizar los integrantes de Pichia para determinar si el gen se había integrado en el genoma de Pichia. De una serie de clones con múltiples copias de inserción de genes, se eligieron los clones con la expresión de proteína más alta.

#### Método de purificación de desintegrina

[0074] Los mutantes Rho se produjeron de la siguiente manera: 100 µl de stock de células se cultivaron a 30°C durante 48 horas en 200 ml de medio de extracto de levadura dextrosa de peptona (YPD) (1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de dextrosa) y 100 µg/ml de zeocina. Las células se transfirieron luego a 800 ml de medio YPD. Después de otras 48 horas, las células se recogieron por centrifugación y se cultivaron en 1 L de medio mínimo de metanol (1,34% de base de nitrógeno de levadura (YNB) con sulfato de amonio sin aminoácidos, 4x10<sup>-5</sup>% de biotina y 1% de metanol). Una vez cada 24 horas, se añadió metanol al 1% para inducir la expresión de proteínas durante 2 días. El sobrenadante se recogió después de la centrifugación y se dializó dos veces contra 5 L de H<sub>2</sub>O y una vez contra 5 L de 20 mM Tris-HCl y NaCl 200 mM a pH 8. La solución final se carga en una columna quelante de níquel y se eluyó con un gradiente de 200 mM de imidazol. Las proteínas Rho recombinantes producidas en P. pastoris se purificaron

adicionalmente por HPLC C18 de fase inversa con un gradiente de acetonitrilo del 15% al 18%. Un análisis de tricina-SDS-PAGE confirmó que la purificación de las proteínas fue superior al 95%.

### Ejemplo 2: Generación de proteínas de fusión mutantes VEGFR/Rho

[0075] El dominio extracelular D2 del receptor Flt-1 (VEGFR1) de SEQ ID NO: 8 y el dominio extracelular D3 del receptor Flt-1 (VEGFR2) de SEQ ID NO: 9, conocido colectivamente como trampa de VEGF, proporcionaron el componente de proteína para unirse al ligando VEGF. Para unirse tanto al ligando de VEGF como a las integrinas, se generaron proteínas de fusión que comprenden VEGFR1 D2/VEGFR2 D3 de SEQ ID NO: 10 y el mutante Rho de SEQ ID NO: 13.

[0076] Se usó una trampa VEGF previamente generada unida a los dominios de inmunoglobulina humana G1 CH2 y CH3 (IgG1 Fc) para generar construcciones de ADN que codifican el híbrido mutante VEGFR1 D2/VEGFR2 D3-Rho. Ver Holash, J., et al., PNAS, 2002, 99 (17): 11393-11398 para una descripción de la trampa VEGF que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Se construyó una proteína de fusión de SEQ ID NO: 16 uniendo VEGFR1 D2/VEGFR2 D3 de SEQ ID NO: 10 y el mutante Rho de SEQ ID NO: 13 a través de al menos un conector peptídico de Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (G<sub>4</sub>S).

[0077] De forma similar, las proteínas de fusión 2 y 3 de SEQ ID NO: 15 y 17 también se generaron fusionando mutantes Rho de SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14 respectivamente con el VEGFR1 D2/VEGFR2 D3 de SEQ ID NO: 10. Proteína de fusión 4 de la SEQ ID NO: 18 se generó mediante la fusión de una Trampa de VEGF disponible comercialmente, aflibercept (Eylea<sup>®</sup>, Regeneron) y el mutante Rho de SEQ ID NO: 13. La Figura 1 proporciona un esquema que muestra la estructura de una proteína de fusión de acuerdo con una realización de la invención. SS es una secuencia de péptido señal de SEQ ID NO: 20 que ayuda a la secreción de proteínas de la célula CHO. La trampa de VEGF está formada por los dominios extracelulares de tipo Ig 2 y 3 de VEGFR1 y VEGFR2 humanos. Un fragmento Fc es la región CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> de IgG1 humano. Un GS es un enlazador. Los mutantes Rho se han descrito en la patente de EE.UU. N<sup>os</sup> 7,943,728 y la Solicitud PCT N<sup>o</sup> PCT/US 15/46322.

[0078] Para generar Proteína de Fusión 1, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, la secuencia de ADN que codifica Proteína de Fusión 1 se optimizó con codón para la expresión en células CHO. El ADN sintetizado con codón optimizado, con una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 19, junto con el péptido señal que tiene una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 21 se clonó en un vector de expresión. Las células huésped CHO K1 se sembraron a 2 x 10<sup>5</sup> células/ml en CD CHO (Gibco 12490-003) que contenía glutamina 4 mM (JT Baker 2078-06) y suplemento de HT al 1% (Gibco 1 1067-030) 72 horas antes de la transfección. Las células huésped se incubaron en un agitador Infors (36,5°C, 75% de humedad, 6% CO<sub>2</sub>, 110 RPM) y se contaron para la densidad celular antes de su uso. Se añadió una cantidad adecuada de ADN plasmídico de expresión en las células huésped (volumen de trabajo de 1 L o 5 L), y se añadió reactivo de transfección basado en polímero. Los cultivos transfectados se incubaron en un agitador Infors (36,5°C, 75% de humedad, 6% CO<sub>2</sub>, 110 RPM) se añadió durante 4 horas y una solución de alimentación patentada. Los cultivos transfectados se incubaron entonces en un agitador Infors (32°C, 75% de humedad, 6% CO<sub>2</sub>, 110 RPM). Los cultivos transfectados se cosecharon el día 10 después de transfección. Los sobrenadantes se purificaron para la generación de materiales de investigación. El proceso de purificación incluyó clarificación, cromatografía de afinidad de proteína A, concentración por Amicon Ultracel, cromatografía de exclusión por tamaño, diálisis por Slide-A-Lyzer y concentración final por Amicon Ultracel en el tampón de formulación.

[0079] Las proteínas de fusión que tienen actividades simultáneas anti-VEGF y anti-integrina se construyeron, expresaron, purificaron y caracterizaron. La Figura 2 proporciona un esquema que caracteriza la proteína de fusión 1 purificada por SDS-PAGE. El marcador molecular se cargó en el Carril M. Las formas reducidas y no reducidas de VEGF-trampa de ingeniería (Control Positivo 1; SEQ ID NO: 22) que consisten en porciones de VEGFR1 y VEGFR2 humano fusionados a la porción Fc de IgG1 humano se cargaron en Carriles 1 y 2, respectivamente. Formas no reducidas y reducidas de trampa VEGF disponible comercialmente, aflibercept (Eylea<sup>®</sup>, Regeneron) (Control Positivo 2) se cargaron en los carriles 3 y 4, respectivamente. Las formas no reducidas y reducidas de proteína de fusión 1 se cargaron en los carriles 5 y 6. Cada muestra de proteína se cargó en un volumen de 3 µg en cada carril. Como se muestra en la Figura 2, los resultados indican que tanto el Control Positivo como la proteína de fusión 1 exhibieron una alta integridad y pureza en condiciones reductoras y no reductoras. La concentración final de la proteína de fusión 1 fue de aproximadamente 40 mg/ml en el tampón de formulación designado (basado en la absorción a 280 nm).

[0080] La producción de homodímeros de proteínas por transfección celular con sus respectivas construcciones se confirmó mediante SDS-PAGE y análisis de bioactividad.

### Ejemplo 3: Afinidad de unión de proteína de fusión a VEGF<sub>165</sub> humano

[0081] Se usó un ensayo de inmunosorbente ligado a enzima de unión directa (ELISA) para medir la afinidad de unión de las proteínas de fusión de la invención con VEGF<sub>165</sub> humano, una variante de empalme de VEGF-A.

[0082] La trampa de VEGF es un receptor de VEGF soluble que fue diseñado para uso terapéutico y actualmente está aprobado por la FDA para tratar la DMAE. La trampa VEGF contiene el segundo dominio similar a Ig 2 (D2) de VEGFR1

fusionado con el tercer dominio similar a Ig 3 (D3) de VEGFR2 fusionado a la región Fc de IgG1 humano (Holash, J., et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 20 de agosto de 2002; 99(17):11393-8). La trampa VEGF se dirige a VEGF-A, VEGF-B y PlGF. La trampa de VEGF disponible comercialmente, aflibercept (Eylea®, Regeneron), se incluyó como Control Positivo 2.

[0083] Se agregaron 100 µl de una solución de recubrimiento (1 µg/mL de VEGF<sub>165</sub> en 1 x solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2) a cada pocillo de una placa ELISA de 96 pocillos, y la placa se incubó durante la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron dos veces con 400 µl de 1 x tampón PBS, y el exceso de líquido se eliminó cuidadosamente con una toalla de papel.

[0084] Se añadieron 400 µl de una solución de bloqueo (5 g de leche descremada sin grasa en 100 ml de 1 x PBS) a cada pocillo, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pocillos se lavaron dos veces con 1 x tampón PBS.

[0085] Las proteínas de fusión y las muestras de control se diluyeron en serie tres veces en solución de bloqueo, con una concentración de proteína más alta de 10 nM. Se añadieron 100 µl de las muestras diluidas en serie a cada pocillo. La placa se cubrió y se incubó en un agitador de placa (-100 rpm) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado (1 x PBS, Tween-20 al 0,05%).

[0086] Se agregaron a cada pocillo 100 µl de 1:2500 anticuerpos específicos de IgG Fc anti-humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano diluido en solución de bloqueo. Las placas se sellaron y se incubaron en un agitador de placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado.

[0087] Se añadieron 100 µl de 3,5,3',5'-tetrametilbencidina (TMB) a cada pocillo, y las placas se incubaron durante 3 a 5 minutos para permitir que tenga lugar la reacción. Para detener la reacción, se añadieron 100 µl de solución de parada (1N HCl) a cada pocillo.

[0088] La densidad óptica (DO) de cada pocillo se determinó usando un lector de placas ELISA a una longitud de onda de absorbanza de 450 nm. La absorbanza se representó frente a la concentración de proteína de la proteína de fusión o el control, y se determinó la concentración a la cual la señal era la mitad de la concentración efectiva máxima (CE<sub>50</sub>).

[0089] La afinidad de unión, expresada como el valor EC<sub>50</sub>, estaba entre 0,10 y 0,21 nM para las proteínas de fusión probadas de la invención. Los resultados de ELISA se muestran en la **Tabla 1**.

**Tabla 1**

Prueba de material	CE <sub>50</sub> (nM)
Control positivo 2 (aflibercept)	0,088-0,195
Proteína de fusión 1 (SEQ ID NO: 16)	0,106-0,207

[0090] Los resultados del Ejemplo 3 mostraron que las proteínas de fusión de acuerdo con las realizaciones de la invención, se unen a VEGF<sub>165</sub> con alta afinidad. Esto también se ilustra en la Figura 3.

**Ejemplo 4: Unión competitiva de la proteína de fusión a Integrina αvβ3**

[0091] La unión competitiva se usó para medir la afinidad de unión de la proteína de fusión 1 de la invención a la integrina αvβ3. Rho de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) y variante Rho KG (SEQ ID NO: 13) se sintetizaron de acuerdo con el ejemplo 1 y se incluyeron como Control Positivo 3 y Control Positivo 4 respectivamente en el ensayo de unión competitiva.

[0092] Se añadió 1 µg/ml de vitronectina disuelta en solución de recubrimiento a cada pocillo de una placa ELISA de 96 pocillos, y la placa se incubó durante la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron dos veces con tampón PBS, y el exceso de líquido se eliminó cuidadosamente con una toalla de papel.

[0093] Se añadió solución de bloqueo (5 g de leche descremada sin grasa en 100 ml de 1 x PBS) a cada pocillo, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pocillos se lavaron dos veces con 1 x tampón PBS.

[0094] Se mezclaron diversas concentraciones de Control Positivo 3, Control Positivo 4 y Proteína de fusión 1 con cierta concentración de integrina soluble αvβ3. Se añadieron cien microlitros (100 µl) de las muestras diluidas en serie a cada pocillo. La placa se cubrió y se incubó en un agitador de placa (-100 rpm) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado (1 x PBS, Tween-20 al 0,05%).

[0095] Se añadió anticuerpo primario anti-integrina αv diluido y se incubó, luego se lavó. Se agregaron a cada pocillo anticuerpos específicos de IgG Fc de cabra conjugados con peroxidasa de rábano en solución de bloqueo. Las placas

se sellaron y se incubaron en un agitador de placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado.

**[0096]** Se añadieron 100 µl de 3,5,3',5'-tetrametilbencidina (TMB) a cada pocillo, y las placas se incubaron durante 3 a 5 minutos para permitir que tenga lugar la reacción. Para detener la reacción, se añadieron 100 µl de solución de parada (1N HCl) a cada pocillo.

**[0097]** La densidad óptica (DO) de cada pocillo se determinó usando un lector de placas ELISA a una longitud de onda de absorbancia de 450 nm. La absorbancia se representó frente a la concentración de proteína de la proteína de fusión o el control, y se determinó la concentración a la cual la señal era la mitad de la concentración de inhibición máxima (CI<sub>50</sub>).

**[0098]** La unión competitiva, expresada como el valor IC<sub>50</sub>, estaba entre 2,2 y 16 nM para la proteína de fusión probada de la invención. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y también se ilustran en la Figura 4.

**Tabla 2**

Material de prueba	CI <sub>50</sub> (nM)
Control positivo 3 (Rho de tipo silvestre, SEQ ID NO: 1)	2,6-3,2
Control positivo 4 (variante Rho KG, SEQ ID NO: 13)	2,2-2,9
Proteína de fusión 1 (SEQ ID NO: 16)	2,2-16,0

**Ejemplo 5 - Inhibición de la proliferación de HUVEC por proteína de fusión**

**[0099]** Se realizó un ensayo de proliferación de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) para probar la funcionalidad de las proteínas de fusión de la invención. Una Trampa de VEGF comercialmente disponible, aflibercept (Eylea®, Regeneron), se incluyó como Control Positivo 2.

**[0100]** Se agregaron 100 µl de una solución de recubrimiento (gelatina al 1% en agua doblemente destilada) a cada pocillo de una placa ELISA de 96 pocillos, y la placa se incubó durante 2 horas o durante la noche a 37°C. Los pocillos se lavaron dos veces con 1 x tampón PBS.

**[0101]** Se agregaron 3500 recuentos de células endoteliales de la vena umbilical humana en medio de crecimiento de células endoteliales a cada pocillo, y la placa se incubó durante la noche a 37°C.

**[0102]** Las muestras de proteína de fusión se diluyeron en tampón de ensayo (Medio-199 1 x Sales de Earle, suero bovino fetal al 10%, HEPES 10 mM, 1 x antibiótico/antimicótico), con una concentración de proteína más alta de 300 nM. Las muestras de proteína de fusión se mezclaron con VEGF<sub>165</sub> (8 ng/ml), y las mezclas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con 200 µl de 1 x PBS.

**[0103]** Se añadieron 100 µl de la mezcla VEGF<sub>165</sub>/muestra a cada pocillo, y las placas se incubaron durante 72 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, reactivo de detección de 10 µl MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-5-(3-carboximetoxifenilo)-2-(4-sulfonilo)-2H-tetrazolio) + metosulfato de fenazina en PBS destilado) se añadieron a cada pocillo, y las placas se incubaron a 37°C durante 2,5 horas.

**[0104]** La DO de cada pocillo se determinó usando un lector de placa ELISA a una longitud de onda de absorbancia de 490 nm. La absorbancia se representó frente a la concentración de proteína de la proteína de fusión o el control, y se determinó la concentración a la que se inhibió la proliferación celular en un 50% (CI<sub>50</sub>).

**[0105]** Se determinó que la inhibición de la proliferación celular (CI<sub>50</sub>) estaba entre 0,039 y 0,103 nM para la proteína de fusión probada de la invención. Los resultados del ensayo de proliferación se muestran en la Tabla 3 y también se ilustran en la Figura 5. Tanto el Control Positivo 2 como la Proteína de Fusión 1 exhibieron una actividad similar en la inhibición de la proliferación de HUVEC dependiente de VEGF.

**Tabla 3**

Material de prueba	CI <sub>50</sub> (nM)
Control positivo 2 (aflibercept)	0,026-0,136
Proteína de fusión 1 (SEQ ID NO: 16)	0,039-0,103

**Ejemplo 6 - Inhibición de la adhesión celular αvβ3 y α5β1 por la proteína de fusión**

**[0106]** Se evaluó la adhesión de las células CHO que sobreexpresan αvβ3 al fibrinógeno y las células K562 que expresan α5β1 a la fibronectina en presencia de proteínas de fusión.

[0107] Las placas de microtitulación Immulon-2 de 96 pocillos (Costar, Corning, NY) se recubrieron con 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS: tampón fosfato 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4) que contenía sustratos a una concentración de 50-500 nM, y se incubaron durante la noche a 4°C. Los sustratos y sus concentraciones de recubrimiento fueron fibrinógeno (Fg) a 200 µg/mL y fibronectina (Fn) a 25 µg/mL. Los sitios de unión a proteínas no específicos se bloquearon incubando cada pocillo con 200 µL de albúmina de suero bovino (BSA) desnaturalizada al 1% (Calbiochem) a temperatura ambiente durante 1,5 horas. El BSA desnaturalizado por calor se desechó y cada pocillo se lavó dos veces con 200 µl de PBS.

[0108] Las células CHO que expresaron la integrina αvβ3 (CHO-αvβ3) de la misma fuente de la Solicitud de Patente N° 62/US2015/46322 se mantuvieron en DMEM. La eritroleucemia humana K562 se mantuvo tal como está escrita en la Solicitud de Patente N° 62/US2015/46322 de ATCC y se cultivó en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 que contiene 5% de FCS. El K562 cosechado se lavó en tampón PBS que contenía EDTA 1 mM y se resuspendió en tampón de Tyrode (NaCl 150 mM, KCl 5 mM y HEPES 10 mM, pH 7,35) que contenía MgSO<sub>4</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM y 500 µM MnCl<sub>2</sub>.

[0109] Las células (CHO y K562) se diluyeron a 3 x 10<sup>5</sup> células/ml, y 100 µl de las células se usaron para el ensayo. Rho y sus mutantes se añadieron a las células cultivadas y se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 15 minutos. Rho y sus variantes se usaron como inhibidores a las concentraciones de 0,001-500 µM. Las células tratadas se añadieron luego a la placa recubierta y se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 hora. La solución de incubación se desechó y las células no adheridas se eliminaron lavando dos veces con 200 µl PBS. Las células unidas se cuantificaron por tinción con cristal violeta. Brevemente, el pozo se fijó con 100 µl de formalina al 10% durante 10 minutos y se secó. Cincuenta microlitros (50 µl) de cristal violeta al 0,05% se añadieron al pozo a temperatura ambiente durante 20 minutos. Cada pocillo se lavó con 200 µl de agua destilada cuatro veces y se secó. La coloración se realizó mediante la adición de 150 µl de solución colorante (50% de alcohol y 0,1% de ácido acético). La absorbancia resultante se leyó a 600 nm y las lecturas se correlacionaron con el número de células adheridas.

[0110] El cálculo de inhibición de la adhesión celular se realizó de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \frac{OD_{600}(TA) - OD_{600}(NC)}{OD_{600}(PC) - OD_{600}(NC)} \times 100$$

[0111] En la ecuación anterior, TA se refiere a un "artículo de prueba"; NC se refiere a "control negativo" y PC se refiere a "control positivo".

[0112] La CI<sub>50</sub> se definió como la concentración (nM) de una variante de desintegrina requerida para una inhibición del 50% de la adhesión celular mediada por una integrina particular. Por lo tanto, baja CI<sub>50</sub> indica una mayor especificidad o potencia de la variante de desintegrina al inhibir la actividad de adhesión celular de la respectiva integrina, por lo tanto, una mayor actividad de unión (o selectividad) de la variante de desintegrina a la respectiva integrina. Los resultados de CI<sub>50</sub> se resumen en la **Tabla 4**. La Figura 6 proporciona un esquema que muestra la inhibición de la adhesión celular CHO-αvβ3 por la Proteína de Fusión 1.

**Tabla 4**

Material de prueba	αvβ3, CI <sub>50</sub> (nM)	α5β1, CI <sub>50</sub> (nM)
Control positivo 3 (SEQ ID NO: 1)	24,7	252,5
Control positivo 4 (SEQ ID NO: 13)	19,6	17,5
Proteína de fusión 1 (SEQ ID NO: 16)	4,76	3,4

**Ejemplo 7: Inhibición de la formación de tubos HUVEC por proteína de fusión**

[0113] Se colocaron HUVEC (1,5 X 10<sup>4</sup> células/pocillo) en una placa recubierta con matrigel de 96 pocillos. Seis dosis de proteína de fusión 1 (0,1 µM, 0,3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, y 30 µM) y vehículo se añadieron a cada pocillo en medio de crecimiento en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Después de un período de incubación de 18 horas, se evaluó por fotomicroscopía la morfología de los tubos de células endoteliales, que se asemejan a una red capilar. La interrupción (antiangiogénesis) de la longitud total del tubo se midió a partir de cada fotografía y se determinó en relación con el grupo de control del vehículo. La concentración inhibitoria mínima (MIC ≥ 30%) de la formación del tubo se determinó y se usó para evaluar el grado de antiangiogénesis. La Suramin se usó como control positivo antiangiogénico (Control Positivo 5) para todos los estudios.

[0114] Se determinó que la inhibición de la formación del tubo (CI<sub>50</sub>) era inferior a 0,1 µM para la proteína de fusión 1 probada, que mostró una mayor potencia que el Control Positivo 4. Los resultados del ensayo de formación del tubo se muestran en la **Tabla 5**. Las Figuras 7A-G proporcionan un esquema que muestra el efecto inhibitorio de Proteína de Fusión 1 sobre la formación del tubo cuando se agregó Proteína de Fusión 1 a una dosis de 0,1 µM, 0,3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM y 30 µM, respectivamente.



Tabla 5

Material de prueba	CI <sub>50</sub> (µM)
Control positivo 5 (Suramin®)	15,8
Control positivo 4 (SEQ ID NO: 13)	5,9
Proteína de fusión 1 (SEQ ID NO: 16)	<0,1

5

10 **Ejemplo 8 - Inhibición de la fuga inducida por VEGF en conejos con cinturón holandés por proteínas de fusión**

15 **[0115]** Las proteínas de fusión de la invención se probaron en un modelo *in vivo* de permeabilidad vascular para determinar su eficacia en la prevención de la fuga vascular. En este modelo, se inyectó VEGF por vía intravítrea en el vítreo de los ojos de conejo para inducir una fuga retiniana incontrolada. Aflibercept (Eylea®, Regeneron), una proteína de fusión recombinante que consiste en porciones de VEGFR1 y VEGFR2 humanos fusionados a la porción Fc de IgG1 humano, y bevacizumab (Avastin®, Roche), un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante que bloquea la angiogénesis inhibiendo VEGF-A se incluyeron como controles positivos 2 y 6, respectivamente.

20 **[0116]** En una realización, una composición farmacéutica contenía 20.000 µg/mL de Proteína de Fusión 1 en un tampón de formulación que comprende tampón de histidina 25 mM, NaCl 20 mM, sacarosa al 6% (p/v), polisorbato al 0,03% (p/v), pH 6,0.

25 **[0117]** Los conejos con cinturón holandés fueron anestesiados con isoflurano (3-5%), y sus ojos fueron tratados con solución oftálmica de Betadine. Los ojos de los conejos se lavaron con solución salina estéril y se aplicó clorhidrato de lidocaína (inyectable al 2%) o proparacaína (0,5%) a la superficie ocular.

30 **[0118]** El día 1, se inyectó por vía intravítrea a conejos con cinturón holandés proteínas de fusión de la invención, control de vehículo (negativo) o controles de referencia (positivos) a dosis predeterminadas usando una jeringa de insulina BD 300 µl (31 ga x 5/16 pulgada). La aguja se insertó a través del cuadrante dorsotemporal del ojo, aproximadamente 3-4 mm posterior al limbo y 3-4 mm lateral a los músculos rectos dorsales, y se administraron 50 µl de solución. La fuga vascular se indujo inyectando VEGF<sub>165</sub> exógeno en los mismos ojos el día 3.

35 **[0119]** La angiografía con fluoresceína (AF) se realizó en todos los grupos de dosificación 3 días después de la inyección de VEGF para evaluar la fuga y la tortuosidad utilizando una escala de 0 (normal) a 4 (grave).

40 **[0120]** Los signos de irritación ocular se puntuaron utilizando el sistema de puntuación Draize antes de la dosificación de la proteína de fusión, la inducción de VEGF y las evaluaciones. Según el análisis de Draize, todos los ojos de conejo eran normales antes del inicio de la dosificación. Se observaron signos transitorios de inflamación ocular mínima en todos los grupos de tratamiento después de la administración de dosis intravítrea, y se atribuyeron al procedimiento intravítreo. No hubo hallazgos relacionados con las drogas evidentes durante el curso del estudio.

45 **[0121]** Las AF asociadas con el grupo de control del vehículo tuvieron la puntuación media más alta (2,58) asociada con la fuga y la tortuosidad de la vasculatura retiniana. Los dos grupos de Control Positivo de referencia 2 y 6 tuvieron puntuaciones medias de 0 y 0,25, lo que indica una reducción significativa en la fuga y la tortuosidad de la vasculatura retiniana. Las proteínas de fusión probadas de la invención tenían una puntuación media de 0,167, mostrando efectividad en la reducción de la fuga retiniana inducida por VEGF y la tortuosidad comparable a los controles positivos. Los resultados del ensayo *in vivo* se muestran en la Tabla 6. Las Figuras 8A-D proporcionan las AF representativas que muestran la inhibición de la fuga inducida por VEGF en conejos de cinturón holandés por la proteína de fusión 1 y controles positivos.

50

Tabla 6

Material de prueba	Dosis (µg)	Nº de puntajes	Día 6 puntaje de fuga medio
Vehículo	0	12	2.583
Control Positivo 6 (bevacizumab)	1250	12	0,250
Control Positivo 2 (aflibercept)	625	12	0
Proteína de fusión 1 (SEQ ID NO: 16)	1000	12	0,417

60 **Ejemplo 9 - Inhibición de la respuesta a la dosis de la fuga inducida por VEGF en conejos con cinturón holandés por proteína de fusión**

65 **[0122]** Las proteínas de fusión de la invención se probaron en un modelo *in vivo* de permeabilidad vascular retiniana a dosis variables para determinar su efectividad dosis-respuesta para prevenir la fuga vascular. En este modelo, se inyectó intravenalmente VEGF<sub>165</sub> humano en el vítreo de los ojos de conejo para inducir la fuga retiniana.

[0123] El día 1, a los conejos con cinturón holandés se les inyectó intravítreamente proteína de fusión 1 de acuerdo con una realización de la invención a varias dosis, control de vehículo (negativo) o controles de referencia (positivos). La fuga vascular se indujo inyectando VEGF<sub>165</sub> exógeno en los mismos ojos el día 3.

[0124] Las AF se realizaron en todos los grupos de dosificación 3 días después de la inducción de VEGF (día 6) para evaluar la filtración y la tortuosidad utilizando una escala de 0 (normal) a 4 (grave).

[0125] Los signos de irritación ocular se puntuaron utilizando el sistema de puntuación Draize antes de la dosificación de la proteína de fusión, la inducción de VEGF y las evaluaciones. Según el análisis de Draize, todos los ojos de conejo eran normales antes del inicio de la dosificación. Se observaron signos transitorios de inflamación ocular mínima en todos los grupos de tratamiento después de la administración de dosis intravítrea, y se atribuyeron al procedimiento intravítreo. No hubo hallazgos relacionados con las drogas evidentes durante el curso del estudio.

[0126] Para la primera inyección exógena de VEGF, las AF asociadas con el grupo de control del vehículo tuvieron la puntuación media más alta (3,4) asociada con la fuga y la tortuosidad de la vasculatura retiniana. Los dos grupos de Control Positivo de referencia tuvieron puntajes promedio de 0, lo que indica una reducción significativa en la fuga y la tortuosidad de la vasculatura retiniana. La proteína de fusión probada de la invención (proteína de fusión 1) tenía puntuaciones de 0,08, 0,42 y 0,17 a dosis de 100, 500 y 1000 µg, respectivamente, lo que demuestra la eficacia en la reducción de la fuga retiniana inducida por VEGF y la tortuosidad comparable a los controles positivos.

[0127] Los resultados del ensayo in vitro dosis-respuesta se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Material de prueba	Dosis (µg)	Nº de puntajes	Día 6 puntaje de fuga medio
Vehículo	0	10	3,400
Control Positivo 6 (bevacizumab)	1250	12	0,17
Control Positivo 2 (aflibercept)	625	12	0
Proteína de fusión 1 (SEQ ID NO: 16)	1000	12	0,33
Proteína de fusión 1 (SEQ ID NO: 16)	500	10	0,40
Proteína de fusión 1 (SEQ ID NO: 16)	100	10	0,60

**Ejemplo 10 - Reducción del tamaño de la lesión en neovascularización coroidea inducida por láser (CNV) en ratas por proteínas de fusión**

[0128] Los ojos de las ratas Brown Norway se dilataron con una solución de ciclogilo al 1% y se protegieron de la luz. Después de la dilatación, las ratas se anestesiaron usando una mezcla de ketamina y xilazina. Se introdujeron tres quemaduras de lesión en la retina de cada ojo usando un láser a 532 nm el día 1.

[0129] El día 3, los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina y xilazina, sus ojos se dilataron, y se inyectaron intravítreamente 5 µl de proteína de fusión 1, vehículo (control negativo) o Control Positivo 2 (referencia) a dosis predeterminadas en ambos ojos de un animal usando una jeringa Hamilton con aguja de calibre 33.

[0130] Para confirmar la formación exitosa de la lesión, se tomaron imágenes del fondo utilizando un oftalmoscopio de animales pequeños de Micron III (Phoenix Research) antes de la introducción de la lesión, después de que la lesión se haya quemado y el día 22. Los animales recibieron una inyección IP de fluoresceína sódica al 10% a 1 µL/g de peso corporal el día 22 para evaluar la neovascularización de las quemaduras por lesiones. A partir de los angiogramas de fluoresceína, se determinó el tamaño de la lesión y se comparó entre los grupos de dosificación como se muestra en las Figuras 9A-C, en donde la Figura 9A muestra un esquema del vehículo, la Figura 9B muestra un esquema del Control Positivo 2, y la Figura 9C muestra un esquema de la proteína de fusión 1. Las flechas (T) en las Figuras 9A-C indicaron puntos de lesión con láser.

**Ejemplo 11 - Reducción del tamaño de la lesión en CNV inducida por láser en monos por proteínas de fusión**

[0131] Las proteínas de fusión se prueban en un modelo de CNV inducido por láser establecido en monos. Se introducen de seis a nueve quemaduras alrededor de la mácula de cada ojo usando fotocoagulación con láser de diodo de 532 nm, y se inyectan intravítreamente 0,5-4 mg de proteínas de fusión de la invención el mismo día.

[0132] Los animales están sedados con pentobarbitona soluble intravenosa al 2,5% (1 ml/kg) 20 días después Los párpados se fijan para mantener los ojos abiertos, y se toman fotografías en color con una cámara de fondo de ojo.

[0133] Se inyecta un tinte de fluoresceína (20% de fluoresceína sódica; 0,05 ml/kg) en una vena de una extremidad inferior. Se toman fotografías en varios puntos de tiempo después de la inyección del tinte, incluida la fase arterial, la

fase arteriovenosa temprana y varias fases arteriovenosas tardías, para controlar la fuga de fluoresceína asociada con las lesiones de la CNV.

5 **Ejemplo 12 - Inhibición del crecimiento de tumor de glioblastoma humano ortotópico en ratones de xenoinjerto por proteínas de fusión**

[0134] La línea celular de glioblastoma humano U87-MG ( $2,5 \times 10^5$  células/2  $\mu$ l, células de luciferasa) se implanta en ratones desnudos BALB/c para establecer un modelo de xenoinjerto ortotópico.

10 [0135] Con el fin de evaluar los efectos inhibitorios de las proteínas de fusión de la invención sobre el crecimiento tumoral, se implantan células tumorales en ratones desnudos, y se determinan diversas concentraciones de proteínas de fusión según las realizaciones de la invención, que varían de 3 a 30 mg/kg administrado a los ratones por vía intravenosa dos veces por semana. El crecimiento tumoral y la tasa de supervivencia de los animales se miden semanalmente durante hasta 8 semanas.

15 **Ejemplo 13 - Inhibición de la fibrosis pulmonar en ratones con fibrosis inducida por bleomicina por las proteínas de fusión**

20 [0136] Se usan ratones machos C57BL/6 que pesan  $20 \pm 2$ g para inducir fibrosis pulmonar y el efecto de las proteínas de fusión sobre la inhibición de la fibrosis. Los animales se anestesian con isoflurano y luego se administra una dosis única de bleomicina a 1,5 IU/kg (disuelta en 25  $\mu$ l de solución salina) intratraquealmente en el día 1. Se sabe que esta dosis de bleomicina genera de manera reproducible fibrosis pulmonar y puede inducir una mortalidad del 10-20%.

25 [0137] Nintedanib se administra cada día por sonda oral a 10-50 mg/kg por día como control positivo. El volumen de administración es de 10 ml/kg de peso corporal. Como control negativo, el vehículo de proteína de fusión se administra a los animales mediante inyección IV. Se usa un control sin tratamiento para controlar los cambios en la patología pulmonar después de la administración de bleomicina. Se administran varias dosis de Proteína de Fusión 1 y vehículo por vía intravenosa una vez al día, comenzando desde el día 1 hasta el día 21. Las observaciones clínicas, incluido el peso corporal, se controlan diariamente. Los animales se sacrifican el día 22. Se recoge líquido de lavado broncoalveolar para investigar el recuento celular y el TGF- $\beta$ 1.

30 [0138] Con el fin de evaluar los efectos inhibitorios de las proteínas de fusión de la invención sobre la formación de fibrosis, se extraen los tejidos pulmonares y se homogenizan en tampón para medir el cambio de hidroxiprolina en comparación con una curva estándar. Se realizan otros experimentos de histopatología para reunir la expresión de fibrosis y biomarcadores inflamatorios específicos.

35

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> Wu, Pei-Tzu Shiu, Jia-Hau Zen, Kevin Cherukkury, Mahhu Nguyen, Tan

<120> Proteínas de fusión para la inhibición de angiogenesis

<130> 063426/479685

45 <150> 62/185,716

<151> 2015-06-28

<160> 23

50 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 68

<212> PRT

55 <213> Serpiente

<400> 1

ES 2 797 901 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Glu Leu Cys  
 20 25 30  
 Cys Glu Gln Cys Lys Phe Ser Arg Ala Gly Lys Ile Cys Arg Ile Pro  
 35 40 45  
 Arg Gly Asp Met Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys  
 50 55 60  
 Pro Arg Tyr His  
 65

15  
 20  
 25

<210> 2  
 <211> 68  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20  
 25

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> 9, 40, 41, 42, 43, 46, 47, 48, 50, 52, 53, 65, 66, 67, 68  
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

25

<220>  
 <223> Mutante de rodostomina

30

<400> 2

30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Glu Leu Cys  
 20 25 30  
 Cys Glu Gln Cys Lys Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Cys Xaa Xaa Xaa  
 35 40 45  
 Arg Xaa Asp Xaa Xaa Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys  
 50 55 60  
 Xaa Xaa Xaa Xaa  
 65

45  
 50

<210> 3  
 <211> 70  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

50

<220>  
 <223> Mutante de rodostomina

55

<400> 3

55  
 60  
 65

Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Ser Pro Ser Asn Pro Cys Cys Asp Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Asp Gly Leu Cys  
 20 25 30  
 Cys Asp Gln Cys Arg Phe Lys Lys Lys Arg Thr Ile Cys Arg Ile Ala  
 35 40 45  
 Arg Gly Asp Phe Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys  
 50 55 60  
 Pro Arg Trp Asn Gly Leu  
 65 70

65

ES 2 797 901 T3

<210> 4  
 <211> 49  
 <212> PRT  
 5 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 <223> Equistatina  
 10 <400> 4  
  
 Gln Cys Glu Ser Gly Pro Cys Cys Arg Asn Cys Lys Phe Leu Lys Glu  
 1 5 10 15  
 15 Gly Thr Ile Cys Lys Arg Ala Arg Gly Asp Asp Met Asp Asp Tyr Cys  
 20 25 30  
 Asn Gly Lys Thr Cys Asp Cys Pro Arg Asn Pro His Lys Gly Pro Ala  
 35 40 45  
 Thr  
 20  
 <210> 5  
 <211> 73  
 <212> PRT  
 25 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 <223> Trimucrin  
 30 <400> 5  
  
 Glu Ala Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys  
 1 5 10 15  
 35 Asp Ala Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Glu Gly  
 20 25 30  
 Leu Cys Cys Asp Gln Cys Arg Phe Lys Lys Lys Arg Thr Ile Cys Arg  
 35 40 45  
  
 Arg Ala Arg Gly Asp Asn Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala  
 50 55 60  
 40 Asp Cys Pro Arg Asn Gly Leu Tyr Gly  
 65 70  
  
 45 <210> 6  
 <211> 73  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido  
  
 50 <220>  
 <223> Elegantin  
  
 <400> 6  
  
 55 Glu Ala Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys  
 1 5 10 15  
 Asp Ala Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Asp Gly  
 20 25 30  
 60 Leu Cys Cys Asp Gln Cys Arg Phe Lys Lys Lys Arg Thr Ile Cys Arg  
 35 40 45  
 Arg Ala Arg Gly Asp Asn Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala  
 50 55 60  
 65 Asp Cys Pro Arg Asn Gly Leu Tyr Ser  
 65 70

ES 2 797 901 T3

<210> 7  
 <211> 62  
 <212> PRT  
 5 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 <223> Trigramin  
 10 <400> 7  
  
 Glu Ala Gly Glu Asp Cys Asp Cys Gly Ser Pro Ser Asn Pro Cys Cys  
 1 5 10 15  
 15 Asp Ala Ala Thr Cys Lys Leu Ile Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly  
 20 25 30  
 Leu Cys Cys Asp Gln Cys Ser Phe Ile Glu Glu Gly Thr Val Cys Arg  
 35 40 45  
 20 Ile Ala Arg Gly Asp Asp Leu Asp Asp Tyr Cys Asn Gly Arg  
 50 55 60  
  
 <210> 8  
 <211> 102  
 25 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Dominio extracelular VEGFR1 D2  
 30 <400> 8  
  
 Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys  
 1 5 10 15  
 35 Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp  
 20 25 30  
 Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val  
 35 40 45  
 40 Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu  
 50 55 60  
  
 Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 45 Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe  
 85 90 95  
 Val Arg Val His Glu Lys  
 100  
 50  
  
 <210> 9  
 <211> 102  
 <212> PRT  
 55 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Dominio extracelular VEGFR2 D3  
  
 <400> 9

ES 2 797 901 T3

5  
 10  
 15

```

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

20  
 <210> 10  
 <211> 202  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25  
 <220>  
 <223> Dominio extracelular VEGFR1 D2/Dominio extracelular VEGFR2 D3

30  
 <400> 10

35  
 40  
 45  
 50

```

Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His
 1      5      10      15
Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro
      20      25      30
Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro
      35      40      45
Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser
      50      55      60
Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val
      65      70      75      80
Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn
      85      90      95
Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser
      100      105      110
Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn
      115      120      125
Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His
      130      135      140
Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met
      145      150      155      160
  
```

55  
 60

```

Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp
      165      170      175
Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys
      180      185      190
Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys
      195      200
  
```

65  
 <210> 11  
 <211> 299  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 797 901 T3

<220>

<223> Dominios extracelulares PDGFR-beta D1-D3

<400> 11

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45

Gln	Gly	Leu	Val	Val	Thr	Pro	Pro	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Leu	Asn	Val
1				5					10					15	
Ser	Ser	Thr	Phe	Val	Leu	Thr	Cys	Ser	Gly	Ser	Ala	Pro	Val	Val	Trp
			20					25					30		
Glu	Arg	Met	Ser	Gln	Glu	Pro	Pro	Gln	Glu	Met	Ala	Lys	Ala	Gln	Asp
		35					40					45			
Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Val	Leu	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp
	50					55					60				
Thr	Gly	Glu	Tyr	Phe	Cys	Thr	His	Asn	Asp	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu	Thr
	65				70					75					80
Asp	Glu	Arg	Lys	Arg	Leu	Tyr	Ile	Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Thr	Val	Gly
				85					90					95	
Phe	Leu	Pro	Asn	Asp	Ala	Glu	Glu	Leu	Phe	Ile	Phe	Leu	Thr	Glu	Ile
			100					105					110		
Thr	Glu	Ile	Thr	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Asp	Pro	Gln	Leu	Val	Val
		115					120					125			
Thr	Leu	His	Glu	Lys	Lys	Gly	Asp	Val	Ala	Leu	Pro	Val	Pro	Tyr	Asp
		130				135					140				
His	Gln	Arg	Gly	Phe	Phe	Gly	Ile	Phe	Glu	Asp	Arg	Ser	Tyr	Ile	Cys
	145				150					155					160
Lys	Thr	Thr	Ile	Gly	Asp	Arg	Glu	Val	Asp	Ser	Asp	Ala	Tyr	Tyr	Val
				165					170					175	
Tyr	Arg	Leu	Gln	Val	Ser	Ser	Ile	Asn	Val	Ser	Val	Asn	Ala	Val	Gln
			180					185					190		
Thr	Val	Val	Arg	Gln	Gly	Glu	Asn	Ile	Thr	Leu	Met	Cys	Ile	Val	Ile
		195					200					205			
Gly	Asn	Glu	Val	Val	Asn	Phe	Glu	Trp	Thr	Tyr	Pro	Arg	Lys	Glu	Ser
	210					215					220				
Gly	Arg	Leu	Val	Glu	Pro	Val	Thr	Asp	Phe	Leu	Leu	Asp	Met	Pro	Tyr
					230					235					240
His	Ile	Arg	Ser	Ile	Leu	His	Ile	Pro	Ser	Ala	Glu	Leu	Glu	Asp	Ser
				245					250					255	
Gly	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Thr	Glu	Ser	Val	Asn	Asp	His	Gln	Asp
			260					265					270		
Glu	Lys	Ala	Ile	Asn	Ile	Thr	Val	Val	Glu	Ser	Gly	Tyr	Val	Arg	Leu
		275					280					285			
Leu	Gly	Glu	Val	Gly	Thr	Leu	Gln	Phe	Ala	Glu					
	290					295									

<210> 12

50 <211> 70

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Rodostomina VARIANTE KG-WN

<400> 12



ES 2 797 901 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65  
 70

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys  
 20 25 30  
 Cys Glu Gln Cys Lys Phe Lys Lys Ala Arg Thr Ile Cys Ala Arg Gly  
 35 40 45  
 Arg Gly Asp Asn Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys  
 50 55 60  
 Pro Arg Trp Asn Asp Leu  
 65 70

<210> 13  
 <211> 68  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Rodostomina VARIANTE KG

<400> 13

25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys  
 20 25 30  
 Cys Glu Gln Cys Lys Phe Lys Lys Ala Arg Thr Ile Cys Ala Arg Gly  
 35 40 45  
 Arg Gly Asp Asn Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys  
 50 55 60  
 Pro Arg Tyr His  
 65

<210> 14  
 <211> 68  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Rodostomina VARIANTE KA

<400> 14

45  
 50  
 55  
 60  
 65

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys  
 20 25 30  
 Cys Glu Gln Cys Lys Phe Lys Lys Ala Arg Thr Ile Cys Ala Arg Ala  
 35 40 45  
 Arg Gly Asp Asn Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys  
 50 55 60  
 Pro Arg Tyr His  
 65

<210> 15  
 <211> 517  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Fusión de VEGFR1 D2/VEGFR2 D3 y Rodostomina VARIANTE KG-WN

<400> 15

ES 2 797 901 T3

Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His  
 1 5 10 15  
 Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro  
 20 25 30  
 5 Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro  
 35 40 45  
 Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser  
 50 55 60  
 10 Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val  
 65 70 75 80  
 Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn  
 85 90 95  
 15 Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser  
 100 105 110  
 Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn  
 115 120 125  
 Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His  
 130 135 140  
 20 Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met  
 145 150 155 160  
 Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp  
 165 170 175  
 25 Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys  
 180 185 190  
 Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Gly Pro Gly Asp Lys Thr  
 195 200 205  
 30 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 210 215 220  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 225 230 235 240  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 245 250 255  
 35 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 260 265 270  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 275 280 285  
 40 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 290 295 300  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 305 310 315 320  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 325 330 335  
 45 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 340 345 350  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 355 360 365  
 50 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 370 375 380  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 385 390 395 400  
 55 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 405 410 415  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 420 425 430  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 435 440 445  
 60 Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala Ala  
 450 455 460  
 Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys Cys

65

# ES 2 797 901 T3

```

    465                470                475                480
    Glu Gln Cys Lys Phe Lys Lys Ala Arg Thr Ile Cys Ala Arg Gly Arg
                    485                490                495
5   Gly Asp Asn Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys Pro
    500                505                510
    Arg Trp Asn Asp Leu
        515

10  <210> 16
    <211> 516
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

15  <220>
    <223> Fusión de VEGFR1 D2/VEGFR2 D3 y Rodostomina VARIANTE KG

20  <400> 16
    Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile
    1      5      10
25  Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr
    20      25      30
30  Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu
    35      40      45
35  Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile
    50      55      60
40  Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala
    65      70      75      80
45  Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln
    85      90      95
50  Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu
    100     105     110
55  Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu
    115     120     125
60  Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His
    130     135     140
65  Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser
    145     150     155     160
    Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg
        165     170     175

```

ES 2 797 901 T3

	Ser	Asp	Gln	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	
				180					185					190			
5	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Gly	Pro	Gly	Asp	
			195					200					205				
10	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
		210					215					220					
15	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
	225					230					235					240	
20	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
					245					250					255		
25	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
				260					265					270			
30	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
			275					280					285				
35	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
		290					295					300					
40	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
	305					310					315					320	
45	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
					325					330					335		
50	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
				340					345					350			
55	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
			355					360					365				
60	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
		370					375					380					
65	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
	385					390					395					400	
70	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
					405					410					415		
75	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
				420					425					430			

ES 2 797 901 T3

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
                   435  440  445

5

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala  
           450  455  460

10

Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys  
   465  470  475  480

15

Cys Glu Gln Cys Lys Phe Lys Lys Ala Arg Thr Ile Cys Ala Arg Gly  
   485  490  495

20

Arg Gly Asp Asn Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys  
   500  505  510

25

Pro Arg Tyr His  
           515

30

<210> 17  
 <211> 515  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35

<220>  
 <223> Fusión de VEGFR1 D2/VEGFR2 D3 y Rodostomina VARIANTE KA

40

Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His  
   1                  5                  10                  15

Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro  
                   20                  25                  30

Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro  
                   35                  40                  45

Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser  
   50                  55                  60

45

Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val  
   65                  70                  75                  80

Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn  
                   85                  90                  95

50

Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser  
                   100                  105                  110

Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn  
                   115                  120                  125

55

Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His  
   130                  135                  140

Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met  
   145                  150                  155                  160

Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp  
                   165                  170                  175

60

Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys  
                   180                  185                  190

Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Gly Pro Gly Asp Lys Thr  
                   195                  200                  205

65

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

ES 2 797 901 T3

		210				215				220					
		Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg													
		225			230				235						240
5		Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro													
				245					250					255	
		Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala						265						270	
		Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val						280						285	
10		Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr						290						300	
		Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr						310						315	320
15		Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu						325						330	335
		Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys						340						345	350
20		Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser						355						360	365
		Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp						370						375	380
		Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser						385						390	395
25		Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala												400	405
		Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys												410	415
		Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly												420	425
30								430						435	440
		Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala Ala						445						450	455
		Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys Cys						460						465	470
35		Glu Gln Cys Lys Phe Lys Lys Ala Arg Thr Ile Cys Ala Arg Ala Arg						475						480	485
		Gly Asp Asn Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys Pro						490						495	500
40		Arg Tyr His						505						510	
		515													

45 <210> 18  
 <211> 514  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Fusión de Eylea y Rodostomina VARIANTE KG

55 <400> 18

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

ES 2 797 901 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55

				100						105					110	
	Glu	Leu	Ser	Val	Gly	Glu	Lys	Leu	Val	Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Arg	Thr
				115						120				125		
	Glu	Leu	Asn	Val	Gly	Ile	Asp	Phe	Asn	Trp	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Lys
				130						135				140		
	His	Gln	His	Lys	Lys	Leu	Val	Asn	Arg	Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly
				145						150				155		160
	Ser	Glu	Met	Lys	Lys	Phe	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr
					165					170					175	
	Arg	Ser	Asp	Gln	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met
				180						185				190		
	Thr	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Asp	Lys	Thr
				195					200					205		
	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
				210					215				220			
	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
					225					230			235			240
	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
					245					250					255	
	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
				260						265				270		
	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
				275					280					285		
	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
				290					295				300			
	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
					305						315					320
	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
					325					330					335	
	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
				340						345				350		
	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
				355					360					365		
	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
				370					375					380		
	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
					385						395					400
	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
					405					410					415	
	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly
				420						425				430		
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Lys
				435					440					445		
	Glu	Cys	Asp	Cys	Ser	Ser	Pro	Glu	Asn	Pro	Cys	Cys	Asp	Ala	Ala	Thr
				450					455				460			
	Cys	Lys	Leu	Arg	Pro	Gly	Ala	Gln	Cys	Gly	Glu	Gly	Leu	Cys	Cys	Glu
					465								475			480
	Gln	Cys	Lys	Phe	Lys	Lys	Ala	Arg	Thr	Ile	Cys	Ala	Arg	Gly	Arg	Gly
					485					490					495	
	Asp	Asn	Pro	Asp	Arg	Cys	Thr	Gly	Gln	Ser	Ala	Asp	Cys	Pro	Arg	
				500					505				510			
	Tyr	His														

<210> 19  
 <211> 1551  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia de nucleótidos de proteína de fusión de SEQ ID NO: 16

<400> 19

ES 2 797 901 T3

```

5      agcggcggaa ggcctttcgt cgagatgtac agcggagatcc ccgagatcat tcacatgacc 60
      gaaggcaggg agctcgtgat cccttgacagg gtcacatccc ccaacatcac cgtcaccctc 120
      aagaagttcc ccctggatac cctcatcccc gacggcaagc ggatcatttg ggatagccgg 180
      aagggcttca tcatctccaa cgctacctac aaagaaattg gactgctgac ctgcgaggct 240
      accgtcaacg gccacctcta taagaccaac tacctgacct acaggcagac caataccatc 300
      atcgatgtgg tcctcagccc cagccacgga atcgaactgt ccgtgggcca gaagctggtc 360
      ctgaactgta cagccaggac agaactcaac gtgggcatcg acttcaactg ggagtacct 420
      agctccaagc accagcacia gaagctggtc aaccgggacc tgaagacca gtccggctcc 480
      gaaatgaaga agttcctgtc caccctcacc atcgatggag tcacccggag cgatcagggg 540
10     ctgtatacct gcgccgctc ctccggcctg atgacaaaga agaacagcac cttcgtgcgg 600
      gtgcacgaga aaggccccgg cgacaagaca cacacctgcc ctccctgccc cgcccccgag 660
      ctgctcggcg gaccagcgt gttcctgttc cccctaagc ccaaggacac cctcatgatc 720
      agcaggacct ctgagtgac atgcgtcgtc gtggactga gccatgaaga ccccgaggtg 780
      aagttcaact ggatgtgga cggcgtcgag gtgcataacg ccaagaccaa accccgggag 840
15     gagcaataca acagcacata caggggtggg tccgtgctga ccgtcctgca ccaggattgg 900
      ctgaacggca aagagtataa gtgcaagggt agcaacaaag ccctgcccgc tccatcgag 960
      aagacaatct ccaaggccaa gggccaacct agggagcctc aggtgtacac actgcctcct 1020
      tccccgggagc agctgacaaa aaaccaagtg agcctgacct gcctcgtcaa gggcttctac 1080
      ccttccgata tcgccgtgga gtgggagtcc aacggccagc ctgagaacaa ctacaagacc 1140
20     acccctcccg tgctcgattc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct cacagtggac 1200
      aatcccgggt ggcagcaggg caatgtgttc agctgttccg tgatgcacga ggccctccac 1260
      aatcactaca cccagaagag cctgtccctg tccccggcg gaggcggcgg ctccggcgga 1320
      ggcggctccg gcggcggcgg atccggaaaa gagtgcgatt gcagctcccc cgagaacccc 1380
25     tgctgcgatg ccgctacatg caaactgcgg cctggagccc agtgtggaga aggcctgtgc 1440
      tgcgagcagt gcaagttcaa gaaggcccgg accatttgtg ctaggggccc gggagacaac 1500
      cctgacgatc ggtgcaccgg ccaaaagcgt gactgtcccc ggtaccactg a 1551

```

```

30     <210> 20
      <211> 19
      <212> PRT
      <213> Secuencia artificial

```

```

35     <220>
      <223> Un péptido de señal

      <400> 20

```

```

40     Met Ala Trp Ala Leu Leu Leu Thr Leu Leu Thr Arg Asp Thr Gly
      1           5           10           15
      Ser Trp Ala

```

```

45     <210> 21
      <211> 57
      <212> ADN
      <213> Secuencia artificial

```

```

50     <220>
      <223> Secuencia de nucleótidos de un péptido de señal

      <400> 21
      atggcctggg ctctcctgct gctgaccctg ctgacacggg acacaggatc ctgggcc 57

```

```

55     <210> 22
      <211> 26
      <212> PRT
      <213> Secuencia artificial

```

```

60     <220>
      <223> Péptido de señal de proteína de fusión de SEQ ID NO: 18

      <400> 22

```



ES 2 797 901 T3

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser  
 1 5 10 15  
 5  
 Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly  
 20 25  
 <210> 23  
 <211> 431  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Fusión de dominio extracelular VEGFR1 D2/dominio extracelular VEGFR2 D3 con región de IgG 1  
 Fc humano  
 <400> 23  
 20 Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile  
 1 5 10 15  
 25 Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr  
 20 25 30  
 30 Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu  
 35 40  
 35 Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile  
 50 55 60  
 40 Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala  
 65 70 75 80  
 45 Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln  
 85 90 95  
 50 Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu  
 100 105 110  
 55 Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu  
 115 120 125  
 60 Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His  
 130 135 140  
 65 Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser  
 145 150 155 160  
 Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg  
 165 170 175

ES 2 797 901 T3

Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr  
 180 185 190  
 5  
 Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr His  
 195 200 205  
 10  
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 210 215 220  
 15  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 225 230 235 240  
 20  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 245 250 255  
 25  
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 260 265 270  
 30  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 275 280 285  
 35  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 290 295 300  
 40  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 305 310 315 320  
 45  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 325 330 335  
 50  
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 340 345 350  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 355 360 365  
 55  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 370 375 380  
 60  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 385 390 395 400  
 65  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 405 410 415  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

ES 2 797 901 T3

420

425

430

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

## 1. Una proteína de fusión que comprende:

5 un péptido de unión a integrina que comprende unión de desintegrina a integrina  $\alpha\beta x$  o  $\alpha 5\beta 1$  o sus fragmentos de unión a integrina;  
 otro péptido de unión a proteínas que se une a un factor angiogénico, en el que el factor angiogénico comprende angiopoyetina (ANG), efrina (Eph), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), neuropilina (NRP),  
 10 activadores de plasminógeno, receptor activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento tumoral beta (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), cadherina endotelial vascular (VE-cadherina), Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6), Factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), y sus receptores; y  
 15 un dominio Fc;  
 en donde x es 1, 3, 5, 6 u 8 .

## 2. Una proteína de fusión que comprende:

20 un péptido de unión a integrina que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, o secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7;  
 25 otro péptido de unión a proteínas que comprende dominios extracelulares de receptores VEGF; y  
 un dominio Fc;  
 en donde el péptido de unión a integrina tiene al menos una mutación en o dentro de 15-20 aminoácidos de un motivo de RGD.

## 3. Una proteína de fusión que comprende:

30 un péptido de unión a integrina que comprende desintegrina y sus fragmentos de unión a integrina;  
 otro péptido de unión a proteínas que comprende dominios extracelulares de receptores VEGF; y  
 un dominio Fc;  
 35 en donde el péptido de unión a integrina comprende al menos una mutación en 15-20 aminoácidos de un motivo RGD.

## 4. Una proteína de fusión que comprende:

40 una porción de unión a integrina seleccionada de un grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con al menos una mutación en o dentro de 15-20 aminoácidos de un motivo RGD, una secuencia de 10 aminoácidos que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, y una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;  
 una subregión constante humana o humanizada que comprende un dominio CH2 de inmunoglobulina y un dominio CH3;  
 45 otro péptido de unión a proteínas que tiene un dominio D2 de tipo Ig de un VEGFR1 y un dominio similar a Ig D3 de un VEGFR2.

## 5. La proteína de fusión de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 o 3

50 que comprende el péptido de unión a integrina, el dominio Fc y el otro péptido de unión a proteína desde el extremo C al extremo N; o  
 que comprende el péptido de unión a integrina, el dominio Fc y el otro péptido de unión a proteína desde el extremo N al extremo C; o  
 que comprende además un enlazador GS o G<sub>9</sub> entre el dominio Fc y el péptido de unión a integrina o el otro péptido de unión a proteína.

## 6. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4,

55 en donde el péptido de unión a integrina tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7; preferiblemente en donde el péptido de unión a integrina tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2; o  
 60 que comprende además una secuencia enlazadora entre el péptido de unión a integrina y el otro péptido de unión a proteínas; o  
 que comprende además una secuencia de péptido señal corriente arriba del otro péptido de unión a proteína.

## 7. Un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

65

## 8. Un dímero de la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

9. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

5 10. Un método para producir una proteína de fusión, que comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en una condición que produce la proteína de fusión y recuperar la proteína de fusión producida por la célula huésped.

10 11. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 2 o 3,  
en donde los dominios extracelulares de los receptores de VEGF comprenden un dominio de tipo Ig D1-D7 de los receptores de VEGF; o  
en donde los dominios extracelulares de receptores de VEGF que comprenden i) un dominio D2 similar a Ig de un VEGFR1 y un dominio D3 similar a Ig de un VEGFR2; ii) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o iii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO: 10.

15 12. Una composición que comprende la proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un adyuvante, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 13. Una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso en el tratamiento/prevenición de una enfermedad angiogénica; preferiblemente en donde la enfermedad angiogénica comprende artritis reumatoide, artritis inflamatoria, osteoartritis, cáncer ocular y sistémico, metástasis e invasión relacionadas con tumores, enfermedades de fibrosis sistémica que incluyen fibrosis pulmonar idiopática (IFF), esteatohepatitis no alcohólica (NASH) o fibrosis hepática, nefropatía diabética y/o fibrosis renal, fibrosis dérmica o queloide, cicatrización de heridas, cardio-fibrosis, accidente cerebrovascular inducido por isquemia, enfermedad ocular caracterizada por neovascularización o isquemia (como neovascularización coroidea), uveítis, retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), retinopatía diabética y edema macular diabético (EMD).

30

35

40

45

50

55

60

65

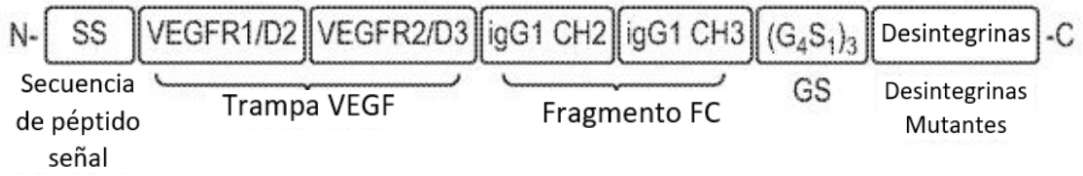


FIG. 1

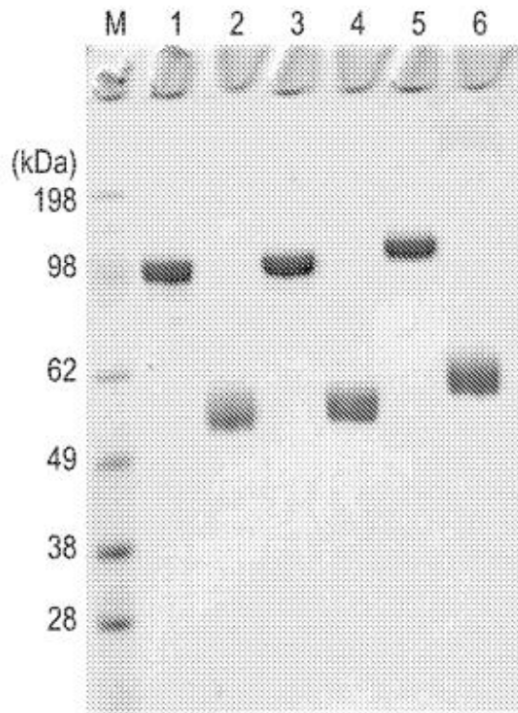


FIG. 2

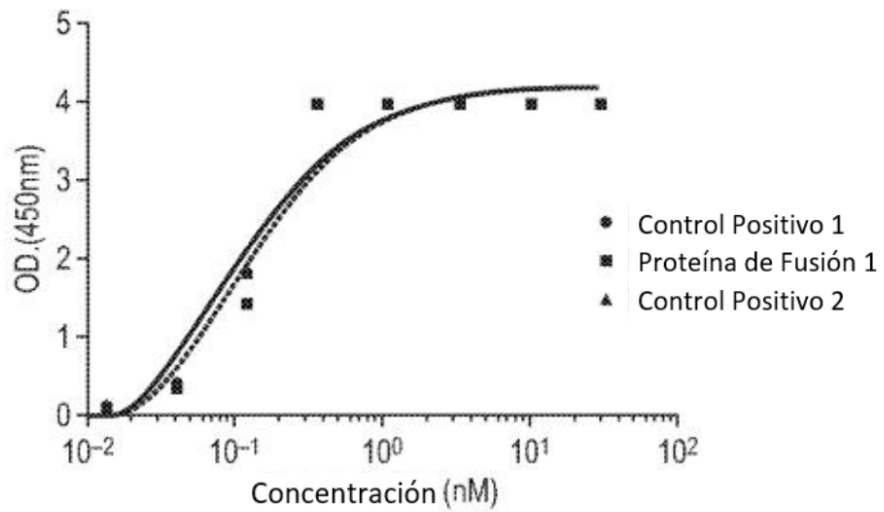


FIG. 3

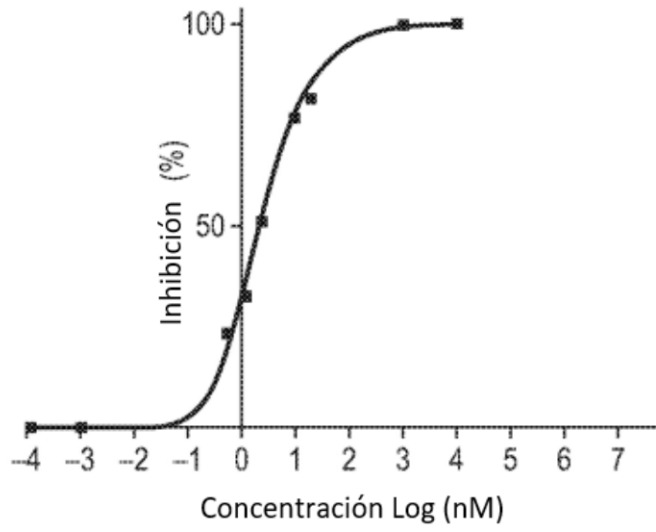


FIG. 4

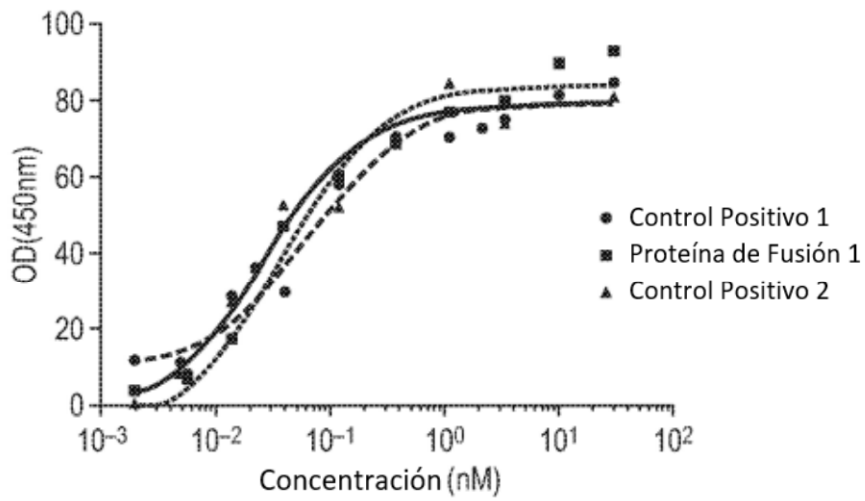


FIG. 5

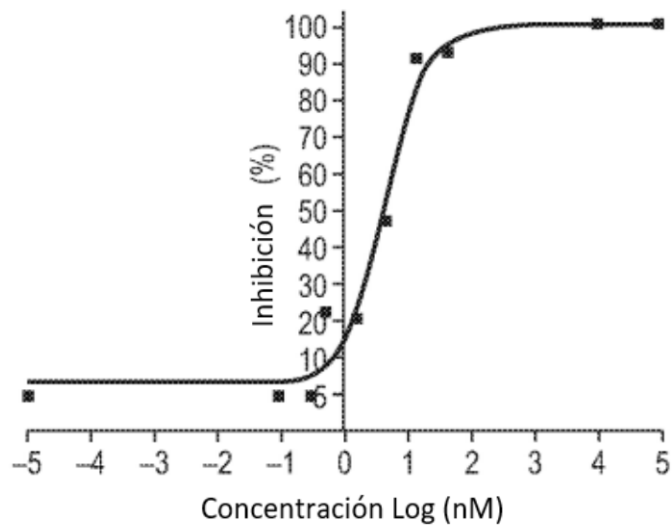


FIG. 6

Vehículo



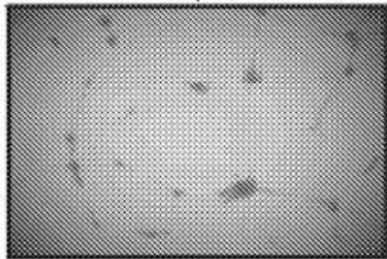
**FIG. 7A**

3  $\mu$ M



**FIG. 7E**

0.1  $\mu$ M



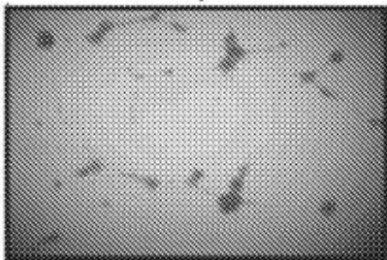
**FIG. 7B**

10  $\mu$ M



**FIG. 7F**

0.3  $\mu$ M



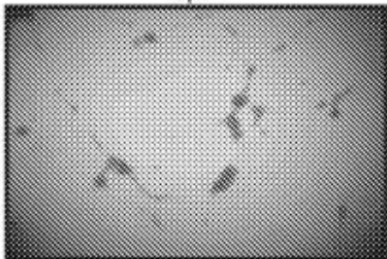
**FIG. 7C**

30  $\mu$ M



**FIG. 7G**

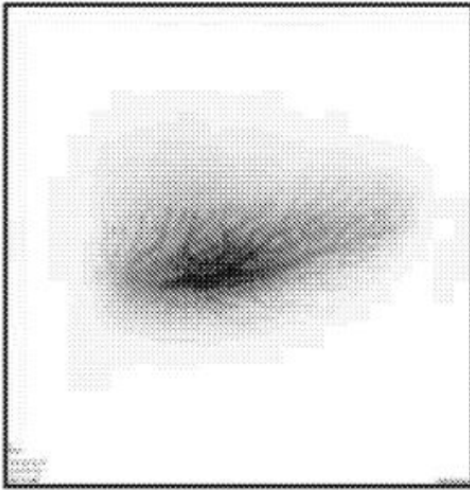
1  $\mu$ M



**FIG. 7D**

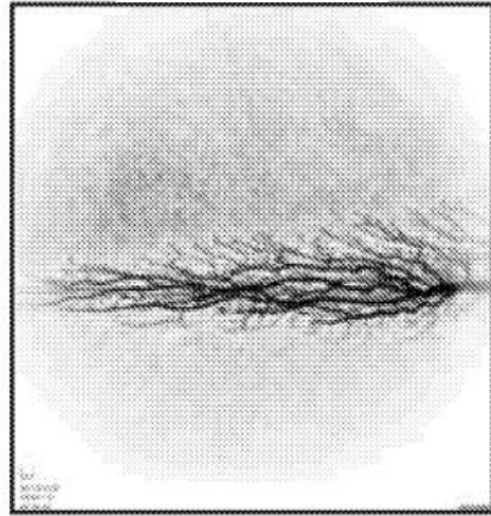


Vehículo



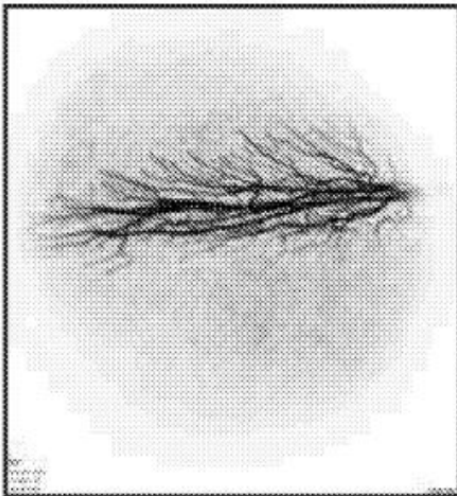
**FIG. 8A**

Control Positivo 2



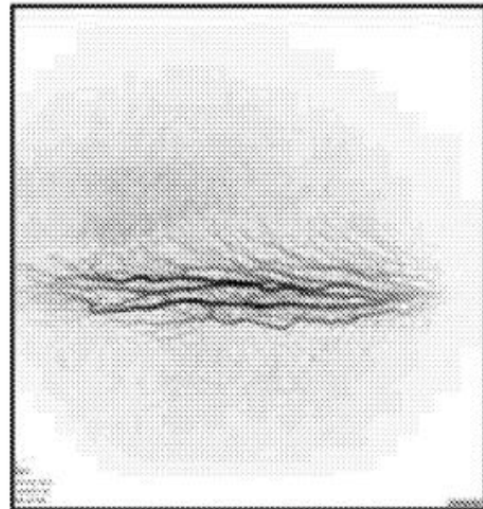
**FIG. 8B**

Control Positivo 6



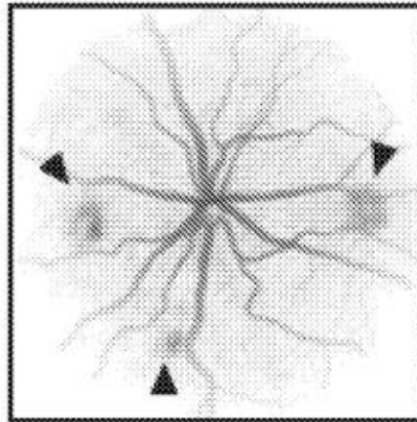
**FIG. 8C**

Proteína de Fusión 1



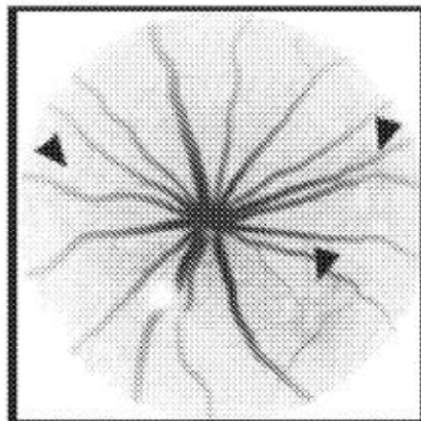
**FIG. 8D**

Vehículo



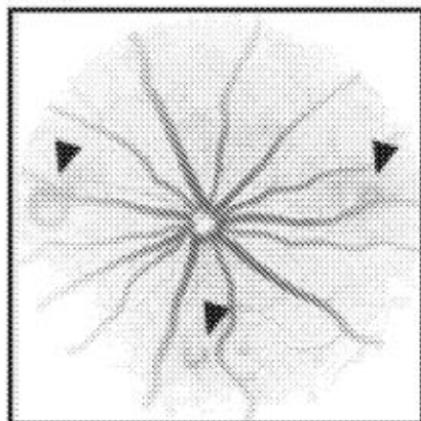
**FIG. 9A**

Control Positivo 2



**FIG. 9B**

Proteína de Fusión 1



**FIG. 9C**