



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 143**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97925475 .2**

86 Fecha de presentación : **06.05.1997**

87 Número de publicación de la solicitud: **0907733**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.1999**

54 Título: **Nuevos inhibidores de la actividad del factor de crecimiento vascular endotelial, sus usos y procedimientos para su producción.**

30 Prioridad: **07.05.1996 US 643839**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Davis-Smyth, Terri, Lynn;**
Chen, Helen, Hsifei;
Presta, Leonard y
Ferrara, Napoleone

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Nuevos inhibidores de la actividad del factor de crecimiento vascular endotelial, sus usos y procedimientos para su producción.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevas proteínas quiméricas receptoras del VEGF que comprenden secuencias de aminoácidos derivadas de los receptores del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) fit-1, KDR y homólogo murino del receptor KDR humano, FLK-1, en la que dichas proteínas quiméricas receptoras de VEGF se unen a VEGF y antagonizan la actividad proliferativa y angiogénica de células endoteliales del mismo. La presente invención también se refiere a los ácidos nucleicos y vectores de expresión que codifican estas proteínas quiméricas receptoras de VEGF, a las células huésped que transportan estos vectores de expresión, a las composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden dichas proteínas, a procedimientos para preparar dichas proteínas, y a procedimientos que utilizan dichas proteínas para el tratamiento de condiciones asociadas con una vascularización no deseada.

Antecedentes de la invención

Los dos componentes celulares mayores del sistema vascular del mamífero son las células endoteliales y las células musculares lisas. Las células endoteliales forman el revestimiento de la superficie interna de todos los vasos sanguíneos en el mamífero y constituyen una interfase no trombogénica entre la sangre y el tejido. Por lo tanto, la proliferación de células endoteliales es un componente importante para el desarrollo de nuevos capilares y vasos sanguíneos que, a su vez, resulta un proceso necesario para el crecimiento y/o la regeneración de los tejidos en el mamífero.

Una proteína que se ha demostrado que desempeña un papel extremadamente importante en la promoción de la proliferación de las células endoteliales y en la angiogénesis es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). El VEGF es un factor de crecimiento de las células endoteliales que se une a la heparina, que se identificó originalmente y se purificó a partir de medios condicionados por células foliculares pituitarias o foliculoestrelladas (FS) (Ferrara y Henzel, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 161:851-858, 1989). El VEGF es un dímero con un peso molecular aparente de 46 kDa, presentando cada subunidad un peso molecular aparente de aproximadamente 23 kDa. El VEGF humano se expresa en una diversidad de tejidos como múltiples formas homodiméricas (de 121, 165, 189 y 206 aminoácidos por monómero), en los que cada forma surge como resultado del corte y empalme alternativos de un solo transcrito de ARN. VEGF121 es un mitógeno soluble que no se une a la heparina, mientras que las formas más largas de VEGF se unen a la heparina con una afinidad progresivamente más elevada.

Los análisis bioquímicos han demostrado que VEGF muestra una especificidad mitogénica fuerte para las células vasculares endoteliales. Por ejemplo, los medios acondicionados por células transfectadas por el ADNc de VEGF humano estimularon la proliferación de las células endoteliales de capilares, mientras que el medio acondicionado por células de control no lo hizo (Leung *et al.*, *Science* 246:1306, 1989). De esta manera, es conocido que VEGF estimula la proliferación y angiogénesis de las células vasculares endoteliales, un proceso que implica la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de endotelio preexistente. Como tal, el VEGF puede resultar útil para el tratamiento terapéutico de numerosas condiciones en las que resulta importante una actividad estimulante del crecimiento sobre las células vasculares endoteliales, por ejemplo en úlceras, lesiones vasculares e infarto de miocardio.

Sin embargo, en contraste, mientras que la proliferación vascular endotelial resulta deseable bajo determinadas circunstancias, la proliferación y angiogénesis vasculares endoteliales también son componentes importantes de una diversidad de enfermedad y trastornos, incluyendo el crecimiento y metástasis tumorales, la artritis reumatoide, la soriasis, la aterosclerosis, la retinopatía diabética, la fibroplasia retrolental, el glaucoma neovascular, la degeneración macular relacionada con la edad, los hemangiomas, el rechazo inmunológico del tejido corneal trasplantado y de otros tejidos, y la inflamación crónica. Evidentemente en los individuos que sufren de cualquiera de estos trastornos, resultaría deseable inhibir, o por lo menos reducir sustancialmente, la actividad proliferativa endotelial de la proteína VEGF.

En el caso específico del crecimiento de las células tumorales, la angiogénesis aparentemente resulta crucial para la transición de hiperplasia a neoplasia, y para proporcionar nutrición al tumor sólido en crecimiento (Folkman *et al.*, *Nature* 339:58, 1989). La angiogénesis también permite que los tumores se encuentren en contacto con el lecho vascular del huésped, que puede proporcionar una vía para la metástasis de las células tumorales. La evidencia de un papel para la angiogénesis en la metástasis tumoral, por ejemplo, ha sido proporcionada por estudios que demuestran una correlación entre el número y densidad de los microvasos en secciones histológicas de carcinoma mamario humano y la presencia real de metástasis distantes (Weidner *et al.*, *New Engl. J. Med.* 324:1, 1991). De esta manera, un posible mecanismo para el tratamiento efectivo de los tumores neoplásicos es inhibir o reducir sustancialmente la actividad proliferativa y angiogénica endotelial de la proteína VEGF.

La actividad proliferativa endotelial de VEGF es conocido que se encuentra mediada por dos receptores tirosina quinasa de elevada afinidad, fit-1 y KDR, que existen únicamente sobre la superficie de las células vasculares endoteliales (DeVries *et al.*, *Science* 225:989-991, 1992, y Terman *et al.*, *Oncogene* 6:1677-1683, 1991). Ambos receptores tirosina quinasa, fit-1 y KDR, presentan siete dominios similares a inmunoglobulina (similares a Ig) que forman las regiones de unión de ligandos extracelulares de los receptores, un dominio transmembranaral que sirve para anclar los receptores sobre la superficie de las células en las que se expresa, y un dominio de tirosina quinasa catalítica intra-

celular que se encuentra interrumpido por una “inserción quinasas”. Aunque el receptor KDR se une únicamente a la proteína VEGF con afinidad elevada, el receptor fit-1 también se une al factor de crecimiento placentario (PLGF), una molécula que presenta una homología estructural significativa con VEGF. Un elemento adicional de los receptores tirosina quinasas con siete dominios similares a Ig en la región de unión de ligandos extracelulares es FLT4, que no es un receptor para VEGF ni para PLGF, pero que se une a un ligando diferente: VH1.4.5. El ligando VH1.4.5 se ha informado en la literatura como proteína relacionada con VEGF (VRP) o como VEGF-C.

Algunos estudios genéticos recientes de knock-out han demostrado tanto los receptores fit-1 como los KDR resultan esenciales para el desarrollo normal del sistema vascular de mamífero, aunque sus papeles respectivos en la proliferación y diferenciación celular endotelial aparentemente son diferentes. De esta manera, la actividad proliferativa y angiogénica endotelial de la proteína VEGF se encuentra mediada por la unión a la región de unión a ligandos extracelulares de los receptores fit-1 y KDR sobre la superficie de las células vasculares endoteliales. La patente WO n° 95/33050 da a conocer una forma soluble alterada del polipéptido FLT capaz de unirse a VEGF y que de esta manera ejerce un efecto inhibitorio sobre el mismo, comprendiendo el polipéptido cinco o menos de cinco dominios similares a inmunoglobulina completos, junto con composiciones farmacéuticas que comprenden el polipéptido, y diversos usos de los mismos.

En vista del papel del VEGF en la proliferación y angiogénesis vascular endotelial, y el papel que estos procesos desempeñan en muchas enfermedades y trastornos diferentes, resulta deseable disponer de medios para reducir o inhibir una o más de las actividades biológicas del VEGF. Como tal, la presente invención se basa en la investigación que pretende identificar el dominio o dominios similares a Ig de la región de unión a ligando extracelular de los receptores fit-1 y KDR, que media en la unión a la proteína VEGF, e insertar o fusionar ese dominio o dominios en secuencias de aminoácidos derivadas de otra proteína para producir una “proteína quimérica receptora de VEGF”. Las proteínas quiméricas receptoras de VEGF de la presente invención se unen e inactivan VEGF endógeno, proporcionando de esta manera un medio para reducir o para inhibir la actividad endógena de VEGF y, a su vez, para reducir o para inhibir la proliferación y angiogénesis de las células endoteliales. De esta manera, es un objetivo de la presente invención proporcionar nuevas proteínas quiméricas receptoras de VEGF que comprenden secuencias de aminoácidos derivadas de la región de unión a ligandos extracelulares de los receptores fit-1 y KDR, en las que dichas proteínas quiméricas receptoras de VEGF son capaces de unirse y de inhibir la actividad del VEGF.

Son objetivos adicionales de la presente invención proporcionar ácidos nucleicos que codifican proteínas quiméricas receptoras de VEGF de la presente invención, vectores de expresión replicables capaces de expresar estas proteínas quiméricas, células huésped transfectadas con dichos vectores de expresión, composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas quiméricas receptoras de VEGF de la presente invención, procedimientos para preparar dichas proteínas quiméricas y un procedimiento de utilización de dichas proteínas quiméricas para el tratamiento terapéutico de un individuo que necesita del mismo.

Sumario de la invención

Los objetivos de la presente invención, tal como se han definido de manera general *supra*, se consiguen mediante la provisión de proteína quimérica receptora de VEGF según se define en las reivindicaciones que son capaces de unirse a VEGF y de ejercer un efecto inhibitorio sobre el mismo, en la que dicha proteína quimérica receptora de VEGF comprende dominios 1, 2 y 3 similares a Ig de los receptores fit-1 y/o KDR (o el homólogo murino del receptor KDR, FLK-1) o equivalentes funcionales de los mismos.

En una realización preferente, las proteínas quiméricas receptoras de VEGF de la presente invención contienen secuencias de aminoácidos de los receptores fit-1 o KDR correspondientes únicamente a los dominios 1, 2 y 3 similares a Ig de la región de unión a ligandos extracelulares de los mismos, y cada dominio similar a Ig se deriva del mismo receptor de VEGF.

Sin embargo, en otras realizaciones, las proteínas quiméricas receptoras de VEGF de la presente invención comprenden los dominios 1, 2 y 3 similares a Ig de la región de unión a ligandos extracelulares de los receptores fit-1 o KDR además de uno o más de los cuatro dominios restantes similares a inmunoglobulina de los mismos. Preferentemente, los dominios similares a Ig utilizados se derivan del mismo receptor, sin embargo resulta de utilidad una combinación de dominios similares a Ig derivados de los receptores tanto fit-1 como KDR.

En otra realización de la presente invención, las proteínas quiméricas receptoras de VEGF de la presente invención comprenden la región de unión a ligandos extracelulares del receptor FLT4, en la que por lo menos el dominio 2 similar a inmunoglobulina del receptor FLT4 se sustituye por el dominio 2 similar a inmunoglobulina del receptor fit-1 o del receptor KDR. Preferentemente, sólo el dominio 2 similar a inmunoglobulina del receptor FLT4 se sustituye por el dominio similar a Ig correspondiente del receptor fit-1 o del receptor KDR, no obstante también pueden sustituirse de manera similar otros dominios.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos según se definen en las reivindicaciones que codifican las proteínas quiméricas receptoras de VEGF descritas en la presente invención y los equivalentes funcionales de las mismas. Es bien conocido para el experto ordinario en la materia que estos ácidos nucleicos pueden variar debido a la degeneración del código genético y estas variantes de ácidos nucleicos también se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

En todavía otras realizaciones, la presente invención se refiere a vectores de expresión replicables que codifican las diversas proteínas quiméricas receptoras de VEGF indicadas *supra*, las células huésped transfectadas con dichos vectores de expresión, y las composiciones que comprenden las proteínas quiméricas receptoras de VEGF indicadas *supra* formando compuesto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En todavía otras realizaciones, la presente invención se refiere a un procedimiento según se define en las reivindicaciones para producir las proteínas quiméricas receptoras de VEGF indicadas *supra* mediante la introducción de un vector de expresión que codifica la proteína quimérica deseada en un sistema de expresión apropiado y para realizar la expresión de dicha proteína.

Todavía otro aspecto de la invención da a conocer la utilización de las proteínas quiméricas receptoras de VEGF de la presente invención como medios para el tratamiento de condiciones asociadas con una vascularización inapropiada, en los que resulta deseable una inhibición de la vascularización y de la angiogénesis.

Descripción detallada de la invención

A. Definiciones

Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión “proteína quimérica receptora de VEGF” significa una molécula de receptor con secuencias de aminoácidos derivadas de por lo menos dos proteínas diferentes, por lo menos una de las cuales es el receptor fit-1 o KDR, siendo capaz dicha molécula de receptor de unirse y de inhibir la actividad del VEGF. Preferentemente, las proteínas quiméricas receptoras de VEGF de la presente invención consisten de secuencias de aminoácidos derivadas de únicamente dos moléculas diferentes de receptor de VEGF, sin embargo las secuencias de aminoácidos que comprenden dominios similares a Ig de la región de unión a ligandos extracelulares de los receptores fit-1 y/o KDR pueden unirse a las secuencias de aminoácidos de otras proteínas no relacionadas, por ejemplo secuencias de inmunoglobulina. Otras secuencias de aminoácidos con las que se combinan dominios similares a IgG resultarán claramente evidentes para los expertos ordinarios en la materia.

La expresión “receptor KDR” tal como se utiliza en la presente invención pretende abarcar no sólo el receptor KDR sino también el homólogo murino del receptor KDR humano, denominado FLK-1.

La expresión “dominio similar a inmunoglobulina” o “dominio similar a Ig” se refiere a cada uno de los siete dominios independientes y diferentes que se encuentran en la región de unión a ligando extracelular de los receptores fit-1, KDR y FLT4. Generalmente se hace referencia a los dominios similares a Ig con un número.

Tal como se utiliza en la presente invención, la expresión “dominio similar a Ig” pretende abarcar no sólo el dominio de tipo salvaje completo, sino también las variantes por inserción, por delección y por sustitución del mismo, que conservan sustancialmente las características funcionales del dominio intacto. Resultará claramente evidente al experto ordinario en la materia que pueden obtenerse numerosas variantes de los dominios similares a Ig de los receptores fit-1 y KDR que conservan sustancialmente las mismas características funcionales del dominio de tipo salvaje.

El término “soluble” tal como se utiliza en la presente invención con referencia a las proteínas quiméricas receptoras de VEGF de la presente invención pretenden referirse a proteínas quiméricas receptoras de VEGF que no se encuentran fijadas en la superficie de las células mediante un dominio transmembranal. Como tales, las formas solubles de las proteínas quiméricas de unión a VEGF de la presente invención, aunque son capaces de unirse y de inactivar VEGF, no comprenden un dominio transmembranal, y de esta manera generalmente no se asocian con la membrana celular de las células en las que se expresa la molécula. Una forma soluble del receptor ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad biológica de la proteína VEGF mediante la unión a VEGF, evitando de esta manera que se une a sus receptores naturales presentes sobre la superficie de las células diana.

La expresión “unido a membrana” tal como se utiliza en la presente invención con referencia a las proteínas quiméricas receptoras de VEGF de la presente invención pretende referirse a las proteínas quiméricas receptoras de VEGF que se encuentran fijadas, mediante un dominio transmembranal, a la superficie de las células en las que se expresan.

La expresión “equivalentes funcionales” cuando se utiliza en referencia a los dominios similares a Ig de las regiones de unión a ligandos extracelulares de los receptores fit-1, KDR o FLT4 se refiere a que el dominio o dominios similares a Ig poseen por lo menos una alteración particular, tal como una delección, adición y/o sustitución en los mismos, aunque conservan sustancialmente las mismas características funcionales que el dominio o dominios similares a Ig de tipo salvaje con referencia más específicamente a dominios 1, 2 y 3 similares a Ig de los receptores fit-1 y/o KDR, la expresión “equivalentes funcionales” pretende un alcance de una parte suficiente de los dominios que resulte en una unión por lo menos sustancial a VEGF, es decir, una secuencia parcial de cada uno de dichos dominios que produzca un efecto de unión. La expresión “efecto inhibitorio” cuando se utiliza en referencia a la actividad de una proteína quimérica receptora de VEGF de la presente invención se refiere a que la proteína quimérica receptora de VEGF se une y sustancialmente inhibe la actividad del VEGF. Generalmente, el resultado de este efecto inhibitorio es una reducción de la vascularización y/o angiogénesis que se produce como resultado de la acción de la proteína VEGF.

La expresión “vascularización no deseada” se refiere a la proliferación y/o angiogénesis endotelial que se asocia con una enfermedad o trastorno no deseable y que, si se reduce o se elimina, resultará en una reducción o una eliminación de las características no deseables de la enfermedad o del trastorno. Por ejemplo, la vascularización y/o angiogénesis asociados a la formación y metástasis de tumores y diversas retinopatías no resultan deseables.

El término “transfección” se refiere a la incorporación de un vector de expresión por una célula huésped se exprese o no ninguna secuencia codificante. El experto ordinario en la materia conoce numerosos procedimientos de transfección, por ejemplo CaPO₄ y electroporación. La transfección con éxito generalmente se identifica al producirse alguna indicación del funcionamiento del vector dentro de la célula huésped.

El término “transformación” se refiere a la introducción de ADN en un organismo de manera que el ADN resulte replicable, sea como elemento extracromosómico o mediante la integración en un cromosoma. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar apropiadas para la célula. El tratamiento de calcio utilizando cloruro de calcio, tal como describe Cohen, S.N., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69:2110, 1972, y Mandel *et al.*, J. Mol. Biol. 53:154, 1978, se utiliza generalmente para procariotas u otras células que contienen barreras de pared celular sustanciales. Para las células de mamífero, sin estas paredes celulares, resulta preferente el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham, F. y van der Eb, A., Virology 52:456-457, 1978. Los aspectos generales de las transformaciones de los sistemas de células huésped de mamífero se han descrito en Axel, patente US n° 4.399.216, publicada el 16 de agosto de 1983. Las transformaciones de la levadura típicamente se llevan a cabo de acuerdo con el procedimiento de Van Solingen, P. *et al.*, J. Bact. 130:946, 1977, y Hsiao, C.L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76:3829, 1979. Sin embargo, también pueden utilizarse otros procedimientos para introducir ADN en las células, tales como la inyección nuclear, la electroporación o la fusión de protoplasto.

La “mutagénesis sitio-dirigida” es una técnica estándar en la técnica, y se lleva a cabo utilizando un cebador oligonucleótido sintético complementario a un ADN fágico de cadena única que debe mutagenizarse, excepto por un desapareamiento limitado, que representa la mutación deseada. En resumen, los oligonucleótidos sintéticos se utilizan como cebador para dirigir la síntesis de una cadena complementaria al fago, y el ADN de doble cadena resultante se transforma en un huésped bacteriano que da soporte al fago. Los cultivos de las bacterias transformadas se siembran en placa de ágar Top Agar, permitiendo la formación de placas a partir de células individuales que transportan el fago. En teoría, el 50% de las nuevas placas contendrá el fago, presentando, en forma de cadena única, la forma mutada; el 50% presentará la secuencia original. Las placas se hibridan con cebador sintético quinasado a una temperatura que permite la hibridación con un apareamiento exacto, pero a la que los desapareamientos con la cadena original resultan suficientes para evitar la hibridación. Las placas que se hibridan con la sonda seguidamente se seleccionan y se cultivan y el ADN se recupera.

La expresión “ligado operablemente” se refiere a la yuxtaposición, de manera que pueda llevarse a cabo la función normal de los componentes. De esta manera, una secuencia codificante “ligada operablemente” a secuencias e control se refiere a una configuración en la que la secuencia codificante puede expresarse bajo el control de estas secuencias y en la que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder de secreción, son contiguas y se encuentran en el mismo marco de lectura. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder de secreción se encuentra operablemente ligado a ADN para un polipéptido si se expresa como preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador se encuentra ligado operablemente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma se encuentra ligado operablemente a una secuencia codificante si se encuentra situado para facilitar la traducción. La unión se consigue mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen estos sitios, se utilizan adaptadores o linkers oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

La expresión “secuencias de control” se refiere a secuencias e ADN que resultan necesarias para la expresión de una secuencia codificante operablemente ligada en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que resultan adecuadas para los procariotas, por ejemplo, incluyendo un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, un sitio de unión a ribosoma, y posiblemente, otras secuencias todavía poco conocidas. Las células eucarióticas es conocido que utilizan promotores, secuencias de poliadenilación e intensificadores.

La expresión “sistema de expresión” se refiere a secuencias de ADN que contienen una secuencia codificante deseada y secuencias de control en ligamiento operable, de manera que los huéspedes transformados con estas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Para producir la transformación, el sistema de expresión puede incluirse en un vector; sin embargo, el ADN relevante puede integrarse entonces en el cromosoma del huésped.

Tal como se utiliza en la presente invención, las expresiones “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se utilizan intercambiamente y todas estas expresiones incluyen la progenie. De esta manera, las expresiones “transformante” o “células transformadas” incluyen la célula sujeto principal y los cultivos derivados de la misma con independencia del número de transferencias. También se entiende que no toda la progenie debe ser precisamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluye la progenie mutante que presenta la misma funcionalidad que la buscada mediante cribado en la célula transformada originalmente. En el caso de que se pretendan utilizar denominaciones diferentes, resultará evidente a partir del contexto.

Los “plásmidos” se designan mediante una p minúscula precedida y/o seguida por letras mayúsculas y/o números. Los plásmidos de partida en la presente invención se encuentran disponibles comercialmente, se encuentran disponibles públicamente de manera ilimitada, o pueden construirse a partir de plásmidos disponibles de esta manera de acuerdo a procedimientos publicados. Además, son conocidos otros plásmidos equivalentes en la técnica y resultarán evidentes para el experto ordinario.

El término “digestión” de ADN se refiere al corte catalítico del ADN con un enzima que actúa únicamente en determinados sitios del ADN. Estos enzimas se denominan enzimas de restricción, y los sitios para los que cada uno es específico se denomina sitio de restricción. Los diversos enzimas de restricción utilizados en la presente invención se encuentran disponibles comercialmente y se utilizan las diversas condiciones, cofactores y otros requisitos de reacción según establecen los suministradores de enzimas. Los enzimas de restricción se denominan comúnmente mediante abreviaturas compuestas de una letra mayúscula seguida de otras letras que representan el microorganismo a partir del cual se obtuvo originalmente cada enzima de restricción y después un número que designa el enzima particular. En general, se utiliza aproximadamente 1 mg de plásmido o de fragmento de ADN con aproximadamente 1 a 2 unidades de enzima en aproximadamente 20 ml de solución tampón. Los tampones apropiadas y las cantidades de sustrato para los enzimas de restricción particulares se encuentran especificados por el fabricante. La incubación de aproximadamente 1 hora a 37°C se utiliza habitualmente, puede variar de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Tras la incubación, las proteínas se eliminan mediante extracción con fenol y cloroformo, y los ácidos nucleicos digeridos se recuperan de la fracción acuosa mediante precipitación con etanol. Con menos frecuencia tras la digestión con un enzima de restricción se realiza una hidrólisis con fosfatasa alcalina bacteriana de los fosfatos 5' terminales para evitar que los dos extremos cortados con enzimas de restricción de un fragmento de ADN se “circularicen” o formen un bucle cerrado que impediría la inserción de otro fragmento de ADN en el sitio de restricción. A menos que se indique lo contrario, tras la digestión de los plásmidos no se realiza la desfosforilación 5' terminal. Los procedimientos y reactivos para la desfosforilación son los convencionales (T. Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), 1982), páginas 133-134).

La “recuperación” o “aislamiento” de un fragmento dado de ADN de un digerido de restricción significa la separación del digerido en un gel de poliacrilamida o de gel de agarosa mediante electroforesis, la identificación del fragmento de interés mediante la comparación de su movilidad con la de fragmentos marcadores de ADN de peso molecular conocido, la extracción de la sección de gel que contiene el fragmento deseado, y la separación del gel del ADN. Este procedimiento es conocido de manera general. Por ejemplo, ver R. Lawn *et al.*, Nucleic Acids Res. 9:6103-6114, 1981, y D. Goeddel *et al.*, Nucleic Acids Res. 8:4057, 1980.

El término “ligación” se refiere al procedimiento de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácidos nucleicos de doble cadena (T. Maniatis *et al.*, *supra*, 1982, página 146). A menos que se indique lo contrario, la ligación puede conseguirse utilizando tampones y condiciones conocidas utilizando 10 unidades de ADN ligasa de T4 (“ligasa”) por cada 0,5 mg de cantidades aproximadamente equimolares de los fragmentos de ADN que deben ligarse.

“Preparación” de ADN a partir de transformantes se refiere al aislamiento de plásmido de ADN a partir de un cultivo microbiano. A menos que se indique lo contrario, puede utilizarse el procedimiento alcalino/SDS de Maniatis *et al.*, *supra*, 1982, página 90.

Los “oligonucleótidos” son polidesoxinucleótidos de longitud corta, de cadena única o doble que se sintetizan químicamente mediante procedimientos conocidos (tal como reacciones fosfotriéster, fosfito o fosforamidita, utilizando técnicas en fase sólida, tales como las descritas en la patente EP publicación n° 266.032 publicada el 4 de mayo de 1988, o mediante intermediarios desoxinucleósido H-fosfonato, tal como describen Froehler *et al.*, Nucl. Acids Res. 14:5399-5407, 1986. A continuación, se purifican en geles de poliacrilamida.

B. Metodología general

1. Variantes de secuencia de aminoácidos

Se apreciará que pueden realizarse diversas sustituciones de aminoácidos en el dominio o dominios similares a Ig de las proteínas quiméricas receptoras de VEGF de la presente invención sin apartarse del espíritu de la invención con respecto a la capacidad de las proteínas quiméricas de unirse al VEGF y de inhibir su actividad. De esta manera, pueden realizarse mutaciones puntuales y otras variaciones más amplias en el dominio o dominios similares a Ig de las proteínas quiméricas receptoras de VEGF de la presente invención de manera que proporcionen propiedades interesantes que no afecten sustancialmente a la capacidad de la proteína quimérica de unirse al VEGF y de inhibir su actividad. Estas variantes pueden prepararse por medios generalmente bien conocidos en la técnica.

a. Modificaciones covalentes

Pueden realizarse modificaciones covalentes en diversos residuos aminoácidos del dominio o dominios similares a Ig presentes en la proteína quimérica receptora de VEGF, proporcionando de esta manera nuevas propiedades a ese dominio o dominios similares a Ig sin eliminar su capacidad de unirse a VEGF y de inactivarlo.

Por ejemplo, los residuos cisteinilo con más frecuencia se hacen reaccionar con a-haloacetatos (y las aminas correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, proporcionando derivados carboximetilo o carboxiami-

dometilo. Los residuos cisteinilo también se derivatizan mediante reacción con bromotrifluoroacetona, ácido a-bromo-b-(5-imidozoi)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alkuilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil-2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

- 5 Los residuos histidilo se derivatizan mediante reacción con dietilpirocarbonato a un pH comprendido entre 5,5 y 7,0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral histidilo. También resulta útil el bromuro de para-bromofenacilo; la reacción preferentemente se lleva a cabo en cadoilato sódico 0,1 M a pH 6,0.

- 10 Los residuos lisinilo y aminoterminales se hacen reaccionar con anhídridos succínicos u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes presenta el efecto de invertir la carga de los residuos lisinilo. Entre otros reactivos adecuados para derivatizar los residuos que contienen a-amino se incluyen imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, pirodoxal, cloroborohidruo, ácido trinitrobenzenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

- 15 Los residuos arginilo se modifican mediante la reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilgloxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de residuos arginina requiere que la reacción se lleve a cabo en condiciones alcalinas debido al elevado pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como con el grupo epsilon-amino de la arginina.

- 20 La modificación específica de los residuos tirosilo *per se* se ha estudiado extensivamente, con particular interés en la introducción de marcajes espectrales en los residuos tirosilo mediante la reacción con compuestos diazonio aromáticos o con tetranitrometano. Más frecuentemente, se utilizan N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Los residuos tirosilo se yodan utilizando ¹²⁵I o ¹³¹I para preparar proteínas marcadas para la utilización en radioinmunoensayo, resultando adecuado el procedimiento de la cloramina T indicado anteriormente.

- 25 Los grupos laterales carboxilo (asparatilo o glutamilo) se modifican selectivamente mediante reacción con carbodiimidias (R'-N-C-N-R'), tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos aspartilo y glutamilo se convierten en residuos asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones amonio.

- 30 La derivatización con agentes bifuncionales resulta útil para entrecruzar la proteína quimérica receptora de VEGF con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para la utilización en el procedimiento para purificar la proteína VEGF de una mezcla compleja. Entre los agentes entrecruzantes utilizados comúnmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo los disuccinimidil ésteres, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato) y las maleimidias bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes derivatizantes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato rinden intermediarios fotoactivables que son capaces de formar enlaces cruzados en presencia de luz. Alternativamente, las matrices reactivas insolubles en agua, tales como los carbohidratos activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes US nº 3.969.287, nº 3.691.016, nº 4.195.128, nº 4.247.642, nº 4.229.537 y nº 4.330.440 se utilizan para la inmovilización de proteínas.

- 40 Los residuos glutaminilo y asparaginilo con frecuencia se desamidán en los residuos glutamilo y aspartilo correspondientes. Alternativamente, estos residuos se desamidán bajo condiciones levemente ácidas. Cualquiera de estas formas de estos residuos se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

- 45 Entre otras modificaciones se incluyen la hidroxilación de la prolisina y de la lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de los residuos serilo o treonilo, la metilación de los grupos a-amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86, 1983), la acetilación de la amina N-terminal y, en algunos casos, la amidación del grupo carboxilo C-terminal.

b. Mutaciones del ADN

- 55 Las variantes de secuencia de aminoácidos del dominio o dominios similares a Ig presentes en las proteínas quiméricas receptoras de VEGF de la presente invención también pueden prepararse mediante la creación de mutaciones en el ADN codificante de la proteína quimérica. Entre estas variantes se incluyen, por ejemplo, las delecciones, o inserciones o sustituciones de residuos aminoácidos dentro de la secuencia e aminoácidos del dominio o dominios similares a IgG. También puede llevarse a cabo cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para alcanzar el constructo final, con la condición de que el constructo final posea la actividad deseada. Evidentemente las mutaciones que se realizarán en el ADN codificante de la variante no deben desplazar la secuencia fuera del marco de lectura, y preferentemente no crearán regiones complementarias que podrían producir estructura secundaria en el ARNm (ver el documento EP nº 75.444A).

- 60 Al nivel genético, las variantes del dominio o dominios similares a Ig presentes en las proteínas quiméricas receptoras de VEGF de la presente invención habitualmente se preparan mediante mutagénesis sitio-dirigida de nucleótidos en el ADN codificante del dominio o dominios similares a Ig, produciendo de esta manera ADN codificante del a

variante, y expresando después el ADN en cultivo celular recombinante. Las variantes típicamente muestran la misma capacidad cualitativa de unirse al ligando de VEGF que la proteína quimérica no alterada.

Mientras que el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos en el dominio o dominios similares a Ig de la proteína quimérica receptora de VEGF se encuentra predeterminada, la mutación *per se* no es necesario que se encuentre predeterminada. Por ejemplo, para optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dato, puede llevarse a cabo mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y cribarse las variantes expresadas de la proteína quimérica para la combinación óptima de atributos deseados, tales como la capacidad de unirse específicamente al ligando de VEGF, la vida media *in vivo*, y similares. Las técnicas para realizar mutaciones por sustitución en sitios predeterminados en el ADN que presenta una secuencia conocida son bien conocidas, por ejemplo la mutagénesis sitio-específica.

La preparación de variantes en el dominio o dominios similares a Ig de una proteína quimérica receptora de VEGF de acuerdo con la invención preferentemente se consigue mediante mutagénesis sitio-específica del ADN que codifica una proteína quimérica preparada anteriormente. La mutagénesis sitio-específica permite la producción de variantes de dominio similar a Ig mediante la utilización de secuencias específicas de oligonucleótidos que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos contiguos, para proporcionar una secuencia de cebador de tamaño y complejidad de secuencia suficientes para formar un dúplex estable en ambos lados de la unión de delección que se atraviesa. Típicamente, resulta preferente un cebador de aproximadamente 20 a 25 nucleótidos de longitud, alterando aproximadamente 5 a 10 residuos en ambos lados de la unión de la secuencia que se altera. En general, la técnica de mutagénesis sitio-específica es bien conocida en la técnica, tal como ejemplifican publicaciones tales como Adelman *et al.*, DNA 2:183, 1983.

Tal como se apreciará, la técnica de mutagénesis sitio-específica típicamente utiliza un vector fago que existe en forma tanto de cadena única como de cadena doble. Entre los vectores típicos que resultan útiles en la mutagénesis sitio-dirigida se incluyen vectores tales como el fago M13, por ejemplo, tal como dan a conocer Messing *et al.*, Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA, editor A. Walton, Elsevier, Amsterdam, 1981. Estos fagos se encuentran disponibles comercialmente con facilidad y su utilización es generalmente bien conocida por los expertos en la materia. Alternativamente, pueden utilizarse vectores plásmido que contienen un origen de replicación de fago de cadena única (Veira *et al.*, Meth. Enzymol. 153:3, 1987) con el fin de obtener ADN de cadena única.

En general, la mutagénesis sitio-dirigida de acuerdo con la invención se lleva a cabo obteniendo en primer lugar un vector de cadena única que incluya dentro de su secuencia una secuencia de ADN que codifique la proteína quimérica receptora de VEGF relevante. Se prepara un cebador oligonucleótido que porte la secuencia mutada que se desea, generalmente sintéticamente, por ejemplo mediante el procedimiento de Crea *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75:5765, 1978. A continuación, se hibrida el cebador con el vector quimérico de cadena única que contiene la secuencia de proteína, y se somete a enzimas polimerizadores de ADN, tales como el fragmento klenow de la polimerasa I de *E. coli*, para completar la síntesis de la cadena que porta la mutación. De esta manera, se forma un heterodúplex en el que una cadena codifica la secuencia no mutada original y la segunda cadena porta la mutación deseada. Este vector heterodúplex seguidamente se utiliza para transformar células apropiadas, tales como las células JM101 y se seleccionan clones que incluyen vectores recombinantes que portan la disposición de secuencia mutada.

Tras seleccionar dicho clon, el ADN mutado que codifica la proteína quimérica variante receptora de VEGF puede extraerse e introducirse en un vector apropiado para la producción de proteína, generalmente un vector de expresión del tipo que puede utilizarse para la transformación de un huésped apropiado.

c. Tipos de mutaciones

Las delecciones de secuencia de aminoácidos generalmente se encuentran comprendidas entre aproximadamente 1 y 15 residuos, más preferentemente entre 1 y 7 residuos, y típicamente son contiguas.

Las inserciones de secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino-terminales y/o carboxi-terminales de entre un residuo y polipéptidos de longitud esencialmente ilimitada, así como inserciones intrasecuencia de uno o múltiples residuos aminoácidos. Las inserciones intrasecuencia (es decir, las inserciones dentro de las secuencias de dominio similar a Ig) pueden encontrarse comprendidas generalmente entre aproximadamente 1 y 10 residuos, más preferentemente entre 1 y 5. Un ejemplo de una inserción terminal incluye una fusión de una secuencia de señal, sea heterólogo u homólogo de la célula huésped, con el extremo N-terminal de la proteína quimérica receptora de VEGF para facilitar la secreción de la proteína quimérica de los huéspedes recombinantes.

El tercer grupo de mutaciones que puede introducirse en el dominio o dominios similares a Ig presente en la proteína quimérica receptora de VEGF son aquellas en las que por lo menos un residuo aminoácido en el dominio o dominios similares a Ig, y preferentemente sólo uno, ha sido extraído y se ha insertado en su lugar un residuo diferente. Estas sustituciones preferentemente se realizan de acuerdo con la Tabla 1 siguiente cuando se desea modular finamente las características del dominio o dominios similares a Ig.

TABLA 1

	Residuo original	Sustituciones ejemplares
5	Ala (A)	gly, ser
	Arg (R)	lys
	Asn (N)	gln, his
	Asp (D)	glu
10	Cys (C)	ser
	Gln (Q)	asn
	Glu (E)	asp
	Gly (G)	ala, pro
15	His (H)	asn, gln
	Ile (I)	leu, val
	Leu (L)	ile, val
	Lys (K)	arg, gln, glu
20	Met (M)	leu, tyr, ile
	Phe (F)	met, leu, tyr
	Ser (S)	thr
	Thr (T)	ser
	Trp (W)	tyr
25	Tyr (Y)	trp, phe
	Val (V)	ile, leu

Se realizan cambios sustanciales en la función o identidad inmunológica mediante la selección de sustituciones que son menos conservativas que aquéllas en la Tabla 1, es decir, seleccionando residuos que difieren más significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo en la conformación de lámina o de hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades de los dominios similares a Ig son aquéllas en las que (a) la glicina y/o la prolina (P) se sustituye por otro aminoácido o se deleciona o se inserta; (b) un residuo hidrofílico, por ejemplo serilo o treonilo, se sustituye por (o con) un residuo hidrofóbico, por ejemplo leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo, o alanilo; (c) se sustituye un residuo cisteína por (o con) cualquier otro residuo; (d) un residuo con una cadena lateral electropositiva, por ejemplo lisilo, arginilo o histidilo, se sustituye por (o con) un residuo con una carga electronegativa, por ejemplo glutamilo o aspartilo; (e) un residuo con una cadena lateral electronegativa se sustituye por (o con) un residuo con una carga electropositiva; o (f) un residuo con una cadena lateral voluminosa, por ejemplo fenilalanina, se sustituye por (o con) uno que no presenta una cadena lateral voluminosa, por ejemplo la glicina.

La mayoría de las delecciones e inserciones, y las sustituciones en particular, no se espera que produzcan cambios radicales en las características del dominio o dominios similares a Ig de la proteína quimérica receptora de VEGF. Sin embargo, cuando resulta difícil predecir el efecto exacto de la sustitución, de la delección o de la inserción anticipadamente, un experto en la materia apreciará que el efecto se evaluará mediante ensayos de cribado rutinarios. Por ejemplo, una variante de dominio similar a Ig típicamente se realiza mediante mutagénesis sitio-específica del ácido nucleico que codifica la proteína quimérica receptora de VEGF intacta, la expresión del ácido nucleico variante en cultivo celular recombinante, la purificación de la proteína quimérica variante receptora de VEGF del cultivo celular, y la detección de la capacidad de la proteína quimérica variante receptora de VEGF de unirse específicamente a un ligando de VEGF. Los ensayos de unión que pueden utilizarse rutinariamente para determinar si una alteración o alteraciones particulares en un dominio o dominios similares a Ig afectan a la capacidad de la proteína quimérica receptora de VEGF de unirse a VEGF y de inhibir la actividad del mismo se describen tanto en los Ejemplos posteriormente como en el artículo de Park *et al.*, J. Biol. Chem. 269:25646-25654, 1994.

De esta manera, puede cribarse para la actividad de una proteína quimérica variante receptora de VEGF en un ensayo de cribado adecuado para la característica adecuada. Por ejemplo, puede medirse un cambio en la capacidad de unirse específicamente a un ligando de VEGF mediante un ensayo de unión a VEGF de tipo competitivo. Las modificaciones de estas propiedades de la proteína, tales como el redox o la estabilidad térmica, la hidrofobicidad, la susceptibilidad a la degradación proteolítica, o la tendencia a agregar con portadores o en multímeros, se someten a ensayo mediante procedimientos bien conocidos por el experto ordinario en la materia.

2. Expresión recombinante

Las proteínas quiméricas receptoras de VEGF de la presente invención se preparan mediante cualquier técnica, incluyendo los bien conocidos procedimientos recombinantes. De manera similar, en la presente invención se entiende

por ADN asilado un ADN sintetizado químicamente, un ADNc, un ADN cromosómico o extracromosómico con o sin las regiones 3'-flanqueantes y/o 5'-flanqueantes. Preferentemente, la proteína quimérica receptora de VEGF de la presente invención que se desea se prepara mediante síntesis en cultivo celular recombinante.

5 Para dicha síntesis, en primer lugar resulta necesario conseguir ácidos nucleicos que codifican una proteína quimérica receptora de VEGF de la presente invención. El ADN codificante de un receptor fit-1 o KDR puede obtenerse a partir de células vasculares endoteliales mediante (a) la preparación de una biblioteca de ADNc a partir de estas células, (b) llevar a cabo un análisis de hibridación con ADN marcado codificante del receptor fit-1 o KDR o fragmentos de los mismos (de longitud hasta 100 pares de bases o más) para detectar clones en la biblioteca que
10 contiene secuencias homólogas, y (c) analizar los clones mediante análisis de enzimas de restricción y secuenciación de ácidos nucleicos para identificar los clones de longitud completa. Si no se encuentran presentes los clones de longitud completa en una biblioteca de ADNc, los fragmentos apropiados pueden recuperarse a partir de diversos clones utilizando la información de secuencia de ácidos nucleicos y de aminoácidos conocida para los receptores fit-1 y KDR y ligarse en sitios de restricción comunes para los clones con el fin de construir un clon de longitud completa codificante del dominio fit-1 o KDR. Alternativamente, las bibliotecas genómicas pueden proporcionar el ADN deseado.
15

Tras identificar y aislar dicho ADN de la biblioteca, este ADN puede ligarse en un vector de expresión apropiado conectado operablemente a secuencias de control apropiadas. Además, tras clonarlo en un vector apropiado, el ADN
20 puede alterarse de numerosas maneras, tal como se ha descrito anteriormente, para producir variantes funcionalmente equivalentes del mismo. Además, el ADN codificante de diversos dominios, tales como los dominios intracelular, transmembranal y/o diversos dominios similares a Ig pueden delecionarse y/o sustituirse por ADN codificante de dominios correspondientes de otros receptores. El ADN codificante de secuencias de aminoácidos no relacionadas, tales como la parte Fc de una molécula de inmunoglobulina, también pueden fusionarse al ADN codificante de parte
25 o todo el receptor de VEGF, produciendo de esta manera una molécula quimérica receptora de VEGF.

En un ejemplo de un sistema de expresión recombinante, se expresa un dominio similar a Ig que contiene una proteína quimérica receptora de VEGF en células de mamífero mediante transformación con un vector de expresión que comprende ADN codificante de la proteína quimérica receptora de VEGF. Resulta preferente transformar células
30 huésped capaces de conseguir este procesamiento, de manera que se obtiene la proteína quimérica en el medio de cultivo o en el periplasma de la célula huésped, es decir, para obtener una molécula secretada.

a. Células huésped y vectores útiles

35 Los vectores y procedimientos dados a conocer en la presente invención resultan adecuados para la utilización en células huésped en un amplio abanico de organismos procarióticos y eucarióticos.

En general, evidentemente, los procariotas resultan preferentes para la clonación inicial de secuencias de ADN y la construcción de los vectores que resultan útiles en la invención.
40

Por ejemplo, resulta particularmente útil la cepa MM 294 de *E. coli* K12 (ATCC nº 31.446). Entre otras cepas microbianas que pueden utilizarse se incluyen cepas de *E. coli* tales como *E. coli* B y *E. coli* X1776 (ATCC nº 31.537). Estos ejemplos pretenden, evidentemente, ser ilustrativos y no limitativos.

45 También pueden utilizarse procariotas para la expresión. Pueden utilizarse las cepas anteriormente indicadas, así como las cepas W3110 de *E. coli* (F-, lambda-, fototrófica, ATCC nº 27.325), K5772 (ATCC nº 53.635), y SR101, y bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacteriáceas, tales como *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcesans*, y diversas especies de *Pseudomonas*.

50 En general, los vectores plásmido que contienen secuencias de replicón y de control que se derivan de especies compatibles con la célula huésped se utilizan en conexión con estos huéspedes. El vector habitualmente porta un sitio de replicación, así como secuencias marcadores que pueden permitir la selección fenotípica en las células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* típicamente se transforma utilizando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli* (ver, por ejemplo, Bolivar *et al.*, Gene 2:95, 1977). pBR322 contiene genes para la resistencia a la ampicilina y a la tetraciclina, y de esta manera proporciona medios sencillos para identificar las células transformadas. El plásmido
55 pBR322 u otro plásmido microbiano o fago debe contener, o modificarse para que contenga promotores que puede utilizar el organismo microbiano para la expresión de sus propias proteínas.

Entre aquellos promotores utilizados comúnmente en la construcción de ADN recombinante se incluyen los sistemas promotores de la β -lactamasa (penicilasa) y de la lactosa (Chang *et al.*, Nature 375:615, 1978; Itakura *et al.*, Science 198:1056, 1977; Goeddel *et al.*, Nature 281:544, 1978) y un sistema promotor del triptófano (trp) (Goeddel *et al.*, Nucleic Acids Res. 8:4057, 1980; solicitud EPO publicación nº 0036.776). Aunque estos son los utilizados más frecuentemente, se han descubierto y utilizado otros promotores microbianos, y se han publicado detalles referentes a sus secuencias de nucleótidos, permitiendo al experto en la materia ligarlos funcionalmente con vectores plásmido
60 (ver, por ejemplo, Siebenlist *et al.*, Cell 20:269, 1980).

Además de los procariotas, también pueden utilizarse microbios eucariotas, tales como los cultivos de levaduras. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero, es el microorganismo eucariótico utilizado más frecuentemente,

aunque se encuentran comúnmente disponibles varias otras cepas. Para la expresión en *Saccharomyces*, se utiliza comúnmente el plásmido YRp7 (Stinchcomb *et al.*, Nature 282:39, 1978; Kingsman *et al.*, Gene 7:141, 1979; Tschemper *et al.*, Gene 10:157, 1980). Este plásmido ya contiene el gen *trp1*, que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo ATCC n° 44.706 o PEP4-12 (Jones, Genetics 85:12, 1977). La presencia de la lesión en *trp1* como característica del genoma de la célula huésped levadura proporciona entonces un ambiente eficaz para detectar la transformación mediante el crecimiento en ausencia de triptófano.

Entre las secuencias promotoras adecuadas en vectores levadura se incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem. 255:2073, 1980) u otros enzimas glucolíticos (Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg. 7:149, 1968; Holland *et al.*, Biochemistry 17:4900, 1978), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa. Durante la construcción de plásmidos de expresión adecuados, las secuencias de terminación asociadas con estos genes también se ligan en el vector de expresión en dirección 3' a la secuencia que se desea expresar para proporcionar la poliadenilación del ARNm y la terminación. Otro promotores, que presentan la ventaja adicional de que la transcripción se encuentra controlada por las condiciones de cultivo, son la región promotora para la alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, los enzimas degradativos asociados con el metabolismo del nitrógeno, y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa anteriormente indicada, y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y de la galactosa. Resulta adecuado cualquier vector plásmido que contenga promotores, origen de replicación y secuencias de terminación compatibles con la levadura.

Además de microorganismos, pueden utilizarse como huéspedes cultivos de células derivadas de organismos multicelulares. En principio, cualquier de estos cultivos celulares puede trabajarse, sea de un cultivo de vertebrado o de invertebrado. Sin embargo, el mayor interés se ha centrado en las células de vertebrado, y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario en los últimos años (Tissue Culture, Academic Press, Kruse y Patterson, editores, 1973). Entre los ejemplos de estas líneas de células huésped adecuadas se encuentran las células VERO y HeLa, las líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO), y las líneas celulares W138, BHK, COS-7, 293 y MDCK. Los vectores de expresión para estas células habitualmente incluyen (si resulta necesario) un origen de replicación, un promotor situado delante del gen que debe expresarse, junto con cualquier sitio de unión de ribosoma necesario, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias de terminación de la transcripción.

Para la utilización en las células de mamífero, las funciones de control en los vectores de expresión con frecuencia son proporcionadas por material vírico. Por ejemplo, los promotores utilizados comúnmente se derivan de polioma, de adenovirus 2, y con más frecuencia el virus 40 del simio (SV40). Los promotores temprano y tardío del virus SV40 resultan particularmente útiles debido a que ambos se obtienen con facilidad del virus en forma de fragmento que también contiene el origen de replicación vírico de SV40 (Fiers *et al.*, Nature 273:113, 1978). También pueden utilizarse fragmentos más cortos y más largos de SV40, con la condición de que se incluye la secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende entre el sitio HindIII hacia el sitio BgII situado en el origen de replicación vírico. Además, también resulta posible, y con frecuencia deseable, utilizar las secuencias promotoras o de control asociadas normalmente con la secuencia génica deseada, con la condición de que estas secuencias de control sean compatibles con los sistemas de célula huésped.

Puede proporcionarse un origen de replicación mediante la construcción del vector para que incluye un origen exógeno, tal como puede derivarse de SV40 o de otra fuente vírica (por ejemplo polioma, adeno, VSV, BPV), o puede ser proporcionada por el mecanismo de replicación cromosómico de la célula huésped. Si el vector se integra en el cromosoma de la célula huésped, éste con frecuencia resulta suficiente.

Se producen cantidades satisfactorias de proteína en los cultivos celulares; sin embargo, los perfeccionamientos con una secuencia codificante secundaria sirven para incrementar los niveles de producción todavía más. Una secuencia codificante secundaria comprende dihidrofolato reductasa (DHFR) que resulta afectada por un parámetro controlado externamente, tal como el metotrexato (MTX), permitiendo de esta manera el control de la expresión mediante el control de la concentración de metotrexato.

Al seleccionar una célula huésped preferente para la transfección por los vectores de la invención que comprenden las secuencias de ADN codificantes tanto de la proteína quimérica como la proteína DHFR, resulta apropiado seleccionar el huésped de acuerdo con el tipo de proteína DHFR utilizado. Si se utiliza proteína DHFR de tipo salvaje, resulta preferible seleccionar una célula huésped que sea deficiente en DHFR, permitiendo de esta manera la utilización de la secuencia codificante de DHFR como marcador para la transfección con éxito en medio selectivo que carece de hipoxantina, glicina y timidina. Una célula huésped apropiada en este caso es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad DHFR, preparada y propagada tal como describen Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4216, 1980.

Por otra parte, si se utiliza proteína DHFR de baja afinidad de unión para MTX como la secuencia de control, no resulta necesario utilizar células deficientes en DHFR. Debido a que el mutante para DHFR es resistente al metotrexato, pueden utilizarse medios que contienen MTX como medio de selección con la condición de que las células huésped sean ellas mismas sensibles al metotrexato. La mayoría de las células eucarióticas que son capaces de absorber MTX

aparentemente son sensibles al metotrexato. Una de estas líneas celulares útiles es una línea CHO, CHO-AK1 (ATCC nº CCL 61).

b. *Metodología típica utilizable*

La construcción de vectores adecuados que contienen las secuencias codificantes y de control deseadas utilizan técnicas de ligación estándar. Los plásmidos aislados o fragmentos de ADN se cortan, se ajustan, y se religan en la forma deseada para preparar los plásmidos requeridos.

Si se requieren extremos romos, la preparación puede tratarse durante 15 minutos a 15°C con 10 unidades de polimerasa I (klenow) extraída con fenol-cloroformo y precipitada con etanol.

La separación por tamaños de los fragmentos cortados puede llevarse a cabo utilizando gel de 6 por ciento de poliacrilamida descrita por Goeddel *et al.*, Nucleic Acids Res. 8:4057, 1980.

Para que el análisis confirme las secuencias correctas en los plásmidos construidos, las mezclas de ligación típicamente se utilizan para transformar la cepa 294 de *E. coli* K12 (ATCC nº 31.446) u otras cepas adecuadas de *E. coli*, y los transformantes exitosos se seleccionan mediante la resistencia a la ampicilina o la tetraciclina según resulte apropiado. Los plásmidos de los transformantes se preparan y se analizan mediante mapaje de restricción y/o mediante secuenciación de ADN mediante el procedimiento de Messing *et al.*, Nucleic Acids Res. 9:309, 1981, o mediante el procedimiento de Maxam *et al.*, Methods of Enzymology 65:499, 1980.

Tras la introducción del ADN en la célula huésped e mamífero y la selección en medio para transfectantes estables, la amplificación de las secuencias codificantes de proteína DHFR se lleva a cabo mediante el cultivo de cultivos de células huésped en presencia de concentraciones aproximadas de entre 20.000 y 500.000 nM de metotrexato, un inhibidor competitivo de la actividad de DHFR. El intervalo efectivo de concentraciones es altamente dependiente, evidentemente, de la naturaleza del gen de DHFR y de las características del huésped. Claramente, no pueden determinarse límites superior e inferior definidos generalmente. También podrían utilizarse concentraciones adecuadas de otros análogos del ácido fólico o de otros compuestos que inhiben el DHFR. Sin embargo, el MTX mismo resulta conveniente, se encuentra fácilmente disponible y resulta efectivo.

Otras técnicas utilizables se describen en los Ejemplos.

c. *Quimeras de receptor de VEGF-inmunoglobulina (immunoadhesinas)*

Las inmunoglobulinas y determinadas variantes de las mismas son conocidas y se pueden preparar en cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, ver la patente US nº 4.745.055, patente EP nº 256.654; Faulkner *et al.*, Nature 298:286, 1982; patente EP nº 120.694, patente EP nº 125.023; Morrison, J. Immunol. 123:793, 1979; Kohler *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197, 1980; Raso *et al.*, Cancer Res. 41:2073, 1981; Morrison, Ann. Rev. Immunol. 2:239, 1984; Morrison, Science 229:1202, 1985; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851, 1984; patente EP nº 266.663, y patente WO nº 88/03559. También son conocidas las cadenas reorganizadas de inmunoglobulina. Ver, por ejemplo, la patente US nº 4.444.878, patente WO nº 88/03565, y la patente EP nº 68.763, y referencias citadas en las mismas.

Las quimeras construidas a partir de una secuencia de receptor de proteína unidas a una secuencia de dominio constante de una inmunoglobulina apropiada (immunoadhesinas) son conocidas en la técnica. Entre las immunoadhesinas informadas en la literatura se incluyen las fusiones del receptor de las células T (Gascoigne *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940, 1987), CD4 (Capon *et al.*, Nature 337:525-531, 1989), L-selectina (receptor de alojamiento) (Watson *et al.*, J. Cell Biol. 110:2221-2229, 1990), CD44 (Aruffo *et al.*, Cell 61:1303-1313, 1990), CD28 y B7 (Linsley *et al.*, J. Exp. Med. 173:721-730, 1991), CTLA-4 (Linsley *et al.*, J. Exp. Med. 174:561-569, 1991), CD22 (Stamenkovic *et al.*, Cell 66:1133-1144, 1991), receptor de TNF (Ashkenazi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539, 1991) y el receptor alfa de IgE (Ridgway *et al.*, J. Cell Biol. 115:resumen 1448, 1991).

El diseño de immunoadhesina más simple y fácil combina la región o regiones de unión de una proteína "adhesina" con las regiones Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Habitualmente, al preparar receptores quiméricos de VEGF de la presente invención que presentan secuencias de inmunoglobulina, se fusionan ácidos nucleicos codificantes de dominios similares a Ig del receptor o receptores de VEGF en posición C-terminal al ácido nucleico que codifica el extremo N-terminal de una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina, aunque también resultan posibles las fusiones N-terminales.

Típicamente, en dichas fusiones, el polipéptido quimérico fusionado conserva por lo menos la bisagra funcionalmente activa, los dominios CH2 y CH3 de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. También se realizan fusiones con el extremo C-terminal de la parte Fc de un dominio constante, o en posición inmediatamente N-terminal a CH1 de la cadena pesada o a la región correspondiente de la cadena ligera.

El sitio preciso en el que se realiza la fusión no resulta crucial; son bien conocidos sitios particulares y pueden seleccionarse con el fin de optimizar la actividad biológica, las características de secreción o de unión de la quimera receptor de VEGF/inmunoglobulina.

En algunas realizaciones, las quimeras de receptor de VEGF/Ig pueden construirse como monómeros o como heteromultímeros u homomultímeros, y particularmente como dímeros o trímeros, esencialmente tal como se ilustra en la patente WO n° 91/08298.

5 En una realización preferente, los dominios similares a Ig de receptor de VEGF se fusionan con el extremo N-terminal del dominio Fc de la inmunoglobulina G1 (IgG-1). Resulta posible fusionar la región constante entera de cadena pesada con los dominios de interés similares a Ig del receptor de VEGF. Sin embargo, más preferentemente, se utiliza una secuencia que se inicia en la región bisagra inmediatamente corriente arriba del sitio de corte de la papaína, que define Fc químicamente, o se utilizan sitios análogos de otras inmunoglobulinas en la fusión. En realizaciones
10 particularmente preferentes, los dominios similares a Ig del receptor de VEGF de interés se fusionan con (a) la región bisagra y CH2 y CH3, o (b) los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3, de una cadena pesada de IgG-1, IgG-2 o IgG3-. El sitio preciso en el que se realiza la fusión no resulta crucial, y el sitio óptimo puede determinarse mediante experimentación rutinaria.

15 En algunas realizaciones, las quimeras de dominio similares a Ig de receptor de VEGF/inmunoglobulina de la presente invención se construyen como multímeros, y particularmente como homodímeros o como homotetrámeros. Generalmente, estas inmunoglobulinas construidas presentan estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural básica de cuatro cadenas se encuentra en la forma en la que existen IgG, IgD e IgE. Se repite una unidad de cuatro cadenas en las inmunoglobulinas de peso molecular más elevado; IgM generalmente existe en forma de pentámero de
20 cuatro unidades básicas mantenidas juntas mediante enlaces disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la globulina IgG, también pueden existir en forma multimérica en el suero.

Las secuencias de dominio similar a Ig de los receptores de VEGF también pueden insertarse entre las secuencias de cadena pesada y de cadena ligera de inmunoglobulina, de manera que se obtiene una inmunoglobulina que comprende
25 una cadena pesada quimérica. En la presente realización, las secuencias similares a Ig del receptor de VEGF se fusionan con el extremo 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina en cada región de la inmunoglobulina, entre la bisagra y el dominio CH2, o entre los dominios CH2 y CH3. Se ha informado de constructos similares en Hoogenboom *et al.*, Mol. Immunol. 28:1027-1037, 1991.

30 Aunque la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina no resulta necesaria en las inmunoadhesinas de la presente invención, puede encontrarse presente una cadena ligera de inmunoglobulina asociada covalentemente a un polipéptido de fusión de dominio similar a Ig de receptor de VEGF-cadena pesada de inmunoglobulina, o fusionada directamente a los dominios similares a Ig del receptor de VEGF. En el primer caso, el ADN codificante de una cadena ligera de inmunoglobulina típicamente se coexpresa con la proteína quimérica dominio similar a Ig de receptor de
35 VEGF-cadena pesada de inmunoglobulina. Tras la secreción, el híbrido de cadena pesada y cadena ligera se encontrará asociado covalentemente, proporcionando una estructura similar a inmunoglobulina que comprende dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina unidos por disulfuros. Los procedimientos adecuados para la preparación de estas estructuras se dan a conocer, por ejemplo, en la patente US n° 4.816.567, publicada el 28 de marzo de 1989.

40 En una realización preferente, las secuencias de inmunoglobulina utilizadas en la construcción de las inmunoadhesinas de la presente invención proceden de un dominio de cadena pesada de inmunoglobulina IgG. Para las inmunoadhesinas humanas, resulta preferente la utilización de secuencias de inmunoglobulinas IgG1 e IgG3 humanas. Una ventaja importante de la utilización de las inmunoadhesinas IgG1 e IgG3 es que pueden purificarse eficazmente sobre proteína A inmovilizada. Sin embargo, deben tenerse en cuenta otras propiedades estructurales y funcionales al seleccionar la pareja de fusión de Ig para una construcción particular de inmunoadhesina. Por ejemplo, la bisagra de IgG3
45 es más larga y más flexible, de manera que puede alojar dominios "adhesina" más grandes que pueden no doblarse o funcionar apropiadamente al fusionarse a IgG1. Otra consideración puede ser la valencia; las inmunoadhesinas IgG1 son homodímeros bivalentes, mientras que los subtipos de Ig, tales como IgA e IgM pueden dar lugar a estructuras diméricas o pentaméricas, respectivamente, de la unidad básica de homodímero de Ig. Para las quimeras de dominio
50 similar a Ig de receptor de VEGF/inmunoglobulina diseñadas para las aplicaciones *in vivo*, también resultan importantes las propiedades farmacocinéticas y las funciones efectoras especificadas por la región Fc. Aunque IgG1, IgG2 e IgG4 presentan vidas medias *in vivo* de 21 días, sus potencias relativas en la activación del sistema del complemento son diferentes. Además, las diversas inmunoglobulinas poseen números variables de isotipos alotípicos.

55 Los procedimientos generales adecuados para la construcción y expresión de inmunoadhesinas son los mismos que aquellos descritos anteriormente en la presente memoria con respecto a dominios similares a Ig (nativos o variantes) de los diversos receptores de VEGF. Las inmunoadhesinas quiméricas de la presente invención se construyen más convenientemente mediante la fusión de la secuencia de ADNc codificante del dominio o dominios de interés similares a Ig de receptor de VEGF en el mismo marco de lectura de una secuencia de ADNc de Ig. Sin embargo, también
60 puede utilizarse la fusión a fragmentos de Ig genómicos (ver, por ejemplo, Gascoigne *et al.*, *supra*). Este último tipo de fusión requiere la presencia de secuencias de Ig reguladoras para la expresión. Los ADNc codificantes de la "adhesina" derivada del dominio o dominios similares a Ig de receptor de VEGF y las partes de Ig de la quimera se insertan en tándem en un vector plásmido que dirige la expresión eficiente en las células huésped seleccionadas. Puede crearse la unión exacta mediante la eliminación de las secuencias adicionales entre los condones de la unión diseñada
65 utilizando mutagénesis por delección dirigida por oligonucleótido (Zoller y Smith, Nucl. Acids Res. 10:6487, 1982). Pueden utilizarse oligonucleótidos sintéticos, en los que cada mitad es complementaria a la secuencia situada en cada lado de la unión deseada. Alternativamente, pueden utilizarse técnicas de PCR para unir las dos partes de la molécula en el mismo marco de lectura que un vector apropiado.

Las inmunoadhesinas quiméricas de la presente invención pueden purificarse mediante diversos procedimientos bien conocidos, incluyendo la cromatografía de unidad en proteína A o G, la cromatografía de gel tiofílico (Hutchens *et al.*, Anal. Biochem. 159:217-226, 1986) y la cromatografía de quelato metálico inmovilizado (Al-Mashikhi *et al.*, J. Dairy Sci. 71:1756-1763, 1988).

d. Usos terapéuticos y formulaciones

Para las aplicaciones terapéuticas, las proteínas quiméricas de receptor de VEGF de la presente invención se administran a un mamífero, preferentemente a un ser humano, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable, incluyendo aquéllas que pueden administrarse a un ser humano intravenosamente en forma de bolo o mediante infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo, mediante vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarterial, intrasínovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Las proteínas quiméricas receptoras de VEGF de la presente invención también se administran adecuadamente mediante las vías intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, ejerciendo efectos locales así como sistémicos. La vía intraperitoneal se espera que resulte particularmente útil, por ejemplo en el tratamiento de los tumores ováricos.

Dichas formas de dosificación abarcan los portadores farmacéuticamente aceptables que son esencialmente no tóxicos y no terapéuticos. Entre los ejemplos de estos portadores se incluyen los intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como la albúmina de suero humano, sustancias tamponadoras, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicérido de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato de potasio, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en la celulosa, y polietilenglicol. Entre los portadores para las formas tópicas o basadas en gel de la proteína quimérica se incluyen los polisacáridos, tales como la carboximetilcelulosa sódica o la metilcelulosa sódica, la polivinilpirrolidona, los poliacrilatos, los polímeros en bloque de polioxietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y alcoholes de cera de madera. Para todas las administraciones, se utilizan convenientemente formas convencionales de depósito. Entre estas formas se incluyen, por ejemplo, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, tiritas, formas de inhalación, pulverizadores nasales, tabletas sublinguales, y preparaciones de liberación sostenida. Para ejemplos de composiciones de liberación sostenida ver la patente US n° 3.773.919, el documento EP n° 58.481A, la patente US n° 3.887.699, la patente EP n° 158.277A, la patente canadiense n° 1176565; U. Sidman *et al.*, Biopolymers 22:547, 1983, y R. Langer *et al.*, Chem. Tech. 12:98, 1982. La proteína quimérica habitualmente se formula en estos vehículos a una concentración de entre aproximadamente 0,1 mg/ml y 100 mg/ml.

Opcionalmente, pueden añadirse otros ingredientes a las formulaciones farmacéuticas de las proteínas quiméricas receptoras de VEGF de la presente invención, tales como antioxidantes, por ejemplo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente diez residuos), por ejemplo poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico, o arginina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; y alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol.

La formulación de proteína quimérica de receptor de VEGF a utilizar para la administración terapéutica debe ser estéril. La esterilidad se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril (por ejemplo membranas de 0,2 micrómetros). La proteína quimérica de receptor de VEGF habitualmente se almacena en forma liofilizada o como solución acuosa si es altamente estable a la desnaturalización térmica y oxidativa. El pH de las preparaciones de proteína quimérica de receptor de VEGF típicamente es de aproximadamente 6 a 8, aunque también pueden resultar apropiados valores de pH más bajo en determinados casos.

Para la prevención o el tratamiento de enfermedades, la dosis apropiada de proteína quimérica de receptor de VEGF depende del tipo de enfermedad que debe tratarse, de la severidad y curso de la enfermedad, de si las proteínas quiméricas de receptor de VEGF se administran con fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, el historial clínico del paciente y la respuesta a la proteína quimérica de receptor de VEGF y el criterio del médico responsable. La proteína quimérica de receptor de VEGF se administra adecuadamente al paciente en una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Para los fines de la presente invención, la "cantidad terapéuticamente efectiva" de una proteína quimérica de receptor de VEGF es una cantidad que resulta efectiva para prevenir, disminuir el empeoramiento, aliviar, o curar la condición tratada, en particular aquella cantidad que resulta suficiente para reducir o para inhibir la proliferación del endotelio vascular *in vivo*.

Las proteínas quiméricas de receptor de VEGF de la presente invención resultan útiles en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos neoplásicos y no neoplásicos. Entre los neoplasmas y condiciones relacionadas que pueden someterse a tratamiento se incluyen los carcinomas de mama, de pulmón, de esófago, de la anatomía gástrica, de colon, de recto, de hígado, de ovario, de cérvix, de endometrio, los tecomas, los arrenoblastomas, la hiperplasia endometrial, la endometriosis, los fibrosarcomas, el coriocarcinoma, el cáncer de cabeza y cuello, el carcinoma nasofaríngeo, el carcinoma laríngeo, el hepatoblastoma, el sarcoma de Kaposi, el melanoma, los carcinomas de piel, el hemangioma, el hemangioma cavernoso, el hemangioblastoma, el carcinoma de páncreas, el retinoblastoma, el astrocitoma, el glioblastoma, el Schwannoma, el oligodendroglioma, el meduloblastoma, los neuroblastomas, el rabdomiosarcoma, el sarcoma osteogénico, los leiomiomas, los carcinomas del tracto urinario, los carcinomas del tiroides, el tumor

de Wilm, el carcinoma de las células renales, el carcinoma de próstata, la proliferación vascular anormal asociada con las facomatosis, el edema (tal como la asociada con los tumores cerebrales) y el síndrome de Meigs.

Entre las condiciones no neoplásicas que pueden someterse a tratamiento se incluyen la artritis reumatoide, la soriasis, la aterosclerosis, la retinopatía diabéticas y otras retinopatías, la fibroplasia retrolental, el glaucoma neovascular, la degeneración macular relacionada con la edad, las hiperplasias del tiroides (incluyendo la enfermedad de Grave), el trasplante corneal y de otros tejidos, la inflamación crónica, la inflamación pulmonar, el síndrome nefrótico, la preclampsia, la ascites, la efusión pericárdica (tal como la asociada con la pericarditis) y la efusión pleural.

Los ejemplos siguientes únicamente pretenden ilustrar el mejor modo que se conoce en la actualidad de poner en práctica la invención, aunque la invención no debe considerarse limitada a los detalles de dichos ejemplos.

Ejemplo 1

Construcción y análisis de la quimera dominio extracelular de fit-1/IgGF (fit-1/IgG) y constructos por delección de la misma

Se construyó esencialmente tal como describen Park *et al.*, J. Biol. Chem. 269:25646-25654, 1994, un constructo de expresión consistente en la región de unión a ligandos extracelulares de fit-1 nativo, que presenta siete dominios similares a Ig, fusionado a la parte Fc de la IgG humana. Específicamente, se clonó la región de unión a ligandos extracelulares del receptor fit-1 mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando la polimerasa Pfu. Como molde se utilizó el ADNc de placenta humana. Los cebadores abarcaban la totalidad de la región de unión a ligandos extracelulares del ADNc codificante de la región de unión a ligandos extracelulares de fit-1, incluyendo los péptidos de señal (Shibuya *et al.*, Oncogene 5:519-524, 1990, y deVries *et al.*, Science 255:989-991, 1992). El ADNc para la región de unión a ligandos extracelulares de fit-1 se clonó en dos fragmentos para facilitar la secuenciación. SE utilizaron dos conjuntos de cebadores (mostrados posteriormente), y la banda resultante (de un tamaño aproximado de una 1 kilobase) se digirió con los enzimas apropiados y se subclonó en pBluescriptII o pSL301. El ADNc producido codificaba los primeros 758 aminoácidos del receptor fit-1. Se creó el ADNc de la región de unión a ligandos extracelulares mediante el ligamiento de los dos clones de fit-1 producidos mediante reacción en cadena de la polimerasa en un único sitio de restricción MunI natural.

conjunto n° 1 de cebadores de fit-1:

5' TCTAGAGAATTCCATGGTCAGCTACTGGGACACC 3'

5' CCAGGTCATTTGAACTCTCGTGTTTC 3'

conjunto n° 2 de cebadores de fit-1:

5' TACTTAGAGGCCATACTCTTGTCCT 3'

5' GGATCCTTCGAAATTAGACTTGTCCGAGGTTC 3'

Estos cebadores sustituyeron el aminoácido n° 757 de la región de unión a ligandos extracelulares de fit-1 por fenilalanina e introdujeron un sitio BstBI en el extremo 3' de la misma. Se introdujo en el extremo 5' de CH2CH3, una mutación Bst BI que eliminaba cualquier secuencia líker, un clon de ADNc de cadena pesada de IgGγ1 (Capon *et al.*, Nature 337:525-531, 1989). A continuación, se fusionaron las secuencias de la región de unión a ligandos extracelulares de fit-1 con las secuencias codificantes de los aminoácidos n° 216 a n° 443 de dicho clon de cadena pesada de IgGγ1 a través del sitio único Bst BI en el extremo 3' de la región codificante de la región de unión a ligandos extracelulares de fit-1. A continuación, este constructo se subclonó en el plásmido pHEBO23 para la expresión en células CEN4, tal como describen Park *et al.*, Mol. Biol. Cell 4:1317-1326, 1993. Se verificó la autenticidad del clon mediante secuenciación de ADN. Esto resultó en la construcción con éxito de la quimera "fit-1/IgG", en la que la región nativa de unión a ligandos extracelulares del receptor fit-1 se encuentra fusionada con la parte Fc de la IgG humana.

Las secuencias de aminoácidos de la región de unión a ligandos extracelulares de los receptores fit-1, KDR y FLT4 seguidamente se alinearon utilizando el programa de análisis de secuencias "align" y los límites de cada uno de los siete dominios similares a Ig presentes en las regiones de unión a ligandos extracelulares de los receptores fit-1, KDR y FLT4 se determinaron a partir de consideraciones estructurales y de secuencia.

Tras definir los límites de los siete dominios similares a Ig en las regiones de unión a ligandos extracelulares de los receptores fit-1, KDR y FLT4, el constructo fit-1/IgG preparado anteriormente se utilizó como molde para deleccionar sistemáticamente cada uno de los siete dominios individuales similares a Ig de la región de unión a ligandos extracelulares de fit-1 mediante la utilización de la técnica de mutagénesis "loop-out" descrita anteriormente por Urfer *et al.*, EMBO J. 14:2795-2805, 1995. Ver también Kunkle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492, 1985. Específicamente, mediante la utilización de mutagénesis dirigida por oligonucleótido, se diseñaron oligonucleótidos para extraer en un bucle un solo dominio similar a Ig del constructo fit-1/IgG, creando simultáneamente también

ES 2 267 143 T3

sitios de restricción únicos en los límites de cada uno de los siete dominios similares a Ig a utilizar para insertar otros dominios similares a Ig obtenidos de otras regiones de unión a ligandos extracelulares de receptor de VEGF con el fin de crear otras moléculas quiméricas de receptor de VEGF (ver posteriormente).

- 5 Estos experimentos resultaron en la obtención de siete constructos fit-1/IgG adicionales, cada uno con la delección de uno de los siete dominios diferentes similares a Ig.

Para crear la delección del dominio 1 similar a Ig de fit-1 se utilizó el oligonucleótido 5'-AAAATTAAAAGATCCAG ATCTGACTATCTATATATTTATTAGTGATACCGGTAGACCTTTT-3' para extraer en un bucle los aminoácidos n°
10 36 a n° 123 y para introducir un sitio Bgl II y un sitio Age I en los extremos 5' y 3' de la delección del dominio 1, respectivamente. La creación del sitio Bgl II sustituyó el aminoácido E33 por D.

Para crear la delección del dominio 2 similar a Ig de fit-1 se utilizó el oligonucleótido 5'-GAAGGAAACAGAAGGC GCCATCTATATATTTATTCGAGGTACCAATACAATCATAG-3', eliminando efectivamente los aminoácidos S129 a H223. La creación de los sitios de restricción KasI y KpnI causó los cambios de los aminoácidos S122 a G y de Q225 a G, respectivamente.

La delección del tercer dominio similar a Ig eliminó los aminoácidos N227 a S325 utilizando el oligonucleótido 5'-CAAACATCTCACACATAGATCTACCGTGCATATATATGATACGGTTTCATCACTGTGAAAC-3'. Los aminoácidos Q225, K331 y A332 se cambiaron por S, T y G, respectivamente, para preparar la inserción de los sitios de restricción Bgl II y Age I.

El oligonucleótido 5'-GTTAACACCTCAGTGCACGTGTATGATGTCAATGTGAAACCCAGATCTACGAAA AGGCCGTGTC-3' se utilizó para extraer en un bucle los aminoácidos K331 a I425 (delección del dominio 4 similar a Ig de fit-1). El cambio de aminoácidos resultante de la generación de un sitio de restricción Bbr PI era I328 por V. La producción de un sitio de restricción Bgl II en el extremo 3' del dominio 4 similar a Ig no alteró ninguno de los aminoácidos.

La delección de los aminoácidos K427 a S549 del dominio 5 similar a Ig se consiguió utilizando el oligonucleótido 5'-AAACCTCACTGCCACGCTAGCTGTCAATGTGTTTATATCACAGATCTGCCAAATGGGTTTCAT-3'. La introducción de un sitio de restricción Nhe I en el extremo 5' produjo la mutación de I423 por A; el aminoácido V555 se sustituyó por L durante la inserción del sitio Bgl II en el extremo 3'.

Para generar el mutante por delección del dominio 6 similar a Ig, el oligonucleótido 5'-GTGGAAGAAACA TAAGCTTTGTATACATTACAATCAGATCTCAGGAAGCACCATAC-3' extrajo los aminoácidos T553 a E652. La producción del sitio de restricción Bst 11071 en el extremo 5' modificó los aminoácidos Y551 y 1552 por V e Y, respectivamente; el aminoácido D657 se sustituyó por S durante la formación del sitio de restricción Bgl II en el extremo 3'.

El último dominio similar a Ig de fit-1 que se delecionó, el dominio 7, eliminó los aminoácidos Q658 a Y745, mientras que la adición del sitio de restricción BstI WI y Kpn I 5' y 3', respectivamente. El oligonucleótido 5'-CCA GAAGAAAGAAATTACCGTACGAGATCTCACTGTTCAAGGTACCTCGGACAAGTCTAAT-3' no causó una sustitución de aminoácido en 1655 por V.

Tras la construcción del constructo fit-1/IgG y los constructos por delección del dominio similar a Ig basados en fit-1/IgG, los constructos se transformaron independientemente en la cepa XL-1 Blue de *E. coli* utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Tras la transformación de los constructos en la cepa XL-1 Blue de *E. coli*, las colonias se sometieron a ensayo mediante digestión con enzimas de restricción para la presencia de los sitios de restricción recién creados y posteriormente se secuenció la región codificante entera de cada constructo utilizando el kit Sequenase versión 2.0 (U.S. Biochemical Corp.). Se preparó ADN de doble cadena de cada clon seleccionado utilizando el kit de purificación de ADN de QIAGEN (Qiagen Inc.) y se utilizó para la transfección en células CEN4.

Se introdujo ADN de plásmido para la proteína nativa fit-1/IgG o se introdujeron las delecciones del dominio fit-1/IgG en células CEN4 mediante precipitación con fosfato de calcio (Current protocols in Molecular Biology). Las células CEN4 son derivadas de la línea celular 293 de riñón embrionario humano que expresan el antígeno nuclear 1 del virus Epstein-Barr, necesario para la replicación episómica del vector pHEBO23 en el que se basa el constructo fit-1/IgG (Su *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10870-10874, 1991). Se utilizaron diez µg de ADN de plásmido para la transfección de una sola placa de 10 mm de cultivo celular confluyente al 80%. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recogieron los medios que contenían los receptores quiméricos solubles de VEGF y se determinó la concentración de proteína producida mediante ensayos ELISA diseñados para detectar la parte Fc de la proteína quimérica.

Ejemplo 2

65 Ensayos de unión para detectar la unión del ligando de VEGF

Se llevaron a cabo ensayos de unión con los receptores quiméricos solubles de VEGF generados en el Ejemplo 1 anterior, esencialmente tal como describen Park *et al.*, J. Biol. Chem. 269:25646-25654, 1994. Específicamente,

los ensayos de unión se llevaron a cabo en placas de ensayo inmunoabsorbentes de noventa y seis pocillos de tiras separables (Nunc) recubiertas durante la noche a 4°C con 2 µg/ml de Fc de IgG de cabra antihumano purificado por afinidad (Organon-Teknika) en Na₂CO₃ 50 mM, pH 9,6. Las placas se bloquearon durante 1 hora con suero de feto bovino al 10% en PBS (tampón B). Tras la separación del tampón de bloqueo, se añadieron 100 µl de un cóctel de unión en cada pocillo. Los cócteles de unión consistían de una cantidad dada de una proteína quimérica fit-1/IgG, 125I-VEGF165 (<9.000 cpm/pocillo) más/menos 50 ng de competidor de VEGF no marcado en caso necesario, todos en tampón B para un volumen final de 100 µl; los cócteles se prepararon y se dejaron equilibrar durante la noche a 4°C. VEGF165 se yodó mediante el procedimiento de la cloramina T tal como ha descrito anteriormente Keyt *et al.*, J. Biol. Chem. 271:5638-5646, 1996. La actividad específica del VEGF yodado era de 5,69 x 10⁷ cpm/microgramo. La incubación en los pocillos recubierto se llevó a cabo durante 4 horas a temperatura ambiente, seguido de 4 lavados con tampón B. La unión se determinó mediante el recuento de pocillos individuales en un contador gamma. Los datos se analizaron utilizando un programa de ajuste de curvas no lineales de 4 parámetros (Kalidagraph, Abelbeck Software).

Se obtuvieron los resultados de los ensayos de unión utilizando la proteína quimérica fit-1/IgG intacta y las siete proteínas quiméricas de delección fit-1/IgG similares a Ig. De todas las proteínas quiméricas sometidas a ensayo, sólo la proteína quimérica que carecía del dominio 2 similar a Ig no pudo unirse al ligando de VEGF de manera específica. El resto de las demás quiméricas de delección fit-1/IgG, así como la quimera fit-1/IgG intacta, conservaron la capacidad de unirse al ligando de VEGF de manera específica. Estos resultados demuestran que el dominio 2 similar a Ig de la región de unión a ligandos extracelulares de fit-1 resulta necesario para la unión específica al ligando de VEGF.

Estos resultados condujeron a la clonación, expresión y ensayo de diversos otros constructos quiméricas de delección fit-1/IgG. Se crearon constructos específicos de dominio similar a Ig/IgG mediante la amplificación de los dominios similares a Ig específicos deseados, utilizando los cebadores de PCR que contenían los sitios de restricción (Cla I y Bst BI, 5' y 3', respectivamente) que proporcionaban los sitios dentro del marco de lectura para clonar dentro del extremo 5' del plásmido de ADNc de la cadena pesada de IgG1 (ver Capon *et al.*, Nature 337:525-531, 1989). Esto resultó en la construcción de un constructo de delección fit-1/IgG que presentaba únicamente los dominios 1 y nº 2 similares a Ig de la región de unión a ligandos extracelulares fusionada con el Fc de IgG [fit(1,2)]. Para la construcción de fit(1,2), se amplificaron los aminoácidos M1 a Q224 utilizando los oligonucleótidos 5'-CAGGTCAATCATC GATGGTCAGCTACTGGGACACC-3' (Flt.sp.Cla I) y 5'-GGTCAACTATTTCTGAATTGTGTCGATGTGTGAGA TAG-3' (Flt.2C.Bst BI).

De manera similar se prepararon otras quimeras de delección fit-1/IgG, y contenían la combinación de dominio 2 similar a Ig únicamente [fit(2)], dominios 2 y 3 similares a Ig únicamente [fit(2,3)] y dominios 1, 2 y 3 similares a Ig únicamente [fit(1,2,3)]. También se utilizaron los dos mismos oligonucleótidos utilizados para crear fit(1,2), para crear fit(2) a partir de un constructo que carecía del dominio 1 similar a Ig. Se generó fit(2,3) mediante la amplificación de un constructo sin el dominio 1 similar a Ig con el oligonucleótido Flt.sp.ClaI y con otro oligonucleótido 5'-GGTCAACTATTTCTGAATATATGCACTGAGGTGTTAAC-3' (Flt.3C.Bst BI), que incluía la secuencia codificante hasta I328. La amplificación de los dominios 1 a nº 3 similares a Ig se consiguió utilizando los cebadores Flt.sp.Cla I y Flt.3C.Bst BI en un constructo que presentaba los tres dominios similares a Ig. A continuación, se subclonó la totalidad del dominio-secuencia codificante de IgG en pHEBO23 en los sitios ClaI y NotI.

Todas dichos constructos quiméricos fit-1/IgG se clonaron, se expresaron y se sometieron a ensayo para su capacidad para unirse específicamente a VEGF, tal como se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 1 y 2. Al igual que con otros constructos fit-1/IgG, todos estos constructos por delección fit-1/IgG se secuenciaron, se transfectaron en células CEN4 y la proteína expresada se cuantificó mediante ELISA de Fc. Se obtuvieron los resultados de los ensayos de unión de VEGF con las quimeras por delección de fit-1/dominio de IgG.

Los resultados demuestran que el dominio 2 similar a Ig de fit-1 por sí mismo resulta insuficiente para la unión del ligando de VEGF. El dominio 1 similar a Ig en combinación con el dominio 2 también resultó insuficiente para la unión del ligando de VEGF. Pudo detectarse una cantidad reducida de unión a VEGF en la presencia combinada de los dominios 2 y nº 3 de VEGF, aunque el grado y afinidad de esta unión necesita analizarse adicionalmente. Sin embargo, en contraste, se restauró por completo la capacidad de unión al ligando de VEGF cuando se encontraban presentes en combinación los dominios 1, 2 y 3 similares a Ig. Por lo tanto, estos resultados demuestran que la combinación de los dominios 1, 2 y 3 similares a Ig de fit-1 resulta suficiente para la unión de VEGF.

A continuación, se utilizaron cantidades crecientes de ligando de VEGF no marcado para titular la unión de ¹²⁵I-VEGF₁₆₅ a 1 ng de fit-1/IgG o fit(1,2,3) inmunorreactivo. Se llevaron a cabo ensayos de unión esencialmente tal como se ha descrito anteriormente. Los resultados de este experimentos se obtuvieron utilizando el ajuste de curva logística 4 P: [(m1-m4)/(1+(m0/m3)m2)]+m4, siendo igual el valor de m3 a la concentración que resulta en una inhibición del 50% (IC₅₀). Esto se produce en el punto de inflexión de la curva. La IC₅₀ para la proteína quimérica fit-1/IgG intacta y para la quimera de delección fit(1,2,3) son similares, con valores de 1,89 ng/ml y de 1,34 ng/ml, respectivamente. De esta manera, la quimera de delección fit(1,2,3) se comporta de una manera similar a la proteína quimérica fit-1/IgG intacta con respecto a la unión del ligando de VEGF.

Ejemplo 3

Ensayos de unión para detectar la unión de quimeras “de intercambio” al ligando de VEGF

5 Se determinaron los límites para cada uno de los siete dominios similares a Ig presentes dentro de las regiones de unión de ligandos extracelulares de los receptores fit-1, KDR y FLT4. Basándose en esta información, se prepararon diversas quimeras “de intercambio” en las que uno o más de los dominios similares a Ig del constructo fit-1/IgG se sustituyeron por los mismos dominios similares a Ig del receptor KDR o del receptor FLT4. Con el fin de construir estas quimeras “de sustitución”, se amplificó el fragmento deseado de dominio del receptor KDR o del receptor FLT4
10 utilizando cebadores para PCR que contenían los mismos sitios de restricción flanqueantes en el mismo marco de lectura de la misma manera que se crearon durante la construcción del constructo fit-1/IgG intacto descrito anteriormente. El corte de tanto el constructo fit-1/IgG intacto como el fragmento PCR obtenido del a amplificación del ADN del receptor KDR o del receptor FLT4 con los enzimas de restricción y la ligación posterior de los fragmentos resultantes proporcionó los constructos codificantes de las quimeras “de intercambio” deseadas. Todos los constructos quiméricos
15 producidos se secuenciaron para confirmar su autenticidad.

En un experimento, el dominio 2 similar a Ig del receptor KDR o del receptor FLT4 se “intercambió” por el dominio 2 similar a Ig del constructo fit-1/IgG para producir quimeras “de intercambio” que presentaban los dominios 1 y 3-7 similares a Ig de fit-1 en combinación con el dominio 2 similar a Ig de KDR (fit.K2) o de FLT4 (fitF4.2). Tal como anteriormente, se secuenciaron ambos constructos “de intercambio” previamente a la transfección y expresión
20 en células CEN4 y las quimeras “de intercambio” producidas por las células CEN4 se sometieron a ELISA de Fc. Las proteínas quiméricas seguidamente se sometieron a ensayo tal como se ha descrito anteriormente para su capacidad de unirse específicamente a 125I-VEGF165. Se obtuvieron los resultados.

25 Los resultados demuestran que la sustitución del dominio 2 similar a Ig de fit-1 por el dominio 2 similar a Ig del receptor KDR funciona reestableciendo la capacidad de unirse específicamente al ligando de VEGF, mientras que la presencia del dominio 2 similar a Ig de FLT4 no restablece la capacidad de unirse específicamente al ligando de VEGF. Debido a que es conocido que el receptor FLT4 conocido no se une al ligando de VEGF y debido a que el receptor KDR no interacciona con este ligando, estos resultados demuestran que el dominio 2 similar a Ig es el dominio primario
30 responsable de la unión de VEGF.

Tal como se prevía, la quimera fit-1/IgG nativa se unió específicamente al ligando de VEGF, mientras que la quimera fit-1/IgG carente de dominio 2 no se unía específicamente al ligando de VEGF.

35 A continuación, se llevaron a cabo experimentos para determinar si la especificidad de unión al ligando de VEGF residía en el dominio 2 similar a Ig de los receptores fit-1 y KDR. Específicamente, es bien conocido que el factor de crecimiento placentario (PLGF) es capaz de unirse a la región de unión a ligandos extracelulares del receptor fit-1 pero que no se une a las regiones de unión a ligandos extracelulares de los receptores KDR o FLT4. De esta manera, la unión de PLGF puede competir con la unión del ligando de VEGF al receptor fit-1.
40

Basándose en esta información, se llevó a cabo un ensayo de competición para la unión a VEGF utilizando una serie de mutantes “de intercambio” que consistían de proteína quimérica fit-1/IgG en la que diversos dominios similares a Ig de la misma se habían sustituido por los mismos dominios similares a Ig del receptor KDR. Específicamente, se construyeron quimeras “de intercambio” tal como se ha descrito anteriormente en las que se sustituyeron los dominios
45 1, 2, 3, 5 ó 7 similares a Ig de la quimera fit-1/IgG por el dominio similar a Ig correspondiente del receptor KDR. Los ensayos de unión competitiva se llevaron a cabo tal como se ha descrito anteriormente, en los que los competidores consistían de 50 ng de VEGF no marcado o de 50 ng de PLGF no marcado. Se obtuvieron los resultados de estos ensayos de unión competitiva.

50 Los resultados demuestran que únicamente cuando el dominio 2 similar a Ig del receptor fit-1 se sustituye por el dominio 2 similar a Ig del receptor KDR, la interacción de VGF resulta más similar al KDR de tipo salvaje que el fit-1 de tipo salvaje. Cada una de las otras quimeras “de intercambio” construidas se comportó de manera similar al receptor fit-1 de tipo salvaje. Además, cuando el dominio 2 similar a Ig de la proteína quimérica fit-1/IgG se sustituyó por el dominio 2 similar a Ig del receptor FLT4, la proteína quimérica resultante mostró la especificidad de unión del receptor FLT4 intacto (datos no mostrados). Por lo tanto, estos datos demuestran que el dominio 2 similar a Ig de los
55 receptores fit-1 y KDR es el determinante principal de la especificidad de ligando.

A continuación, se utilizó un constructo de expresión codificante del receptor FLT4 humano completo, incluyendo el dominio extracelular, la región transmembranal y el dominio tirosina quinasa intracelular (Lee *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1988-1992, 1996) para crear diversas otros receptores quiméricos. El constructo codificante del receptor FLTR4 completo seguidamente se cometió a mutagénesis dirigida por oligonucleótido tal como se ha descrito anteriormente para crear sitios de restricción en el mismo marco de lectura situados al inicio del dominio 1 similar a Ig de la región de unión a ligandos extracelulares de FLT4 (Aft 11), el extremo del dominio 1/inicio del dominio 2 (NheI), el final del dominio 2/inicio del dominio 3 (Bsi WI), y el final del dominio 3 (MluI). A continuación, las combinaciones siguientes de dominio similar a Ig de fit-1 se amplificaron esencialmente tal como se ha descrito anteriormente utilizando cebadores PCR que poseían los mismos sitios de restricción en el mismo marco de lectura:
60 el dominio 2 solo y los dominios 1-3 solos. La clonación de los productos PCR de fit-1 en el constructo codificante de FLT4 mutagenizado resultó en constructos quiméricos receptores fit-1/FLT4. Específicamente, se prepararon cons-

tructos que poseían las secuencias de receptor FLT4 enteras excepto en que los dominios 1-3 similares a Ig de FLT4 se sustituyeron por los dominios 1-3 similares a Ig del receptor fit-1 (constructo fit-1 (1,2,3)/FLT4), o en que el dominio 2 similar a Ig de FLT4 se sustituyó por el dominio 2 similar a Ig del receptor fit-1 (constructo fit-112/FLT4). Para fit-1(1,2,3)/FLT4, la secuencia de FLT4 codificante de los aminoácidos N33 a E324 se sustituyó por las secuencias de fit-1 codificantes de S35 a S325. La creación de los sitios de clonación resultó en un cambio de I325 de FLT4 por R. Para fit-1(2)/FLT4, la secuencia de FLT4 codificante de S128 a I224 se sustituyó por la secuencia de fit-1 codificante de I124 a R224. Esto también cambió los aminoácidos de FLT4 N33 a I326 por S y R, respectivamente, y añadió T36. La secuenciación confirmó la autenticidad de estas quimeras.

Tras la preparación de estos constructos de expresión, se transfectaron células 293 con los constructos a través de DEAE-dextrano y se analizaron las células de expresión transitoria para su capacidad de unirse al ligando de VEGF. Para detectar la unión del ligando de VEGF, se llevó a cabo un ensayo de unión saturante en células 293 de expresión transitoria que expresaban el receptor FLT4 intacto, el receptor quimérico dominio n° 2 de fit-1/FLT4, el receptor quimérico de los dominios 1-3 de fit-1/FLT4, o el receptor fit-1 intacto. Específicamente, se incubaron $2,5 \times 10^5$ células con cantidades crecientes de ^{125}I -VEGF (actividad específica de $56,9 \times 10^6$ cpm/ μg) en un volumen final de 0,2 ml de tampón C (medio 50/50 con BSA al 0,1% y HEPES 25 mM, pH 7,3) durante 4 horas a 4°C con agitación suave. La mezcla de células seguidamente se recubrió sobre una capa de 0,75 ml de sacarosa al 30%, se centrifugó durante 10 minutos a velocidad máxima, y se recuperó el pellet y se realizó un recuento en un contador gamma. Debido a que las células 293 presentan cierta capacidad similar a fit-1 de unirse a VEGF, también se utilizaron células no transfectadas y los contajes de fondo se restaron de los contajes recuperados de las células transfectadas. A continuación, la radioactividad añadida y la radioactividad recuperada se sometieron a análisis de Scatchard.

Los resultados de estos experimentos demuestran que, tal como se esperaba, las células que expresan el receptor FLT4 intacto no se unían específicamente al ligando de VEGF. Sin embargo, las células que expresaban el receptor quimérico dominio 2 de fit-1/FLT4 o el receptor quimérico dominios 1-3 de fit-1/FLT4, sí se unía específicamente al ligando de VEGF específicamente y fuertemente. Las Kd eran de aproximadamente $10,2 \text{ pM} \pm 3,4 \text{ pM}$, respectivamente para el receptor quimérico dominio 2 de fit-1/FLT4 y el receptor quimérico dominios 1-3 de fit-1/FLT4. Estos valores se encuentran próximos al intervalo informado para el receptor fit-1 de longitud completa intacto.

También se llevaron a cabo experimentos para medir la cantidad de fosforilación de las tirosinas en células 293 que expresaban transitoriamente estos receptores quiméricos 60 a 72 horas después de la transfección. Se llevaron a cabo ensayos de fosforilación de tirosinas esencialmente tal como se describe en Park *et al.*, J. Biol. Chem. 269:25646-25654, 1994. Las células 293 de expresión transitoria se privaron de suero 16 a 18 horas previamente a la estimulación con un factor dado. Las células se estimularon con ligando de FLT4 (VH1.4.5; VEGF-C/VRP) a una concentración de 400 ng/ml, 50 ng/ml de VEGF, o PLGF 0,5 nM durante 15 minutos a 37°C. Tras la separación del medio de estimulación, las células se lavaron dos veces con PBS helado y después se lisaron en 1 ml de tampón. El lisado se clarificó de residuos celulares y los receptores se inmunoprecipitaron utilizando JTL1, un anticuerpo policlonal dirigido contra el dominio extracelular del receptor FLT4 (ver Lee *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1988-1992, 1996). A continuación, los inmunoprecipitados se sometieron a análisis de gel/transferencia western utilizando el anticuerpo monoclonal antifosfotirosina 4G10 (UBI, Lake Placid, NY). Las bandas inmunorreactivas se visualizaron con un kit ABC siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Vector Laboratories).

Para establecer líneas celulares estables, cada uno de los constructos quiméricos se cotransfectó con un plásmido que contenía el gen de la resistencia a la neomicina mediante precipitación con fosfato de calcio en células NIH 3T3. Los clones que proliferaron en presencia de G418 se cribaron para su capacidad de unirse a VEGF. Los clones que expresaban la quimera fit-1(1,2,3)/FLT4 o la fit-1(2)/FLT4 se analizaron en un ensayo de unión celular para determinar la Kd para VEGF mediante la titulación de una cantidad traza de ^{125}I -VEGF₁₆₅ (aproximadamente 5.000 cpm/ml finales) con cantidades crecientes de VEGF₁₆₅ frío. En primer lugar, las células adherentes se lavaron con tampón C de unión frío (medio DMEM/F12 con BSA al 0,2% y HEPES 25 mM, pH 7,4), seguidamente se añadieron simultáneamente ^{125}I -VEGF₁₆₅ y el competidor frío, cada uno de ellos en 0,5 ml de tampón C. A continuación las células se mantuvieron a 4°C durante 4 horas. Tras separar por aspiración el tampón de unión, las células se lavaron con PBS frío y después dos veces con PBS frío que contenía NaCl 2 M. Finalmente las células se lisaron con NaOH 0,25 M y el lisado entero se contó en un contador gamma. Los resultados se analizaron y se calcularon las Kd utilizando el programa de análisis de Scatchard New Ligand (Genentech, Inc.).

Se sembraron en placas células NIH 3T3 que expresaban establemente los receptores quiméricos fit-1(1,2,3)/FLT4 o fit-1(2)/FLT4 en un formato de 12 pocillos a una densidad de 50.000 células/pocillo en medio DMEM bajo en glucosa que contenía FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina-estreptomicina (Gibco BRL), glutamina 2 mM, 2,5 microgramos/ml de fungizona (Gibco BRL) y 200 microgramos/ml de G418 (Gibco BRL). Tras privar a las células de suero durante 18 a 24 horas en medio que contenía FBS al 0,5%, se añadieron factores de crecimiento o FBS al 10%. La concentración de VEGF₁₆₅ añadida se encontraba comprendida entre 5 pg/ml y 300 ng/ml; las concentraciones de PIGF₁₅₂ se encontraban comprendidas entre 5,12 ng/ml y 3,2 microgramos/ml; la concentración de VEGF-C era de 40 ng/ml y de 4 microgramos/ml. Tras la estimulación durante 12 a 16 horas a 37°C, se añadió [^3H]-timidina (1 mCi/ml; 5 Ci/mmol) para una concentración final de 1 microcurio/ml y se llevó a cabo la incubación a 37°C durante 4 horas. Tras separar el medio y realizar varios lavados con PBS, se llevó a cabo la precipitación con TCA. Tras la eliminación del TCA, las células se lisaron con NaOH 0,2 N, SDS al 1%, se transfirieron a viales de centelleo y se neutralizaron con Na₂OAc 2 M, pH 4,0. Las muestras se contaron utilizando el canal del tritio.

Los resultados de estos experimentos demostraron que, aunque VEGF no estimuló la fosforilación de las tirosinas en las células que expresaban transitoriamente el receptor FLT4 intacto, se observó un nivel significativo de fosforilación de tirosinas en células que expresaban transitoriamente el receptor quimérico fit-1(2)/FLT4 o el receptor quimérico fit-1(1,2,3)/FLT4. De esta manera, estos experimentos demuestran que el receptor quimérico fit-1(2)/FLT4 y el receptor quimérico fit-1(1,2,3)/FLT4 son capaces de unirse y de responder específicamente al VEGF. Además, estos clones mostraron una respuesta significativa a VEGF en el ensayo de incorporación de timidina.

Conclusiones

La descripción anterior proporciona detalles de procedimientos específicos que pueden utilizarse para la práctica de la presente invención. Tras detallar estos procedimientos específicos, los expertos en la materia conocerán suficientemente cómo diseñar procedimientos fiables alternativos para obtener la misma información al utilizar los frutos de la presente invención. De esta manera, aunque aparentemente lo anteriormente expuesto es muy detallado, no debe interpretarse como limitativo del alcance global de la invención; por el contrario, el ámbito de la presente invención debe determinarse únicamente mediante la lícita construcción de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Proteína quimérica receptora de VEGF capaz de unirse a VEGF y de esta manera ejercer un efecto inhibitorio sobre el mismo, comprendiendo:

el dominio 1 similar a Ig del receptor fit-1 o del receptor KDR;

el dominio 2 similar a Ig del receptor fit-1 o del receptor KDR; y

el dominio 3 similar a Ig del receptor fit-1 o del receptor KDR,

en la que dicha proteína quimérica receptora de VEGF: (a) carece de los dominios 4 a nº 7 similares a Ig y presenta dominios 1 a nº 3 similares a Ig derivados del mismo receptor de VEGF, o (b) presenta por lo menos un dominio similar a Ig del receptor fit-1 y por lo menos un dominio similar a Ig del receptor KDR, y en la que la expresión “dominio similar a Ig del receptor fit-1 o del receptor KDR” abarca el dominio de tipo salvaje completo y los equivalentes funcionales del mismo.

2. Proteína quimérica receptora de VEGF según la reivindicación 1, en la que los dominios 1, 2 y 3 similares a inmunoglobulina derivan todos del receptor fit-1.

3. Proteína quimérica receptora de VEGF según la reivindicación 1, en la que los dominios 1, 2 y 3 similares a inmunoglobulina derivan todos del receptor KDR.

4. Proteína quimérica receptora de VEGF según la reivindicación 1, en la que los dominios 1 y 3 similares a inmunoglobulina se derivan del receptor fit-1 y el dominio 2 similar a inmunoglobulina deriva del receptor KDR.

5. Proteína quimérica receptora de VEGF según la reivindicación 1, en la que los dominios 1 y 3 similares a inmunoglobulina derivan del receptor KDR y el dominio 2 similar a inmunoglobulina deriva del receptor fit-1.

6. Proteína quimérica receptora de VEGF según la reivindicación 1, en la que los dominios 1 y 2 similares a inmunoglobulina derivan del receptor fit-1 y el dominio 3 similar a inmunoglobulina deriva del receptor KDR.

7. Proteína quimérica receptora de VEGF según la reivindicación 1, en la que los dominios 1 y 2 similares a inmunoglobulina derivan del receptor KDR y el dominio 3 similar a inmunoglobulina deriva del receptor fit-1.

8. Proteína quimérica receptora de VEGF según la reivindicación 1, en la que el dominio 1 similar a inmunoglobulina deriva del receptor fit-1 y los dominios 2 y 3 similares a inmunoglobulina derivan del receptor KDR.

9. Proteína quimérica receptora de VEGF según la reivindicación 1, en la que el dominio 1 similar a inmunoglobulina se deriva del receptor KDR y los dominios 2 y 3 similares a inmunoglobulina derivan del receptor fit-1.

10. Proteína quimérica receptora de VEGF según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos dominios 1, 2 y 3 similares a inmunoglobulina se fusionan con la parte Fc de una inmunoglobulina IgG humana.

11. Proteína quimérica receptora de VEGF según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es soluble.

12. Proteína quimérica receptora de VEGF capaz de unirse a VEGF y de esta manera ejercer un efecto inhibitorio sobre el mismo, comprendiendo dicha proteína quimérica receptora de VEGF el dominio extracelular del receptor FLT4, en la que el dominio 2 similar a inmunoglobulina de dicho receptor FLT4 se sustituye por el dominio 2 similar a inmunoglobulina del receptor fit-1 o del receptor KDR o un equivalente funcional de los mismos, y en la que uno o más otros dominios similares a inmunoglobulina de dicho receptor FLT4 se sustituyen opcionalmente por el dominio similar a inmunoglobulina correspondiente del receptor fit-1 o del receptor KDR o equivalente funcional de los mismos.

13. Proteína quimérica receptora de VEGF según la reivindicación 12, que presenta el dominio 2 similar a inmunoglobulina del receptor fit-1 y los dominios 1 y 3 a 7 similares a inmunoglobulina del receptor FLT4.

14. Proteína quimérica receptora de VEGF según la reivindicación 12, que presenta los dominios 1 a 3 similares a inmunoglobulina del receptor fit-1 y los dominios 4 a 7 similares a inmunoglobulina del receptor FLT4.

15. Proteína quimérica receptora de VEGF según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que es soluble.

16. Proteína quimérica receptora de VEGF según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que se encuentra unida a membrana.

17. Ácido nucleico codificante de la proteína quimérica receptora de VEGF según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

ES 2 267 143 T3

18. Vector de expresión replicable capaz en una célula huésped transformante de expresar la proteína quimérica receptora de VEGF según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

5 19. Células huésped transformadas con el vector de expresión replicable según la reivindicación 18, en las que dichas células huésped no constituyen un ser humano.

20. Células huésped según la reivindicación 19, que son células CEN4.

10 21. Composición de materia que comprende una proteína quimérica receptora de VEGF según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, formando compuesto con un portador farmacéuticamente aceptable.

15 22. Procedimiento para producir una proteína quimérica receptora de VEGF que comprende las etapas de introducir en un sistema de expresión adecuado, el vector de expresión según la reivindicación 18 y llevar a cabo la expresión de dicha proteína quimérica receptora de VEGF, en el que dicho sistema de expresión no es un ser humano.

23. Proteína quimérica receptora de VEGF según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para la utilización en un procedimiento de tratamiento médico.

20 24. Proteína quimérica receptora de VEGF según la reivindicación 23, para la utilización en el tratamiento de una condición asociada con la vascularización no deseada en un mamífero.

25 25. Proteína quimérica receptora de VEGF según la reivindicación 24, en la que dicha condición asociada con la vascularización no deseada incluye la formación de un tumor.

26. Proteína quimérica receptora de VEGF según la reivindicación 25, en la que dicho tumor es maligno.

27. Proteína quimérica receptora de VEGF según la reivindicación 23 para la utilización en la inhibición de la actividad de VEGF en un mamífero.

30 28. Utilización de una proteína quimérica receptora de VEGF según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una condición asociada con la vascularización no deseada en un mamífero.

35 29. Utilización según la reivindicación 28, en la que dicha condición asociada con la vascularización no deseada incluye la formación de un tumor.

30. Utilización según la reivindicación 29, en la que dicho tumor es maligno.

40 31. Utilización de una proteína quimérica receptora de VEGF según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de VEGF.

45

50

55

60

65