

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 836 948**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 47/60 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2009 PCT/EP2009/064483**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2010 WO10060748**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2009 E 09756279 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2020 EP 2358746**

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

30 Prioridad:

03.11.2008 EP 08168166

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

28.06.2021

73 Titular/es:

**MOLECULAR PARTNERS AG (100.0%)
Wagistrasse 14
8952 Schlieren, CH**

72 Inventor/es:

**BINZ, HANS KASPAR;
FORRER, PATRIK y
STUMPP, MICHAEL TOBIAS**

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 836 948 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

5 Campo de la invención

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

10

Antecedentes de la invención

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

20

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

35

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

50

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

60

Además de los anticuerpos, pueden usarse otros dominios de unión para neutralizar un ligando o un receptor (Skerra, A., J. Mol. Recog. 13, 167-187, 2000; Binz, HK, Amstutz, P. y Plückthun, A., Nat. Biotechnol. 23, 1257-1268, 2005). Una de tales nuevas clases de dominios de unión se basa en dominios de repetición diseñados (documento de patente núm. WO 02/20565; Binz, HK, Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, MT, Briand, C., Forrer, P., Grütter, M. G., y Plückthun, A., Nat. Biotechnol. 22, 575-582, 2004). El documento de patente núm. WO 02/20565 describe cómo se

65

pueden construir grandes bibliotecas de proteínas con repeticiones y su aplicación general. No obstante, el documento de patente núm. WO 02/20565 no describe la selección de dominios de repetición con especificidad de unión para VEGF-Axxx ni motivos concretos de secuencias repetidas de dominios de repetición que se unen específicamente a VEGF-Axxx.

Dirigirse a VEGF-A con los agentes terapéuticos disponibles actualmente no es eficaz en todos los pacientes ni para todas las enfermedades (por ejemplo, cánceres que expresan EGFR). Incluso se ha hecho cada vez más evidente que el beneficio terapéutico asociado con la terapia dirigida a VEGF-A es complejo y probablemente implica múltiples mecanismos (Ellis y Hicklin, loc. cit.). Por ejemplo, fármacos anti-VEGF comercializados, tales como bevacizumab (Avastin®) o ranibizumab (Lucentis®) (ver documentos de patente núms. WO 96/030046, WO 98/045331 y WO 98/045332) o fármacos en desarrollo clínico, tales como VEGF-Trap® (documento de patente núm. WO 00/075319) no distingue entre las formas proangiogénicas y antiangiogénicas de VEGF-A, por lo que inhiben ambas. Como resultado, inhiben la angiogénesis, pero también privan a los tejidos sanos de un factor de supervivencia esencial, a saber, VEGF-Axxx, lo que resulta en citotoxicidad y efectos secundarios que limitan la dosis, que a su vez limitan la eficacia. Los efectos secundarios comunes a las terapias anti-VEGF-A actuales son perforaciones gastrointestinales, sangrado, hipertensión, eventos tromboembólicos y proteinuria (Kamba, T. y McDonald, D.M., Br. J. Cancer 96, 1788-95, 2007). Así, existe una necesidad de agentes antiangiogénicos mejorados para tratar el cáncer y otras afecciones patológicas.

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

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a una proteína de unión recombinante que comprende un dominio de repetición de anquirina, en donde dicho dominio de repetición de anquirina une VEGF-A165 con una Kd por debajo de 10^{-7} M e inhibe la unión de VEGF-A165 a VEGFR-2, y en donde dicho dominio de repetición de anquirina comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina

1D23G4TPLHLAA56GH7EIVEVLLK8GADVNA (SEQ ID NO: 5)
en donde

1 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, N, R, V, Y, E, H, I, K, L, Q, S y T;

2 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en S, A, N, R, D, F, L, P, T y Y;

3 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T, V, S, A, L y F;

4 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, F y H;

5 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en P, I, A, L, S, T, V y Y;

6 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, F, I, L, T y V;

7 representa el residuo de aminoácido P; y

8 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, H, N y Y. Particularmente una proteína de unión de ese tipo inhibe el brote de esferoides de HUVEC con un valor de IC₅₀ por debajo de 10 nM.

En una modalidad preferida de la proteína de unión de la presente invención, dicho dominio de repetición de anquirina comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina.

1D23G4TPLHLAA56GHLEIVEVLLK7GADVNA (SEQ ID NO: 6),

en donde dicho módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 6 va precedido del módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 5, y en donde para el motivo de secuencia de repetición de anquirina

1D23G4TPLHLAA56GHLEIVEVLLK7GADVNA (SEQ ID NO: 6)

1 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en H, Q, A, K, R, D, I, L, M, N, V y Y;

2 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Y, F y H;

3 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Q, F y T;

4 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, M, G, H, N y T;

5 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T, A, M, L y V;

6 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en I, L, V, D y T; y

7 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, H, N y Y.

Se describe además una proteína de unión recombinante que comprende un dominio de unión con especificidad por VEGF-A, que es un dominio de repetición, por ejemplo, un dominio de repetición de anquirina, particularmente un dominio de repetición de anquirina que comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina.

1D23G4TPLHLAA56GHLEIVEVLLK7GADVNA (SEQ ID NO: 1)

en donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 7, representan, independientemente entre sí, un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y.

5 En una modalidad preferida de la proteína de unión de la presente invención, dicho dominio de repetición de anquirina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio de repetición de anquirina seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 24 a 26.

10 En otra modalidad preferida de la proteína de unión de la presente invención, dicho dominio de repetición de anquirina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 24.

15 La invención se refiere además a proteínas de unión que comprenden una proteína de unión recombinante de la presente invención unida a uno o más porciones adicionales, por ejemplo, una porción que también se une a VEGFR-2 o a un objetivo diferente, una porción de marcaje, una porción que facilita la purificación de proteínas, o una porción que proporciona una farmacocinética mejorada, por ejemplo, una porción de polietilenglicol. En ciertas modalidades, la porción adicional es una porción proteica. En otras ciertas modalidades, la porción adicional es una porción polimérica no proteica.

20 La invención se refiere además a moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de unión recombinantes de la presente invención ya una composición farmacéutica que comprende una o más de las proteínas de unión o moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente.

25 Se describe un método de tratamiento del cáncer y otras afecciones patológicas, por ejemplo, enfermedades oculares tales como AMD o DME, mediante el uso de las proteínas de unión de la invención.

La invención se refiere además a la proteína de unión de la presente invención para el uso en el tratamiento de un trastorno ocular.

30 La invención se refiere además a la proteína de unión o al ácido nucleico de la presente invención para el uso en un método de tratamiento de la angiogénesis patológica en un mamífero, que incluye el hombre.

Breve descripción de las Figuras

35 *Figura 1. Unión específica de VEGF-A164 de perro de proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas seleccionadas.*

40 La interacción de clones seleccionados con VEGF-A164 de perro (VEGF) y una proteína de control negativo (MBP, proteína de unión a maltosa de *E. coli*) se muestra mediante ELISA de extracto crudo. El VEGF-A164 biotinilado de perro y MBP se inmovilizaron sobre NeutrAvidin. Los números se refieren a clones de DARPin individuales seleccionados en la presentación de ribosomas contra el VEGF-A164 de perro o el VEGF-A165 humano correspondiente. A = Absorbancia. Las barras blancas indican la unión al VEGF-A164 de perro, las barras negras muestran la unión de fondo no específica a MBP.

45 *Figura 2. Inhibición del crecimiento de esferoides mediante una DARPin seleccionada.*

La longitud de los brotes en un ensayo de inhibición del crecimiento de esferoides se muestra en presencia de varias concentraciones de (a) DARPin # 30 (SEQ ID NO: 29), un DARPin con especificidad para VEGF-Axxx, o (b) DARPin NC, un DARPin control negativo sin especificidad para VEGF-Axxx.

50 *Figura 3. Reconocimiento específico de isoformas de VEGF-A.*
Análisis de resonancia de plasmón de superficie (SPR) de proteínas de unión en isoformas de VEGF-A.

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

(c) y (d): análisis SPR de DARPin # 27 (SEQ ID NO: 16). Se aplicaron 250 nM de DARPin # 27 a una celda de flujo con VEGF-A164 de perro inmovilizado (c) o VEGF-A164b de perro (d) durante 100 segundos, seguido de lavado con flujo de tampón. RU = Unidades de resonancia.

60 *Figura 4. Inhibición eficaz de VEGF-A165 humano en el ojo de conejo.*

65 Modelo de conejo de fuga vascular para mostrar la eficacia de una DARPin al inhibir el VEGF-A165 humano en el ojo en comparación con Lucentis®. En el día 1, se aplica ya sea PBS, DARPin # 30 o Lucentis® mediante una inyección intravítrea en un ojo de cada conejo (ojo tratado). El día 4 o el día 30, ambos ojos de cada conejo se retaron mediante inyección intravítrea de 500 ng de VEGF-A165 humano. Todos los ojos se evaluaron 48 horas

después de la inyección de VEGF-A165 midiendo el contenido de fluoresceína en el vítreo y la retina de todos los ojos una hora después de la inyección intravenosa de fluoresceína sódica.

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

Descripción detallada de la invención

El VEGF-A de mamífero existe como dos familias de isoformas empalmadas alternativas: (i) las isoformas proangiogénicas "VEGF-Axxx" generadas por el empalme proximal del exón 8 y (ii) las isoformas antiangiogénicas "VEGF-Axxxb" generadas por empalme distal del exón 8. Preferentemente, el dominio de unión de acuerdo con la invención es específico para el VEGF-Axxx proangiogénico de origen de perro, conejo, mono o humano. Con mayor preferencia, el dominio de unión de acuerdo con la invención es específico para el VEGF-Axxx proangiogénico de origen humano. Lo más preferido, el dominio de unión de acuerdo con la invención es específico para VEGF-A165 humano.

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

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

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

El término "enlazador polipeptídico" se refiere a una secuencia de aminoácidos, que es capaz de unir, por ejemplo, dos dominios proteicos, una etiqueta polipeptídica y un dominio proteico, un dominio proteico y una porción no polipeptídica tales como polietilenglicol o dos etiquetas de secuencias. Tales dominios, etiquetas, porciones no polipeptídicas y enlazadores adicionales son conocidos por el experto en la técnica relevante. Se proporciona una lista de ejemplos en la descripción de la solicitud de patente núm. WO 02/20565. Ejemplos particulares de tales enlazadores son enlazadores de glicina-serina de longitudes variables; preferentemente, dichos enlazadores tienen una longitud entre 2 y 16 aminoácidos.

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

El término "proteína de unión" se refiere a una proteína que comprende uno o más dominios de unión, como se explica más abajo. Preferentemente, dicha proteína de unión comprende hasta cuatro dominios de unión. Con mayor preferencia, dicha proteína de unión comprende hasta dos dominios de unión. Con preferencia superlativa, dicha proteína de unión comprende solo un dominio de unión. Además, cualquier proteína de unión de este tipo puede comprender dominios proteicos adicionales que no son dominios de unión, porciones de multimerización, etiquetas polipeptídicas, enlazadores polipeptídicos y/o moléculas poliméricas no proteicas. Ejemplos de porciones de multimerización son regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina que se aparean para proporcionar dominios Fc de inmunoglobulina funcionales, y cremalleras o polipéptidos de leucina que comprenden un tiol libre

que forma un enlace disulfuro intermolecular entre dos de tales polipéptidos. Ejemplos de moléculas de polímero no proteico son hidroxietil almidón (HES), polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, o polioxialquileño.

El término "PEGilado" significa que una porción de PEG se une covalentemente a, por ejemplo, un polipéptido de la invención.

El término "dominio de unión" significa un dominio de proteína que presenta el mismo "pliegue" (disposición tridimensional) que un andamio de proteína y que tiene una propiedad predeterminada, como se define más abajo. Un dominio de unión de ese tipo puede obtenerse mediante técnicas de ingeniería de proteínas racionales, o más comúnmente, combinatorias, habilidades que se conocen en la técnica (Skerra, 2000, loc. Cit.; Binz y otros, 2005, loc. Cit.). Por ejemplo, un dominio de unión que tiene una propiedad predeterminada puede obtenerse mediante un método que comprende las etapas de (a) proporcionar una colección diversa de dominios proteicos que exhiben el mismo pliegue que un andamio de proteína como se define más abajo; y (b) tamizar dicha colección diversa y/o seleccionar de dicha colección diversa para obtener al menos un dominio de proteína que tenga dicha propiedad predeterminada. La colección diversa de dominios proteicos puede proporcionarse mediante varios métodos de acuerdo con el sistema de tamizaje y/o selección que se esté usando, y puede comprender el uso de métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como presentación de fagos o presentación de ribosomas.

El término "andamio de proteína" significa una proteína con áreas superficiales expuestas en las que las inserciones, sustituciones o delecciones de aminoácidos son altamente tolerables. Ejemplos de andamios de proteínas que pueden usarse para generar dominios de unión de la presente invención son anticuerpos o fragmentos de estos tales como fragmentos Fv o Fab de cadena sencilla, proteína A de *Staphylococcus aureus*, proteína de unión a bilina de *Pieris brassicae* u otras lipocalinas, proteínas con repetición de anquirina, u otras proteínas con repeticiones y fibronectina humana. Los expertos en la técnica conocen los andamios de proteínas (Binz y otros, 2005, loc. Cit.; Binz y otros, 2004, loc. Cit.).

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

Preferentemente, la proteína de unión de la invención no es un anticuerpo o un fragmento de este, tales como los fragmentos Fab o scFv. El experto en la técnica conoce bien los anticuerpos y sus fragmentos.

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

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

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

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

Se prefiere además un dominio de unión desprovisto de un residuo Cys libre. Un residuo de Cys libre no se involucra en la formación de un enlace disulfuro. Incluso se prefiere más un dominio de unión libre de cualquier residuo Cys.

Un dominio de unión preferido de la invención es un dominio de repetición o un dominio de repetición diseñado, preferentemente como se describe en el documento de patente núm. WO 02/20565.

Un dominio de unión particularmente preferido es un dominio de repetición de anquirina diseñado (Binz, HK y otros, 2004, loc. Cit.), preferentemente como se describe en el documento de patente núm. WO 02/20565. En los Ejemplos se muestran ejemplos de dominios de repeticiones de anquirina diseñados.

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

El término "proteínas con repeticiones" se refiere a una proteína que comprende uno o más dominios de repeticiones. Preferentemente, cada una de dichas proteínas con repeticiones comprende hasta cuatro dominios de repeticiones. Con mayor preferencia, cada una de dichas proteínas con repeticiones comprende hasta dos dominios de repeticiones. Con preferencia superlativa, cada una de las proteínas con repeticiones comprende solo un dominio de repeticiones. Además, dicha proteína con repeticiones puede comprender dominios proteicos sin repetición adicionales, etiquetas polipeptídicas y/o enlazadores polipeptídicos.

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

El término "proteína con repeticiones diseñada" y "dominio de repeticiones diseñado" se refieren a una proteína con repeticiones o dominio de repeticiones, respectivamente, obtenidos como resultado del procedimiento inventivo explicado en la solicitud de patente núm. WO 02/20565. Las proteínas con repeticiones diseñadas y los dominios de repeticiones diseñados son sintéticos y no de la naturaleza. Son proteínas o dominios artificiales, respectivamente, obtenidos por expresión de ácidos nucleicos diseñados correspondientemente. Preferentemente, la expresión se realiza en células eucariotas o procariotas, tales como células bacterianas, o mediante el uso de un sistema de expresión *in vitro* sin células.

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

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

El término "residuos marco" se refiere a los residuos de aminoácidos de las unidades repetidas, o los residuos de aminoácidos correspondientes de los módulos de repetición, que contribuyen a la topología de plegado, es decir, que contribuyen al pliegue de dicha unidad de repetición (o módulo) o que contribuye a la interacción con una unidad (o módulo) vecino. Tal contribución podría ser la interacción con otros residuos en la unidad de repetición (módulo), o la influencia sobre la conformación de la cadena principal del polipéptido como se encuentra en las hélices α o láminas β , o tramos de aminoácidos que forman polipéptidos o bucles lineales.

El término "residuos de interacción objetivo" se refiere a residuos de aminoácidos de las unidades de repetición, o los residuos de aminoácidos correspondientes de los módulos de repetición, que contribuyen a la interacción con sustancias objetivo. Tal contribución podría ser la interacción directa con las sustancias objetivo, o la influencia sobre otros residuos que interactúan directamente, por ejemplo, estabilizando la conformación del polipéptido de una unidad de repetición (módulo) para permitir o mejorar la interacción de residuos que interactúa directamente con dicho objetivo. Tales residuos de interacción de marco y objetivo pueden identificarse mediante el análisis de los datos estructurales obtenidos por métodos fisicoquímicos, tales como la cristalografía de rayos X, la espectroscopia de NMR y/o CD, o mediante la comparación con información estructural conocida y relacionada bien conocida por los expertos de la biología estructural y/o bioinformática.

Preferentemente, las unidades de repetición usadas para la deducción de un motivo de secuencia con repeticiones son unidades de repetición homólogas, en donde las unidades de repetición comprenden el mismo motivo estructural y en donde más del 70 % de los residuos estructurales de dichas unidades de repetición son homólogos entre sí. Preferentemente, más del 80 % de los residuos de marco de dichas unidades de repetición son homólogos. Con preferencia superlativa, más del 90 % de los residuos marco de dichas unidades de repetición son homólogos. Los programas informáticos para determinar el porcentaje de homología entre polipéptidos, tales como Fasta, Blast o Gap, son conocidos por el experto en la técnica. Además, preferentemente, las unidades de repetición usadas para

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

El término "motivo de secuencia de repetición" se refiere a una secuencia de aminoácidos, que se deduce de una o más unidades de repetición. Preferentemente, dichas unidades de repetición son de dominios de repetición que tienen especificidad de unión para el mismo objetivo. Tales motivos de secuencia de repetición comprenden posiciones de residuos de marco y posiciones de residuos de interacción objetivo. Dichas posiciones de residuos de marco corresponden a las posiciones de los residuos de marco de las unidades de repetición. Asimismo, dichas posiciones de los residuos de interacción con el objetivo corresponden a las posiciones de los residuos de interacción objetivo de las unidades de repetición. Los motivos de secuencia de repetición comprenden posiciones fijas y posiciones aleatorias. El término "posición fija" se refiere a una posición de aminoácido en un motivo de secuencia de repetición, en donde dicha posición se establece en un aminoácido particular. Muy frecuentemente, tales posiciones fijas corresponden a las posiciones de los residuos de marco y/o las posiciones de los residuos de interacción objetivo que son específicos para un determinado objetivo. El término "posición aleatoria" se refiere a una posición de aminoácido en un motivo de secuencia de repetición, en donde se permiten dos o más aminoácidos en dicha posición de aminoácido, por ejemplo, en donde se permite cualquiera de los veinte aminoácidos habituales de origen natural, o en donde se permiten la mayoría de los veinte aminoácidos de origen natural, tales como los aminoácidos distintos de la cisteína, o los aminoácidos distintos de la glicina, cisteína y prolina. Muy frecuentemente, tales posiciones aleatorias corresponden a las posiciones de los residuos de interacción objetivo. Sin embargo, también pueden aleatorizarse algunas posiciones de los residuos de marco.

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

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

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

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

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

El término "módulo de protección" se refiere a un polipéptido fusionado al módulo de repetición N o C terminal de un dominio de repetición, en donde dicho módulo de protección forma interacciones terciarias estrechas con dicho módulo de repetición, proporcionando así una caperuza que protege el núcleo hidrófobo de dicho módulo de repetición en el lado que no está en contacto con el módulo de repetición consecutivo del disolvente. Dicho módulo de protección N- y/o C-terminal puede ser, o puede derivarse de, una unidad de protección u otro dominio encontrado en una proteína con repeticiones de origen natural adyacente a una unidad de repetición. El término "unidad de protección" se refiere a un polipéptido plegado de origen natural, en donde dicho polipéptido define una unidad estructural particular que se fusiona en el extremo N o C terminal a una unidad de repetición, en donde dicho polipéptido forma interacciones terciarias estrechas con dicha unidad de repetición proporcionando de ese modo una

caperuza que protege el núcleo hidrófobo de dicha unidad de repetición en un lado del disolvente. Tales unidades de protección pueden tener similitudes de secuencia con dicho motivo de secuencia de repetición. Los módulos de protección y las repeticiones de protección se describen en el documento de patente núm. WO 02/020565. Por ejemplo, el módulo de protección N terminal de SEQ ID NO: 21 se codifica por los aminoácidos desde la posición 1 a la 32. También se prefiere un módulo de protección N terminal de ese tipo que tiene un residuo de glicina o aspartato en la posición 5.

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

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

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

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

Se prefieren además las proteínas de unión o los dominios de unión de origen no natural.

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

La invención se refiere a una proteína de unión que comprende un dominio de unión, en donde dicho dominio de unión inhibe la unión de VEGF-Axxx a VEGFR-2 y en donde dicha proteína de unión y/o dominio de unión tiene una temperatura de desnaturalización de punto medio (T_m) superior a 40 °C tras el despliegue térmico y forma menos del 5 % (p/p) de agregados insolubles a concentraciones de hasta 10 g/L cuando se incuban a 37 °C durante 1 día en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Un dominio de unión puede inhibir la unión de VEGF-Axxx a VEGFR-2 ya sea uniéndose a VEGF-Axxx o al unirse a VEGFR-2 de manera que la constante de disociación aparente (K_d) entre VEGF-Axxx y VEGFR-2 se aumenta más de 10^2 veces, preferentemente más de 10^3 veces, con mayor preferencia más de 10^4 veces, con mayor preferencia más de 10^5 veces, y con preferencia superlativa más de 10^6 veces. Preferentemente, la K_d para la interacción del dominio de unión a ya sea VEGF-Axxx o VEGFR-2 es por debajo de 10^{-7} M, preferentemente por debajo de 10^{-8} M, con mayor preferencia por debajo de 10^{-9} M, con mayor preferencia por debajo de 10^{-10} M, y con preferencia superlativa por debajo de 10^{-11} M. Los métodos para determinar las constantes de disociación de las interacciones proteína-proteína, tales como tecnologías basadas en resonancia de plasmón de superficie (SPR), son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Un dominio de unión preferido se une a VEGF-Axxx. Incluso se prefiere más un dominio de unión que se une a VEGF-A165 humano.

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

Preferentemente, la proteína de unión y/o el dominio de unión tiene una temperatura de desnaturalización de punto medio (T_m) por encima de 45 °C, con mayor preferencia por encima de 50 °C, con mayor preferencia por encima de 55 °C, y con preferencia superlativa por encima de 60 °C tras el despliegue térmico. Una proteína de unión o un dominio de unión de la invención posee una estructura secundaria y terciaria definida en condiciones fisiológicas. El despliegue térmico de un polipéptido de ese tipo resulta en una pérdida de su estructura terciaria y secundaria, que puede ser seguida, por ejemplo, por mediciones de dicroísmo circular (CD). La temperatura de desnaturalización del punto medio de una proteína de unión o dominio de unión tras el despliegue térmico corresponde a la temperatura en el punto medio de la transición cooperativa en el tampón fisiológico tras la desnaturalización por calor de dicha proteína o dominio aumentando lentamente la temperatura de 10 °C a aproximadamente 100 °C. La determinación de una temperatura de desnaturalización de punto medio tras el despliegue térmico es bien conocida por el experto en la técnica. Esta temperatura de desnaturalización de punto medio de una proteína de unión o dominio de unión tras el despliegue térmico es indicativa de la estabilidad térmica de dicho polipéptido.

Se prefiere también una proteína de unión y/o un dominio de unión que forme menos del 5 % (p/p) de agregados insolubles en concentraciones de hasta 20 g/l, preferentemente hasta 40 g/l, con mayor preferencia hasta 60 g/L, incluso con mayor preferencia hasta 80 g/L, y con preferencia superlativa hasta 100 g/L cuando se incubaba durante más de 5 días, preferentemente durante 10 días, con mayor preferencia durante 20 días, con mayor preferencia durante 40 días, y con preferencia superlativa durante 100 días a 37 °C en PBS. La formación de agregados insolubles puede detectarse mediante la aparición de precipitaciones visuales, filtración en gel o dispersión dinámica de la luz, que aumenta fuertemente con la formación de agregados insolubles. Los agregados insolubles pueden eliminarse de una muestra de proteína mediante centrifugación a 10 000 xg durante 10 minutos. Preferentemente, una proteína de unión y/o un dominio de unión forma menos del 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,2 %, 0,1 % o 0,05 % (p/p) de agregados insolubles en las condiciones de incubación mencionadas a 37 °C en PBS. Los porcentajes de agregados insolubles pueden determinarse mediante la separación de los agregados insolubles de la proteína soluble, seguido de la determinación de las cantidades de proteína en la fracción soluble e insoluble mediante métodos de cuantificación estándar.

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

En una modalidad particular, la invención se refiere a una proteína de unión que comprende un dominio de unión que inhibe la unión de VEGF-Axxx a VEGFR-2 y que tiene la temperatura de desnaturalización de punto medio indicada o preferida y las propiedades de no agregación como se definen anteriormente, en donde dicha proteína de unión inhibe el brote de esferoides de HUVEC con un valor de IC_{50} por debajo de 100 nM.

El término "HUVEC" significa células endoteliales de la vena umbilical humana, que pueden aislarse de la vena umbilical humana normal y que responden a la estimulación de VEGF-A.

Los expertos en la técnica conocen bien los ensayos para medir el brote de esferoides de HUVEC, tal como el descrito en el Ejemplo 2.

Un valor de IC_{50} es la concentración de una sustancia, tal como una proteína de unión o dominio de unión, que se requiere para la inhibición *in vitro* del 50 % de un parámetro experimental determinado, tal como el brote de esferoides de HUVEC. Los valores de IC_{50} pueden determinarse fácilmente por la persona experta en la técnica (Korff T. y Augustin HG, J. Cell Biol. 143 (5), 1341-1352, 1998).

Se prefiere una proteína de unión y/o dominio de unión que inhibe el brote de esferoide de HUVEC con un valor de IC_{50} por debajo de 10 nM, preferentemente por debajo de 1 nM, con mayor preferencia por debajo de 0,1 nM, y con preferencia superlativa por debajo de 0,05 nM.

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

Particularmente, la invención se refiere a una proteína de unión que comprende un dominio de unión que inhibe la unión de VEGF-Axxx a VEGFR-2 y que tiene la temperatura de desnaturalización de punto medio indicada o preferida y las propiedades de no agregación como se definió anteriormente, en donde la K_d para la interacción de dicho dominio de unión a VEGF-Axxx es al menos 10 veces mayor en comparación con la K_d para la interacción de dicho dominio de unión con el correspondiente VEGF-Axxx.

Preferentemente, la K_d para la interacción del dominio de unión a VEGF-Axxx es de al menos 10^2 veces superior, preferentemente 10^3 veces superior, con mayor preferencia 10^4 veces superior, con mayor preferencia 10^5 veces superior.

superior, y con preferencia superlativa 10^6 veces superior en comparación con la K_d para la interacción del dominio de unión con el correspondiente VEGF-Axxx.

También preferentemente, la K_d para la interacción de un dominio de unión a VEGF-Axxx está por encima de 10^3 nM y la K_d para la interacción del dominio de unión a VEGF-Axxx está por debajo de 10 o 1 nM.

La K_d para la interacción de un dominio de unión preferido para VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF o PDGF está por encima de 1 nM, preferentemente por encima de 10 nM, con mayor preferencia por encima de 10^2 nM, incluso con mayor preferencia por encima de 10^3 nM, y con preferencia superlativa por encima de 10^4 nM.

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

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

Se prefiere una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina

1D23G4TPHLAA56GHLEIVEVLLK7GADVNA (SEQ ID NO: 1)

en donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 7, representan, independientemente entre sí, un residuo de aminoácido seleccionado del grupo A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y.

Se prefiere particularmente una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina.

1D23GWTPHLAA45GHLEIVEVLLK6GADVNA (SEQ ID NO: 2)

en donde

1 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, T, N, R, V, A, I, K, Q, S e Y; preferentemente F, T, N, R y V; con mayor preferencia F y T;

2 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, Y, H y F; preferentemente W, Y y H;

3 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en M, I, F y V; preferentemente M e I;

4 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en H, A, K, G, L, M, N, T, V, W e Y; preferentemente H, A y K;

5 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en E, Y, F, V, H, I, L, N y R; preferentemente E, Y, F, V y H; con mayor preferencia E, Y, F y V; y

6 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, N, Y, H y R.

Se prefiere además una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina.

1D23G4TPHLAA56GHLEIVEVLLK7GADVN8 (SEQ ID NO: 3)

en donde

1 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T, E, A, D, F, K, N, Q, R, S, W e Y; preferentemente T y E;

2 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en V, F, Y, A, H, I, K, R, T y W; preferentemente V, F e Y;

3 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en S, A, N, F y M; preferentemente S, A y N; con mayor preferencia S y A;

4 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Y, F, S y W;

5 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, S, L e Y; preferentemente A y S;

6 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D, N, M, A, I, K e Y; preferentemente D, N y M; con mayor preferencia D y N;

7 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, Y, H, N y D; y

8 representa el residuo de aminoácido T o A.

Se prefiere además una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina.

1D23GWTPHL4ADLG5LEIVEVLLK6GADVN7 (SEQ ID NO: 4)
en donde

- 1 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en K, T e Y;
- 2 representa el residuo de aminoácido N o M;
- 3 representa el residuo de aminoácido T o F;
- 4 representa el residuo de aminoácido S o A;
- 5 representa el residuo de aminoácido H o R;
- 6 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, Y, H y N; y
- 7 representa el residuo de aminoácido A o T.

Incluso se prefiere más una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 3, en donde dicho módulo de repetición se precede por un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 2 y/o seguido de un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 4.

Se prefiere además una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina.

1D23G4TPHLAA56GH7EIVEVLLK8GADVNA (SEQ ID NO: 5)
en donde

- 1 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, N, R, V, Y, E, H, I, K, L, Q, S y T; preferentemente A, N, R, V e Y; con mayor preferencia A y R;
- 2 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en S, A, N, R, D, F, L, P, T e Y; preferentemente S, A, N y R;
- 3 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T, V, S, A, L y F; preferentemente T, V, S, A y L; con mayor preferencia T, V y S;
- 4 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, F y H;
- 5 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en P, I, A, L, S, T, V e Y; preferentemente P e I;
- 6 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, F, I, L, T y V;
- 7 representa el residuo de aminoácido L o P; y
- 8 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, H, N y Y.

Se prefiere además una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina.

1D23G4TPHLAA56GHLEIVEVLLK7GADVNA (SEQ ID NO: 6)
en donde

- 1 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en H, Q, A, K, R, D, I, L, M, N, V e Y; preferentemente H, Q, A, K y R; con mayor preferencia A y R;
- 2 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Y, F y H;
- 3 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Q, F y T;
- 4 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, M, G, H, N y T; preferentemente W y M;
- 5 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T, A, M, L y V; preferentemente T, A y M;
- 6 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en I, L, V, D y T; preferentemente I, L y V; y
- 7 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, H, N y Y.

Incluso se prefiere más una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 6, en donde dicho módulo de repetición se precede por un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 5.

Se prefiere además una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina.

1D23GWTPHLAA45GHLEIVEVLLK6GADVNA (SEQ ID NO: 7)

en donde

- 1 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en K, M, N, R y V;
 2 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Y, H, M y V;
 5 3 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, L, M y V;
 4 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R, H, V, A, K y N; preferentemente R, H, V y A;
 5 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, D, H, T, Y, M y K; preferentemente F, D, H, T e Y; y
 10 6 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, H, N y Y.

Se prefiere además una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina.

- 15 1D23G4TPLHLAA56GHLEIVEVLLK7GADVN8 (SEQ ID NO: 8)
 en donde

- 1 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T, A, H, I, N y S;
 2 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, I, Q, R, V y N;
 20 3 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, G, N, Q y V;
 4 representa el residuo de aminoácido W o Y;
 5 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, S, T y M;
 6 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en N, V, S, F, M y W;
 7 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, H, N e Y; y
 25 8 representa el residuo de aminoácido T o A.

Se prefiere además una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina.

- 30 1D23G4TPLHL5A67GHLEIVEVLLK8GADVNA (SEQ ID NO: 9)
 en donde

- 1 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en K, A, V y N;
 2 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en N, I e Y;
 35 3 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T, F, Y y W;
 4 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, D e Y;
 5 representa el residuo de aminoácido S o A;
 6 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D, I y M;
 7 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L, T e Y; y
 40 8 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, H, Y y N;

Incluso se prefiere más una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 8, en donde dicho módulo de repetición se precede por un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 7 y/o seguido de un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 9.

Se prefiere además una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina.

- 50 1DFK2DTPLHLAA34GH5 EIVEVLLK 6 GADVNA (SEQ ID NO: 10)
 en donde

- 1 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L, S y T;
 55 2 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en G, S y C; preferentemente G y S;
 3 representa el residuo de aminoácido S o A;
 4 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Q, S, M y N; preferentemente Q y S;
 60 5 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L, M y Q; y
 6 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, H, N, Y y D.

Se prefiere además una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina.

- 65 1D2L34TPLHLA567GHLEIVEVLLK8GADVNA (SEQ ID NO: 11)

en donde

- 1 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Y, H, F, I, L y W; preferentemente Y y H;
- 2 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en M, D, I, L, V; preferentemente M y D;
- 3 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en G, S y V;
- 4 representa el residuo de aminoácido W o F;
- 5 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, G y T;
- 6 representa el residuo de aminoácido D o W;
- 7 representa el residuo de aminoácido L o F; y
- 8 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, H, N y Y.

Incluso se prefiere más una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 11, en donde dicho módulo de repetición se precede por un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 10.

Se prefiere además una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina.

1D23G4TPL5LAA67GHLEIVEVLLK8GADVNA (SEQ ID NO: 12)
en donde

- 1 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en K, S, I, N, T y V; preferentemente K y S;
- 2 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en K, N, W, A, H, M, Q y S; preferentemente K y N;
- 3 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, Q, L, H y V; preferentemente F, Q y L;
- 4 representa el residuo de aminoácido F o T;
- 5 representa el residuo de aminoácido Q o H;
- 6 representa el residuo de aminoácido Y o S;
- 7 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en N, H, Y y M; preferentemente N y H; y
- 8 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, H, N y Y.

Se prefiere además una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina.

1D23GWT4LHLAADLG5LEIVEVLLK6GADVNA (SEQ ID NO: 13)
en donde

- 1 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en F, Y, H y W; preferentemente F, Y y H;
- 2 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en I, M, D y V; preferentemente I, M y D;
- 3 representa el residuo de aminoácido F o L;
- 4 representa el residuo de aminoácido L o P;
- 5 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en H, L e Y; y
- 6 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, H, N, C e Y.

Incluso se prefiere más una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición de anquirina o dicho dominio de repetición de anquirina diseñado comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 13, en donde dicho módulo de repetición se precede por un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 12.

Otra modalidad preferida es una proteína de unión recombinante que comprende al menos un dominio de repetición con especificidad de unión para VEGF-Axxx, en donde dicho dominio de repetición compite por la unión a VEGF-Axxx con un dominio de repetición seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, 22, 23, 29, 30 y 33, o un dominio de repetición seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16, 22, 23, 29, 30, 33, 34, 36, 39 y 40.

En una modalidad preferida de la proteína de unión de la presente invención, dicho dominio de repetición compite por la unión a VEGF-A165 humano con un dominio de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 29.

El término "competir por la unión" significa la incapacidad de dos dominios de unión diferentes de la invención para unirse simultáneamente al mismo objetivo, mientras que ambos pueden unirse al mismo objetivo individualmente. Así, estos dos dominios de unión compiten por unirse a dicho objetivo. Los métodos, tales como el ELISA de competición o las mediciones de SPR de competición (por ejemplo, mediante el uso del instrumento Proteon de BioRad), para determinar si dos dominios de unión compiten por la unión a un objetivo, son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Una proteína de unión recombinante que compite por la unión a VEGF-Axxx con una proteína con repeticiones seleccionada puede identificarse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de competición (ELISA).

Otra modalidad preferida es una proteína de unión recombinante que comprende un dominio de repetición con especificidad de unión para VEGF-Axxx seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 14 a 33, o seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 14 a 40.

Se prefiere además una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición con especificidad de unión para VEGF-Axxx comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio de repetición de dicho grupo de dominios de repetición. Preferentemente, dicha identidad de secuencia de aminoácidos es al menos 75 %, con mayor preferencia 80%, con mayor preferencia 85 %, con mayor preferencia 90% y con preferencia superlativa 95 %.

Se prefiere además una proteína de unión recombinante, en donde dicho dominio de repetición con especificidad de unión para VEGF-Axxx comprende un módulo de repetición que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un módulo de repetición de un dominio de repetición de dicho grupo de dominios de repetición. Preferentemente, dicha identidad de secuencia de aminoácidos es al menos 75 %, con mayor preferencia 80%, con mayor preferencia 85 %, con mayor preferencia 90% y con preferencia superlativa 95 %.

En una modalidad preferida de la proteína de unión de la presente invención, dicho dominio de repetición de anquirina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio de repetición de anquirina seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 24 a 26.

En una modalidad preferida de la proteína de unión de la presente invención, dicho dominio de repetición de anquirina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 24.

En una modalidad preferida de la proteína de unión de la presente invención, dicho dominio de repetición de anquirina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 24.

En una modalidad preferida de la proteína de unión de la presente invención, dicho dominio de repetición de anquirina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 24.

En una modalidad preferida adicional de una proteína de unión recombinante que comprende un dominio de repetición de acuerdo con la presente invención, uno o más de los residuos de aminoácidos de los módulos de repetición de dicho dominio de repetición se intercambian por un residuo de aminoácido que se encuentra en la posición correspondiente en la alineación de una unidad de repetición. Preferentemente, se intercambian hasta 30 % de los residuos de aminoácidos, con mayor preferencia, hasta 20 %, e incluso con mayor preferencia, se intercambian hasta 10 % de los residuos de aminoácidos. Con preferencia superlativa, dicha unidad de repetición es una unidad de repetición de origen natural. Incluso con mayor preferencia, dicho dominio de repetición tiene especificidad de unión para VEGF-Axxx o VEGFR-2.

Aún en otra modalidad particular, hasta 30 % de los residuos de aminoácidos, con mayor preferencia, hasta 20 %, e incluso con mayor preferencia, hasta 10% de los residuos de aminoácidos se intercambian con aminoácidos que no se encuentran en las correspondientes posiciones de unidades de repetición.

En modalidades adicionales, cualquiera de las proteínas o dominios de unión a VEGF-Axxx descritos en la presente descripción puede unirse covalentemente a uno o más porciones adicionales, que incluyen por ejemplo, una porción que también se une a VEGFR-2 (por ejemplo, un polipéptido de unión a VEGFR-2), una porción que se une a un objetivo diferente, tales como PIGF, albúmina de suero humano, un receptor celular (por ejemplo, Her2), una inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1), una citoquina (por ejemplo, TNF-alfa o una interleucina) o un factor de crecimiento para crear un agente de unión de especificidad dual, una porción de marcado (por ejemplo, un marcador fluorescente tal como fluoresceína o un trazador radiactivo), un grupo que facilita la purificación de proteínas (por ejemplo, una pequeña etiqueta de péptido, tal como una etiqueta de His o strep), una porción que proporciona funciones efectoras para mejorar la eficacia terapéutica (por ejemplo, la parte Fc de un anticuerpo para proporcionar

citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, una porción de proteína tóxica tal como la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (ETA) o un agente tóxico molecular pequeño como maitansinoides o agentes alquilantes de ADN) o una porción que proporciona una farmacocinética mejorada. La farmacocinética mejorada puede evaluarse de acuerdo con la necesidad terapéutica percibida. Frecuentemente, es deseable aumentar la biodisponibilidad y/o aumentar el tiempo entre dosis, posiblemente aumentando el tiempo que una proteína permanece disponible en el suero después de la dosificación. En algunos casos, es deseable mejorar la continuidad de la concentración sérica de la proteína a lo largo del tiempo (por ejemplo, disminuir la diferencia en la concentración sérica de la proteína poco después de la administración y poco antes de la siguiente administración). Las fracciones que tienden a retardar la eliminación de una proteína de la sangre incluyen hidroxietil almidón (HES), polietilenglicol (PEG), azúcares (por ejemplo, ácido siálico), fracciones proteicas bien toleradas (por ejemplo, Fragmento Fc o albúmina sérica), y dominios de unión o péptidos con especificidad y afinidad por abundantes proteínas séricas, tales como fragmentos Fc de anticuerpos o albúmina sérica. La proteína de unión recombinante de la invención puede unirse a una porción que reduce la velocidad de eliminación de polipéptidos en un mamífero (por ejemplo, en ratón, rata o ser humano) en más de tres veces con respecto a los polipéptidos no modificados.

Pueden unirse uno o más porciones de polietilenglicol en diferentes posiciones en la proteína de unión, y tal unión puede lograrse mediante reacción con aminos, tioles u otros grupos reactivos adecuados. La unión de porciones de polietilenglicol (PEGilación) puede estar dirigida al sitio, en donde se introduce un grupo reactivo adecuado en la proteína para crear un sitio donde se produce preferentemente la PEGilación, o está presente originalmente en la proteína de unión. El grupo tiol puede estar presente en un residuo de cisteína; y el grupo amina puede ser, por ejemplo, una amina primaria que se encuentra en el extremo N-terminal del polipéptido o un grupo amina presente en la cadena lateral de un aminoácido, tal como lisina o arginina. En una modalidad preferida, la proteína de unión se modifica para que tenga un residuo de cisteína en la posición deseada, permitiendo la PEGilación dirigida al sitio en la cisteína, por ejemplo, mediante reacción con un derivado de polietilenglicol que lleva una función maleimida. La porción de polietilenglicol puede variar ampliamente en peso molecular (es decir, de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 100 kDa) y puede ser ramificado o lineal. Preferentemente, el polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 kDa, preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 kDa, incluso con mayor preferencia de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 kDa y con preferencia superlativa de aproximadamente 20 kDa.

En una modalidad adicional, la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de unión recombinantes particulares. Además, se proporciona un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico.

Además, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una o más de las proteínas de unión mencionadas anteriormente, particularmente proteínas de unión recombinantes que comprenden dominios de repetición, o moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de unión recombinantes particulares, y opcionalmente se proporciona un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables son conocidos por el experto en la técnica y se explican con más detalle a continuación. Se describe incluso, además, una composición de diagnóstico que comprende una o más de las proteínas de unión recombinantes mencionadas anteriormente, particularmente proteínas de unión que comprenden dominios de repetición.

La proteína de unión de la invención suprime o previene la angiogénesis patológica inducida por VEGF, la fuga vascular (edema), la hipertensión pulmonar, la formación de tumores y/o los trastornos inflamatorios. Con "supresión" se entiende que la proteína recombinante previene las patologías mencionadas hasta cierto punto, por ejemplo, al 10 % o 20 %, con mayor preferencia 50 %, particularmente 70 %, 80 % o 90 %, o incluso al 95 %.

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

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

El término "angiogénesis patológica" se refiere a la formación y crecimiento de vasos sanguíneos durante el mantenimiento y la progresión de varios estados patológicos. Ejemplos particulares de angiogénesis patológica se encuentran en vasos sanguíneos (aterosclerosis, hemangioma, hemangioendotelioma), huesos y articulaciones (artritis reumatoide, sinovitis, destrucción de huesos y cartílagos, osteomielitis, crecimiento del pannus, formación de

osteofitos, neoplasias y metástasis), piel (verrugas, granulomas piogénicos, crecimiento del cabello, sarcoma de Kaposi, queloides cicatriciales, edema alérgico, neoplasias), hígado, riñón, pulmón, oído y otros epitelios (procesos inflamatorios e infecciosos que incluyen hepatitis, glomerulonefritis, neumonía; y asma, pólipos nasales, otitis, trastornos de trasplante, trastornos de la regeneración hepática, neoplasias y metástasis), útero, ovario y placenta (hemorragia uterina disfuncional debido a dispositivos anticonceptivos intrauterinos, formación de quistes foliculares, síndrome de hiperestimulación ovárica, endometriosis, neoplasias), cerebro, nervios y ojos (retinopatía del prematuro, retinopatía diabética, trastornos coroideos y otros trastornos intraoculares, leucomalacia, neoplasias y metástasis), corazón y músculo esquelético debido a sobrecarga de trabajo, tejido adiposo (obesidad), órganos endocrinos (tiroiditis, agrandamiento de la tiroides, trastornos del trasplante de páncreas), hematopoyesis (síndrome de Kaposi en el SIDA), neoplasias hematológicas (leucemias), y vasos linfáticos (metástasis tumoral, trastornos linfoproliferativos).

El término "enfermedades isquémicas de la retina" significa que el suministro de sangre y oxígeno de la retina disminuye, las porciones periféricas de la retina pierden su fuente de nutrición y dejan de funcionar correctamente. Un ejemplo particular de enfermedad isquémica de la retina es la retinopatía. Las enfermedades comunes que conducen a la retinopatía son la retinopatía diabética, la oclusión de la vena central de la retina, la estenosis de la arteria carótida y la retinopatía de células falciformes. La retinopatía diabética es una de las principales causas de pérdida visual en pacientes diabéticos. En la retina isquémica se produce el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización). Estos vasos frecuentemente crecen en la superficie de la retina, en el nervio óptico o en la parte frontal del ojo en el iris. Los nuevos vasos no pueden reemplazar el flujo de nutrientes necesarios y, en cambio, pueden causar muchos problemas como hemorragia vítrea, desprendimiento de retina, y glaucoma incontrolado. Estos problemas ocurren porque los vasos nuevos son frágiles y propensos a sangrar. Si se detecta en sus primeras etapas, la retinopatía diabética proliferativa a veces puede detenerse con la fotocoagulación panretiniana. Sin embargo, en algunos casos, la cirugía de vitrectomía es la única opción.

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

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

El término "hipertensión pulmonar" significa un trastorno en donde la presión sanguínea en las arterias pulmonares es anormalmente alta. En ausencia de otras enfermedades del corazón o los pulmones, se denomina hipertensión pulmonar primaria. El estrechamiento difuso de las arteriolas pulmonares se produce como resultado de la arteriogénesis patológica seguida de hipertensión pulmonar como respuesta al aumento de la resistencia al flujo sanguíneo. La incidencia es de 8 de cada 100.000 personas. Sin embargo, la hipertensión pulmonar también puede ocurrir como una complicación de Enfermedades Pulmonares Obstructivas Crónicas (COPD) como enfisema, bronquitis crónica o fibrosis intersticial difusa y en pacientes con COPD asmático. La incidencia de COPD es de aproximadamente 5 de cada 10.000 personas.

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

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

Las proteínas de unión de acuerdo con la invención pueden usarse para tratar la formación de tumores. El término "tumor" significa una masa de tejido anormal que surge sin una causa obvia de células corporales preexistentes, no tiene una función intencionada y se caracteriza por una tendencia al crecimiento autónomo y desenfrenado. Los tumores son bastante diferentes de las inflamaciones o de otras inflamaciones porque las células de los tumores son anormales en su apariencia y otras características. Las células anormales, es decir, el tipo de células que generalmente forman los tumores, se diferencian de las células normales por haber sufrido una o más de las siguientes alteraciones: (1) hipertrofia, o un aumento en el tamaño de las células individuales; (2) hiperplasia o aumento del número de células dentro de una zona determinada; (3) anaplasia, o una regresión de las características físicas de una célula hacia un tipo más primitivo o indiferenciado. Los tumores pueden ser benignos, por ejemplo, lipomas, angiomas, osteomas, condromas, y adenomas. Ejemplos de tumores malignos son los carcinomas (tales como los tumores de mama, los carcinomas de las vías respiratoria y gastrointestinal, las glándulas endocrinas y el sistema genitourinario), los sarcomas (en los tejidos conectivos, que incluyen los tejidos fibrosos, los tejidos adiposos (grasa), los vasos, huesos y cartílagos), carcinosarcoma (tanto en tejido epitelial como conectivo), leucemias y linfomas, tumores de tejidos nerviosos (que incluye el cerebro) y melanoma (un cáncer de las células cutáneas pigmentadas). El uso de las proteínas de unión de la presente invención contra tumores también puede combinarse con cualquier otra terapia tumoral conocida en la técnica, tal como irradiación, terapia fotodinámica, quimioterapia o cirugía.

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

Una composición farmacéutica preferida para el tratamiento de enfermedades oculares comprende unir proteínas como se describió anteriormente y un detergente tal como polisorbato 20 (por ejemplo, aproximadamente 0,04%), un tampón tales como histidina, fosfato o ácido láctico y un azúcar tales como sacarosa o trehalosa. Preferentemente, dicha composición comprende proteínas de unión como se describió anteriormente y PBS. Dichas composiciones farmacéuticas pueden administrarse localmente, ya sea por vía tópica en una parte del ojo o inyectarse en el ojo, por ejemplo, en el espacio subconjuntival, peri o retrobulbar o directamente en el ojo. Alternativamente, dichas composiciones pueden administrarse sistémicamente mediante administración parental. Preferentemente, dicha composición farmacéutica se aplica en el ojo mediante una inyección intravítrea. También preferentemente, dicha composición farmacéutica se aplica en el ojo por vía tópica y como un colirio. El colirio se puede aplicar a la córnea (parte transparente en el centro del ojo) permitiendo que las moléculas penetren dentro del ojo. Para el tratamiento de una enfermedad que afecta la parte posterior del ojo, puede ser más deseable que la proteína de unión penetre en la esclerótica cuando se inyecte debajo de la conjuntiva o alrededor del globo. La administración de la proteína de unión puede realizarse después de una etapa preliminar de modular la superficie del ojo para mejorar la penetración de las moléculas. Preferentemente, la capa epitelial, como el epitelio corneal, se modula por un potenciador de la penetración para permitir una penetración suficiente y rápida de las moléculas como, por ejemplo, se describió anteriormente. El uso de las proteínas de unión de la presente invención contra las enfermedades oculares también puede combinarse con cualquier otra terapia conocida en la técnica tal como terapia fotodinámica.

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

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

La composición farmacéutica puede administrarse mediante cualquier método adecuado dentro del campo de conocimiento del experto. La vía de administración preferida es la parenteral. En la administración parental, el medicamento de esta invención se formulará en una forma inyectable de dosis unitaria tal como una solución, suspensión o emulsión, en asociación con los excipientes farmacéuticamente aceptables como se definió anteriormente. La dosis y el modo de administración dependerán del individuo que se trata y de la enfermedad en particular. Generalmente, la composición farmacéutica se administra de modo que la proteína de unión de la

presente invención se administra a una dosis entre 1 µg/kg y 20 mg/kg, con mayor preferencia entre 10 µg/kg y 5 mg/kg, con preferencia superlativa entre 0,1 y 2 mg/kg. Preferentemente, se administra como una dosis de bolo. También puede utilizarse la infusión continua e incluye la administración subcutánea continua a través de una minibomba osmótica. Si es así, la composición farmacéutica puede infundirse a una dosis entre 5 y 20 µg/kg/minuto, con mayor preferencia entre 7 y 15 µg/kg/minuto. En particular, la composición farmacéutica se administra mediante inyecciones en el ojo para que la proteína de unión de la invención se administre en una dosis entre 0,1 mg y 10 mg por inyección, con mayor preferencia entre 0,3 y 6 mg por inyección, con preferencia superlativa entre 1 mg y 4 mg por inyección. Además, la composición farmacéutica se administra en gotas para los ojos de modo que una sola gota de una solución que contenga una concentración de la proteína de unión de la invención entre 10 y 120 mg/ml, con mayor preferencia entre 20 y 100 mg/ml, con preferencia superlativa se aplica en el ojo entre 40 y 80 mg/ml.

En otra modalidad de la invención, puede usarse una proteína de unión que inhibe la actividad de VEGF-Axxx, como se describió anteriormente, en combinación con una proteína de unión o molécula pequeña que inhibe la actividad de PIGF, con los mismos niveles de inhibición de PIGF que los descritos anteriormente para VEGF-Axxx. Esta modalidad se basa en el hecho de que se encuentra que PIGF es angiogénico en los sitios en los que aumentan los niveles de VEGF-Axxx. Además, una proteína de unión que inhibe la actividad de VEGF-Axxx, como se describió anteriormente, puede usarse en combinación con una proteína de unión o molécula pequeña que inhibe la actividad del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), VEGF-C u otros miembros familia de proteínas VEGF, factor de necrosis tumoral alfa (TNFalfa), ligando delta tipo 4 (Dll4), interleucina 6 (IL-6), neuropilina o angiopoyetina 2 (Ang2).

Se describen además métodos de tratamiento. En un aspecto, se describe un método para tratar una retinopatía, el método que comprende administrar, a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de unión de la invención, particularmente una proteína de unión que inhibe la interacción entre VEGF-Axxx humano y VEGFR-2 humano, pero no la interacción entre VEGF-Axxxb humano y VEGFR-2 humano, y la proteína de unión inhibe la angiogénesis mediada por VEGFR-2.

Se describen además métodos para usar una proteína de unión como se describe para inhibir una actividad biológica de VEGF-A en una célula o para inhibir una actividad biológica mediada por VEGFR-2. La célula puede estar situada *in vivo* o *ex vivo* y puede ser, por ejemplo, una célula de un organismo vivo, una célula cultivada o una célula en una muestra de tejido. El método puede comprender poner en contacto dicha célula con cualquiera de las proteínas de unión que inhiben la interacción VEGF-A/VEGFR-2 descrita en la presente descripción, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inhibir dicha actividad biológica.

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

La proteína de unión recombinante de acuerdo con la invención puede obtenerse y/o desarrollarse adicionalmente mediante varios métodos tales como presentación en la superficie de bacteriófagos (documentos de patentes núms. WO 90/02809, WO 07/006665) o de células bacterianas (documento de patente núm. WO 93/10214), presentación ribosómica (documento de patente núm. WO 98/48008), presentación en plásmidos (documento de patente núm. WO 93/08278) o mediante el uso de construcciones híbridas de proteína de repetición de ARN covalente (documento de patente núm. WO 00/32823), o expresión intracelular y selección/tamizaje tal como por ensayo de complementación de proteínas (documento de patente núm. WO 98/341120). Tales métodos son conocidos por el experto en la técnica.

Puede obtenerse una biblioteca de proteínas con repetición de anquirina usadas para la selección/tamizaje de una proteína de unión recombinante de acuerdo con la invención de acuerdo con los protocolos conocidos por el experto en la técnica (documento de patente núm. WO 02/020565, Binz, HK y otros, JMB, 332, 489-503, 2003 y Binz y otros, 2004, loc. Cit). El uso de una biblioteca de ese tipo para la selección de DARPin específicas de VEGF-Axxx se muestra en el Ejemplo 1. De manera análoga, los motivos de secuencia de repetición de anquirina como se presentaron anteriormente pueden usarse para construir bibliotecas de proteínas con repetición de anquirina que pueden usarse para la selección o tamizaje de DARPin específicas de VEGF-Axxx. Además, los dominios de repetición de la presente invención pueden ensamblarse modularmente a partir de módulos repetidos de acuerdo con las invenciones actuales y los módulos de protección apropiados (Forrer, P., y otros, FEBS letters 539, 2-6, 2003) mediante el uso de tecnologías estándar de ADN recombinante (por ejemplo, el documento de patente núm. WO 02/020565, Binz y otros, 2003, loc. cit. y Binz y otros, 2004, loc. cit.).

La invención no se limita a las modalidades particulares descritas en los Ejemplos. Se pueden usar y procesar otras fuentes siguiendo el esquema general que se describe a continuación.

Ejemplos

Todos los materiales de partida y reactivos descritos a continuación son conocidos por los expertos en la técnica y están disponibles comercialmente o pueden prepararse mediante el uso de técnicas bien conocidas.

Materiales

Los productos químicos se adquirieron en Fluka (Suiza). Los oligonucleótidos fueron de Microsynth (Suiza). A menos que se indique de cualquier otra forma, las ADN polimerasas, las enzimas de restricción y los tampones eran procedentes de New England Biolabs (EE.UU.) o Fermentas (Lituania). La cepa de clonación y producción de proteínas fue *E. coli* XL1-blue (Stratagene, EE.UU.). Las variantes de VEGF fueron procedentes de R&D Systems (Minneapolis, EE. UU.) o se produjeron en células de ovario de hámster chino o en *Pichia pastoris* y se purificaron de acuerdo con protocolos estándar (Rennel, ES y otros, European J. Cancer 44, 1883-94, 2008; el sistema de expresión Pichia procedente de Invitrogen). Las variantes de VEGF biotiniladas se obtuvieron químicamente mediante el acoplamiento de la porción de biotina a aminas primarias de las variantes de VEGF purificadas mediante el uso de reactivos y métodos de biotinilación estándar (Pierce, EE.UU.).

Biología Molecular

A menos que se indique de cualquier otra forma, los métodos se realizan de acuerdo con los protocolos descritos (Sambrook J., Fritsch EF y Maniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1989, Nueva York).

Bibliotecas de proteínas con repetición de anquirina diseñadas

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

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

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

Mediante el uso de la presentación de ribosomas (Hanes, J. y Plückthun, A., PNAS 94, 4937-42, 1997), se seleccionaron muchas proteínas con repetición de anquirina diseñadas (DARPin) con especificidad de unión para VEGF-Axxx de las bibliotecas N2C o N3C DARPin descritas por Binz. y otros 2004 (loc. cit.). La unión de los clones seleccionados hacia objetivos específicos (VEGF-Axxx) e inespecíficos (MBP, proteína de unión a maltosa de *E. coli*) se evaluó mediante ELISA de extracto crudo que indica que las proteínas de unión a VEGF-Axxx se seleccionaron con éxito (Figura 1). Las SEQ ID NO: 14 a 40 constituyen secuencias de aminoácidos de proteínas de unión seleccionadas que comprenden un dominio de repetición con especificidad de unión para VEGF-Axxx. El análisis de secuencia de aglutinantes seleccionados reveló motivos de secuencia de repetición de anquirina específicos inherentes a ciertas familias seleccionadas de aglutinantes. Tales motivos de secuencia de repetición de

anquirina presentes en dominios de repetición con especificidad de unión para VEGF-Axxx se proporcionan en las SEQ ID NO: 1 a 13.

Selección de proteínas con repetición de anquirina específicas de VEGF-Axxx mediante visualización de ribosomas

La selección de proteínas con repetición de anquirina específicas de VEGF-Axxx se realizó mediante presentación de ribosomas (Hanes y Plückthun, loc. cit.) mediante el uso de VEGF-A164 de perro o VEGF-A165 humano como proteínas objetivo, la biblioteca de proteínas con repetición de anquirina diseñadas como se describe (documento de patente núm. WO 02/020565, Binz y otros, 2003, loc. cit. y Binz y otros, 2004, loc. cit.) y protocolos establecidos (Zahnd, C., Amstutz, P. y Plückthun, A., Nat. Methods 4, 69-79, 2007). Se realizaron rondas de selección de presentación de ribosomas en variantes de VEGF de perro o humano (que incluyen variantes biotiniladas inmovilizadas sobre neutravidina o estreptavidina) con las bibliotecas de N2C y N3C DARPin mediante el uso de protocolos establecidos (Binz y otros 2004, loc. cit.). El número de ciclos de transcripción inversa (RT)-PCR después de cada ronda de selección se redujo constantemente de 40 a 30, ajustándose al rendimiento debido al enriquecimiento de aglutinantes. Cuatro rondas de selección inicial en VEGF de perro produjeron grupos de DARPin de afinidad nanomolar, como se reveló mediante mediciones de ELISA y SPR de clones individuales. Para encontrar DARPin con afinidades mejoradas, se realizaron selecciones de constante de disociación adicionales en VEGF biotinilado humano o de perro inmovilizado sobre neutravidina o estreptavidina, tomando grupos después de la segunda y tercera rondas iniciales de selección de presentación de ribosomas, seguidas de una ronda de selección de constante de asociación en VEGF humano.

Clones seleccionados se unen específicamente a VEGF-Axxx como se muestra en el ELISA de extracto crudo

Las DARPin seleccionadas individuales que se unen específicamente a VEGF-Axxx se identificaron mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) mediante el uso de extractos crudos de células de *Escherichia coli* de expresión de DARPin mediante el uso de protocolos estándar. Los clones seleccionados se clonaron en el vector de expresión pQE30 (Qiagen), se transformaron en *E. coli* XL1-Blue (Stratagene) y luego se cultivaron durante toda la noche a 37 °C en una placa de 96 pocillos profundos (cada clon en un solo pocillo) que contenía 1 ml de medio de crecimiento (2YT que contiene glucosa al 1 % y ampicilina 100 µg/ml). Se inoculó 1 ml de 2YT reciente que contenía 50 µg/ml de ampicilina con 100 µl del cultivo nocturno en una placa nueva de 96 pocillos profundos. Después de la incubación durante 2 horas a 37 °C, se indujo la expresión con IPTG (concentración final 1 mM) y se continuó durante 3 horas. Las células se recolectaron, se resuspendieron en 100 µl de B-PERII (Pierce) y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente con agitación. Luego, se añadieron 900 µl de PBS-TB (PBS suplementado con BSA al 0,2 %, Tween 20 al 0,1 %, pH 7,4) y los restos celulares se eliminaron por centrifugación. Se aplicaron 100 µl de cada clon lisado a un pocillo de una placa MaxiSorp recubierta con NeutrAvidin que contenía una variante de VEGF-Axxx o la MBP no relacionada inmovilizada mediante su porción de biotina y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Después de un lavado extenso con PBS-T (PBS suplementado con 0,1 % Tween 20, pH 7,4) la placa se desarrolló mediante el uso de procedimientos estándar de ELISA mediante el uso del anticuerpo monoclonal anti-RGS(His)4 (34650, Qiagen) como anticuerpo primario y un anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (A3562, Sigma) como reactivo secundario. Luego se detectó la unión mediante el uso de 4-nitrofenilfosfato disódico (4NPP, Fluka) como sustrato para la fosfatasa alcalina. El desarrollo de color se midió a 405 nm. En la Figura 1 se muestran los resultados de un ELISA del extracto crudo de ejemplo usado para identificar la unión de DARPin a VEGF-Axxx. El tamizaje de varios cientos de clones mediante un ELISA de extracto de células en bruto reveló más de cien DARPin diferentes con especificidad para VEGF-Axxx. Estas proteínas de unión se eligieron para un análisis adicional. Se proporcionan ejemplos de secuencias de aminoácidos de dominios de repetición de anquirina seleccionados que se unen específicamente a VEGF-Axxx en las SEQ ID NO: 14 a 40.

Deducir motivos de secuencia de repetición de dominios de repetición seleccionados con especificidad de unión para VEGF-Axxx

Las secuencias de aminoácidos de dominios de repetición seleccionados con especificidad de unión para VEGF-Axxx se analizaron adicionalmente mediante herramientas de análisis de secuencias conocidas por los profesionales en la técnica (documento de patente núm. WO 02/020565; Forrer y otros, 2003, loc. cit.; Forrer, P., Binz, HK, Stumpp, MT y Plückthun, A., ChemBioChem, 5 (2), 183-189, 2004). Sin embargo, en contraste con el documento de patente núm. WO 02/020565 donde se usaron motivos repetidos de origen natural para deducir motivos de secuencia de repetición, aquí los motivos de secuencia de repetición se dedujeron de las unidades de repetición de dominios de repetición seleccionados con especificidad de unión para VEGF-Axxx. De ese modo se determinaron las familias de dominios de repetición seleccionados que comprenden un motivo de secuencia de repetición común. Tales motivos de secuencia de repetición presentes en los dominios de repetición con especificidad de unión para VEGF-Axxx se proporcionan en las SEQ ID NO: 1 a 13.

Expresión soluble y alto nivel de DARPin

Para un análisis adicional, los clones seleccionados que mostraban unión específica de VEGF-Axxx en el ELISA de extracto celular crudo como se describió anteriormente se expresaron en células *E. coli* XL1-blue y se purificaron

mediante el uso de su etiqueta His mediante el uso de los protocolos estándar. Se usaron 25 ml de cultivos estacionarios durante toda la noche (LB, glucosa al 1 %, 100 mg/l de ampicilina; 37 °C) para inocular cultivos de 1 l (medio similar). A la A(600) = 0,7, los cultivos se indujeron con IPTG 0,5 mM y se incubaron a 37 °C durante 4 h. Los cultivos se centrifugaron y los sedimentos resultantes se resuspendieron en 40 ml de TBS500 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8) y se sonicaron. El lisado se volvió a centrifugar y se añadieron glicerol (concentración final al 10 % (v/v)) e imidazol (concentración final 20 mM) al sobrenadante resultante. Las proteínas se purificaron sobre una columna de Ni- ácido nitrilotriacético (volumen de columna de 2,5 ml) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (QIAGEN, Alemania). Pudieron purificarse hasta 200 mg de DARPin altamente solubles con especificidad de unión a VEGF-Axxx a partir de un litro de cultivo de *E. coli* con una pureza > 95 % estimada a partir de SDS-PAGE al 15 %.

Estas DARPin purificadas se usan para caracterizaciones adicionales.

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

La adición de VEGF-Axxx a esferoides HUVEC embebidos en matrices de colágeno conduce al brote de esferoides. La adición de un inhibidor de VEGF-Axxx bloqueará la formación de brotes, que puede cuantificarse estadísticamente por el número y la longitud de los brotes. Puede determinarse la IC₅₀ mediante la adición de diferentes concentraciones de inhibidor y una cantidad constante de VEGF.

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

Los ensayos de crecimiento de esferoides se realizaron de acuerdo con los protocolos estándar (Korff y otros, Loc. cit.). Se seleccionaron DARPin con especificidad para VEGF-Axxx y se purificaron hasta > 96 % de pureza como se describió en el Ejemplo 1. Las células de la vena umbilical humana se hicieron crecer hasta la confluencia en un cultivo de monocapa. Después de la tripsinización, la suspensión celular se colocó en una gota colgante para formar esferoides, es decir, aproximadamente 500 HUVEC agregadas organizadas. Los esferoides se embebieron en una matriz de colágeno y se estimularon con VEGF-A165 para iniciar el crecimiento de los brotes. Además, se agregaron inhibidores del brote para observar sus efectos sobre la inhibición del brote. Los números de brotes por esferoide y las longitudes de los brotes se cuantificaron mediante el uso de un programa gráfico.

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

Ejemplo 3: Determinación de la especificidad objetivo de DARPin #27 en comparación con Avastin® mediante el análisis de resonancia de plasmón de superficie

El VEGF-A164 de perro o el VEGF-A164b de perro se inmovilizaron en una celda de flujo y se analizaron la interacción de DARPin #27 (SEQ ID NO: 16) y Avastin® con los objetivos inmovilizados.

Análisis de resonancia de plasmón de superficie (SPR)

La SPR se midió mediante el uso de un instrumento ProteOn (BioRad). El tampón de corrida fue HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,005 %. Aproximadamente 1200 RU de VEGF-A164 de perro o VEGF-A164b de perro se inmovilizaron en un chip GLC (BioRad). Las interacciones se midieron a un flujo de 60 µl/min con un flujo de tampón de 5 min, una inyección de 100 segundos de Avastin® o DARPin #27 a una concentración de 250 nM y una medición de la constante de disociación de unos pocos minutos con flujo de tampón. La señal de una célula de referencia sin recubrimiento se restó de las mediciones.

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

Ejemplo 4: Eficacia in vivo de DARPin #30 para inhibir VEGF-A165 en un modelo de conejo con fuga vascular.

Se aplica DARPin #30 pegilada (SEQ ID NO:29) o Lucentis® mediante inyección intravítrea en un ojo de conejo para probar su eficacia para inhibir la fuga vascular inducida por una inyección intravítrea posterior de VEGF-A165 humano.

Medidas de inhibición de la fuga vascular en conejos

En el día 1, se aplica PBS, DARPin #30 PEGilada (125 µg) o la cantidad equimolar de Lucentis® (162 µg) mediante una inyección intravítrea en un ojo de cada conejo (ojo tratado). El día 4 o el día 30, el ojo tratado de cada conejo se

retó mediante inyección intravítrea de 500 ng de VEGF-A165 humano. Ambos ojos de todos los animales se evaluaron 48 horas después de la inyección de VEGF-A165 midiendo el contenido de fluoresceína en todos los ojos 1 hora después de la inyección intravenosa de fluoresceína sódica (50 mg/kg de peso corporal del animal, 10 % (p/v) en 0,9 % (p/v) solución salina). Se calcularon las proporciones de las cantidades de fluorescencia en los ojos tratados y sin tratar para cada animal. Una proporción de uno corresponde a la ausencia de fuga de fluorescencia adicional en el ojo tratado, una proporción mayor de uno indica más fuga de fluorescencia en el ojo tratado que en el ojo de control no tratado.

Preparación de DARPin pegilada

La PEGilación de la proteína mediante el uso de un único residuo de Cys y la química de maleimida es bien conocida por el experto en la técnica y puede realizarse de acuerdo con protocolos establecidos (por ejemplo, de Pierce). La DARPin #30 que comprende un enlazador C-terminal adicional (GGGSGGGSC, SEQ ID NO: 41) se purificó hasta casi homogeneidad mediante el uso de métodos cromatográficos estándar. La proteína se reduce completamente mediante el uso de DTT y se purifica por filtración en gel para eliminar el DTT y cambiar el tampón por PBS. PEG-maleimida (metoxi-poli(etilenglicol)-oxopropilamino-propil maleimida; NOF, núm. Sunbright ME-200MA) disuelto en PBS se mezcla con DARPin en PBS a un exceso molar de aproximadamente 15 % de PEG-maleimida durante 2-4 horas a temperatura ambiente. A continuación, DARPin PEGilada se separa de DARPin no reactiva y de las porciones de PEG no reactivos mediante el uso de cromatografía de intercambio aniónico estándar.

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

Listado de secuencias

<110> Molecular Partners AG Binz, Hans Kaspar Forrer, Patrik Stumpp, Michael Tobias

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

<130> P368A

<150> EP08168166.0

<151> 2008-11-03

<160> 41

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Motivo de secuencia de repetición de anquirina

<220>

<221> misc_característica

<222> (1)..(1)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> misc_característica

<222> (3)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> misc_característica

<222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> misc_característica

<222> (14)..(15)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (27)..(27)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <400> 1

 10 Xaa Asp Xaa Xaa Gly Xaa Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Xaa Xaa Gly
 1 5 10 15

 15 His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn
 20 25 30

 Ala

 20
 <210> 2
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Motivo de secuencia de repetición de anquirina

 30 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 35 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (3)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 40 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (14)..(15)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 45 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 50 <400> 2

 Xaa Asp Xaa Xaa Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Xaa Xaa Gly
 1 5 10 15
 55
 His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn
 20 25 30

 60 Ala

 65 <210> 3
 <211> 33
 <212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> Motivo de secuencia de repetición de anquirina
 5
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(1)
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (3)..(4)
 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (6)..(6)
 20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (14)..(15)
 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (27)..(27)
 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (33)..(33)
 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 3
 40 Xaa Asp Xaa Xaa Gly Xaa Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Xaa Xaa Gly
 1 5 10 15
 His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn
 45 20 25 30
 Xaa
 50 <210> 4
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Motivo de secuencia de repetición de anquirina
 <220>
 60 <221> misc_característica
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 65 <221> misc_característica
 <222> (3)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> misc_característica
 5 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> misc_característica
 10 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> misc_característica
 15 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> misc_característica
 20 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 4
 25
 Xaa Asp Xaa Xaa Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Xaa Ala Asp Leu Gly
 1 5 10 15
 30
 Xaa Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn
 20 25 30
 Xaa
 35
 <210> 5
 <211> 33
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> Motivo de secuencia de repetición de anquirina
 45
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 50
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (3)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 55
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 60
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (14)..(15)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 65
 <220>

<221> misc_característica
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 5 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 10 <400> 5

 Xaa Asp Xaa Xaa Gly Xaa Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Xaa Xaa Gly
 1 5 10 15
 15 His Xaa Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn
 20 25 30
 20 Ala

 <210> 6
 <211> 33
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Motivo de secuencia de repetición de anquirina
 30

 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(1)
 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (3)..(4)
 40 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (6)..(6)
 45 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (14)..(15)
 50 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (27)..(27)
 55 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <400> 6

 60

 65

ES 2 836 948 T3

Xaa Asp Xaa Xaa Gly Xaa Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Xaa Xaa Gly
 1 5 10 15

5 His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn
 20 25 30

10 Ala

<210> 7
 <211> 33
 15 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Motivo de secuencia de repetición de anquirina
 20

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(1)
 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (3)..(4)
 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (14)..(15)
 35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (27)..(27)
 40 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 7

45 Xaa Asp Xaa Xaa Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Xaa Xaa Gly
 1 5 10 15

50 His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn
 20 25 30

55 Ala

<210> 8
 <211> 33
 60 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Motivo de secuencia de repetición de anquirina
 65

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 5
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (3)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 10
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 15
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (14)..(15)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 20
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 25
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (33)..(33)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 30
 <400> 8
 35
 Xaa Asp Xaa Xaa Gly Xaa Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Xaa Xaa Gly
 1 5 10 15
 40
 His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn
 20 25 30
 45
 Xaa
 50
 <210> 9
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 60
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (3)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 65
 <220>
 <221> misc_característica

<222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 5 <221> misc_característica
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 10 <221> misc_característica
 <222> (14)..(15)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 15 <221> misc_característica
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <400> 9
 20

 Xaa Asp Xaa Xaa Gly Xaa Thr Pro Leu His Leu Xaa Ala Xaa Xaa Gly
 1 5 10 15

 25 His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn
 20 25 30

 30 Ala

 <210> 10
 <211> 33
 35 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> Motivo de secuencia de repetición de anquirina

 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(1)
 45 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (5)..(5)
 50 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (14)..(15)
 55 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (18)..(18)
 60 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (27)..(27)
 65 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

ES 2 836 948 T3

<400> 10

5 Xaa Asp Phe Lys Xaa Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Xaa Xaa Gly
1 5 10 15

His Xaa Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30

10 Ala

15 <210> 11
<211> 33
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Motivo de secuencia de repetición de anquirina

25 <220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30 <220>
<221> misc_característica
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35 <220>
<221> misc_característica
<222> (5)..(6)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

40 <220>
<221> misc_característica
<222> (13)..(15)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45 <220>
<221> misc_característica
<222> (27)..(27)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

50 <400> 11

Xaa Asp Xaa Leu Xaa Xaa Thr Pro Leu His Leu Ala Xaa Xaa Xaa Gly
1 5 10 15

55 His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn
20 25 30

60 Ala

65 <210> 12
<211> 33
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
 <223> Motivo de secuencia de repetición de anquirina

5

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (3)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (14)..(15)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35

<400> 12

40

	Xaa	Asp	Xaa	Xaa	Gly	Xaa	Thr	Pro	Leu	Xaa	Leu	Ala	Ala	Xaa	Xaa	Gly
	1				5					10					15	

45

	His	Leu	Glu	Ile	Val	Glu	Val	Leu	Leu	Lys	Xaa	Gly	Ala	Asp	Val	Asn
				20				25						30		

50

<210> 13
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> Motivo de secuencia de repetición de anquirina

60

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

65

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (3)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> misc_característica
 5 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> misc_característica
 10 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <220>
 <221> misc_característica
 15 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 13
 20
 Xaa Asp Xaa Xaa Gly Trp Thr Xaa Leu His Leu Ala Ala Asp Leu Gly
 1 5 10 15
 25
 Xaa Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Xaa Gly Ala Asp Val Asn
 20 25 30
 Ala
 30
 <210> 14
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Dominio de repetición de anquirina
 <400> 14
 40
 45
 50
 55
 60
 65

ES 2 836 948 T3

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

<210> 15

<211> 159

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio de repetición de anquirina

<400> 15

ES 2 836 948 T3

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

<210> 16

<211> 159

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio de repetición de anquirina

<400> 16

ES 2 836 948 T3

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

<210> 17

<211> 159

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio de repetición de anquirina

<400> 17

ES 2 836 948 T3

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

<210> 18

<211> 159

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio de repetición de anquirina

<400> 18

ES 2 836 948 T3

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

<210> 19

<211> 159

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio de repetición de anquirina

<400> 19

Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15
 55
 Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30
 60
 65

ES 2 836 948 T3

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

<210> 20

35 <211> 159

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <223> Dominio de repetición de anquirina

<400> 20

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

ES 2 836 948 T3

	Ala Thr Asp Val Ser Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Asp	65	70	75	80
5	Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val	85	90	95	
10	Asn Thr Thr Asp Asn Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ser Ala Asp	100	105	110	
15	Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp	115	120	125	
20	Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile	130	135	140	
25	Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala	145	150	155	
	<210> 21				
	<211> 159				
	<212> PRT				
	<213> Artificial				
	<220>				
30	<223> Dominio de repetición de anquirina				
	<400> 21				
35	Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln	1	5	10	15
40	Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala	20	25	30	
45	Phe Asp Tyr Met Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala His Asn Gly	35	40	45	
50	His Met Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn	50	55	60	
55	Ala Ser Asp Tyr Ser Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Asp	65	70	75	80
60	Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val	85	90	95	
65					

ES 2 836 948 T3

	Asn Thr Lys Asp Asn Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ser Ala Asp
	100 105 110
5	Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp
	115 120 125
10	Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile
	130 135 140
15	Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala
	145 150 155
	<210> 22
	<211> 159
20	<212> PRT
	<213> Artificial
	<220>
	<223> Dominio de repetición de anquirina
25	<400> 22
30	Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
	1 5 10 15
35	Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
	20 25 30
40	Val Asp Tyr Ile Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Tyr Gly
	35 40 45
45	His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Ser Ala Asp Val Asn
	50 55 60
50	Ala Glu Asp Phe Ala Gly Tyr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ser Asn
	65 70 75 80
55	Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val
	85 90 95
60	Asn Thr Lys Asp Asn Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ser Ala Asp
	100 105 110
65	Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp
	115 120 125
70	Val Asn Thr Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile
	130 135 140
75	Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala
	145 150 155

<210> 23
<211> 159
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Dominio de repetición de anquirina

<400> 23

```

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

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

Thr Asp Tyr Met Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Lys Val Gly
          35          40          45

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

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

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

Asn Thr Lys Asp Asn Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ser Ala Asp
          100          105          110

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

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

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

```

<210> 24
<211> 126
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Dominio de repetición de anquirina

<400> 24

ES 2 836 948 T3

	Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
	1 5 10 15
5	Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
	20 25 30
10	Arg Asp Ser Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Pro Trp Gly
	35 40 45
15	His Pro Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn
	50 55 60
20	Ala Ala Asp Phe Gln Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Val
	65 70 75 80
25	Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val
	85 90 95
30	Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp
	100 105 110
35	Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala
	115 120 125
<210>	25
<211>	126
<212>	PRT
<213>	Artificial
<220>	
<223>	Dominio de repetición de anquirina
<400>	25

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

ES 2 836 948 T3

Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30
 5
 Arg Asp Ser Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Pro Trp Gly
 35 40 45
 10
 His Pro Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60
 15
 Ala Ala Asp Phe Gln Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Val
 65 70 75 80
 20
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp Val
 85 90 95
 25
 Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp
 100 105 110
 30
 Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala
 115 120 125
 <210> 26
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Dominio de repetición de anquirina
 <400> 26
 40
 Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15
 45
 Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Thr
 20 25 30
 50
 Ala Asp Ser Thr Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Pro Trp Gly
 35 40 45
 55
 His Pro Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60
 60
 65
 Ala His Asp Tyr Gln Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Thr Leu
 65 70 75 80

ES 2 836 948 T3

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

5

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

10

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

15

<210> 27
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Dominio de repetición de anquirina
 <400> 27

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

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

60

<210> 28
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial

65

<220>
 <223> Dominio de repetición de anquirina
 <400> 28

ES 2 836 948 T3

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

<210> 29

<211> 126

35 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <223> Dominio de repetición de anquirina

<400> 29

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

ES 2 836 948 T3

	His	Leu	Glu	Ile	Val	Glu	Val	Leu	Leu	Lys	Tyr	Gly	Ala	Asp	Val	Asn
	50						55					60				
5	Ala	Lys	Asp	Phe	Gln	Gly	Trp	Thr	Pro	Leu	His	Leu	Ala	Ala	Ala	Ile
	65					70					75					80
10	Gly	His	Gln	Glu	Ile	Val	Glu	Val	Leu	Leu	Lys	Asn	Gly	Ala	Asp	Val
					85					90					95	
15	Asn	Ala	Gln	Asp	Lys	Phe	Gly	Lys	Thr	Ala	Phe	Asp	Ile	Ser	Ile	Asp
				100					105					110		
20	Asn	Gly	Asn	Glu	Asp	Leu	Ala	Glu	Ile	Leu	Gln	Lys	Ala	Ala		
		115						120					125			
25	<210>	30														
	<211>	126														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial														
30	<220>															
	<223>	Dominio de repetición de anquirina														
	<400>	30														
35	Gly	Ser	Asp	Leu	Gly	Lys	Lys	Leu	Leu	Glu	Ala	Ala	Arg	Val	Gly	Gln
	1				5					10					15	
40	Asp	Asp	Glu	Val	Arg	Ile	Leu	Met	Ala	Asp	Gly	Ala	Asp	Val	Asn	Ala
				20					25					30		
45	Ser	Asp	Phe	Lys	Gly	Asp	Thr	Pro	Leu	His	Leu	Ala	Ala	Ser	Gln	Gly
			35					40					45			
50	His	Leu	Glu	Ile	Val	Glu	Val	Leu	Leu	Lys	Tyr	Gly	Ala	Asp	Val	Asn
	50						55					60				
55	Ala	Tyr	Asp	Met	Leu	Gly	Trp	Thr	Pro	Leu	His	Leu	Ala	Ala	Asp	Leu
	65					70					75					80
60	Gly	His	Leu	Glu	Ile	Val	Glu	Val	Leu	Leu	Lys	Tyr	Gly	Ala	Asp	Val
					85					90					95	
65	Asn	Ala	Gln	Asp	Arg	Phe	Gly	Lys	Thr	Ala	Phe	Asp	Ile	Ser	Ile	Asp
				100					105					110		
	Asn	Gly	Asn	Glu	Asp	Leu	Ala	Glu	Ile	Leu	Gln	Lys	Ala	Ala		
		115						120					125			

<210> 31
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Dominio de repetición de anquirina

<400> 31

```

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 32
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Dominio de repetición de anquirina

<400> 32

ES 2 836 948 T3

	Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Val Gly Gln	
	1 5 10 15	
5	Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala	
	20 25 30	
10	Leu Asp Phe Lys Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala Ser Gly	
	35 40 45	
15	His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val Asn	
	50 55 60	
20	Ala His Asp Met Leu Ser Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Gly Asp Leu	
	65 70 75 80	
25	Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val	
	85 90 95	
30	Asn Ala Gln Asp Arg Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp	
	100 105 110	
35	Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala	
	115 120 125	
<210>	33	
<211>	126	
<212>	PRT	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	Dominio de repetición de anquirina	
<400>	33	

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

ES 2 836 948 T3

	Ala Phe Asp Ile Phe Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Asp Leu	
	65 70 75 80	
5	Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asp Val	
	85 90 95	
10	Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Arg Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile Asp	
	100 105 110	
15	Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala	
	115 120 125	
	<210> 34	
	<211> 127	
20	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Dominio de repetición de anquirina	
25	<400> 34	
30	Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Val Arg Ala Gly Gln	
	1 5 10 15	
35	Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala	
	20 25 30	
40	Ser Asp Asn Gln Gly Thr Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ser His Gly	
	35 40 45	
45	His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn	
	50 55 60	
50	Asp Ala His Asp Asp Leu Gly Trp Thr Pro Leu His Leu Ser Ala Asp	
	65 70 75 80	
55	Leu Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp	
	85 90 95	
60	Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile	
	100 105 110	
65	Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala	
	115 120 125	
	<210> 35	
	<211> 127	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	

<223> Dominio de repetición de anquirina

<400> 35

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

<210> 36

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio de repetición de anquirina

<400> 36

ES 2 836 948 T3

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

<210> 37

35 <211> 126

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <223> Dominio de repetición de anquirina

<400> 37

45

50

55

60

65

ES 2 836 948 T3

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

<210> 38

<211> 126

35 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <223> Dominio de repetición de anquirina

<400> 38

ES 2 836 948 T3

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

<210> 39

<211> 159

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Dominio de repetición de anquirina

<400> 39

ES 2 836 948 T3

Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15
 5
 Asp Asp Glu Val Arg Ile Leu Met Ala Asn Gly Ala Asp Val Asn Ala
 20 25 30
 10
 Lys Asp Ile Tyr Gly Arg Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Leu His Gly
 35 40 45
 15
 His Pro Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val Asn
 50 55 60
 20
 Ala Asn Asp Tyr Trp Gly Thr Thr Ser Leu His Leu Val Ala Ile Trp
 65 70 75 80
 25
 Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys Tyr Gly Ala Asp Val
 85 90 95
 30
 Asn Ala Val Asp Asp Ile Gly Gln Thr Pro Leu His Leu Ala Ala Ala
 100 105 110
 35
 Trp Gly His Leu Glu Ile Val Glu Val Leu Leu Lys His Gly Ala Asp
 115 120 125
 40
 Val Asn Ala Gln Asp Lys Phe Gly Lys Thr Ala Phe Asp Ile Ser Ile
 130 135 140
 45
 Asp Asn Gly Asn Glu Asp Leu Ala Glu Ile Leu Gln Lys Ala Ala
 145 150 155
 50
 <210> 40
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Dominio de repetición de anquirina
 55
 Gly Ser Asp Leu Gly Lys Lys Leu Leu Glu Ala Ala Arg Ala Gly Gln
 1 5 10 15
 60
 65

ES 2 836 948 T3

	Asp	Asp	Glu	Val	Arg	Ile	Leu	Met	Ala	Asn	Gly	Ala	Asp	Val	Asn	Ala
				20					25					30		
5	Asn	Asp	Tyr	Asp	Gly	Met	Thr	Pro	Leu	His	Leu	Ala	Ala	Met	Glu	Gly
			35					40					45			
10	His	Leu	Glu	Ile	Val	Glu	Val	Leu	Leu	Lys	Tyr	Gly	Ala	Asp	Val	Asn
		50					55					60				
15	Ala	Asn	Asp	His	Tyr	Gly	Phe	Thr	Pro	Leu	His	Leu	Ala	Trp	Thr	Gly
	65					70					75					80
20	Arg	Leu	Glu	Ile	Val	Glu	Val	Leu	Leu	Lys	Asn	Gly	Ala	Asp	Val	Asn
					85					90					95	
25	Ala	Ala	Asp	Val	Phe	Gly	Arg	Thr	Pro	Leu	His	Leu	Ala	Ala	Thr	Ser
				100					105					110		
30	Gly	His	Leu	Glu	Ile	Val	Glu	Val	Leu	Leu	Lys	Tyr	Gly	Ala	Asp	Val
			115					120					125			
35	Asn	Ala	Gln	Asp	Lys	Phe	Gly	Lys	Thr	Ala	Phe	Asp	Ile	Ser	Ile	Asp
		130					135					140				
40	Asn	Gly	Asn	Glu	Asp	Leu	Ala	Glu	Ile	Leu	Gln	Lys	Ala	Ala		
	145					150					155					
45																
	<210> 41															
	<211> 9															
	<212> PRT															
	<213> Artificial															
	<220>															
	<223> Enlazador GS															
50	<400> 41															
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Cys							
	1				5											

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión recombinante que comprende un dominio de repetición de anquirina, en donde dicho dominio de repetición de anquirina se une a VEGF-A165 con una Kd por debajo de 10^{-7} M e inhibe la unión de VEGF-A165 a VEGFR-2, y en donde dicho dominio de repetición de anquirina comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina 1D23G4TPLHLAA56GH7EIVEVLLK8GADVNA (SEQ ID NO: 5) en donde
 - 1 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, N, R, V, Y, E, H, I, K, L, Q, S y T;
 - 2 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en S, A, N, R, D, F, L, P, T y Y;
 - 3 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T, V, S, A, L y F;
 - 4 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, F y H;
 - 5 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en P, I, A, L, S, T, V y Y;
 - 6 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, F, I, L, T y V;
 - 7 representa el residuo de aminoácido P; y
 - 8 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, H, N y Y.
2. La proteína de unión de la reivindicación 1, en donde dicho dominio de repetición de anquirina inhibe el brote de esferoides de HUVEC con un valor de IC₅₀ por debajo de 10 nM.
3. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde dicho dominio de repetición de anquirina comprende un módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina. 1D23G4TPLHLAA56GHLEIVEVLLK7GADVNA (SEQ ID NO: 6), en donde dicho módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 6 va precedido del módulo de repetición con el motivo de secuencia de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 5, y en donde para el motivo de secuencia de repetición de anquirina 1D23G4TPLHLAA56GHLEIVEVLLK7GADVNA (SEQ ID NO: 6)
 - 1 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en H, Q, A, K, R, D, I, L, M, N, V y Y;
 - 2 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Y, F y H;
 - 3 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Q, F y T;
 - 4 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en W, M, G, H, N y T;
 - 5 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T, A, M, L y V;
 - 6 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en I, L, V, D y T; y
 - 7 representa un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A, H, N y Y.
4. La proteína de unión de la reivindicación 3, en donde 7 en la SEQ ID NO: 6 representa el residuo de aminoácido A.
5. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho dominio de repetición compete por la unión a VEGF-A165 humano con un dominio de repetición de anquirina de SEQ ID NO: 29.
6. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho dominio de repetición de anquirina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio de repetición de anquirina seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 24 a 26.
7. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho dominio de repetición de anquirina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 24.
8. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho dominio de repetición de anquirina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 24.
9. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho dominio de repetición de anquirina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 24.
10. La proteína de unión de la reivindicación 1, en donde hasta el 20 % de los residuos de aminoácidos de dicho módulo de repetición se intercambian por residuos de aminoácidos que se encuentran en las posiciones correspondientes en el alineamiento de una unidad de repetición de anquirina.

11. La proteína de unión de la reivindicación 1, en donde dicho dominio de repetición de anquirina comprende dos o más módulos de repetición consecutivos.
- 5 12. Una proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende adicionalmente una porción polimérica no proteica.
13. Un ácido nucleico que codifica una proteína de unión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 10 14. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o el ácido nucleico de la reivindicación 13 y, opcionalmente, un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 15 15. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14 para su uso en el tratamiento de un trastorno ocular.
16. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el tratamiento de un trastorno ocular.
- 20 17. La proteína de unión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o el ácido nucleico de la reivindicación 13 para su uso en un método para tratar la angiogénesis patológica en un mamífero, que incluye el hombre.

Figura 1

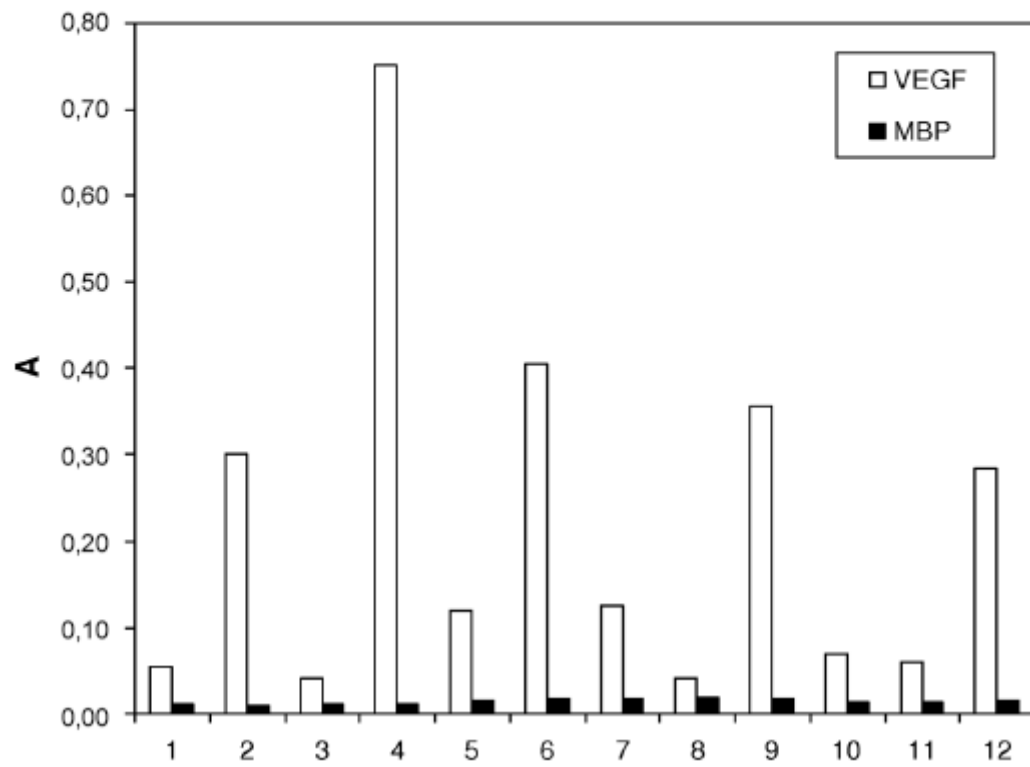


Figura 2a

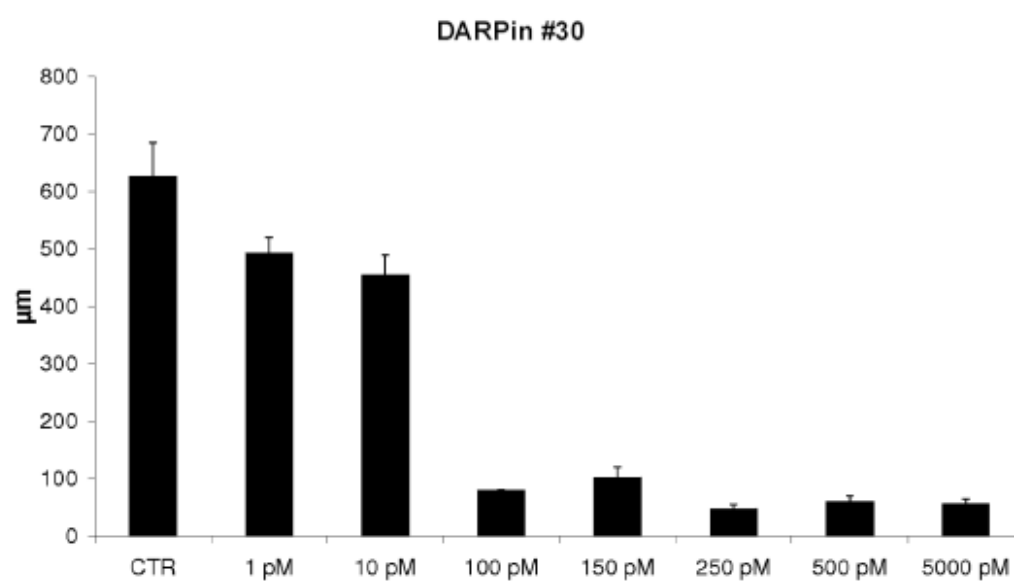


Figura 2b

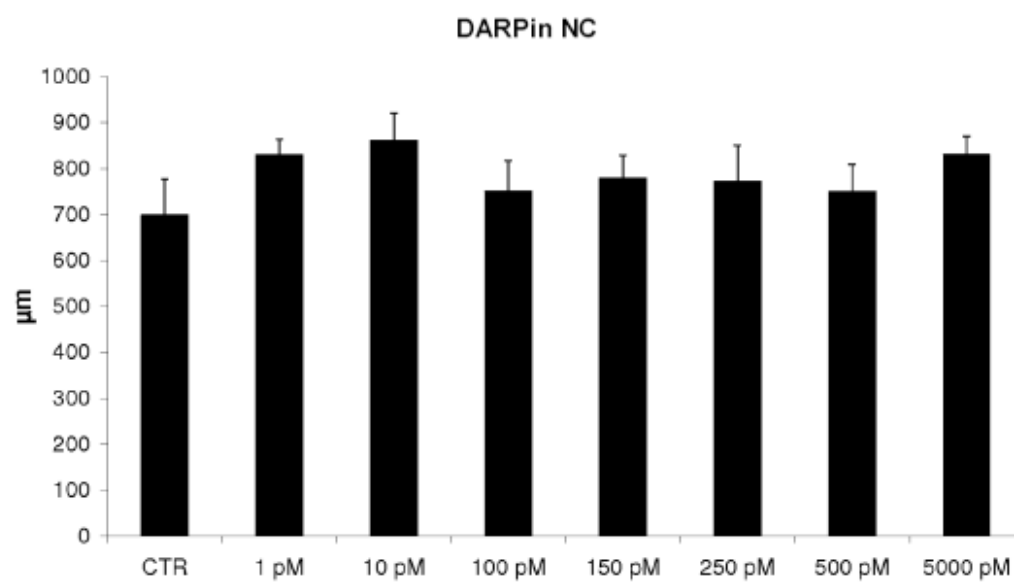


Figura 3a

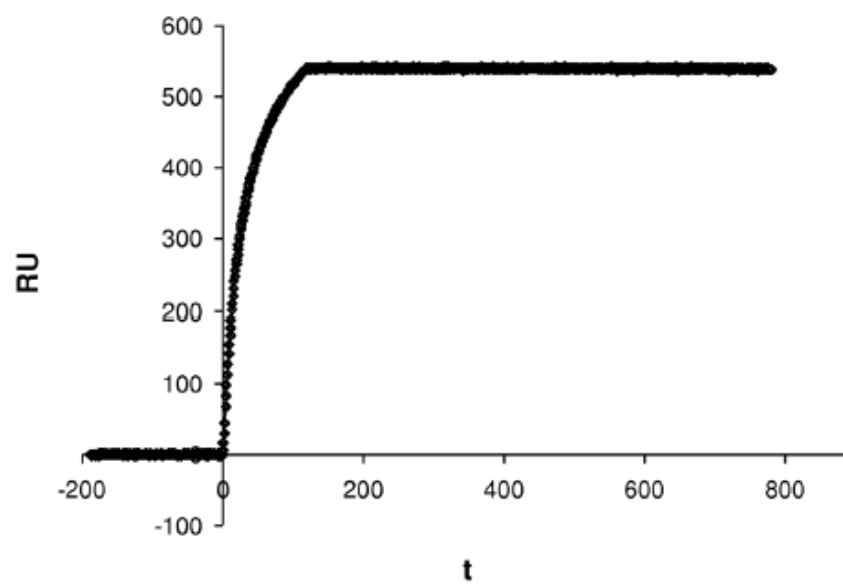


Figura 3b

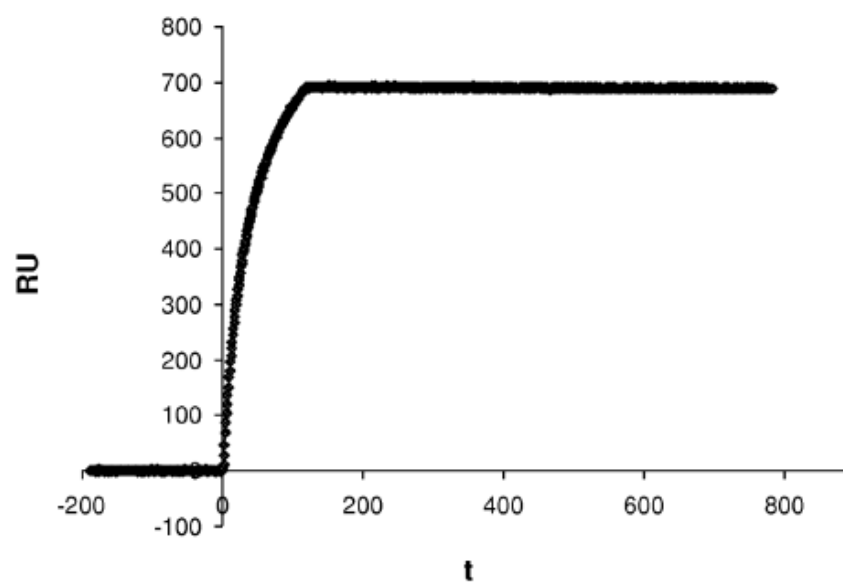


Figura 3c

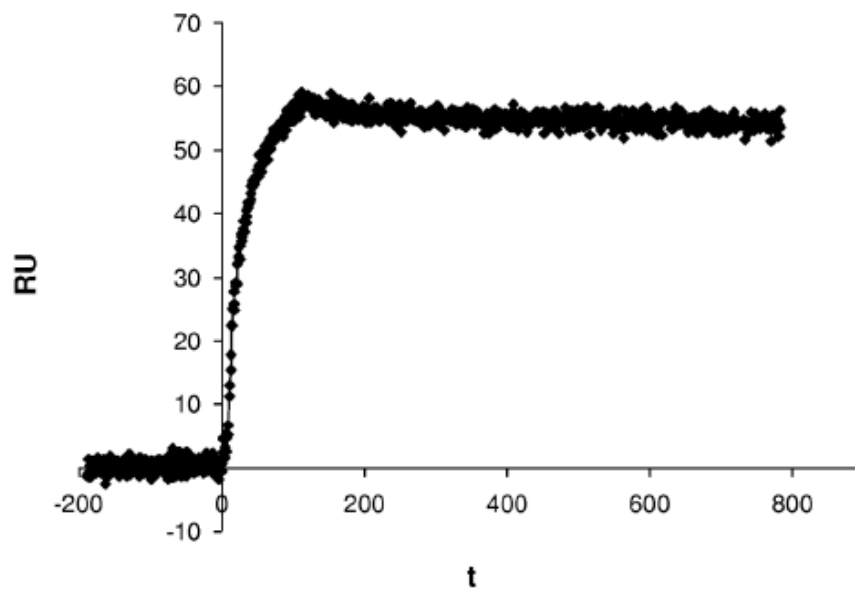


Figura 3d

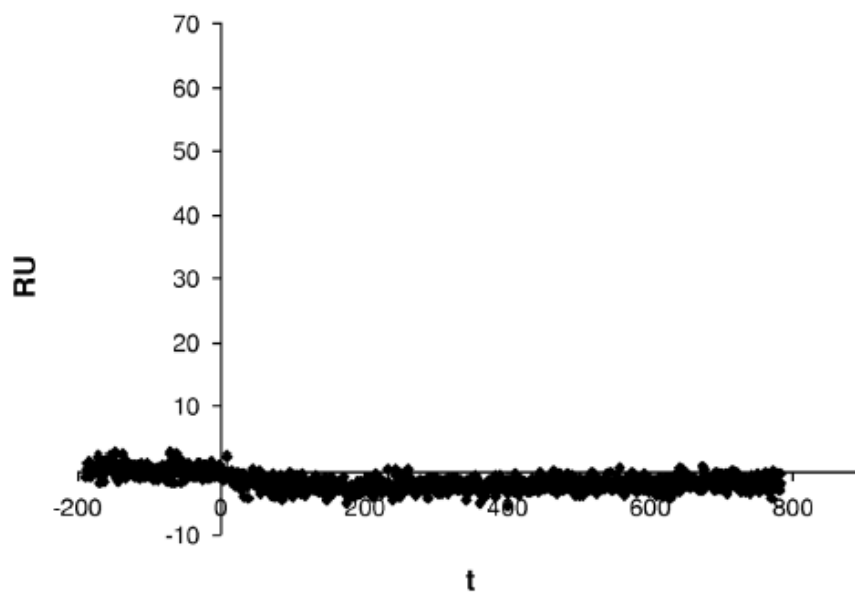


Figura 4

