



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 265 931**

⑮ Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C07K 14/52** (2006.01)

**G01N 33/566** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

⑫

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **00921966 .8**

⑯ Fecha de presentación : **10.04.2000**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1171594**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2002**

⑮ Título: **Variantes del factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF) y sus usos.**

⑯ Prioridad: **16.04.1999 US 129788 P**  
**23.02.2000 US 184235 P**

⑰ Titular/es: **GENENTECH, Inc.**  
**1 DNA Way**  
**South San Francisco, California 94080-4990, US**

⑯ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2007**

⑰ Inventor/es: **Cunningham, Brian;**  
**Devos, Abraham y**  
**Li, Bing**

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2007**

⑰ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 265 931 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Variantes del factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF) y sus usos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención está relacionada con variantes del factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF), con procedimientos para la preparación de las citadas variantes y con procedimientos, composiciones y ensayos que utilizan las citadas variantes. En particular, la invención está relacionada con variantes de VEGF que poseen propiedades de afinidad de unión para los receptores VEGF, KDR y FLT-1, diferentes a las del VEGF de origen natural.

10 **Antecedentes de la invención**

Los dos principales componentes celulares de la vasculatura son las células endoteliales y las de la musculatura lisa. 15 Las células endoteliales forman el revestimiento de la superficie interior de todos los vasos sanguíneos y constituyen una interfaz no trombógena entre la sangre y el tejido. Además, las células endoteliales constituyen un importante componente para el desarrollo de nuevos capilares y vasos sanguíneos. Por lo tanto, las células endoteliales proliferan durante la angiogénesis o la neovascularización, asociadas con el crecimiento tumoral y la metástasis, al igual que ocurre con una diversidad de enfermedades o trastornos no neoplásicos.

20 Se ha informado al respecto de que diversos polipéptidos de origen natural inducen la proliferación de células endoteliales. Entre los citados polipéptidos se encuentran los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) de tipo ácido y básico, Burgess and Maciag, *Annual Rev. Biochem.*, 58: 575 (1989), Platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), Ishikawa *et al.*, *Nature*, 338:557 (1989), y vascular endothelial growth factor (VEGF), Leung *et al.*, *Science* 246:1306 (1989); Ferrara and Henzel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 161:851 (1989); Tischer *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165: 1198 (1989); Ferrara *et al.*, publicación de solicitud PCT N°. WO 90/13649 (publicada el 15 de noviembre de 1990).

30 El VEGF fue primeramente identificado en medios acondicionados por células foliculoestrelladas o células folículares de pituitaria bovina. El análisis bioquímico indica que el VEGF bovino es una proteína dímera con una masa molecular aparente de aproximadamente 45.000 Dalton y con una aparente especificidad mitógena para las células endoteliales vasculares. Se aisló el DNA que codifica para el VEGF bovino mediante el cribado de una biblioteca de cDNA obtenida a partir de las citadas células, utilizando, como sondas de hibridación, oligonucleótidos basados en la secuencia de aminoácidos amino terminales de la proteína.

35 El VEGF humano se obtuvo cribando en primer lugar una biblioteca de cDNA obtenido a partir de células humanas, utilizando VDGF cDNA bovino como sonda de hibridación. Un cDNA identificado a través de este procedimiento codifica para una proteína de 165 aminoácidos que tiene más de un 95% de homología con el VEGF bovino; esta proteína de 165 aminoácidos es identificada habitualmente como VEGF (hVEGF) humano o VEGF<sub>165</sub>. La actividad mitógena del VEGF humano fue confirmada mediante la expresión del VEGF cDNA humano en células huésped de mamífero. El medio acondicionado por células transfectadas por VEGF cDNA humano favorecía la proliferación de células endoteliales capilares, lo que no ocurría con las células control. [Ver Leung *et al.*, *Science*, 246:1306 (1989)].

40 Si bien un factor de crecimiento celular endotelial vascular podía ser aislado y purificado a partir de fuentes de origen natural para un uso terapéutico subsiguiente, las concentraciones relativamente bajas de la proteína en las células folículares y el elevado coste, tanto en términos de esfuerzo como de gasto, derivado de recuperar el VEGF demostró ser no viable desde el punto de vista comercial. Por consiguiente, se llevaron a cabo nuevos esfuerzos con vistas a clonar y expresar el VEGF a través de técnicas de DNA recombinantes. [Ver, por ejemplo, *Laboratory Investigation*, 72:615 (1995), y las referencias citadas en el referido artículo].

45 50 Se ha informado acerca de que el VEGF resulta de utilidad para el tratamiento de dolencias en las cuales resulta importante efectuar una acción selectiva sobre las células endoteliales vasculares, en ausencia de excesivo factor de crecimiento, por ejemplo, en úlceras diabéticas y en lesiones vasculares originadas como resultado de traumatismos tales como heridas subcutáneas. El VEGF, un factor de crecimiento celular endotelial vascular (arterias y venas) 55 puede recuperar células que han resultado dañadas, un proceso identificado como vasculogénesis y puede estimular la formación de nuevos vasos, un proceso identificado como angiogénesis [Ver, por ejemplo, Ferrara *et al.*, *Endocrinol. Rev.*, 18; 4-25 (1997)].

60 65 El VEGF es expresado en una diversidad de tejidos en forma de múltiples formas hemodímeras (121, 165, 189 y 206 aminoácidos por monómero) resultantes de cortar y empalmar RNA alternativo. El VEGF<sub>121</sub> es un mitógeno soluble que no se une a heparina; las formas más largas de VEGF se unen a heparina con afinidad progresivamente más elevada. Las formas de unión a heparina de VEGF pueden ser fragmentadas en el grupo carboxi terminal, a través de plasmina para liberar(a) forma(s) difusible(s) de VEGF. La secuencia de aminoácidos del péptido carboxi terminal identificado después de la rotura con plasmina es Arg<sub>110</sub>-Ala<sub>111</sub>. La proteína "núcleo" aminoterminal, VEGF (1-110) aislada como homodímero, se une a anticuerpos monoclonales neutralizadores (tales como los anticuerpos identificados como 4.6.1 y 3.2E3.1.1 y a formas solubles de receptores FLT-1 y KDR, con afinidad similar, en comparación con el homodímero VEGF<sub>165</sub> intacto.

El VEGF contiene dos puntos que resultan responsables, respectivamente, de la unión a los receptores KDR (región de dominio kinasa) y FLT-1 (tirosina-kinasa similar a FMS). Se considera que estos receptores tan solo existen en células (vasculares) endoteliales. La producción de VEGF se incrementa en células que devienen privadas de oxígeno como resultado de, por ejemplo, un traumatismo o acción similar, permitiendo con ello que tenga lugar la unión del VEGF con los citados receptores para desencadenar las rutas señaladas que dan lugar a una respuesta biológica. Por ejemplo, la unión de VEGF a los citados receptores puede conducir a una permeabilidad vascular incrementada, provocando el que las células se dividan y expandan para formar nuevas rutas vasculares- a saber, vasculogénesis y angiogénesis. [Ver, por ejemplo, Malavaud *et al.*, *Cardiovascular Research*, 36:276-281 (1997)]. Se ha informado al respecto de que la señal inducida por VEGF a través del receptor KDR es responsable de los efectos mitógenos de VEGF y, posiblemente, en gran medida, de la actividad angiogénica de VEGF. [Waltenberger *et al.*, *J.Biol. Chem.*, 289: 26988-26995)]. No obstante, el(los) rol(es) de FLT-1 no está muy bien entendido.

Los puntos o regiones de la proteína VEGF involucrados en la unión con receptores han sido identificados y se ha averiguado que los mismos se encuentran localizados en posiciones próximas. [Ver, Weismann *et al.*, *Cell*, 28: 695-704 (1997); Muller *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 7192-7197 (1997); Muller *et al.*, *Structure*, 5: 1325-1338 (1997); Fuh *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273:11197-11204 (1998)]. Se ha averiguado que el receptor KDR se une a VEGF predominantemente a través de los puntos situados sobre un bucle que contiene arginina (Arg ó R), en la posición 82 de VEGF, lisina (Lys o K) en la posición 84 e histidina (His o H) en la posición 86. Se ha averiguado que el receptor FLT-1 se une a VEGF predominantemente a través de puntos sobre un bucle que contiene ácido aspártico (Asp o D) en la posición 63, ácido glutámico (Glu ó E) en la posición 64 y ácido glutámico (Glu ó E) en la posición 67. [Key *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271: 5638-5646 (1996)]. En base a la estructura cristalina de VEGF y a la ubicación funcional del punto de unión de VEGF a KDR, se ha averiguado adicionalmente que el VEGF se compromete con los receptores KDR utilizando dos puntos de unión localizados simétricamente en extremos opuestos de la molécula. Cada uno de los puntos está compuesto de dos "puntos calientes" para la unión, los cuales consisten en restos procedentes de ambas subunidades del homodímero VEGF. [Muller *et al.*, *supra*]. Dos de estos determinantes de unión están localizados dentro del punto caliente sobre una corta lámina beta con tres ramales, la cual es mantenida en el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ ) y en el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

Se han identificado determinadas moléculas relacionadas con VEGF, que se unen de forma selectiva a un receptor diferente de los otros que han sido mencionados. Una molécula, P1GF, comparte un 53% de identidad con el dominio similar a PDGF de VEGF. P1Gf parece unirse a Flt-1 con elevada afinidad, pero es incapaz de reaccionar con KDR. Tal y como se describe en la literatura, el P1GF ha mostrado una gran variabilidad en la actividad mitógena para células endoteliales [Maglione *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 9267-9271 (1991); Park *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269: 25646-25654 (1994); Sawano *et al.*, *Cell Growth & Differentiation*, 7: 213-221 (1996); Landgren *et al.*, *Oncogene*, 16: 359-367 (1998)].

Recientemente, Ogawa *et al.*, describieron un gen que codifica para un polipéptido (denominado VEGF-E) con aproximadamente un 25% de identidad con el VEGF de mamífero. El VEGF-E fue identificado en el genoma de virus Orf (cepa NZ-7), un parapoxvirus que afecta a ovejas y cabras y, ocasionalmente, a humanos, para generar lesiones con angiogénesis. Los investigadores llevaron a cabo un ensayo de proliferación celular e informaron de que el VEGF-E estimulaba el crecimiento de células endoteliales de vena umbilical humana, al igual que células endoteliales sinusoidales de hígado de rata con casi el mismo grado que el VEGF humano. Se informó también al respecto de ensayos de unión. Se llevó a cabo un experimento de competición mediante la incubación de células que sobreexpresan ya sea al receptor KDR o al receptor FLT-1 con cantidades fijas de VEGF o VEGF-E humano marcado con  $^{125}$ I, añadiendo posteriormente cantidades crecientes de VEGF o de VEGF-E humano no marcado. Los investigadores informaron de que el VEGF-E se unía selectivamente al receptor KDR, en comparación con el receptor FLT-1. [Ogawa *et al.*, *J. Biological Chem.*, 273:31273-31281 (1998)].

Meyer *et al.*, *EMBO J.*, 18:363-374 (1999) han identificado también un componente de la familia VEGF, al que denominan VEGF-E. La molécula VEGF-E, reportada por Meyer *et al.*, fue identificada en el genoma de la cepa de virus Orf D1701. *In vitro*, se averiguó que el VEGF-E estimulaba la liberación del factor tisular y la proliferación de células endoteliales vasculares. En un modelo *in vivo* de conejo, El VEGF-E estimulaba la angiogénesis en la córnea de conejo. El análisis de las propiedades de unión de la molécula VEGF-E reportado por Meyer *et al.*, revelaba, en determinados ensayos, que la molécula se unía de forma selectiva al receptor KDR, en comparación con el receptor FLT-1. Ver también, Wise *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 3071-3076 (1999).

Olofsson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 11709-11714 (1998) informaron acerca de que una proteína identificada como "VEGF-B" se unía a FLT-1 de forma selectiva. Los investigadores describen un experimento de mutagénesis en el que restos Asp63, Asp64 y Glu67 en VEGF-B fueron mutados a restos alanina. El análisis de las propiedades de unión de la forma mutada de VEGF-B reveló que la proteína mutada mostraba una afinidad reducida hacia FLT-1.

## Resumen de la invención

Los solicitantes han identificado variantes de VEGF que incluyen al menos una mutación de aminoácido (en comparación con la secuencia de aminoácidos del VEGF de origen natural), particularmente con al menos una mutación de aminoácido en o entre las posiciones de aminoácido 17 a 25 y/o las posiciones 63 a 65. Los solicitantes han identificado también variantes de VEGF que incluyen al menos una mutación de aminoácido (en comparación con la secuencia de aminoácidos del VEGF de origen natural), en las posiciones 43, 46, 79 y 83, y en particular las que incluyen las

sustituciones de aminoácido por alanina en las posiciones 43, 46, 79 y 83. De forma sorprendente, los solicitantes averiguaron que las diversas variantes de VEGF mostraban afinidades de unión modificadas en relación con los receptores KDR y FLT-1 (en comparación con el VEGF de origen natural) y mostraban además afinidad de unión selectiva para el receptor KDR o FLT-1.

5 La invención proporciona variantes de VEGF tal y como se definen en las reivindicaciones, las cuales incluyen sustituciones de aminoácido (en comparación con las secuencias de aminoácido de VEGF de origen natural) y una afinidad de unión selectiva para el receptor KDR.

10 La invención proporciona variantes de VEGF que comprenden al menos una sustitución de aminoácido a o entre las posiciones 17 a 25 de VEGF, tal y como es definido adicionalmente en las reivindicaciones. Entre las sustituciones particulares de aminoácidos se incluyen F17I, M18E, Y21L, Y21F, Q22R, Q22K, Q22E, Y25S ó Y25I. En una realización preferida, las citadas variantes de VEGF incluirán al menos una sustitución de aminoácido en las posiciones 18 y/o 21 de VEGF, en la cual el resto aminoácido metionina en la posición 18 es sustituido por ácido glutámico y/o 15 el resto aminoácido tirosina en la posición 21 es sustituido por leucina.

En una realización, la invención proporciona variantes del VEHGF que comprenden al menos una sustitución de aminoácido en o entre las posiciones 63 a 66 del VEGF. Entre las sustituciones particulares de aminoácido se incluyen D63S, G65M, G65A, G65A, L66R ó L66T. Las variantes de VEGF preferidas tienen una o más sustituciones en las 20 posiciones 63, 65 y/o 66 del VEGF, en las que el resto aminoácido ácido aspártico en la posición 63 es sustituido por serina, el resto aminoácido glicina en la posición 65 es sustituido por metionina y/o el resto aminoácido leucina en la posición 66 es sustituido por arginina.

25 Nuevas variantes preferidas de VEGF incluirán múltiples mutaciones de aminoácidos (a saber más de una) en las posiciones 63, 65, y/o 66 de VEGF y/o una o más mutaciones de aminoácidos en una o más de las posiciones 17, 18, 21, 22 y/o 25 de VEGF. Incluso más preferiblemente, las variantes de VEGF comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones 18, y/o 21 de VEGF, en donde la posición 18 está sustituida por ácido glutámico y/o la posición 21 está sustituida por leucina, y una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones 63, 65 y/o 30 66 de VEGF, en las que la posición 63 está sustituida por serina, la posición 65 está sustituida por metionina y/o la posición 66 está sustituida por arginina. Más preferiblemente, las variantes VEGF pueden incluir uno o más de los siguientes grupos de sustituciones de aminoácidos: M18E, Y21L, Q22R, Y25S, D63S, G65M, L66R, M18E, D63S, G65M, L66R, o Y21L, D63S, G65M, L66R.

35 En una realización preferida, la variante de VEGF es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido VEGF165, la cual incluye una o más sustituciones de aminoácido descritas en la presente invención.

En la Tabla 2 se describen variantes de VEGF preferidas adicionales, que comprenden múltiples sustituciones de aminoácidos en las citadas posiciones en la secuencia de VEGF.

40 En otro aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican para las variantes de VEGF descritas en el presente documento. Se proporcionan también vectores de expresión capaces de expresar las variantes de VEGF de la invención, células huésped que contienen los citados vectores y procedimientos para la producción de variantes de VEGF mediante el cultivo de células huésped en condiciones adecuadas para producir las variantes de VEGF.

45 En realizaciones adicionales, la invención proporciona composiciones que comprenden una variante de VEGF y un soporte. Opcionalmente, el soporte puede ser un soporte farmacéuticamente aceptable.

50 La invención proporciona además procedimientos para el tratamiento de dolencias en las cuales la vasculogénesis o la angiogénesis resulta deseable, tales como traumatismos del sistema vascular, por ejemplo, provocados por incisiones quirúrgicas, heridas, laceraciones, penetraciones de vasos sanguíneos y úlceras superficiales. En los procedimientos, una cantidad eficaz de la variante de VEGF puede ser administrada a un mamífero(s) que padezca(n) de la(s) citada(s) dolencia(s).

55 La invención proporciona también procedimientos de diagnóstico para la utilización de variantes de VEGF *in vitro*. En una realización, los procedimientos incluyen el sometimiento a ensayos de células o tejidos utilizando la(s) variante(s) para detectar la presencia o ausencia del receptor KDR y/o FLT-1.

60 Finalmente, la invención proporciona kits y artículos de fabricación que contienen la(s) variante(s) descritas en el presente documento.

#### Breve descripción de los dibujos

65 Las Figuras 1 A y 1 B muestran la secuencia de nucleótido (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de aminoácidos putativa (SEQ ID NO: 4) de los 165 aminoácidos de la cadena VEGF de origen natural ("wild type").

La Figura 2 muestra la curva de valoración del ensayo ELISA para el VEGF de origen natural VEGF (8-109).

## ES 2 265 931 T3

La Figura 3 muestra la curva de valoración para el ensayo KIRA para el VEGF de origen natural (8-109).

La Figura 4 muestra la curva de valoración correspondiente al ensayo de proliferación HUVEC (8-109).

5 La Figura 5 muestra las afinidades de unión a KDR por parte de VEGF de origen natural (“WT VEGF”), LK-VRB-2s\* (variante selectiva de KDR) y Flt-1-sel (variante selectiva de Flt), medidas mediante desplazamiento competitivo de  $^{125}\text{I}$ -VEGF (1-165) de células NIH373 que expresan KDR, utilizando diversas concentraciones de ligando. El ensayo se describe en detalle en el Ejemplo 7. Cada uno de los puntos representa el promedio de determinaciones duplicadas y se considera que los errores son inferiores al 15% de los valores.

10 La Figura 6 muestra las afinidades de unión a Flt-1 por parte de VEGF de origen natural (“WT VEGF”), LK-VRB-2s\* (variante selectiva de KDR) y Flt-1-sel (variante selectiva de Flt), medidas mediante desplazamiento competitivo de  $^{125}\text{I}$ -VEGF (1-165) de células NIH373 que expresan FLT-1, utilizando diversas concentraciones de ligando. El ensayo se describe en detalle en el Ejemplo 7. Cada uno de los puntos representa el promedio de determinaciones 15 duplicadas y se considera que los errores son inferiores al 15% de los valores.

20 La Figura 7 muestra una tabla que identifica el grado de reducción en la unión de diversas variantes de sustitución de alanina VEGF. Tal y como se describe en el Ejemplo 8, se llevaron a cabo ELISAs de proteínas con las diversas variantes de alanina. Para cada uno de los restos se lista la relación  $IC_{50}$  de la variante con la  $IC_{50}$  del VEGF de 25 origen natural (1-109), representando el grado de reducción en la unión de la variante en comparación con el VEGF de origen natural. Las  $IC_{50}$ s para los VEGF de origen natural (1-109) se muestran entre paréntesis. Los restos mostrados en negrita se utilizaron para generar la variante selectiva Flt-1. Para generar variantes selectivas KDR, las regiones mutadas fueron divididas en cinco grupos, tal y como se indica, y los cuatro primeros se utilizaron para construir bibliotecas para las subsiguientes selecciones de muestra de fagos. Los restos marcados con un asterisco (\*) fueron sometidos a una aleatoriedad suave para un 50% de propensión hacia el tipo natural y los restos marcados con dos asteriscos fueron sometidos a una aleatoriedad dura.

30 La figura 8 A muestra los resultados de un ensayo de unión a un receptor radioinmune (RIA), en el cual se mostró que la variante selectiva de Flt-1 (“Flt-1-sel”) había reducido al menos 470 veces la afinidad de unión a KDR. Se muestra también la afinidad de unión a VEGF de origen natural (“WT VEGF”). Cada uno de los puntos representa el promedio de determinaciones duplicadas y los errores se estimaban inferiores al 15% de los valores.

35 La Figura 8 B muestra los resultados de un ensayo de unión a receptor radioinmune (RIA), en el cual se mostró que la variante selectiva de Flt-1 (“Flt-1-sel”) tenía una afinidad de unión a FLT-1 similar a la mostrada por el VEGF de origen natural (“WT VEGF”). Cada uno de los puntos representa el promedio de determinaciones duplicadas y los errores se estimaron inferiores al 15% de cada uno de los valores.

40 La Figura 9 muestra los resultados de un ensayo KIRA que medía la capacidad del VEGF de origen natural (“WT VEGF”) y de la variante selectiva de Flt-1 (“Flt-1-sel”) para inducir fosforilización KDR.

45 La Figura 10 muestra los resultados de un ensayo de proliferación HUVEC que mide la capacidad del VEGF de origen natural (“WT VEGF”) y de la variante selectiva de Flt-1 (“Flt-1-sel”) de inducir proliferación celular HUVEC. Cada uno de los puntos de datos era el promedio de experimentos por triplicado, con un error estimado de entre el 10 y el 20%.

50 Las Figuras 12 A y 12 B ilustran análisis de transferencia Western llevados a cabo para determinar la activación de MAP kinasas por parte de VEGF de origen natural (“WT VEGF”), Flt-sel (variante selectiva de Flt-1) y la variante selectiva de KDR (“KDR-sel”). El ensayo se describe en detalle en el Ejemplo 10.

55 Las Figuras 13 A y 13 B ilustran análisis de transferencia Western llevados a cabo para determinar el papel del VEGF de origen natural (“wt” o “VEGF”), la variante selectiva de KDR (“KDR-sel”) y la variante selectiva de Flt-1 (“Flt-sel”) y KDR en PLC-gamma y fosforilización PI3’kinasa. Los ensayos se describen en detalle en el Ejemplo 11.

60 Las Figuras 14 A y 14 B muestran diagramas de barras que ilustran los resultados de ensayos de migración HUVEC llevados a cabo en cámaras Boyden modificadas. La Figura 14 A muestra la migración HUVEC alcanzada a través de las concentraciones indicadas de VEGF de origen natural (“wt”), variante selectiva de Flt (“Flt-sel”) y la variante selectiva de KDR (“KDR-sel”). La Figura 14 B muestra los resultados de un experimento en el cual la adición de inhibidor PI3’-kinasa (“LY”) dificultaba la migración HUVEC, en respuesta a VEGF de origen natural (“VEGF”). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los errores en las barras representan al error estándar.

65 Las Figuras 15 A y 15 B muestran los resultados de un ensayo de angiogénesis *in vivo* en la bolsa córnea. Las diapositivas de la Figura 15 A muestran ejemplos representativos de la extensión de la angiogénesis en cornea como respuesta al tratamiento control, VEGF de origen natural (“VEGF”), variante selectiva de KDR y variante selectiva Flt.

La Figura 15 B ilustra un análisis cuantitativo del área superficial de angiogénesis en cornea resultante de tratamiento control, VEGF de origen natural (“VEGF”), variante selectiva de KDR (“KDR-sel”), variante selectiva Flt-1 (“Flt-sel”) y PIGF.

## 5 Descripción detallada de la invención

### A. Definiciones

Los términos “VEGF” y “VEGF de origen natural”, tal y como se utilizan en el presente documento se refieren al factor de crecimiento celular endotelial de 165 aminoácidos y a los factores de crecimiento celular endoteliales vasculares relacionados de 121-, 189- y 206 aminoácidos, tal y como se describen por parte de Leung *et al*, *Science*, 246:1306 (1989) y Houck *et al*, *Mol. Endocrin.*, 5: 1806 (1991), (y proporcionado adicionalmente en las Figuras 1 A y 1 B), conjuntamente con las formas alélicas de origen natural y de las procesadas de los mismos. Los términos “VEGF” y “VEGF de origen natural”) se utilizan también para hacer referencia a formas truncadas del polipéptido que comprende los aminoácidos 8 a 109 ó 1 a 109 del factor de crecimiento celular endotelial vascular de 165 aminoácidos. La referencia a cualquiera de las citadas formas de VEGF puede ser identificada en la presente solicitud, por ejemplo, a través de los términos “VEGF (8-109)”, “VEGF (1-109)” o “VEGF 165 o VEGF (1-165)”. Las posiciones de los aminoácidos para un VEGF de origen natural “truncado” son numeradas tal y como se indica en la secuencia de VEGF de origen natural. Por ejemplo, la posición del aminoácido 17 (metionina) en el VEGF de origen natural truncado coincide con la posición 17 (metionina) en el VEGF de origen natural. El VEGF de origen natural truncado tiene, preferiblemente, una afinidad de unión para los receptores KDR y FLT-1, comparable con la del VEGF de origen natural.

El término “variante de VEGF”, tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia a un polipéptido VEGF que incluye una o más mutaciones de aminoácido en la secuencia de VEGF de origen natural y presenta afinidad de unión para el receptor KDR. Entre las variantes de VEGF selectivas para KDR referidas en la invención se incluyen mutaciones de aminoácido y preferiblemente muestran afinidad de unión para el receptor KDR que es igual o superior ( $\geq$ ) a la afinidad de unión del VEGF de origen natural para el receptor KDR e, incluso más preferiblemente, las variantes de VEGF muestran menos afinidad de unión (<) para el receptor FLT-1 que la afinidad de unión mostrada por el VEGF de origen natural para FLT-1. Cuando la afinidad de unión de la citada variante de VEGF hacia el receptor KDR es aproximadamente igual (no modificada) o superior (incrementada) en comparación con la del VEGF de origen natural, y la capacidad de unión de la variante de VEGF para el receptor FLT-1 es inferior a o casi inexistente, en comparación con la del VEGF de origen natural, la afinidad de unión de la variante de VEGF, a los efectos del presente documento, es considerada “selectiva” para el receptor KDR. Las variantes selectivas preferidas para KDR y VEGF de la invención tendrán al menos 100 veces menos afinidad de unión para el receptor FLT-1 (en comparación con el VEGF de origen natural). La respectiva afinidad de unión de la variante de VEGF puede ser determinada por medio de ensayos ELISA, RIA y/o BIA, conocidos en el estado de la técnica y descritos adicionalmente en los Ejemplos indicados más adelante. Las variantes de VEGF selectivas para KDR de la presente invención mostrarán también actividad en ensayos KIRA (tale y como se describe en los Ejemplos), como reflejo de la capacidad para provocar fosforilización del receptor KDR. Las variantes preferidas de VEGF selectivas para KDR de la invención provocarán también, adicional o alternativamente, la proliferación celular endotelial (que puede ser determinada a través de procedimientos conocidos en el estado de la técnica, tales como el ensayo de proliferación HUVEC de los Ejemplos). En la actualidad se considera que la inducción de proliferación celular endotelial es el resultado de transmisión de señal por parte del receptor KDR.

A los efectos de designación abreviada de las variantes de VEGF descritas en el presente documento, se hace notar que los números hacen referencia a la posición del resto aminoácido a lo largo de la secuencia de aminoácidos del VEGF de origen natural putativo (proporcionada en Leung *et al.*, *supra* and Houck *et al.*, *supra*). La identificación de los aminoácidos utiliza el alfabeto de letra única de los aminoácidos, a saber:

50	Asp	D	Ácido aspártico	Ile	I	Isoleucina
	Thr	T	Treonina	Leu	L	Leucina
	Ser	S	Serina	Tyr	Y	Tirosina
55	Glu	E	Ácido glutámico	Phe	F	Fenilalanina
	Pro	P	Prolina	His	H	Histidina
	Gly	G	Glicina	Lys	K	Lisina
	Ala	A	Alanina	Arg	R	Arginina
60	Cys	C	Cisteína	Trp	W	Triptófano
	Val	V	Valina	Gln	Q	Glutamina
	Met	M	Metionina	Asn	N	Asparagina

65 “Unido operativamente” se refiere a yuxtaposición, de tal forma que la función normal de los componentes pueda ser llevada a cabo. Por consiguiente, una secuencia de codificación “unida operativamente” a secuencias control hace referencia a una configuración en la que la secuencia de codificación puede ser expresada bajo el control de estas secuencias y en la que las secuencias de DNA que está unidas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas

y en fase de lectura. Por ejemplo, un DNA para una presecuencia o líder secretor está operativamente unido a DNA para un polipéptido, si el mismo es expresado como preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un favorecedor o reforzador está unido operativamente a una secuencia de codificación si el mismo afecta a la transcripción de la secuencia; o un punto de unión a ribosoma está operativamente unido a una secuencia de codificación si está

5 posicionado de tal forma que facilite la traducción. La unión se logra mediante enganche en los puntos de restricción adecuados. Si los citados puntos no existen, en este caso se utilizan adaptadores o unidores de origen sintético, según la práctica convencional.

El término “secuencias control” hace referencia a secuencias de DNA necesarias para la expresión de una secuencia 10 de codificación operativamente unida, en un organismo huésped en particular. Las secuencias control que resultan adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un favorecedor, opcionalmente una secuencia operadora, y un punto de unión a ribosoma. Las células eucariotas son conocidas por utilizar favorecedores, señales de poliadenalización y reforzadores.

15 Por “sistema de expresión” se hace referencia a secuencias de DNA que contienen una secuencia de codificación deseada y secuencias control con unión operativa, por lo que los huéspedes transformados con estas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Para efectuar la transformación puede incluirse en sistema de expresión o un vector, no obstante, el DNA relevante puede estar entonces integrado en el cromosoma huésped.

20 Tal y como se utiliza en el presente documento, “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se utilizan de forma intercambiable y la totalidad de las citadas designaciones incluyen la progenie. Así pues, los términos “transformadores” o “células transformadas” incluyen la célula inicial y los cultivos derivados de la misma, sin tomar en consideración el número de transferencias. Se da también por entendido que la totalidad de la progenie puede no ser precisamente idéntica en contenido de DNA, dado que pueden tener lugar, de forma deliberada o inadvertida, mutaciones. Se incluye 25 la progenie mutante que presenta la misma funcionalidad que la cribada en las células transformadas inicialmente. Cuando se intenten conseguir designaciones distintas, ello resultará evidente a partir del contexto.

Los “plásmidos” se designan por la letra minúscula “p” precedida y/o seguida de letras mayúsculas y/o números. 30 Los plásmidos iniciales en el presente documento se encuentran comercialmente disponibles, se encuentran al alcance del público sin ningún tipo de restricción o pueden ser construidos a partir de plásmidos disponibles, de acuerdo con procedimientos publicados. Además, en el estado de la técnica se tiene conocimiento de la existencia otros plásmidos equivalentes y esto resultará evidente para el experto en la materia.

35 El término “receptor de VEGF”, tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia a un receptor celular para VEGF, habitualmente un receptor de superficie celular localizado sobre células endoteliales vasculares, al igual que fragmentos y variantes del mismo que conservan la capacidad de unirse a VEGF (tales como fragmentos o formas truncadas del dominio extracelular del receptor). Un ejemplo de receptor de VEGF es la tirosina kinasa similar a fms (FLT o FLT-1), un receptor de transmembrana de la familia tirosina kinasa. El término “receptor FLT-1” utilizado en la solicitud hace referencia al receptor de VEGF descrito, por ejemplo, por DeVries *et al.*, *Science*, 255:989 40 (1992); y Shibuya *et al.*, *Oncogene*, 5:519 (1990). La longitud total del receptor FLT-1 comprende un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina kinasa. El dominio extracelular está involucrado en la unión de VEGF, mientras que el dominio intracelular está involucrado en la transducción de señal. El receptor KDR (identificado también como FLK-1) constituye otro ejemplo de receptor de VEGF. El término “receptor KDR” utilizado en la solicitud hace referencia al receptor VEGF descrito, por ejemplo, por Matthews *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 88:9026 (1991); y Terman *et al.*, *Oncogene* 6:1677 (1991); Terman *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 187:1579 (1992).

45 El término “tratamiento” hace referencia tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas de tipo profiláctico o preventivo, en el que el objetivo consiste en prevenir o reducir (rebajar) la dolencia o trastorno patológico de interés. Entre los necesitados de tratamiento se incluyen tanto los que ya padecen el trastorno como los que son proclives a padecerlo, o aquellos en relación con los cuales deba evitarse la existencia del trastorno.

50 La administración “crónica” hace referencia a la administración del agente(s) de forma continua, es decir lo contrario de un tratamiento agudo, con vistas a mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un período de tiempo prolongado. La administración intermitente es un tratamiento que no se efectúa de forma consecutiva sin interrupción, sino que es cíclico por naturaleza.

55 Por “mamífero”, a los efectos de tratamiento, se hace referencia a un animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, para deportes y de compañía, tales como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas o cerdos. Preferiblemente, el mamífero es humano.

60 La administración en “combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y la consecutiva, en cualquier orden.

## B. Procedimientos y composiciones

## 1. Preparación de variantes de VEGF

5 Mediante mutaciones en el VEGF DNA pueden prepararse variantes en la secuencia de aminoácidos de VEGF. Entre las citadas variantes se incluyen, por ejemplo, abandonos, inserciones o sustituciones de restos dentro de la secuencia de aminoácidos mostrada en Leung *et al.*, *supra*, y Houck *et al.*, *supra*. Para lograr la construcción final con la actividad deseada puede efectuarse cualquier tipo de combinación entre abandono, inserción y sustitución. 10 Obviamente, las mutaciones a efectuar en el DNA que codifica para la variante no deben situar a la secuencia fuera del marco de lectura y, preferiblemente, no crearán regiones complementarias que pudieran producir una estructura mRNA secundaria (ver EP 75.444 A].

15 Las variantes de VEGF se preparan, opcionalmente, a través de mutagénesis dirigida al punto de nucleótidos en el DNA que codifica para el VEGF de origen natural o de técnicas de despliegue de fagos, produciendo con ello DNA que codifica para la variante y expresando después el DNA en cultivo celular recombinante.

20 Si bien el punto para introducir una variación de secuencia de aminoácido está determinado con anterioridad, la mutación *per se* no precisa ser predeterminada. Por ejemplo, para optimizar el desarrollo de una mutación en un determinado punto, puede efectuarse una mutagénesis aleatoria en el codón o región objetivo y las variantes VEGF expresadas sometidas a cribado en búsqueda de la combinación óptima de actividad deseada. Las técnicas para llevar a cabo mutaciones por sustitución en puntos de DNA predeterminados que tienen una secuencia conocida son bien conocidas, tales como, por ejemplo, la mutagénesis en un punto específico.

25 La preparación de las variantes de VEGF descritas en el presente documento es preferiblemente lograda a través de técnicas de despliegue de fago, tales como las descritas en el Ejemplo 1.

30 Una vez seleccionado el clón, la región de proteína mutada puede ser extraída y colocada en un vector adecuado para la producción de proteína, por lo general, en un vector de expresión del tipo que puede ser utilizado para llevar a cabo la transformación de un huésped adecuado.

35 Los abandonos de secuencias de aminoácidos oscilan generalmente entre aproximadamente 1 y 30 restos, más preferiblemente, entre 1 y 10 restos y habitualmente son contiguos.

40 Entre las inserciones de secuencias de aminoácido se incluyen fusiones de amino- y/o carboxilo-terminal procedentes de un resto con polipéptidos de longitud esencialmente no restringida, al igual que inserciones de intrasecuencias de restos de aminoácido únicos o múltiples. Las inserciones de intrasecuencias (a saber, inserciones dentro de la secuencia de VEGF de origen natural) pueden oscilar generalmente entre aproximadamente 1 y 10 restos, más preferiblemente, entre 1 y 5 restos. Un ejemplo de inserción terminal incluye una fusión de una secuencia de señal, ya sea homóloga o heteróloga, con la de la célula huésped, con el N terminal, para facilitar la secreción a partir de huéspedes recombinantes.

45 Constituyen variantes adicionales de VEGF aquellas en las que al menos un resto aminoácido en el VEGF de origen natural ha sido extraído y un resto diferente insertado en su lugar. Las citadas sustituciones pueden ser efectuadas de acuerdo con las que se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

	Resto Original	Sustituciones ejemplarizadas	
50	Ala	(A)	Gly;
	Arg	(R)	Lys
	Asn	(N)	Gln;
	Asp	(D)	Glu
	Cys	(C)	Ser
	Gln	(Q)	Asn
55	Glu	(E)	Asp
	Gly	(G)	Ala;
	His	(H)	Asn,
	Ile	(I)	Leu;
	Leu	(L)	Ile;
60	Lys	(K)	Arg;
	Met	(M)	Leu;
65			Tyr;
			Ile
			Glu

# ES 2 265 931 T3

TABLA 1 (continuación)

	Resto Original	Sustituciones ejemplarizadas		
5	Phe	(F)	Met;	Leu; Tyr
	Ser	(S)	Thr	
	Thr	(T)	Ser	
	Trp	(W)	Tyr	
10	Tyr	(Y)	Trp; Phe	
	Val	(V)	Ile; Leu	

15 Pueden efectuarse cambios en función de la identidad inmunológica, mediante la selección de sustituciones que sean menos conservadoras que las indicadas en la Tabla 1, a saber, seleccionado restos que difieran más significativamente en su efecto de conservar (a) la estructura del esqueleto polipéptido en el área de sustitución, por ejemplo, como una conformación helicoidal o en forma de lámina, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el punto objetivo, o (c) el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones en relación con las cuales se espera generen los cambios más 20 importantes en las propiedades de la variante de VEGF serán aquellas en las que (a) la glicina y/o prolina (P) está sustituida por otro aminoácido o es abandonada o insertada; (b) un resto hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo, sustituye (o es sustituido por) un resto hidrófobo, por ejemplo leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (c) un resto cisteína sustituye (o es sustituido por) cualquier otro resto; (d) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo o histidilo sustituye (o es sustituido por) un resto que tiene una carga electronegativa, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; (e) un resto que tiene una cadena lateral electronegativa sustituye (o es sustituido por) un resto que tiene una carga electropositiva; o (f) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, sustituye (o es sustituido por) un resto que no tiene la citada cadena lateral, por ejemplo, glicina.

25 El efecto de sustitución, abandono, o inserción puede ser evaluado rápidamente por parte de un experto en la materia utilizando ensayos de cribado rutinarios. Por ejemplo, una variante de VEGF con fago desplegado por selección 30 puede ser expresado en un cultivo celular recombinante y, opcionalmente, purificado desde el citado cultivo celular. La variante de VEGF puede entonces ser evaluada en lo que concierne a afinidad de unión a receptores KDR o FLT-1 y otras actividades biológicas, tales como las descritas en la presente solicitud. Las propiedades o actividades de unión del lisato celular o variante de VEGF purificada pueden ser cribadas en un ensayo de cribado adecuado en búsqueda 35 de la característica deseable. Por ejemplo, puede resultar deseable efectuar un cambio en el carácter de la variante de VEGF en comparación con el VEGF de origen natural, tales como la afinidad para un determinado anticuerpo. El citado cambio puede ser medido a través de inmunoensayo de tipo competitivo, el cual puede ser efectuado según técnicas conocidas. La correspondiente afinidad de unión a receptor de la variante de VEGF puede ser determinada a través de 40 ensayos ELISA, RIA y/o BIAcore, conocidos en el estado de la técnica y descritos adicionalmente en los Ejemplos que siguen. Las variantes de VEGF preferidas de la invención mostrarán también actividad en ensayos KIRA (tal y como se describe en los Ejemplos) y son el reflejo de la capacidad para inducir proliferación celular endotelial (lo cual puede ser determinado a través de procedimientos conocidos en el estado de la técnica, tales como el ensayo de proliferación HUVEC descrito en los Ejemplos).

45 Las variantes de VEGF pueden ser preparadas a través de técnicas conocidas, por ejemplo, procedimientos recombinantes. Por DNA aislado utilizado en estos procedimientos se entenderá en el presente documento DNA sintetizado químicamente, cDNA, 1 DNA cromosómico o extracromosómico, con o sin las regiones de los flancos 3'- y/o 5'. Preferiblemente, las variantes de VEGF en el presente documento se preparan mediante síntesis en cultivos celulares recombinantes.

50 Para la citada síntesis, resulta primero necesario obtener ácido nucleico que codifique para VEGF o para una variante de VEGF. El DNA que codifica para una molécula VEGF puede ser obtenido a partir de células foliculares de pituitaria bovina, a través de (a) preparar una biblioteca de cDNA a partir de estas células, (b) llevar a cabo análisis de hibridación con DNA marcado que codifica para el VEGF o fragmentos del mismo (de hasta o de más de 100 pares 55 de bases en longitud) para detectar clones en la biblioteca que contengan secuencias homólogas, y (c) analizar los clones mediante análisis de enzima de restricción y secuenciación de ácido nucleico para identificar clones de longitud completa. Si en la biblioteca de CDNA no se encuentran presentes clones de longitud completa, pueden recuperarse fragmentos adecuados procedentes de diversos clones, utilizando la información relativa a secuencia de ácido nucleico 60 descrita en el presente documento por primera vez y ligada a puntos de restricción comunes a los clones, para conjuntar un clon de longitud completa que codifique para el VEGF. Alternativamente, bibliotecas genómicas proporcionarán el DNA deseado.

Una vez identificado este DNA y aislado de la biblioteca, el mismo es unido a un vector replicable para nuevo clonado o expresión.

65 En un ejemplo de sistema de expresión recombinante, un gen que codifica para VEGF es expresado en un sistema celular mediante transformación con un vector de expresión que comprende DNA que codifica para el VEGF. Resulta

## ES 2 265 931 T3

preferible transformar células huésped capaces de lograr el citado procesamiento con vistas a obtener el VEGF en el medio de cultivo o periplasma de la célula huésped, a saber, obtener una molécula secretada.

El término “transfección” hace referencia a la recepción de un vector por parte de una célula huésped, con independencia de que se exprese alguna o ninguna secuencia de codificación. Por parte del experto en la materia se tiene conocimiento de numerosos procedimientos de transfección, por ejemplo, CaPO<sub>4</sub> y electroporación. Se reconoce que ha tenido lugar una transfección exitosa cuando cualquier indicación acerca de la operación de este vector tiene lugar dentro de la célula huésped.

Por “transformación” se hace referencia a la introducción de DNA en el interior de un organismo, por lo que el DNA es replicable, ya sea como elemento extracromosómico o a través de un integrante cromosómico. En función de la célula huésped utilizada, la transformación se efectúa utilizando técnicas estándar adecuadas para las citadas células. El tratamiento con calcio utilizando cloruro cálcico, tal y como se describe por parte de Cohen, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 69: 2110 (1972) y Mandel *et al.*, J. Mol. Biol., 53: 154 (1970), es generalmente utilizado para células procariotas y para otras células que contienen sustancialmente barrera de pared celular. Para células de mamífero sin las citadas paredes, el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978) resulta preferido. Aspectos generales de transformaciones de sistema de huéspedes celulares de mamíferos han sido descritos por parte de Axel en la pat. USA N°. 4.399.216, concedida el 16 de agosto de 1983. Las transformaciones en levadura se llevan habitualmente a cabo según el procedimiento de Van Solingen *et al.*, J. Bact. 130: 946 (1977) y Hsiao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979). No obstante, pueden también utilizarse otros procedimientos para la introducción de DNA en el interior de células, tal como a través de inyección nuclear o fusión de protoplasma.

Los vectores y procedimientos descritos en el presente documento resultan adecuados para ser utilizados en células huésped en relación con una amplia banda de organismos procariotas o eucariotas.

En general, naturalmente, resultan preferidos los procariotas para el clonaje inicial de secuencias de DNA y la construcción de los vectores que resultan de utilidad en la presente invención. Por ejemplo, resulta de particular utilidad la cepa K12 de *E. Coli* MM294 (ATCC n°. 31.446). otras cepas microbianas que pueden ser también utilizadas son cepas de *E. Coli* tales como *E. Coli* B y *E. Coli* X1776 (ATCC N°. 31.537). Estos ejemplos pretenden, naturalmente, resultar ilustrativos más que limitativos.

Los procariotas pueden ser también utilizados para expresión. Las cepas mencionadas anteriormente, al igual que las cepas de *E. Coli* W3110 (F-, lambda-, prototrófico, ATCC N°. 27.325), K5772 (ATCC N°. 53.635) y SR101, bacilos tales como *Bacillus subtilis*, y pueden utilizarse otras enterobacteriáceas, tales como la *Salmonella typhimurium* o *Serratia mercesans* y diversas especies de pseudomonas.

En general, vectores plásmidos que contienen secuencias de replicación y de control que proceden de especies compatibles con la célula huésped son utilizados en relación con estos huéspedes. El vector soporta habitualmente un punto de replicación al igual que secuencias de marcaje que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, la *E. Coli* es habitualmente transformada utilizando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. Coli* (ver, por ejemplo, Bolivar *et al.*, Gene, 2:95 (1977). El plásmido pBR322, u otros plásmidos microbianos o fagos, tienen también que contener, o ser modificados para contener, favorecedores que pueden ser utilizados por el organismo microbiano para la expresión de sus propias proteínas.

Entre los favorecedores más habitualmente utilizados en construcciones de DNA recombinante se incluyen la  $\beta$ -lactamasa (penicillinasa) y sistemas favorecedores de lactosa [Chang *et al.*, Nature, 375:615 (1978); Itakura *et al.*, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); solicitud de pat. Europea publicada N°. 0036776]. Si bien estos son las que se utilizan con mayor asiduidad, se han descubierto y utilizado otros favorecedores microbianos y detalles correspondientes a sus secuencias de nucleótidos han sido publicadas, permitiendo que el experto en la materia pueda unir los mismos funcionalmente con vectores plásmidos. [ver, por ejemplo, Siebenlist *et al.*, Cell, 20:269 (1980)].

Además de organismos procariotas, pueden utilizarse organismos eucariotas, tales como cultivos de levadura. De entre los microorganismos eucariotas, el más utilizado habitualmente es el *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero común, si bien se dispone habitualmente de un determinado número de otras cepas. Para expresión en *Saccharomyces*, el plásmido YRp7, por ejemplo [Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10:157 (1980)], es utilizado habitualmente. Este plásmido ya contiene el gen trp 1 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°. 44.076 ó PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12(1977)]. La presencia de la lesión tpr 1 como característica del genoma de célula huésped de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación mediante cultivo en ausencia de triptófano.

Entre las secuencias favorecedoras adecuadas en vectores de levadura se incluyen los favorecedores para 3-fosfoglicerato kinasa [Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] u otros enzimas glicolíticos [Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland *et al.*, Biochemistry, 17:4900 (1978), tal como enolasa, gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa, hexokinasa, piruvatodescarboxilasa, fosfofructokinasa, glucosa-6-fosfato-isomerasa, 3-fosfoglicerato-mutasa, piruvato kinasa, triosefósfato-isomerasa, fosfoglucosa-isomerasa y glucokinasa. A la hora de construir plásmidos de expresión adecuados, las secuencias de terminación asociadas con estos genes están también unidas en

el vector de expresión 3' de la secuencia deseada para ser expresada con vistas a proporcionar poliadenilación del mRNA y terminación. Otros favorecedores, los cuales presentan la ventaja adicional de transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son la región favorecedora para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas de degradación asociados con el metabolismo del nitrógeno, y la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa mencionada anteriormente y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Cualquier vector plásmido que contiene favorecedor compatible con levadura, origen de replicación y secuencias de terminación, resulta adecuado.

Además de microorganismos, cultivos de células derivadas de organismos multicelulares pueden ser también utilizados como huésped. En principio, cualquiera de estos cultivos celulares es operativo, ya sea procedente de cultivos vertebrados como de invertebrados. No obstante, ha crecido el interés en las células de vertebrados y la propagación de células vertebradas en cultivos (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario en los recientes años [Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, editors (1973)]. 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 constituyen ejemplos de las citadas líneas celulares que resultan de utilidad. Entre los vectores de expresión para las citadas células se incluyen habitualmente (si ello resulta necesario) un origen de replicación, un favorecedor localizado al frente del gen que tiene que ser expresado, junto con los puntos de unión a ribosoma que resulten necesarios, puntos de corte y empalme de RNA, puntos de poliadenilación y secuencias terminales transcripcionales.

Para su utilización en células de mamífero, las funciones control sobre los vectores de expresión son a menudo proporcionadas por material vírico. Por ejemplo, los favorecedores utilizados habitualmente proceden de poliomavirus, Adenovirus 2 y, muy frecuentemente, Simian Virus 40 (SV40). Los favorecedores tempranos y tardíos del virus SV40 resultan particularmente útiles dado que ambos son obtenidos de forma fácil a partir del virus, en forma de fragmento que contiene también el origen vírico SV40 origen de replicación [Fiers *et al.*, Nature, 273:113 (1978)]. Pueden también utilizarse fragmentos SV40 más pequeños o más grandes, siempre que esté incluida la secuencia de aproximadamente 250-bp que se extiende desde el punto HindIII hacia el punto BgII localizado en el origen de replicación vírico. Además, resulta también posible, y a menudo deseable, utilizar secuencias de control o favorecedoras normalmente asociadas con la secuencia genética deseada, siempre y cuando las citadas secuencias control resulten compatibles con los sistemas de célula huésped.

Un origen de replicación puede ser proporcionado, ya sea por la construcción del vector para incluir un origen exógeno, tal como el que puede derivarse de SV40 o de otra fuente vírica (por ejemplo, Polyoma, Adeno, VSV, BPV), o puede ser proporcionado por el mecanismo de replicación cromosómico de la célula huésped. Si el vector está integrado en el interior del cromosoma de la célula huésped, el último resulta suficiente.

Los cultivos celulares producen una cantidad satisfactoria de proteína, no obstante, los refinamientos, utilizando una secuencia de codificación secundaria, sirven para reforzar incluso más los niveles de producción. Una secuencia de codificación secundaria comprende dihidrofolato reductasa (DHFR), que resulta afectada por un parámetro controlado externamente, tal como el metotrexato (MTX), permitiendo de este modo el control de la expresión a través del control de la concentración de metotrexato.

A la hora de seleccionar una célula huésped preferida para llevar a cabo la transfección por parte de los vectores de la invención que comprenden las secuencias de DNA que codifican tanto para la proteína VEGF como para la proteína DHFR, resulta apropiado seleccionar el huésped según el tipo de proteína DHFR utilizada. Si se utiliza proteína DHFR de origen natural, resulta preferible seleccionar una célula huésped que sea deficiente en DHFR, permitiendo con ello la utilización de la secuencia de codificación de DHFR como marcador para llevar a cabo la transfección de forma exitosa en un medio selectivo que carece de hipoxantina, glicina y timidina. Una línea celular adecuada en este caso es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO), deficiente en actividad DHFR, preparada y propagada tal y como se describe por parte de Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. (Usa), 77: 4216 (1980).

Por otro lado, si como secuencia control se utiliza la proteína DHFR con baja afinidad para MTX, no resulta necesario utilizar células deficientes en DHFR. Dado que el mutante DHFR es resistente al metotrexato, los medios que contienen metotrexato pueden ser utilizados como medios de selección, siempre y cuando las células huésped sean ellas mismas sensibles al metotrexato. La mayor parte de las células eucariotas que son capaces de absorber MTX parecen ser sensibles al metotrexato. Una de las citadas líneas celulares que resultan de utilidad es la línea CHO, CHO-K1 (ATCC N°. CCL 61).

La construcción de vectores adecuados que contienen las secuencias de codificación y de control adecuadas utiliza técnicas de unión estándar, los plásmidos aislados o los fragmentos de DNA son cortados, entallados y vueltos a unir en la forma deseada para preparar los plásmidos requeridos.

Si resulta necesario disponer de extremos despuntados, la preparación puede ser tratada 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 ser llevada a cabo utilizando, a modo de ejemplo, el gel de poliacrilamida al 6% descrito por Goeddel *et al.*, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980).

# ES 2 265 931 T3

Para confirmar que las secuencias correctas fueron construidas en plásmidos, las mezclas de unión se utilizan habitualmente para transformar la cepa 294(ATCC 31, 446) de *E. Coli* K12 u otras cepas adecuadas de *E. Coli* y otros transformadores exitosos, seleccionados a través de resistencia a ampicilina o tetraciclina, resultaron adecuados. Los plásmidos a partir de los transformadores se preparan y analizan mediante distribución por restricción y/o secuenciado de DNA, a través del procedimiento de Messing *et al.*, Nucleic Acids Res., 9:309 (1981) o a través del procedimiento de Maxam *et al.*, Methods of Enzymology, 65:499 (1980).

Después de la introducción del DNA en el interior de la célula de mamífero y de la selección en el medio de transfectantes estables, la amplificación de las secuencias que codifican para la proteína DHFR es efectuada a través de cultivos de células huésped, en presencia de aproximadamente concentraciones 20.000-500.000 nM de metotrexato (MTX), un inhibidor competitivo de la actividad DHFR. La banda de concentraciones eficaz resulta altamente dependiente, naturalmente, de la naturaleza del gen DHFR y de las características del huésped. Claramente, por regla general, los límites superior e inferior definidos no pueden ser averiguados. Podrían también utilizarse concentraciones adecuadas de otros análogos de ácido fólico o de otros compuestos que inhiben la DHFR. No obstante, el propio MTX resulta conveniente, rápidamente disponible y eficaz.

## 2. Modificaciones covalentes de variantes de VEGF

Las variantes de VEGf de la invención pueden también comprender modificaciones adicionales. Entre los ejemplos se incluyen la(s) modificación(es) covalente(s) en uno o más restos aminoácido. Por ejemplo, los restos cisteinilo pueden ser hechos reaccionar con haloacetatos (y correspondientes aminas), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para proporcionar derivados carboximetilo o carboxiamidometilo. Pueden también derivatizarse restos cisteinilo, mediante reacción con bromotrifluoroacetona; ácido  $\beta$ -bromo-(5-imidozoilo)propiónico; fosfato de cloroacetilo; N-alquilmaleimidas; disulfuro de 3-nitro-2-piridilo; disulfuro de metil-2-piridilo; p-cloromercuribenzoato; 2-cloromercuri-4-nitrofenol; o cloro-7-nitrobenceno-2-oxa-1,3-diazol.

Otro ejemplo incluye la derivatización de restos histidilo mediante reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0. Puede resultar de utilidad el bromuro de para-bromofenacilo, una reacción que es llevada a cabo preferiblemente en cacodilato sódico 0,1M, a pH 6,0.

El lisinilo y restos con amino terminal pueden ser hechos reaccionar con anhídrido succínico o con otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los restos lisinilo. En la relación de otros reactivos adecuados para derivatizar restos que contienen  $\beta$ -amino se incluyen imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobencenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pantanodiona, y la reacción con glioalato catalizada con transaminasa.

Los restos arginilo pueden ser modificados mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre los cuales se encuentra el fenilgioxal; 2,3-butanodiona; 1,2-ciclohexanodiona; y ninhidrina. Estos reactivos pueden ser también utilizados para modificar el grupo amino-epsilon de la lisina. La derivatización de los restos arginina debe ser llevada a cabo en condiciones alcalinas, dado que el grupo funcional guanidina tiene un  $pK_a$  elevado.

La modificación específica de restos tirosilo *per se* ha sido estudiada de forma extensiva, con particular interés en la introducción de marcas espectrales en los restos tirosilo mediante reacción con compuestos diazonio aromáticos o con tetranitrometano. Muy habitualmente, para formar la especie O-acetiltirosilo y los derivados 3-nitro, se utilizan N-acetilimidizol y tetranitrometano, respectivamente. Los restos tirosilo pueden ser yodados utilizando  $^{125}I$  a través de, por ejemplo, utilizar el procedimiento de cloramina T descrito infra, preparando de este modo proteínas marcadas para ser utilizadas en radioinmunoensayos.

Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) pueden ser modificados de forma selectiva mediante reacción con carbodiimidas ( $R'-N-C-N-R''$ ), tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etyl)carbodiimida o 1-etyl-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los restos aspartilo y glutamilo pueden ser convertidos en restos asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones amonio.

La derivatización con agentes bifuncionales resulta de utilidad para reticular la variante de VEGF formando una matriz o superficie de soporte insoluble en agua. Entre los agentes de reticulación utilizados habitualmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehido, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato) y maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Agentes derivatizantes, como metil-3-[*p*-(azidofenil)ditio]propioimidato generan intermedios fotoactivables que son capaces de formar retículos en presencia de la luz. Alternativamente, para la inmobilización de proteínas pueden utilizarse matrices reactivas insolubles en agua, tales como carbohidratos activados con bromuro cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes USA n°s. 3.969.287, 3.691.016, 4.195.128, 4.247.642, 4.229.537 y 4.330.440.

Los restos glutaminilo y asparaginilo son frecuentemente desaminados a los correspondientes restos glutamilo y aspartilo. Alternativamente, estos restos pueden ser desaminados en condiciones moderadamente ácidas. Cualquiera de las formas de estos restos caen dentro del campo de esta invención.

Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos serilo o treonilo, metilación de los grupos a-amino de lisina, arginina, y de las cadenas laterales de histidina [Creighton,

Proteins: Structure and Molecular Properties 79-86 (W.H. Freeman & Co., San Francisco (1983))), acetilación de la amina N-terminal y, en algunos casos, amidación del grupo carboxilo C-terminal.

5 Nuevas modificaciones incluyen unión o fusión de VEGF o de la variante de VEGF (o un agonista de VEGF) a un polímero no proteináceo, tal como polietilenglicol. Los citados procedimientos de pegilación de proteínas son conocidos en el estado de la técnica.

10 La secuencia de aminoácidos de la variante de VEGF puede contener al menos una secuencia de aminoácidos que tenga el potencial para ser glicosilada a través de unión-N y que no está habitualmente glicosilada en el VEGF de origen natural.

15 La introducción de un punto de glicosilación unido a N en la variante requiere una secuencia de tripeptidilo de fórmula: asparagina-X-serina o asparagina-X-treonina, en la que la asparagina es el aceptante y X es cualquiera de los veinte aminoácidos genéticamente codificados, con excepción de prolina, la cual evita la glicosilación. [Ver Struck y Lennarz, in The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans 35 (Lennarz, ed., Plenum Press (1980)), Marshall, Biochem. Soc. Symp., 40:17 (1974); and Winzler, in Hormonal Proteins and Peptides 1-15 (Li, ed., Academic Press, New York (1973))]. La variante de secuencia de aminoácido es modificada mediante sustitución del aminoácido(s) en el punto(s) adecuado(s) por los aminoácidos adecuados para efectuar la glicosilación.

20 20 Si tiene que utilizarse glicosilación unida a O, la unión O-glicosídica tiene lugar en células animales entre N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa y uno de entre varios ácidos hidroxiamino, muy habitualmente serina o treonina, pero también en algunos casos un resto 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina colocado en la región adecuada de la molécula.

25 25 Los patrones de glicosilación para las proteínas producidas por mamíferos se describen en detalle en The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control 271-315 (Putnam, ed, 2nd edition, Academic Press, New York (1984)). En este capítulo, se discute acerca de oligosacáridos unidos a asparagina, incluyendo su subdivisión en al menos tres grupos identificados como, complejo, alta manosa y estructuras híbridas, al igual que oligosacáridos unidos O-glucosídicamente.

30 30 El acoplamiento químico y/o enzimático de glicósidos a proteínas puede ser logrado utilizando una diversidad de grupos activados, por ejemplo, tal y como se describe por Aplin and Wriston en CRC Crit. Rev. Biochem. 259-306 (1981). Las ventajas de las técnicas de acoplamiento son que las mismas son relativamente sencillas y no precisan de la complicada maquinaria enzimática requerida para la glicosilación natural unida a O- y N-. En función del tipo 35 de acoplamiento utilizado, el(los) azúcar(es) puede(n) estar unido(s) a (a)arginina o histidina, (b) grupos carboxilo libres, tales como ácido glutámico o ácido aspártico, (c) grupos sulfidrilo libres, tales como los de cisteina, (d) grupos hidroxilo libres, tales como serina, treonina o hidroxiprolina, (e) restos aromáticos, tales como fenilalanina, tirosina, o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos procedimientos se describen con mayor detalle en la solicitud PCT publicada PCT WO 87/05330, publicada el 11 de septiembre de 1987.

40 40 Patrones para glicosilación para proteínas producidas por levaduras se describen en detalle por parte de Tanner and Lehle, Biochim. Biophys. Acta, 906 (1):81-99 (1987) y por Kukuruzinska *et al.*, Annu. Rev. Biochem., 56:915-944 (1987).

45 45 Si bien la glicosilación de VEGF de origen natural no resulta esencial para la bioactividad [Walter *et al.*, Laboratory Investigation, 74: 546 (1996)], los procedimientos mencionados con anterioridad pueden ser utilizados para alterar la glicosilación de una variante de VEGF, si así se desea.

### 3. Procedimientos terapéuticos y de diagnóstico

50 50 La invención proporciona también procedimientos para la utilización de las variantes de VEGF descritas. Los procedimientos incluyen usos terapéuticos, tales como los usos de las variantes para preparar un medicamento para inducir vasculogénesis o angiogénesis. Los medicamentos pueden también ir dirigidos al tratamiento de traumatismos del sistema vascular, a la vista de la proliferación de células endoteliales vasculares que acompañaría al traumatismo. 55 Entre los ejemplos de los citados traumatismos que podrían ser tratados se incluyen, sin que ello represente ninguna limitación, incisiones quirúrgicas, particularmente las que involucran al corazón, heridas, incluyendo laceraciones, incisiones, y penetraciones de los vasos sanguíneos y úlceras superficiales relacionadas con el endotelio vascular, tales como las ulceras diabéticas, hemofílicas o varicosas. Se contempla el que las variantes de VEGF que tienen afinidad de unión selectiva para el receptor KDR pueden ser utilizadas, cuando así se deseé, para lograr la activación 60 del receptor KDR, pero evitan los potenciales efectos secundarios que pueden acompañar a la activación del receptor FLT-1.

65 La variante de VEGF puede ser formulada y dosificada de una forma consistente con la buena práctica médica, teniendo en cuenta la dolencia específica que tiene que ser tratada, la dolencia del paciente individual, el punto de suministro de la variante de VEGF, el procedimiento de administración y otros factores conocidos por las personas prácticas en la materia. "Una cantidad eficaz" de una variante de VEGF incluye cantidades que evitan, reducen el empeoramiento, alivian, curan la dolencia que está siendo tratada o los síntomas de la misma.

- Las variantes de VEGF pueden ser preparadas para almacenamiento o administración mediante el mezclado de la variante de VEGF que tiene el grado deseado de pureza con soportes, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables. En Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, 1980, Mack Publishing Co., editada por Oslo *et al.*, se describen, por ejemplo, vehículos soporte adecuados y su formulación, inclusive de otras proteínas humanas, por ejemplo sueroalbúmina humana. Habitualmente, para convertir una formulación en isotónica, se utiliza en la misma una cantidad adecuada de una sal farmacéuticamente aceptable. Entre los ejemplos de soporte se incluyen tampones, tales como solución salina, solución de Ringer, y solución de dextrosa. El pH de la solución está preferiblemente comprendido entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0. Por ejemplo, si la variante de VEGF es soluble en agua, la misma puede ser formulada en forma de tampón, tal como fosfato u otra sal de ácido orgánico, a un pH comprendido entre aproximadamente 7,0 y 8,0. Si un VEGF es tan solo parcialmente soluble en agua, el mismo puede ser preparado en forma de microemulsión, mediante la formulación del mismo con un tensioactivo no iónico, tal como Tween, Pluronics o PEG, por ejemplo, Tween 80, en una cantidad comprendida entre 0,04 y 0,05% (peso/volumen), para incrementar su solubilidad.
- En la relación de soportes adicionales se incluyen preparaciones de liberación sostenida, entre las cuales se incluye la formación de partículas microcapsulares y de artículos implantables. Entre los ejemplos de preparaciones de liberación sostenida se incluyen, por ejemplo, matrices semi-permeables de polímeros hidrófobos sólidos, las cuales se presentan en forma de artículos formateados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Para la preparación de composiciones de variantes de VEGF de liberación sostenida, la variante de VEGF es preferiblemente incorporada en el interior de una matriz o de una microcápsula biodegradable. Un material adecuado para tal propósito es una polilactida, si bien pueden también utilizarse otros polímeros de poli-(ácidos  $\beta$ -hidroxicarboxílicos), tales como el ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988 A). Resultan también adecuados otros polímeros biodegradables, tales como, por ejemplo, poli(lactonas), poli(acetales), poli(ortoésteres) o poli(ortocarbonatos).
- Para ejemplos de composiciones de liberación sostenida, ver los siguientes documentos: patente USA nº 3.773.919, patente europea EP 58.481 A, patente USA nº. 3.887.699, patente europea EP 158.277 A, patente canadiense nº. 1176565, Sidman *et al.*, Biopolymers, 22:547 (1983) y Langer *et al.*, Chem. Tech., 12:98 (1982).
- Resultará evidente para los expertos en la materia que determinados soportes resultarán más preferidos en función de, por ejemplo, la vía de administración y la concentración de la variante de VEGF que está siendo administrada.
- Opcionalmente pueden añadirse otros ingredientes, tales como antioxidantes, por ejemplo, ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez restos); por ejemplo, poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como sueroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como la 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 azucarados, tales como manitol o sorbitol. La utilización de excipientes, soportes, estabilizadores o de otros aditivos puede dar lugar a la formación de sales de la variante de VEGF.
- Cuando se seleccionan soportes, excipientes, estabilizadores u otros aditivos, el(s) compuesto(s) seleccionado(s) y los correspondientes productos de degradación deben ser no tóxicos y evitar agravar la dolencia tratada y/o los síntomas de la misma. Esto puede ser determinado a través de cribado rutinario en modelos animales del trastorno objetivo o, en el caso de que los citados modelos no se encuentran disponibles, en animales normales.
- La variante de VEGF que tiene que ser utilizada para administración terapéutica debe ser estéril. La esterilidad se logra de forma rápida mediante filtración a través de membranas de filtración (por ejemplo, membranas de 0,2 micras). La variante de VEGF será habitualmente almacenada en forma liofilizada o en forma de solución acuosa. El pH de las composiciones variantes de VEGF estará habitualmente comprendido entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 8,0, si bien valores más elevados o más bajos pueden resultar también adecuados en algunos casos.
- La administración a un mamífero puede ser lograda mediante inyección (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular) o a través de otros procedimientos, tales como la inhalación o infusión, que aseguren el suministro al torrente sanguíneo, de una forma eficaz. Si la variante de VEGF tiene que ser utilizada parenteralmente, las composiciones terapéuticas que contienen las variantes de VEGF son colocadas, habitualmente, en el interior de un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable mediante una aguja para inyección hipodérmica.
- Generalmente, cuando la dolencia así lo permite, se puede formular y dosificar la variante de VEGF para suministro en un punto específico. Ello resulta conveniente en el caso de heridas y de úlceras.
- Cuando se aplica de forma tópica, la variante de VEGF es combinada de forma adecuada con aditivos, tales como soportes, adyuvantes, estabilizadores o excipientes. Tal y como se ha descrito anteriormente, cuando se seleccionan aditivos para ser mezclados con una variante de VEGF, los aditivos deben ser farmacéuticamente aceptables y eficaces para su administración pretendida. Además, los aditivos no deben afectar a la actividad de las variantes de VEGF. Entre los ejemplos de formulaciones tópicas adecuadas se incluyen ungüentos, cremas, geles, o suspensiones, con o sin colágeno purificado. Las composiciones pueden ser también impregnadas en parches transdérmicos, plasters y vendajes, preferiblemente en forma líquida o semilíquida.

Una formulación en forma de gel que tiene la viscosidad deseada puede ser preparada mediante el mezclado de una variante de VEGF con un polisacárido soluble en agua, tal como un derivado celulosa, o un polímero sintético, tal como polietilenglicol. El término “soluble en agua”, tal como se aplica a los polisacáridos y polietilenglicos, pretende incluir soluciones y dispersiones coloidales. En general, la solubilidad de, por ejemplo, los derivados de celulosa, es determinada por el grado de sustitución de los grupos éter, y los derivados estabilizadores útiles en el presente documento deben tener una cantidad suficiente de los citados grupos éter por unidad de anhidroglucosa en la cadena de celulosa como para convertir a los derivados en solubles en agua. Resulta generalmente suficiente un grado de sustitución de éter de al menos 0,35 grupos éter por unidad de anhidroglucosa. Adicionalmente, los derivados de celulosa pueden estar en forma de sales de metal alcalino, por ejemplo, sales de Li, Na, K, o Cs.

Entre los ejemplos de polisacáridos adecuados se incluyen, por ejemplo, derivados de celulosa, tales como derivados de celulosa eterificados, incluyendo alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas y alquilhidroxialquilcelulosas, por ejemplo, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmethylcelulosa e hidroxipropilmethylcelulosa; almidón y almidón fraccionado; agar, ácido algínico y alginatos; goma arábica; pullulano; agarosa; carragenano; dextrinas; dextrinas; fructanos, inulina; mananos; xilanos; arabinanos; quitosanos; glicógenos; glucanos; y biopolímeros sintéticos; al igual que gomas tales como goma xantano; goma guar; goma de algarroba; goma arábica; goma de tragacanto; y goma de karaya y derivados y mezclas de los mismos. El agente gelificante preferido en el presente documento es uno que es inerte a los sistemas biológicos, no tóxico, sencillo de preparar y no demasiado movedizo o viscoso y que no desestabiliza a la variante de VEGF mantenida en su interior.

Preferiblemente, el polisacárido es un derivado de celulosa eterificado, más preferiblemente, uno que está bien definido, purificado y listado en la USP, por ejemplo, los derivados de metilcelulosa e hidroxialquilcelulosa, tales como hidroxipropilmethylcelulosa, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmethylcelulosa. El más preferido en el presente documento es la metilcelulosa. Por ejemplo, una formulación de gel que comprende metilcelulosa comprende preferiblemente entre 20 aproximadamente el 2 y el 5% de metilcelulosa y entre 300 y 1.000 mg de variante de VEGF por mililitro de gel. Más preferiblemente, la formulación de gel comprende aproximadamente el 3% de metilcelulosa.

El polietilenglicol que resulta de utilidad para la formulación gel es habitualmente una mezcla de polietilenglicos de bajo y alto peso molecular, para obtener la viscosidad adecuada. Por ejemplo, una mezcla de polietilenglicol de peso molecular comprendido entre 400 y 600, con uno de peso molecular 1500 resultaría eficaz para dicho propósito, cuando es mezclado en la relación adecuada para obtener una pasta.

La dosificación que tiene que ser utilizada dependerá de los factores descritos anteriormente. Como propuesta general, la variante de VEGF es formulada y suministrada en el punto o tejido objetivo a una dosis que es capaz de establecer en el tejido un nivel de variante de VEGF superior a aproximadamente 0,1 ng/cc, hasta alcanzar una dosis máxima que resulta eficaz pero no inadecuadamente tóxica. Esta concentración intra-tisular debe ser mantenida, en la medida de lo posible, a través de infusión continua, liberación sostenida, aplicación tópica o de inyección, a frecuencias determinadas empíricamente.

Cae dentro del campo de la presente invención el combinar la terapia de variante de VEGF con otras terapias novedosas o convencionales (por ejemplo, factores de crecimiento conocidos en el estado de la técnica, tales como aFGF, bFGF, HGF, PDGF, IGF, NGF, esteroides anabólicos, EGF ó TGF- $\beta$ ) para reforzar la actividad de cualquiera de los factores de crecimiento, incluyendo VEGF de origen natural, en el favorecimiento y reparación de la proliferación celular. No hace falta que los citados fármacos de co-tratamiento sean incluidos *per se* en las composiciones de esta invención, si bien esto no resultará adecuado cuando los citados fármacos son proteináceos. Las citadas mezclas son administradas adecuadamente de la misma forma y para, por ejemplo, los mismos propósitos que la variante de VEGF en solitario.

Las dosis eficaces y los esquemas de administración pueden ser determinados de forma empírica y la realización de las citadas determinaciones cae dentro de la práctica del experto en la materia.

Las variantes de VEGF de la invención presentan también utilidad en procedimientos y ensayos de diagnóstico. Por ejemplo, las variantes de VEGF pueden ser utilizadas en ensayos de diagnóstico para detectar la expresión o la presencia de receptor KDR en células y en tejidos. Pueden utilizarse diversas técnicas de ensayo de diagnóstico que ya resultan conocidas, tales como ensayos por imagen *in vivo*, ensayos de unión competitiva *in vitro*, ensayos tipo sandwich directos o indirectos y ensayos de inmunoprecipitación llevados a cabo ya sea en fase heterogénea u homogénea. Las variantes de VEGF utilizadas en tales ensayos pueden ser marcadas con un resto detectable. El resto detectable debe ser capaz de producir, ya sea de modo directo o indirecto, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  ó  $^{125}\text{I}$ , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isoftiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina o un enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o peroxidasa de rábano. Puede utilizarse cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica para la conjugación de la variante de VEGF con el resto detectable.

Las variantes de VEGF pueden ser también utilizadas para purificación por afinidad del receptor KDR o del receptor Flt-1, procedentes de un cultivo celular recombinante o de fuentes naturales. Las variantes de VEGF pueden ser inmovilizadas sobre un soporte adecuado, tal como una resina o un papel de filtro, utilizando procedimientos conocidos en el estado de la técnica. La variante de VEGF inmovilizada puede ser posteriormente puesta en contacto con la muestra que contiene el receptor KDR o el receptor Flt-1 y, seguidamente, el soporte es lavado con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente la totalidad del material en la muestra, con excepción del receptor KDR o del

# ES 2 265 931 T3

receptor Flt-1, el cual está unido a la variante de VEGF. Si así se desea, el soporte puede ser lavado con otro disolvente adecuado que liberará el receptor KDR o el receptor Flt-1 de la variante de VEGF.

## 4. Artículos de fabricación

5 A través de la presente aplicación se proporcionan también artículos de fabricación y kits. Un artículo de fabricación tal como un kit que contiene una variante de VEGF de utilidad para ensayos de diagnóstico o para el tratamiento de dolencias descritas en el presente documento comprende al menos un recipiente y una marca. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden ser obtenidos 10 a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que resulta de utilidad para la diagnosis o el tratamiento de una dolencia y puede tener un puerto de acceso esterilizado (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es la variante de VEGF. La marca sobre o asociada 15 con el recipiente indica que la composición es utilizada a efectos de diagnosis o para el tratamiento de la dolencia de elección. El artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. La misma puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y de uso, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos de embalaje con instrucciones para el uso. El artículo de fabricación puede también comprender un segundo o un tercer recipiente con otro agente activo, 20 tal y como se ha descrito anteriormente.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a título ilustrativo y los mismos no pretenden limitar la protección de la presente invención en modo alguno.

25 La totalidad de patentes y de referencias de literatura mencionadas en la presente memoria son por la presente incorporadas por referencia en su integridad.

## Ejemplos

30 Los reactivos comercialmente disponibles mencionados en los ejemplos fueron utilizados según las instrucciones del fabricante, salvo que se indique lo contrario. La fuente de suministro de aquellas células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de toda la memoria, a través de números de acceso ATCC, es la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia.

### Ejemplo 1

#### *Selección de variantes de VEGF específicas para KDR*

40 Para generar las variantes específicas para KDR, se construyeron dos bibliotecas de fagos en las cuales los restos de VEGF (1-109), considerados importantes para la unión a Flt-1 pero no a KDR, fueron mutados aleatoriamente.

#### *Construcción de fagémido*

45 Para construir las bibliotecas de fagos, se obtuvo en primer lugar un vector fagémido con un cDNA que codifica para restos 1-109 de VEGF. El vector fagémido pB2105 (Genentech) fue obtenido mediante amplificación PCR del cDNA que codifica para los restos 1-109 de VEGF, utilizando cebadores que permiten la unión subsiguiente del fragmento de restricción Nsi I/ Xba I en el vector fagémido, phGHam-g3 (Genentech, Inc.). Este introdujo un codón amber inmediatamente después del resto 109 y fusionó el VEGF 1-109 cDNA con la mitad C-terminal de gIII que abarca los restos 249 a 406.

50 En una biblioteca, la totalidad de posibles combinaciones para VEGF 1-109 fueron permitidas en las posiciones 18, 21, 22 y 25 (mediante la utilización de oligonucleótidos que cambiaban los codones objetivo por secuencias NNS, en donde N=G, A, T ó C, y S=C ó G), y el cambio fue permitido con una probabilidad del 40% para la posición 17 (ejerciendo una probabilidad del 70% de tipo natural y una probabilidad del 10% de cada uno de los otros tres tipos de bases para cada una de las bases en el codón objetivo).

Para cambiar los codones objetivo a secuencias NNS se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

60 L-528: CAC GAA GTG GTG AAG TTC NNS GAT GTC NNS NNS CGC AGC  
NNS TGC CAT CCA ATC GAG (SEQ ID N°. 1)

65 L-530: GGG GGC TGC TGC AAT NNS GAG NNS NNS GAG TGT GTG CCC  
ACT (SEQ ID N°. 2)

# ES 2 265 931 T3

En la segunda biblioteca, se permitieron la totalidad de posibles combinaciones de restos para VEGF 1-109 en las posiciones 63, 65, y 66 y se permitió el cambio con un 40% de probabilidad para la posición 64.

En la tercera biblioteca, se permitieron la totalidad de posibles combinaciones de restos para VEGF (1-109) en las posiciones 47 y 48, y se permitió el cambio con una probabilidad del 50% para las posiciones 43 y 46. En la cuarta biblioteca, se permitió la totalidad de posibles combinaciones de restos para VEGF (1-109) en las posiciones 63, 65 y 66, y se permitió el cambio al 50% para la posición 64.

Para generar variantes selectivas para KDR, las regiones mutadas fueron divididas en cinco grupos, tal como se muestra, y los primeros cuatro fueron utilizados para construir bibliotecas para subsiguientes selecciones de despliegue de fagos. Los restos marcados con un asterisco (\*) fueron sometidos a “aleatoriedad baja” para una propensión del 50% hacia el tipo natural y los restos marcados con dos asteriscos fueron sometidos a una “aleatoriedad dura” (ver la Figura 7, *infra*).

## 15 Síntesis de DNA heteroduplex

El DNA heteroduplex fue sintetizado según un procedimiento adaptado de Kunkel *et al.*, Meth. Enzym. 204: 125-139 (1991). A través de este procedimiento, un oligonucleótido mutágeno fue incorporado a una molécula de DNA circular (CCC-DNA) cerrada covalentemente. El procedimiento fue llevado a cabo según los siguientes pasos.

20 Primeramente, los oligonucleótidos descritos anteriormente fueron fosforilados en la posición 5'. Esto fue efectuado mediante la combinación en un tubo eppendorf de 2  $\mu$ g de oligonucleótido, 2  $\mu$ l de tampón 10x TM (Tris HCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5); 2  $\mu$ l de ATP 10 mM y 1  $\mu$ l de DTT 100 mM, añadiéndose después agua hasta totalizar un volumen de 20  $\mu$ l. 20 unidades de polinucleótido kinasa T4 (unidades Weiss) fueron añadidas a la mezcla e incubadas 25 durante 1 hora a 37°C.

30 Seguidamente, cada uno de los oligonucleótidos 5'-fosforilados fue anillado a una plantilla de fagémido (hebra única de DNA purificada a partir de dut-I ung- cepa de *E. Coli* CJ-236). Esto fue efectuado combinando primero 1  $\mu$ g de plantilla de DNA de hebra única, 0,12  $\mu$ g de oligonucleótido fosforilado y 2,5  $\mu$ l de tampón 10x TM (Tris HCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, pH 7,5), añadiendo agua hasta totalizar un volumen de 25  $\mu$ l. Las cantidades de DNA proporcionaron un oligonucleótido a una relación molar de 3:1, asumiendo que la relación de longitud de oligonucleótido a plantilla es 1:100. La mezcla fue incubada a 90°C durante 2 minutos, después sometida a incubación a 50°C durante 3 minutos y después incubada a 20°C durante 5 minutos.

35 Cada uno de los oligonucleótidos fosforilados en la posición 5' fue entonces extendido enzimáticamente y ligado para formar una molécula CCC-DNA, mediante la adición de los siguientes reactivos a la mezcla anillada: 1  $\mu$ l de ATP 10 mM; 1  $\mu$ l de dNTPs 25 mM; 1,5  $\mu$ l de DTT 100 mM, 3 unidades de T4 DNA ligasa y 3 unidades de T7 DNA polimerasa. La mezcla fue después incubada a 20°C durante al menos 3 horas.

40 El DNA fue purificado mediante precipitación con etanol y resuspendido en 15  $\mu$ l de agua.

## *Electroporación de E. Coli*

45 Los fagos de biblioteca fueron obtenidos en una cepa supresora de *E. Coli* conocida como *E. Coli* XL1-azul (Stratagene, LaJolla, CA) mediante electroporación con *E. Coli*. Para llevar a cabo la electroporación, el DNA heteroduplex purificado fue primeramente enfriado en una cubeta de electroporación sobre hielo, con una abertura de 0,2 cm y una alícuota de 100  $\mu$ l del electrocomponente *E. Coli* XL-1 azul fue derritido sobre hielo. Las células de *E. Coli* fueron añadidas al DNA y se mezclaron pipeteando diversas veces.

50 La mezcla fue transferida a una cubeta y sometida a electroporación utilizando un Gene Pulser (Bio-rad, Hercules, CA) con las siguientes características: 2,5 kV de intensidad de campo, 200 ohms de resistencia y 25 mF de capacitancia. Inmediatamente después se añadió 1 ml de medio SOC (5 g de extracto de bacto-levadura, 20 g de bacto-triprona; 0,5 g de NaCl; 0,2 g de KCl; se añade agua hasta totalizar 1 litro y se ajusta el pH a un valor de 7,0 con NaOH; autoclave; después se añaden 5 mL de MgCl<sub>2</sub> 2M sometido a autoclave y 20 mL de glucosa 1M con filtro esterilizado) y la mezcla fue transferida a un tubo de cultivo estéril y cultivada durante un período de 30 minutos a 37°C, con agitación.

60 Para determinar la diversidad de la biblioteca, diluciones en serie fueron ubicadas en placas sobre (10 g de extracto de bacto-levadura; 16 g de bacto-triprona; 5 g de NaCl; se añade agua hasta totalizar 1 litro y se ajusta el pH a 7,0 con NaOH; sometido a autoclave)placas 2YT (suplementadas con 50  $\mu$ g/ml de ampicilina). Adicionalmente, el cultivo fue transferido a un matraz difusor de 250 ml., que contiene 25 ml de 2YT, 25 mg/ml de ampicilina, M13-VCS ( $10^{10}$  pfu/mL) (Stratagene, LaJolla, CA) e incubadas durante el transcurso de una noche a 37°C, manteniendo la agitación.

65 El cultivo fue después centrifugado durante un período de 10 minutos a 10 krpm, 2°C, en un rotor Sorvall GSA (16000 g). El sobrenadante fue transferido a un tubo fresco y se añadió 1/5 de volumen de solución de PEG/NaCl (200 g/L PEG-8000, 146 g/L NaCl; sometido a autoclave) añadido para precipitar el fago. La solución de sobrenadante/PEG-NaCl fue sometida a incubación durante un período de 5 minutos a temperatura ambiente y sometida de nuevo a centrifugación para obtener un pellet de fago.

# ES 2 265 931 T3

El sobrenadante fue decantado y descartado. El pellet de fago fue recentrifugado brevemente y el sobrenadante remanente eliminado y descartado. El pellet de fago fue resuspendido en 1/20 volumen de tampón PBT (PBS, 0,2% BSA, 0,1% Tween 20%) y la materia insoluble fue eliminada y descartada mediante centrifugación del pellet resuspendido durante 5 minutos a 15 krpm, 2°C, en un rotor SS-34 (27.000 g). El resto de sobrenadante contenía el fago.

5 El sobrenadante fue salvado y utilizado para clasificar variantes de VEGF a través de sus afinidades de unión. Mediante la producción del fago en una cepa supresora de *E. Coli*, la proteína de fusión gIII, variante de VEGF (1-109) fueron expresadas y desplegadas sobre la superficie del fago, permitiendo que el fago se une a los receptores KDR y/o Flt-1.

## 10 Clasificación por afinidad de las bibliotecas

Cada una de las bibliotecas fue clasificada por su unión con el monómero KDR (1-3), utilizando una técnica de unión competitiva similar a un procedimiento utilizado por H-Jin, J. Clin. Invest., 98:969 (1996) y que demostró 15 resultar de utilidad para generar variantes selectivas para receptor.

Para llevar a cabo la técnica de unión competitiva, cada una de las bibliotecas fue clasificada por su unión a monómero KDR (1-3) inmovilizado (Genentech, South San Francisco, California) en presencia de una concentración elevada (100 nM) de monómero competidor Flt-1 (1-3) (Genentech, Inc.) en solución. Ello fue logrado revistiendo 20 en primer lugar pocillos de inmunoplaca Maxisorp (Nalge Nunc International, Rochester, New York) con 80 µl por pocillo de 2-5 µg/ml de monómero KDR (1-3) en tampón revestidor (carbonato sódico 50 mM, a pH 9,6) e incubando durante el transcurso de una noche a 4°C. El numero de pocillos necesarios estaba en función de la diversidad de la biblioteca. La solución de revestimiento fue eliminada y bloqueada durante 1 hora con 200 µl de 0,2% BSA en PBS. Al mismo tiempo, un número igual de pocillos no revestidos fue bloqueado como control negativo.

25 Los pocillos fueron lavados 8 veces con tampón PT (PBS, 0,05% Tween 20) para eliminar el tampón de bloqueo. Se añadieron entonces alícuotas de 100 µl de solución de fago de biblioteca ( $10^{12}$  fagos/ml) en tampón PBT (PBS, 0,2% BSA, 0,1% Tween 20) a cada uno de los pocillos revestidos y no revestidos. El monómero Flt-1 (1-3) fue añadido con la solución de fago. Los pocillos fueron incubados a temperatura ambiente durante un período de 2 horas, con suave 30 agitación.

35 Los pocillos fueron después lavados 10 veces con tampón PT (PBS, 0,05% Tween 20) para eliminar la solución de fago y cualquier fago unido a Flt-1. El fago unido a KDR fue eluido de los pocillos mediante incubación de los pocillos con 100 µl de glicina 0,2 mM a pH 2, por espacio de 5 minutos, a temperatura ambiente. Para recoger el fago unido a KDR la solución de glicina fue transferida a un tubo eppendorf y neutralizada con Tris-HCl 1,0 M, a pH 8,0.

40 Los fagos unidos a KDR fueron después repropagados mediante la adición de la mitad de la solución de fago eluido a 10 volúmenes de *E. Coli* XL1-azul ( $OD_{600} < 10$ ) creciendo activamente e incubando durante un período de 30 minutos a 37°C, con agitación. Las diluciones en serie del cultivo fueron ubicadas sobre placas 2YT/amp (siendo 2YT 45 suplementadas con ampicilina 50 mg/ml) para determinar el número de fagos eluidos. Esto fue determinado tanto para los pocillos revestidos con monómero KDR (1-3) como para los pocillos control no revestidos.

El cultivo procedente de la placas fue transferido a 10 volúmenes de 2YT/amp/VCS (estando 2YT suplementado con 50 mg/ml de ampicilina y  $10^{10}$  pfu/ml M13-VCS) e incubado durante el transcurso de una noche a 37°C, con agitación. El fago fue entonces aislado.

50 Los fagos que fueron repropagados fueron clasificados de nuevo por su unión a monómero KDR (1-3) inmovilizado, en presencia de una concentración elevada (100 nM) de monómero competidor Flt-1 (1-3), seguido de lavado del Flt-1 unido al fago y repropagado a partir del fago unido a KDR. La afinidad del procedimiento de clasificación fue monitorizada calculando la relación de enriquecimiento y se repitió hasta que la relación de enriquecimiento alcanzó un valor máximo (aproximadamente 5 a 6 ciclos de clasificación).

55 La relación de enriquecimiento es el número de fagos eluidos procedentes de un pocillo revestido con monómero KDR (1-3), dividido por el número de fagos unidos a un pocillo control no revestido. Una relación superior a 1 es habitualmente indicativa de que el fago se une específicamente a la proteína KDR (1-3), indicando con ello resistencia a la unión con el monómero Flt-1 añadido. Cuando la relación de enriquecimiento alcanzó un máximo, se analizaron clones individuales en búsqueda de unión específica.

## 60 Fago ELISA

La unión específica de fagos que tienen la proteína gIII variante de VEGF 1-109 sobre su superficie con el monómero KDR (1-3) fue medida utilizando un fago ELISA, según Mullet *et al.*, PNAS, 94: 7192 (1997). Para el fago ELISA, placas de microvaloración (Maxisorp, Nunc-Immunoplate, Nalge Nunc International; Rochester, New York) fueron revestidas con monómero KDR (1-3) o monómero Flt-1 purificado (5 µg/ml) en carbonato sódico 50 mM a pH 9,6 e incubadas a 4°C durante el transcurso de una noche. Las placas fueron bloqueadas con 0,5% BSA%. Seguidamente, se añadieron a los pocillos diluciones en serie de variantes VEGF 1-109, conjuntamente con una concentración subsaturadora de receptor competidor (monómero KDR (1-3) o monómero Flt-1 (1-3), en 100 µl de tampón de unión (PBS, 0,5% Tween 20, 0,5% BSA). Después de alcanzado el equilibrio, las placas fueron lavadas y los fagémidos

# ES 2 265 931 T3

unidos fueron teñidos con anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las afinidades (EC50) fueron calculadas en forma de concentración de receptor competitivo que dio lugar a la mitad de unión máxima a fagémido.

- 5 Las secuencias de variantes de VEGF 1-109 que fueron obtenidas a partir de la clasificación por afinidad y que mostraron resistencia al monómero Flt-1 (1-3) fueron determinadas a partir de la secuencia del cDNA fagémido.

## *Purificación de variantes de VEGF 1-109*

- 10 Las proteínas de variante de VEGF 1-109 fueron aisladas en forma de cuerpos retráctiles a partir del cultivo en matraz agitado de *E. Coli* (27c7). El repliegue de las proteínas mutantes fue llevado a cabo tal y como se describe por Yihai *et al.*, J. Biol. Chem., 271: 3154-3162 (1996). Las variantes fueron mezcladas y desplegadas con guanidina HCl 6M más glutationa oxidada 1 mM a pH 6, y dializada frente a 10 volúmenes de urea 2M con glutationa reducida 2 mM y glutationa oxidada 0,5 mM en Tris-HCl 20 mM, a pH 8, durante un período de 10 horas. La urea fue extraída mediante diálisis lenta frente a 20 volúmenes de Tris-HCl 20 mM (pH 8) durante el transcurso de una noche a 4°C. Cada una de las variantes fue purificada adicionalmente mediante intercambio aniónico (Pharmacia HiTrap Q, 1 ml) (Pharmacia Biotech, Piscataway, Nj), para eliminar trazas de monómero malplegado. La identidad de las variantes resultantes puras fue confirmada mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas.
- 20 La Tabla 2 muestra el nombre del identificador de la variante de VEGF, las sustituciones de aminoácido introducidas y el codón que codifica para los correspondientes aminoácidos sustituidos. El asterisco (\*) próximo a determinados identificadores de variante (tal como LK-VRB-1s) indica diversas variantes de VEGF que demuestran afinidades de unión particularmente preferidas y/o actividades biológicas. Los identificadores de variante que contienen una "s" (tal como LK-VRB-1s) indican polipéptidos de variante de VEGF que consisten en la forma truncada 1-109 de VEGF y contenían las mutaciones mencionadas proporcionadas en la Tabla. Los identificadores de variante que contienen una "f" (tales como LK-VRB-1f) indican polipéptidos variantes de VEGF que consisten en la forma VEGF de longitud total 1-165 y contienen las mutaciones mencionadas en la Tabla. La denominación e identificación de las mutaciones en las secuencias de variante está de acuerdo con la convención de denominación. Por ejemplo, para la primera entrada en la Tabla 2, la mutación es identificada como "M18E". Esto significa que la posición 18 de la secuencia de VEGF de tipo natural (utilizando la numeración en la secuencia de aminoácido para VEGF humano de origen natural, tal y como se informa por parte Leung *et al.*, *supra* and Houck *et al.*, *supra*) fue mutada por lo que la metionina (M) de origen natural en dicha posición fue sustituida por un resto ácido glutámico (E) para preparar la variante de VEGF. La columna en la Tabla 2 identificada como "Secuencia de nucleótido" proporciona los correspondientes codones que codifican (5' → 3') para <cada una de las correspondientes mutaciones de aminoácido. Por ejemplo, para la primera entrada en la Tabla 2, la mutación M18E es codificada por el codón "GAG".
- 25
- 30
- 35

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

# ES 2 265 931 T3

TABLA 2

*Variantes de VEGF y las correspondientes mutaciones*

	Identificador de variante	Mutación de aminoácido	Secuencia de nucleótido
5	LK-VRB-1s*	M18E/Y21/Q22R/Y25S	GAG/CTC/CGG/AGC
10	LK-VRB-2s*	D63S/G65M/L66R	AGC/ATG/CGC
15	LK-VRB-3s	F17I/M18E/Y21F/Q22K/Y25S	ATT/GAG/TTC/AAG/AGC
20	LK-VRB-4s	F17I/M18E/Y21F/Q22E/Y25I	ATC/GAG/TTC/GAG/CAC
25	LK-VRB-5s	D63S/L66R	AAG/CAG
30	LK-VRB-6s	D63S/G65A/L66T	AAG/GGC/ATG
35	LK-VRB-7s*	M18E/D63S/G65M/L66R	GAG/AGC/ATG/CGC
40	LK-VRB-8s*	Y21L/D63S/G65M/L66R	CTC/AGC/ATG/CGC
45	LK-VRB-9s	Q22R/D63S/G65M/L66R	CGG/AGC/ATG/CGC
50	LK-VRB-10s	Y25S/D63S/G65M/L66R	AGC/AGC/ATG/CGC
55	LK-VRB-11s	M18E/Y21L/D63S/G65M/L66R	GAG/CTC/AGC/ATG/CGC
	LK-VRB-12s	M18E/Q22R/D63S/G65M/L66R	GAG/CGG/AGC/ATG/CGC
	LK-VRB-13s	M18E/Y25S/D63S/G65M/L66R	GAC/AGC/AGC/ATG/CGC
	LK-VRB-14s	Y21L/Q22R/D63S/G65M/L66R	CTC/CGG/AGC/ATG/CGC
	LK-VRB-15s	Y21L/Y25S/D63S/G65M/L66R	CTC/AGC/AGC/ATG/CGC
	LK-VRB-16s	Q22R/Y25S/D63S/G65M/L66R	CGG/AGC/AGC/ATG/CGC
	LK-VRB-17s	M18E/Y21L/Q22R/D63S/G65M/L66R	GAG/CTC/GAG/AGC/ATG/CGC
	LK-VRB-18s	M18E/Q22R/Y25S/D63S/G65M/L66R	GAG/CGG/AGC/AGC/ATG/CGC
	LK-VRB-19s	M18E/Q22R/Y25S/D63S/G65M/L66R	GAG/CGC/AGC/AGC/ATG/CGC
	LK-VRB-20s	Y21L/Q22R/Y25S/D63S/G65M/L66R	CTC/CGG/AGC/AGC/ATG/CGC
	LK-VRB-21s	D63S/M18E/Y21L/Q22R/Y25S	TCC/GAG/CTC/CGG/AGC
	LK-VRB-22s	G65M/M18E/Y21L/Q22R/Y25S	ATG/GAG/CTC/CGG/AGC
	LK-VRB-23s	L66R/M18E/Y21L/Q22R/Y25S	AGC/GAG/CTC/CGG/AGC
	LK-VRB-24s	D63S/G65M/M18E/Y21L/Q22R/Y25S	TCC/ATG/GAG/CTC/CGG/AGC
	LK-VRB-25s	D63S/L66R/M18E/Y21L/Q22R/Y25S	TCC/AGG/GAG/CTC/CGG/AGC
	LK-VRB-26s	G65M/L66R/M18E/Y21L/Q22R/Y25S	ATG/AGG/GAG/CTC/CGG/AGC
	LK-VRB-27s	M18E/Y21L/Q22R/Y25S/D63S/G65M/L66R	GAG/CTC/CGG/AGC/AGC/ATG/CGC
	LK-VRB-1f	M18E/Y21L/Q22R/Y25S/	GAG/CTC/CGG/AGC
	LK-VRB-2f	D63S/G65M/L66R	AGC/ATG/CGC

## Ejemplo 2

### *Unión de variantes de VEGF al receptor KDR*

La unión de variantes de VEGF (1-109) y de variantes de VEGF 165 (descritas en el Ejemplo 1) al receptor KDR fue evaluada mediante la medición de la capacidad de las variantes para inhibir la unión de VEGF (8-109) de origen natural biotinilado al receptor KDR. Las variantes de VEGF evaluadas contenían las mutaciones mostradas en la Tabla 2.

Los ensayos de unión a receptor fueron llevados a cabo en inmunoplacas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc-Immunoplate, Nalge Nunc International, Rochester, New York). Cada uno de los pocillos fue revestido con 100  $\mu$ l de una

solución que contenía 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de un anticuerpo monoclonal para KDR, conocido como MAKD5 (Genentech, South San Francisco, California), en tampón carbonato 50 mM, a pH 9,6 e incubado a 4°C durante el transcurso de una noche. El sobrenadante fue descartado, los pocillos lavados tres veces en tampón de lavado (0,05% de Tween 20 en PBS) y la placa fue bloqueada (150  $\mu\text{l}$  por pocillo) con tampón de bloqueo (0,5% BSA, 0,01% timerosal en PBS), a temperatura ambiente durante una hora. El sobrenadante fue descartado y los pocillos lavados.

VEGF (8-109) de origen natural diluido en serie, VEGF (1-165) de origen natural, variantes de VEGF (1-109) de origen natural o variantes de VEGF 165 (0,16-168 nM en monómero) fueron incubados con VEGF (8-109) de origen natural biotinilada (84 nM) y KDR (1-3) (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 2 horas a temperatura ambiente, en tampón de ensayo (0,5% BSA, 0,05% Tween 20 en PBS). Alícuotas de esta mezcla (100  $\mu\text{l}$ ) fueron añadidas a pocillos de microvaloración prerrevestidos y la placa fue incubada durante 1 hora a temperatura ambiente. El complejo de KDR (1-3) y de VEGF de origen natural biotinilado que estaba unido a la placa de microvaloración fue detectado mediante incubación de los pocillos con estreptavidina marcada con peroxidasa (0,2 mg/ml, Sigma, St. Louis, Missouri) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos fueron después incubados con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (0,2 gram/litro; Kirkegaard & Perry Laboratoires, Gaithersburg, Maryland) durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia fue leída a 450 nm sobre un lector de placa Vmax (Molecular Devices, Menlo Park, California).

Las curvas de valoración fueron adaptadas con un programa de adaptación de curva de regresión no lineal de cuatro parámetros (KaleidaGraph, Synergy Software, Reading, Pennsylvania). Concentraciones de variantes de VEGF correspondientes a la absorbancia en el punto medio de la curva de valoración del VEGF (8-109) de origen natural fueron calculadas y después divididas por la concentración de VEGF de origen natural correspondiente al punto medio de absorbancia de la curva de valoración de VEGF de origen natural. (ver Figura 2).

Las afinidades de unión determinadas para las variantes VEGF (1-109) y para las variantes VEGF 165 son mostradas en la Tabla 3. Muchas de las variantes de VEGF mostraron unión a receptor KDR que estaba situada dentro de aproximadamente dos veces la correspondiente a la unión del VEGF 8-109 de origen natural.

### Ejemplo 3

#### 30 *Unión de variantes de VEGF al receptor Flt-1*

La unión de las variantes de VEGF (1-109) y de las variantes de VEGF 165 (descritas en el Ejemplo 1) al receptor Flt-1 fue evaluada mediante la medición de la capacidad de las variantes de inhibir la unión de VEGF (8-109) de origen natural biotinilado a receptor Flt-1. Las variantes de VEGF evaluadas contenían las mutaciones mostradas en la Tabla 2.

Se llevaron a cabo ensayos de unión a receptor en inmunoplacas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc-Immunoplate, Nalge Nunc International, Rochester, New York). Cada uno de los pocillos fue revestido con 100  $\mu\text{l}$  de una solución que contenía 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de conejo F (ab') 2 para IgG Fc humana (Jackson ImmunoResearch, West grove, Pennsylvania) en tampón carbonato 50 mM a pH 9,6 e incubado a 4°C durante el transcurso de una noche. El sobrenadante fue entonces descartado, los pocillos lavados tres veces en tampón de lavado (0,05% Tween 20 en PBS) y la placa fue bloqueada (150  $\mu\text{l}$  por pocillo) con tampón de bloqueo (0,5% BSA, 0,01% timerosal en PBS) a temperatura ambiente por espacio de una hora. El sobrenadante fue descartado y los pocillos lavados.

Los pocillos fueron llenados con 100  $\mu\text{l}$  de una solución que contenía Flt-IgG (una molécula químérica Flt-Fc humana) a razón de 50 ng/ml, en tampón de ensayo (0,5% BSA, 0,05% Tween 20 en PBS). Los pocillos fueron incubados a temperatura ambiente durante una hora y después lavados tres veces en tampón de lavado (0,05% Tween 20 en PBS).

VEGF (8-109) de origen natural diluido en serie, VEGF (1-165) de origen natural, variantes de VEGF (1-109) o variantes de VEGF 165 (0,03-33 nM en monómero) fueron mezclados con VEGF (8-109) (0,21 nM) de origen natural biotinilado o VEGF 165 de origen natural biotinilado (0,66 nM). Alícuotas de la mezcla (100  $\mu\text{l}$ ) fueron añadidas a pocillos de microvaloración prerrevestidos y la placa fue incubada durante 2 horas a temperatura ambiente. El complejo de Flt-IgG y de VEGF de origen natural biotinilado que estaba unido a la placa de microvaloración fue detectado mediante incubación de los pocillos con estreptavidina marcada con peroxidasa (0,2 mg/ml, Sigma, St. Louis, Missouri) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos fueron después incubados con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (0,2 gram/litro; Kirkegaard & Perry Laboratoires, Gaithersburg, Maryland) durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia fue leída a 450 nm sobre un lector de placa Vmax (Molecular Devices, Menlo Park, California).

Las curvas de valoración fueron adaptadas con un programa de adaptación de curva de regresión no lineal de cuatro parámetros (KaleidaGraph, Synergy Software, Reading, Pennsylvania). Las concentraciones de variantes de VEGF correspondientes a la absorbancia en el punto medio de la curva de valoración del VEGF (8-109) de origen natural fueron calculadas y después divididas por la concentración de VEGF de origen natural correspondiente al punto medio de absorbancia de la curva de valoración de VEGF de origen natural.

Las afinidades de unión determinadas para las variantes de VEGF (1-109) y para variantes de VEGF 165 se muestran en la Tabla 3. Muchas de las variantes de VEGF mostraron unión a receptor Flt-1 que era más de 2.000 veces inferior a la unión del VEGF (8-109) de origen natural. Los datos de afinidad de unión relativos mostrados en la Tabla

# ES 2 265 931 T3

3 para determinadas variantes de VEGF (por ejemplo, LK-VRB-7s\* y LK-VRB-8s\*) para el receptor FLT-1 no se proporcionan en valores nM, dado que la cantidad de unión detectable era superior a la sensibilidad del ensayo ELISA.

TABLA 3

*Unión de variantes de VEGF a receptor KDR y a receptor FLT-1*

		Afinidad de unión relativa
Identificador de variante		Receptor KDR
LK-VRB-1s*	1 nM/1	2700 nM/6000
LK-VRB-2s*	1 nM/1	>400 nM/>1000
LK-VRB-3s	1 nM/1	170 nM/400
LK-VRB-4s	1 nM/1	100 nM/200
LK-VRB-5s	1 nM/1	233 nM/550
LK-VRB-6s	0,5 nM/0,5	4 nM/10
LK-VRB-7s*	1 nM/1	/>15000
LK-VRB-8s*	0,5 nM/0,5	/>21000
LK-VRB-9s	0,5 nM/0,5	/300
LK-VRB-10s	0,5 nM/0,5	/>2400
LK-VRB-11s	2 nM/2	/>14000
LK-VRB-12s	0,4 nM/0,4	/>5600
LK-VRB-13s	14 nM/14	/>14000
LK-VRB-14s	0,5nM/0,5	/>2900
LK-VRB-15s	2 nM/2	/>21000
LK-VRB-16s	0,6 nM/0,6	/>1400
LK-VRB-17s	3 nM/3	/>1900
LK-VRB-18s	130 1nM/130	/>3900
LK-VRB-19s	7 nM/7	/>35000
LK-VRB-20s	2 nM/2	/>10000
LK-VRB-21s	3 nM/3	/>5600
LK-VRB-22s	4 nM/4	/>30
LK-VRB-23s	11 nM/11	/>8500
LK-VRB-24s	10 nM/10	/>18000
LK-VRB-25s	4 nM/4	/>12000
LK-VRB-26s	23 nM/23	/>25000
LK-VRB-2f	1 nM/1	19 nM/70
Comparación con VEGF (8-109) de origen natural	1 nM/1	0,42 nM/1

# ES 2 265 931 T3

## Ejemplo 4

### *Inducción de fosforilación en receptor mediante variantes de VEGF (1-109)*

5 Para determinar la actividad de las variantes de VEGF, se midió la capacidad de las variantes para inducir la fosforilación del receptor KDR en un ensayo KIRA. Las variantes de VEGF evaluadas contenían las mutaciones encontradas en la Tabla 2. Específicamente, se estudiaron las siguientes variantes de VEGF (1-109): LK-VRB-1s\*, LK-VRB-2s\*, LK-VRB-3s, LK-VRB-4s, LK-VRB-5s y LK-VRB-6s.

10 Variantes de VEGF (1-109) diluidas en serie (0,01-10 nM) fueron añadidas a células CHO que expresan al receptor KDR con un tag gD en el N-terminal (Genentech, South San Francisco, California). Las células fueron sometidas a lisis mediante 0,5% Triton-X100, NaCl 150 mM, Hepes 50 mM a pH 7,2 y el receptor gD-KDR fosforilado en el lisato fue cuantificado por medio de ELISA.

15 Para el ELISA, se utilizaron 96 pocillos de inmunoplaca (Maxisorp, Nunc. Immunoplate, Nalge Nunc International, Rochester, New York). Cada uno de los pocillos fue revestido con 100  $\mu$ l de una solución que contenía 1  $\mu$ g/ml de un anticuerpo monoclonal de ratón para gD, conocido como 3C8 (Genentech, South San Francisco, California) en tampón carbonato 50 mM a pH 9,6 e incubado durante el transcurso de una noche a 4°C. El sobrenadante fue descartado, los pocillos fueron lavados tres veces en tampón de lavado (0,05% Tween 20 en PBS) y la placa fue bloqueada (150  $\mu$ l por pocillo) en tampón de bloqueo (0,5% BSA, 0,01% timerosal en PBS) por espacio de 1 hora a temperatura ambiente. El sobrenadante fue después descartado y las paredes lavadas.

20 Alícuotas del lisato (100  $\mu$ l) fueron añadidas a los pocillos prerrevestidos e incubadas por espacio de 2 horas a temperatura ambiente. El receptor dG-KDR fosforilado fue detectado mediante incubación de los pocillos con anticuerpo monoclonal biotinilado para la fosfotirosina, conocido como 4G10 (0,05 mg/ml) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, New York) por espacio de 2 horas a temperatura ambiente, seguido de incubación de los pocillos con estreptavidina marcada con peroxidasa (0,2 mg/ml, Sigma, St. Louis, Missouri) por espacio de 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos fueron después incubados con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (0,2 g/litro, Kirkegaard & Perry laboratories, Gaithersburg, Maryland) durante aproximadamente 15-20 minutos, a temperatura ambiente. La absorbancia fue leída a 450 nm en un lector de placa Vmax (Molecular Devices, Menlo Park, California).

25 Las curvas de valoración fueron adaptadas con un programa de adaptación de curva de regresión no lineal de cuatro parámetros (KaleidaGraph, Synergy Software, Reading, Pennsylvania). Las concentraciones de las variantes de VEGF correspondientes a la absorbancia en el punto medio de la curva de valoración del VEGF (8-109) de origen natural 30 fueron calculadas y después divididas por la concentración de VEGF de origen natural correspondiente al punto medio de absorbancia de la curva de valoración de VEGF de origen natural. (Figura 3)

35 La actividad inductora de fosforilación de las variantes de VEGF se proporcionan en la Tabla 4. Las variantes de VEGF exhibían generalmente una actividad inductora de fosforilación en torno al doble de la actividad del VEGF (8-109) de origen natural.

TABLA 4

### *Inducción de fosforilación de receptor KDR a través de variantes de VEGF (1-109)*

	Identificador de variante	Actividad inductora de fosforilación
50	LK-VRB-1s*	1 nM/0,5
	LK-VRB-2s*	2 nM/1
	LK-VRB-3s	2 nM/1
55	LK-VRB-4s	1 nM/0,5
	LK-VRB-5s	1 nM/0,5
60	LK-VRB-6s	1 nM/0,5
	Comparación con VEGF (8-109) de origen natural	2 nM/1

## ES 2 265 931 T3

### Ejemplo 5

#### *Ensayo de proliferación de células endoteliales*

5 La actividad mitógena de VEGF (1-109) o de las variantes de VEGF 165 (al igual que una variante de VEGF 165, LK-VRB-2f) fue determinada utilizando células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (Cell Systems, Kirkland, Washington) como células objetivo. Las variantes de VEGF evaluadas contenían las mutaciones en la Tabla 2. Específicamente, las siguientes variantes de VEGF (1-109) fueron estudiadas: LK-VRB-1s\*, LK-VRB-2s\*, LK-VRB-7s\* y LK-VRB-8s\*.

10 HUVEC es una línea celular primaria que es mantenida y cultivada con factores de crecimiento tales como FGF ácido en medio CS-C Complete Growth (Cell Systems, Kirkland, Washington). Para preparar el ensayo, un paso inicial (menos de cinco pasos) de las células fue lavado y sembrado en placas de 96 pocillos (3000 células en 100  $\mu$ l por pocillo) y sometido a ayunas en medio CS-C en ausencia de factores de crecimiento, pero suplementado con 15 2% Diafiltered Fetal Bovine Serum (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) por espacio de 24 horas a 37°C, con incubador de CO<sub>2</sub> al 5%, antes de ser reemplazado con medio de ayunas fresco. Variantes de VEGF a diversas concentraciones (aproximadamente 10 nM a 0,01 nM), diluidas en el mismo medio de ayuno, fueron añadidas a los pocillos para incrementar el volumen hasta 150  $\mu$ l por pocillo y se incubó por espacio de 18 horas.

20 Para medir la síntesis de DNA inducida por las variantes de VEGF, a cada uno de los pocillos se le añadió <sup>3</sup>H-timidina (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL), a razón de 0,5  $\mu$ Ci por pocillo y se sometieron a incubación durante otro período de 24 horas, con el fin de que las células pudieran absorber la radioactividad. Las células fueron después recogidas sobre otra placa de filtro de 96 pocillos y el exceso de marcador fue eliminado por lavado antes de cargar las placas en el Topcount (Packard, Meriden, Connecticut).

25 Las células fueron contadas mediante Topcount. Los contajes medidos por minuto (CPM) fueron llevados a una gráfica frente a la concentración de las variantes individuales, con vistas a comparar sus actividades. (Figura 4).

30 Las capacidades de proliferación celular de las variantes de VEGF se muestran en la Tabla 5. Las variantes de VEGF exhiben generalmente una capacidad de proliferación celular en torno a dos veces la capacidad del VEGF (8-109) de origen natural.

TABLA 5

#### *Actividad mitógena de las variantes de VEGF (1-109)*

Identificador de variante	Actividad de proliferación celular endotelial
LK-VRB-1s*	0,1 nM/0,2
LK-VRB-2s*	0,05 nM/0,1
LK-VRB-7s*	0,5 nM/1
LK-VRB-8s*	0,5 nM/1
LK-VRB-2f	0,05 nM/0,1
Comparación con VEGF (8-109) de origen natural	0,5 nM/1

### Ejemplo 6

#### *Ensayo RIA para determinar la unión de VEGF*

##### *Variantes de receptores KDR y FLT-1*

60 Se llevó a cabo un ensayo RIA, esencialmente tal y como se describe en Muller *et al.*, *PNAS*, 94: 7192-7197 (1997) para examinar las afinidades de unión relativas de diversas variantes de VEGF (descritas en la Tabla 2) en relación con el receptor KDR y el receptor FLT-1, en comparación con el VEGF 165 (8-109) de origen natural. Los resultados se muestran seguidamente en la Tabla 6.

TABLA 6

Afinidad de unión relativa		
Identificador de variante	Receptor KDR	Receptor FLT-1
VEGF 165 de origen natural	1 (97 pM)	1 (37 pM)
VEGF (8-109) de origen natural	12	29
LK-VRB-1f	8	1.700
LK-VRB-1s*	20	14.000
LK-VRB-2f	1	2.400
LK-VRB-2s*	2	27.000

## Ejemplo 7

*Unión de variantes de VEGF a células transfectadas KDR- o FLT-1*

Las propiedades de unión de LK-VRB-2s\* (ver Ejemplo 1, Tabla 2) fueron examinadas adicionalmente en un ensayo de unión celular de receptor transfectado. Se prepararon células NIH3T3 transfectadas por KDR o Flt-1, tal y como se describe por Fuh *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273: 11187-11204 (1998). Las células transfectadas fueron mantenidas en medio F12 suplementado con 10% FBS y 400 µg/ml de G418 (GibcoBRL). Para los ensayos de unión, las células fueron ubicadas en placas de 12 pocillos a razón de 1 x 10<sup>6</sup>/pocillo, para alcanzar la confluencia al día siguientes. Las células fueron después lavadas y bloqueadas en solución salina tamponada de Hank (HBS) con 1% BSA, durante una hora, antes de añadir <sup>125</sup>I-VEGF (1-109) (preparado a través de procedimientos cloramina-T habituales) e incrementar las concentraciones de las variantes de VEGF no marcadas. Para la unión a las células de KDR y Flt-1 se utilizó VEGF (1-109) marcado 50 pM y 10 pM, respectivamente. Las placas fueron incubadas a 4°C durante un período de tres horas y se lavaron después dos veces con HBS con 0,5% BSA. El VEGF, lavado y unido fue recogido mediante solubilización de las células lavadas con NAOH 1N y después sometido a contejo en un contador gamma (Isodata, ICN).

Tal y como se muestra en la Figura 5, el LK-VRB-2s mostró unión con las células transfectadas que expresan KDR a nivel similar a la unión con VEGF de origen natural. No obstante, el LK-VRB-2s, mostró una unión aproximadamente reducida 200 veces a las células transfectadas con Flt-1 (ver la Figura 6).

## Ejemplo 8

## 45 (Referencia)

*Generación y selección de una variante de VEGF específica para Flt-1*

Para definir la importancia relativa de la unión de KDR vs. Flt-1 de los restos individuales de VEGF se utilizó un escáner de alanina (Wells, *Methods Enzymol.*, 202:390-411 (1991). Los restos seleccionados para mutagénesis incluían 22 restos de contacto observados en la estructura cristalina del complejo entre el receptor-dominio de unión de VEGF y dominio 2 de Flt-1 (Wiesmann *et al.*, *Cell*, 91:695-704 (1997)), al igual que Phe 47 y Glu 64, los cuales habían sido identificados previamente como determinantes de unión a KDR (Muller *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 7192-7197 (1997)). La mutagénesis dirigida al punto fue llevada a cabo utilizando el procedimiento de Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.*, 204: 125-139 (1991) en los antecedentes del dominio unido a receptor (restos 1 a 109) de VEGF. La totalidad de las mutaciones fueron verificadas mediante secuenciado de DNA. Los siguientes restos de VEGF fueron mutados individualmente a alanina: Lys 16, Phe 17, Met 18, Tyr 21, Gln 22, Tyr 25, Ile 43, Ile 46, Phe 47, Lys 48, Asp 63, Glu 64, Gly 65, Leu 66, Gln 79, Met 81, Ile 83, His 86, Gln 89, Ile 91, Lys 101, Glu 103, Arg 105, Pro 106. Estos restos fueron mutados individualmente a alanina en los antecedentes del dominio de unión a receptor de VEGF (restos 1 a 109: Keyt *et al.* *J. Biol. Chem.*, 271: 7788-7795 (1996); Muller *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 7192-7197 (1997)).

Cada una de las proteínas mutantes fue producida y purificada hasta lograr la homogeneidad y para determinar las afinidades de unión para los dominios 1 a 3 de KDR y de Flt-1 (estos tres dominios contienen el punto completo de unión de VEGF) se llevó a cabo un ensayo inmunosorbente vinculado a enzima (ELISA); Wiesmann *et al.*, *Cell*, 91: 695-704 (1997); Fuh *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273: 11197-11204 (1998). Para el ELISA, placas de microvaloración fueron revestidas con VEGF (8-109) purificado (a razón de 5 µg/ml) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6) a 4°C durante el transcurso de una noche. Las placas fueron bloqueadas con 0,5% BSA, se añadieron diluciones en serie de mutantes

de competidores VEGF alanina y una concentración sub-saturadora (100 pM) de receptor marcado con biotina (KDR (1-3) o Flt-1 (1-3)) a pocillos en 100  $\mu$ l de tampón de unión (0,5% Tween 20, 0,5% BSA en PBS). Transcurrida 1 hora, las placas fueron lavadas y la proteína unida teñida con conjugado de peroxidasa de rábano estreptavidina (Pharmacia) y sometida a ensayo. Las afinidades se estimaron en forma de valores  $IC_{50}$ : las concentraciones de KDR (1-3) o de Flt-1 (1-3) que bloqueaban el 50% de la unión a proteína.

Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 7. Se lista, para cada uno de los restos, la relación de la  $IC_{50}$  del mutante con la  $IC_{50}$  del VEGF (8-109) de tipo natural, representando el grado de reducción en unión del mutante en comparación con la proteína de tipo natural. Las  $IC_{50}$ s para VEGF (8-109) de tipo natural se muestran entre paréntesis. Los restos mostrados en negrita se utilizaron para generar la variante selectiva para Flt-1.

El análisis concurrente de los mutantes de VEGF para unión a Flt-1 muestran una región de unión a receptor similar y solapamiento, predominantemente localizado en la hélice 20s y el bucle 60s, siendo los determinantes de unión a Flt-1 más importantes Phe 17, Tyr 21, Gln 22 y Leu 66 (Figura 7). Por el contrario, la mutación de los determinantes de unión a Flt-1 críticos tendía también a reducir significativamente la afinidad para KDR (Figura 7).

Se generó una variante de VEGF con una elevada selectividad para el receptor Flt-1, mediante la combinación de cuatro mutaciones que afectaban en gran manera a la unión a KDR pero no a la unión con Flt-1. La mutación a alanina de Ile 43, Ile46, Gln 79 o Ile83 mostraba que las cadenas laterales de estos restos resultan críticas para la estrecha unión a KDR pero no resultan importantes para la unión a Flt-1. Se construyó una variante (identificada en el presente documento como "Flt-sel") con sustituciones alanina en las posiciones Ile43, Ile 46, Gln 79 e Ile 83, utilizando procedimientos de mutagénesis dirigidos a un punto (Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.*, 204: 125-139 (1991)). Esta particular variante Flt-sel puede ser también representada por el identificador 143A/146A/Q79A/183A, según la nomenclatura descrita en el Ejemplo 1 mencionado anteriormente (tal y como se ilustra en la Tabla 2). Los correspondientes codones para estas cuatro sustituciones de alanina en las posiciones 43, 46, 79 y 83 son GCC/GCC/GCG/GCC, respectivamente (según la nomenclatura descrita en el Ejemplo 1 indicado anteriormente e ilustrado en la Tabla 2).

Para examinar las propiedades y las actividades biológicas de la variante 143A/146A/Q79A/183A Flt-sel se llevaron a cabo diversos ensayos. Por ejemplo, se efectuaron mediciones de unión cuantitativa, utilizando un ensayo de unión a radioinmune receptor soluble (RIA), tal y como se describe en el Ejemplo 6 expuesto anteriormente. En el ensayo, el VEGF (8-109) de origen natural presentaba afinidades para KDR y Flt-1 de 0,5 nM y 0,4 nM, respectivamente (Figs. 8 A y 8 B). Se averiguó que Flt-1 presentaba al menos una reducción de 470 veces en la afinidad de unión a KDR en este ensayo (Figura 8A). De forma sorprendente, dado que se habían observado pequeñas reducciones en la unión a Flt-1, a partir de los mutantes de tipo individual en el ELISA (descrito anteriormente), la afinidad de la variante Flt-1 para Flt-1 resultaba esencialmente idéntica a la de la proteína de origen natural (Figura 8 B).

La actividad de la variante de Flt-sel fue también objeto de comprobación en el ensayo de unión a célula transfecada 3T3 descrito en el Ejemplo 7. En consonancia con los datos RIA, Flt-sel no mostraba unión detectable a células 3T3 transfectadas por KDR y una unión ligeramente mejorada a células transfectadas por Flt (Figuras 5 y 6).

La actividad de la variante Flt-sel fue también objeto de comprobación en el ensayo KIRA descrito en el Ejemplo 4. Los resultados se muestran en la Figura 9.

La actividad de la variante Flt-sel fue objeto de comprobación adicional en el ensayo de proliferación HUVEC descrito en el Ejemplo 5. Los resultados se muestran en la Figura 10.

#### Ejemplo 9

##### Ensayo de matriz metaloproteasa 9

Se llevó a cabo un ensayo que midió la secreción de la matriz metaloproteasa 9 después de activación de Flt-1 expresado en células de músculo liso de aorta humana (Wang and Keiser, *Circ. Res.*, 83: 832-840 (1998)). Células de músculo liso de aorta humana (ASMC) (Clonetics) fueron mantenidas en medio SM2 (Clonetics) a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire ambiente, en presencia de 10% suero bovino fetal en placas de poliestireno de 6 pocillos (Becton-Dickinson). Cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia, se interrumpió el crecimiento durante 24 horas en medio exento de suero que contenía un 0,2% de sueroalbúmina bovina (BSA). VEGF (1-109), P1GF (R & D Systems, Minneapolis, MN) o variantes de VEGF (1-109) (LK-VRB-2s\* y Flt-sel (descrito anteriormente) fueron añadidas a una concentración final de 40 ng/ml y las células fueron sometidas a cultivo durante un período adicional de 24 horas en el medio exento de suero que contenía 0,2% BSA. Se analizó posteriormente la galactinasa en el medio acondicionado mediante zimografía. El medio fue recogido y concentrado y se mezclaron alícuotas de 25  $\mu$ l con 2 x tampón de muestra sin agente reductor o calentamiento. Las muestras fueron cargadas sobre 10% gel de poliacrilamida, conteniendo un 0,1% de gelatina (Novex, San Diego, CA) para electroforesis. Además de utilizar marcadores de peso molecular regular, se utilizaron los estándares MMP-2 y 9-zimográficos (Chemicon, Temecula, CA) como estándares de gelatinasa. Después de la electroforesis, las proteínas fueron renaturalizadas mediante incubación de los geles por espacio de 30 minutos a temperatura ambiente en Tampón Ranaturing y en Developing Buffer (Novex) durante el transcurso de una noche a 37°C. Los geles fueron teñidos con 0,25% de Coomassie Brilliant Blue (Sigma). La actividad de la gelatinasa fue identificada como ligeramente teñida o bandas claras después del destañido.

## ES 2 265 931 T3

Los resultados se muestran en la Figura 11. Se muestra un zimograma representativo de uno de dos experimentos. El grado de cambio representa la densidad de banda relativa de VEGF (1-109)-; de las variantes VEGF (1-109); o de los tratados con PIGF frente a control (PBS) tratado con vehículo. En contraste con LK-VRB-2s\*el Flt-sel resultaba plenamente activo en el ensayo, en comparación con la actividad del VEGF (1-109) de origen natural o P1GF (Figura 5 11).

### Ejemplo 10

#### Activación de MAP kinasas

10 Se llevaron a cabo ensayos para determinar si la VEGF de origen natural, la variante de VEGF selectiva para KDR, o la variante de VEGF selectiva para Flt resultaban capaces de mediar el señalamiento mitógeno.

15 Células HUVEC de paso 4-7 (CellSystems, Kirkland, WA) fueron cultivadas en medio completo Cell System (AZ0-500) con 10% de suero de ternera fetal y factores de crecimiento sobre platos revestidos con gelatina y se dejaron inactivas, mediante una período de falta de alimentación de 14 horas en 0,2% de suero. Las células HUVEC inactivas fueron o bien dejadas sin tratar o estimuladas con VEGF (1-165) de origen natural o con variantes de VEGF (una variante selectiva de Flt-1 que comprende una secuencia 165 de longitud completa y que contiene las sustituciones alanino amino 143A/146A/Q79A/183A descritas para la "forma corta" (1-109) de Flt sel del Ejemplo 8 expuesto 20 anteriormente o la variante selectiva para KRD (que también comprende la secuencia 165 de longitud completa) identificada como LK-VRB-2f (ver Ejemplo 1; Tabla 2) (a concentraciones de o bien 50 ng/ml o de 10 ng/ml) por espacio de 5 minutos. Tanto el VEGF (1-165) de origen natural como las variantes de VEGF se expresaron en *E. Coli* y se purificaron tal y como se describe en Keyt *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **271**: 5638-5646 (1996). Las células HUVEC fueron después sometidas a lisis con entre 0,5 y 1 ml de tampón RIPA conteniendo ortovanadato sódico 0,1 mM, para-nitrofenilfosfato 5 mM, fluoruro sódico 10 mM, ácido okadaico 0,5 micromolar y un cocktail inhibidor de proteasa (Roche MB 1836195). El análisis por transferencia Western fue después llevado a cabo, en búsqueda de ERK1 o ERK2 fosforilados, utilizando antisuero ERK anti-fosfo (Promega).

30 La activación por parte de la variante selectiva de KDR, LK-VRB-2f, desencadenó la fosforilación de ERK1 y de ERK2 en células HUVEC (Fig. 12 A). La extensión de la fosforilación no resultaba distinguible de la obtenida utilizando VEGF (1-165) de origen natural. La variante de VEGF selectiva para Flt-1 (a la concentración más elevada utilizada) se traducía en una fosforilación de ERK2 escasamente detectable. No se espera que las variantes de VEGF homodímeras utilizadas en este estudio favorezcan la formación de receptor heterodímero. Por lo tanto, el Flt-1 no contribuye a la activación de la MAP kinasa.

35 Se había informado con anterioridad acerca de que el VEGF estimulaba la p38 Map kinasa activada por tensión [Rousseau *et al.*, *Oncogene*, **15**: 2169-2177 (1997); Yu *et al.*, *J. Cell. Phys.*, **178**: 235-246 (1999)]. Con vistas a analizar que receptor de VEGF está involucrado, se examinó el status de fosforilación de p38 después de estimulación con VEGF (1-165) de origen natural, variante selectiva de Flt-1 o LK-VRB-2f (descrita anteriormente).

40 Células HUVEC de paso 4-7 (CellSystems, Kirkland, WA) fueron cultivadas en medio completo Cell System (AZ0-500) con 10% de suero de ternera fetal y factores de crecimiento sobre platos revestidos con gelatina y se dejaron inactivas, mediante una período de falta de alimentación de 14 horas en 0,2% de suero. Las células HUVEC inactivas fueron o bien dejadas sin tratar o estimuladas con VEGF (1-165) de origen natural o con variantes de VEGF (Flt-sel (forma 165 de longitud completa) o LK-VRB-2f; descritas ambas anteriormente para el ensayo ERK1 y ERK2) (a concentraciones de o bien 50 ng/ml o de 10 ng/ml) por espacio de 5 minutos. Las células fueron después sometidas a lisis en 0,5-1ml de tampón RIPA que contiene ortovanadato sódico 0,1 mM; para-nitrofenilfosfato 5 mM, ácido okadaico 0,5 micromolar y un cocktail inhibidor de proteasa (Roche MB 1836145). El estado de fosforilación de la p38 MAP kinasa activada por tensión fue evaluada con un antisuero específico p38 anti fosfo (NEB).

50 La Fig. 12 B demuestra que la variante de VEGF selectiva para KDR resultaba capaz de estimular la fosforilación de p38.

### Ejemplo 11

#### KDR estimula la PI3'-kinasa y la fosforilación PLC-gamma

55 Se ha informado acerca de que la fosforilación y activación de PLC-gamma había sido involucrada previamente en el señalamiento de VEGF. La unión PLC-gamma a KDR [Dougher *et al.*, *Oncogene*, **18**: 1619-1627 (1989), Cunningham *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **240**: 635-639 (1997)] y a Flt-1 [Seetharam *et al.*, *Oncogene*, **10**: 135-147 (1995); Sawano *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **238**: 487-471 (1997); Ito *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **273**: 23910-23918 (1998)].

60 Con vistas a determinar que receptor(es) de VEGF está(n) involucrado(s) en la activación PCL-gamma en células endoteliales primarias, se trataron células HUVEC con VEGF de origen natural o con variantes selectivas del receptor VEGF y se valoró la fosforilación PCL-gamma después de inmunoprecipitación.

Células HUVEC de paso 4-7 (CellSystems, Kirkland, WA) fueron cultivadas en medio completo Cell System (AZ0-500) con 10% de suero de ternera fetal y factores de crecimiento sobre platos revestidos con gelatina y se dejaron inactivas, mediante una período de falta de alimentación de 14 horas, en 0,2% de suero. Las células HUVEC inactivas fueron o bien dejadas sin tratar o estimuladas con VEGF (1-165) de origen natural o con variantes de VEGF 5 (Flt-sel (forma 165 de longitud total) o LK-VRB-2f; descrito anteriormente en el Ejemplo 10) (a concentraciones de 20 ng/ml), durante un período de 5 minutos. Las células fueron después sometidas a lisis en 0,5-1 ml de tampón RIPA conteniendo ortovanadato sódico 0,1 mM, paranitrofenilfosfato 5 mM, fluoruro sódico 10 mM, ácido akadaico 0,5 micromolar y un cocktail inhibidor de proteasa (Roche MB 1836145). Seguidamente la PLC-gamma fue inmunoprecipitada a partir de lisatos de células completas utilizando anticuerpos monoclonales (Upstate Biotechnology) y 10 analizada en búsqueda de fosforilación de tirosina (Fig. 13 A) o los lisatos fueron inmunoprecipitados con anticuerpos monoclonales frente a p85 PI 3'-kinasa (adquirida en Transduction Labs (P13020) y Neomarkers (MS424-P)) y objeto de comprobación para fosfotirosina utilizando anticuerpos fosfotirosina PY20 o E120H (Transduction Labs.) (Fig. 13B). La inmunoprecipitación fue llevada a cabo tal como sigue. Bolitas de proteína A/G (Pierce) fueron bloqueadas 15 en búsqueda de unión de proteína no específica en HEPES 50 mM, pH 7,2; 0,1% TX-100 0,1%; NaCl 150 mM y ovoalbúmina 1 mg/ml, durante 30 minutos. Los anticuerpos fueron preacoplados en el mismo tampón durante 1 hora a 4°C, con rotación continua y las bolas fueron lavadas 3 veces en tampón de lisis. Las bolas fueron añadidas a los lisatos y rotaron durante el transcurso de una noche. Las bolas fueron lavadas secuencialmente en Tris 50 mM, pH 7,6; NaCl 150 mM; 1% TX-100 1%; CaCl<sub>2</sub> 1 mM; Tris 50 mM, pH 7,6, NaCl 500 mM, 0,1% TX-100, CaCl<sub>2</sub> 1 mM 20 y Tris 50 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, 0,05% TX-100, CaCl<sub>2</sub> 1 mM.. Las bolas fueron después resuspendidas en 2x tampón de muestra y sometidas a ebullición. Los sobrenadantes fueron aplicados directamente a geles de gradiente Tris-Glicerina al 4-12%. (Novex).

Tal y como se muestra en la Fig. 13 A, tanto el VEGF de origen natural como la variante de VEGF selectiva para KDR fueron capaces de estimular la fosforilación PLC-gamma en una extensión similar. La variante de VEGF 25 selectiva para Flt-1 no incrementaba la fosforilación PLC-gamma sobre los de niveles de fondo, discutiendo acerca del papel de Flt-1 en la activación PLC-gamma en células HUVEC.

Se ha demostrado que la PI 3'-kinasa transmite señales de supervivencia a través de la activación de Akt en 30 diversos tipos de células [Marte *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, 22: 355-358 (1997) El VEGF actúa también como factor de supervivencia para células endoteliales y esta señal requiere que la PI-3'kinasa y la Akt kinasa [Gerbern *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273: 30366-30343 (1998)]. Se ha demostrado que, en una diversidad de tipos de células, la actividad de PI-3'kinasa está involucrada en cambios citoesqueléticos después de estimulación del factor de crecimiento, al igual que en la migración celular [Wennstrom *et al.*, *Curr. Biol.*, 4: 385-393 (1994)]. Por consiguiente, la capacidad de las proteínas de provocar fosforilación de la subunidad reguladora p85 de la PI 3'kinasa fue valorada después de 35 inmunoprecipitación. Tan solo el VEGF de origen natural y la variante de VEGF selectiva para KDR eran capaces de provocar fosforilación de la subunidad reguladora PI 3'kinasa, tal y como se muestra en la Fig. 13 B.

#### Ejemplo 12

##### 40 Efectos sobre migración celular endotelial

Uno de los aspectos centrales de la acción de VEGF sobre células endoteliales es su capacidad para actuar como quimioatractante y de estimular la migración de las células endoteliales. La migración de células HUVEC fue analizada 45 en un ensayo de cámara Boyden modificado, de acuerdo con lo que se indica.

Inserciones de filtro Falcon de 8,0 micras (Falcon 3097) fueron revestidas con colágeno de tipo 1 (VITROGEN, COHESION). HUVEC (obtenidas en Cell Systems, < paso 8) fueron cultivadas en medio completo Cell Systems (4ZO-500) con 10% FCS. Las células fueron tritinizadas y transferidas a EBM (medio basal endotelial, Clonetics) con 0,1% BSA para el ensayo. Las células fueron colocadas en placas, a razón de 5 x 10<sup>4</sup> por cámara superior. Factores 50 de crecimiento (VEGF (1-165); variante selectiva de Flt-1; LK-VRB-2f; descritas anteriormente en el Ejemplo 10) fueron colocados en la cámara inferior (a la concentración mostrada en las Figs. 14 A y 14 B) y los inhibidores 55 en la cámara superior. El ensayo fue, de forma rutinaria, un ensayo de 18 horas a 37°C. Para los experimentos del inhibidor LY294002, se permitió la adherencia de las células por espacio de 30 minutos, con anterioridad a la adición del inhibidor. 20 minutos después de la adición del inhibidor, el VEGF fue añadido al pocillo del fondo y se dejó que el ensayo se desarrollara durante tan solo 4 horas, para evitar la ocurrencia de apoptosis asociada con el tratamiento de estas células primarias con LY294002 (adquirida en Biomol).

Las células fueron extraídas de la cara superior de la membrana mediante rascado con un estropajo de poliuretano y, posteriormente, las células restantes sobre la cara del fondo de la membrana fueron fijadas con metanol. Las 60 células fueron teñidas con tinte nuclear Yo-Pro Iodide (Molecular Probes) y se llevó a cabo la contabilización, bajo fluorescencia de baja potencia utilizando un programa de reconocimiento celular Image-Pro.

La Figura 14 A muestra el efecto de variantes de VEGF selectivas de receptor sobre células HUVEC (a las concentraciones indicadas) en una cámara de ensayo Boyden modificada (los experimentos fueron llevados a cabo en triplicado, las barras de error representan el error estándar). En diversos experimentos independientes, el VEGF de origen natural provocaba un incremento de entre 4 y 5 veces en la migración celular HUVEC. La variante de VEGF selectiva para Flt-1 resultó incapaz de incrementar la migración celular sobre los niveles de fondo.

Con vistas a determinar la contribución de PI 3'kinasa a la migración celular endotelial, diferentes concentraciones del inhibidor LY294002 fueron añadidas al ensayo después de que se hubiera permitido que las células se unieran a la membrana. Debido a los efectos dañinos de la inhibición de PI3'-kinasa sobre la supervivencia de células endoteliales, se llevó a cabo un ensayo a corto plazo (tal y como se describe anteriormente). La Fig. 14 B muestra que, a su 5 concentración más elevada, LY 294002, provocaba un 56% de inhibición de migración celular HUVEC. Así pues, la actividad de PI3'-kinasa contribuye de forma significativa a la migración celular endotelial.

Ejemplo 13

10 *Ensayo de angiogénesis en bolsa córnea*

Se llevaron a cabo ensayos tal y como se describe por parte de Polverini *et al.*, Methods Enzymol., 198: 440-450 (1991) con las siguientes modificaciones. Ratas Sprague-Dawley fueron anestesiadas utilizando una combinación de gas (isoflurano)/ketamina inyectable (80 mg/kg)/xilazina (15 mg/kg). Los ojos fueron suavemente exoftalmiados 15 y mantenidos en su sitio utilizando forceps no traumáticos. Con una hoja de # 15, se efectuó una incisión de 1,5 mm ligeramente por debajo del centro de la córnea. Utilizando una microespátula (ST80017, ASSI), la incisión fue cuidadosamente diseccionando a través del estroma y hacia en canthus exterior del ojo. Un pellet revestido con hydron (2 mm x 2 mm) conteniendo factor del crecimiento (200 ng) (VEGF (1-165); variante selectiva para Flt-1; LK-VRB-2f; (descrita anteriormente en el Ejemplo 10) o P1GF (R & D Systems) o metilcelulosa y sufalcrito de aluminio (100 20 µg) (controles) fue insertado en la base de la bolsa. Después de la cirugía, los ojos fueron revestidos con ungüento de gentamicina. Al sexto día, los animales fueron inyectados con FITC-dextrano de elevado peso molecular y eutanizados para permitir la visualización de la vasculatura. La totalidad de protuberancias de la córnea estaban compuestas de ojos enucleados y las mediciones del área neovascular se completó utilizando análisis de imagen asistida por ordenador (Image-Pro Plus).

25 Tal y como se muestra en la Fig. 15 A, la variante de VEGF selectiva para Flt-1 resultaba tan eficaz como el VEGF de origen natural, a la hora de provocar angiogénesis córnea. Si bien la variante de VEGF selectiva para Flt-1 inducía ocasionalmente angiogénesis marginal (Fig. 15 A), el análisis de las áreas superficiales angiogénicas en diversos animales mostraba que la variante de VEGF selectiva para Flt-1 resultaba incapaz de estimular angiogénesis 30 por encima de los niveles control. La P1GF proporcionó tan solo una respuesta marginal (Fig. 15 B). Por consiguiente, en la actualidad se considera que KDR, pero no Flt-1, resulta capaz de favorecer la angiogénesis *in vivo*.

La descripción escrita anteriormente es considerada como suficiente para permitir que un experto en la materia lleve a la práctica la invención. Diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas en el presente 35 documento, resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción precedente y caen dentro del campo de protección de las reivindicaciones anexas.

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Polipéptido variante de VEGF que muestra afinidad de unión selectiva para el receptor KDR, en comparación con el VEGF de origen natural, que comprende:

5 a) una diversidad de sustituciones de aminoácido al nivel de o entre los restos de aminoácido 17-25 del VEGF de origen natural, en el que uno o más de los restos de aminoácido 18, 21, 22 ó 25 están sustituidos; o

10 b) una o más sustituciones de aminoácido a nivel de o entre los restos de aminoácido 17-25 del VEGF de origen natural, en el que uno o más de los restos de aminoácido 18, 21, 22 ó 25 están sustituidos y una o más de las sustituciones de aminoácido tiene lugar a nivel de o entre los restos de aminoácido 63-66 del VEGF de origen natural.

15 2. Variante de VEGF de la reivindicación 1, que comprende al menos una de las sustituciones de aminoácido F17I, M18E, Y21L, Y21F, Q22R, Q22K, Q22E, Y25S e Y25I.

20 3. Variante de VEGF de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende las sustituciones de aminoácido M18E, Y21L, Q22R e Y25S.

25 4. Variante de VEGF de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende las sustituciones de aminoácido F17I, M18E, Y21F, Q22K e Y25S.

5. Variante de VEGF de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende las sustituciones de aminoácido F17I, M18E, Y21F, Q22E e Y25I.

25 6. Variante de VEGF de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende al menos una de las sustituciones de aminoácido D63S, G65M y L66R.

7. Variante de VEGF de la reivindicación 6, que comprende las sustituciones de aminoácido D63S, G65M y L66R.

30 8. Variante de VEGF de las reivindicaciones 6 ó 7, que comprende una de las siguientes combinaciones de sustituciones de aminoácido:

35 a) M18E, D63S, G65M y L66R;

b) Y21L, D63S, G65M y L66R;

c) Q22R, D63S, G65M y L66R;

40 d) Y25S, D63S, G65M y L66R;

e) M18E, Y21L, D63S, G65M y L66R;

f) M18E, Q22R, D63S, G65M y L66R;

45 g) M18E, Y25S, D63S, G65M y L66R;

h) Y21L, Q22R, D63S, G65M y L66R;

i) Y21L, Y25S, D63S, G65M y L66R;

50 j) Q22R, Y25S, D63S, G65M y L66R;

k) M18E, Y21L, Q22R, D63S, G65M y L66R;

55 l) M18E, Q22R, Y25S, D63S, G65M y L66R;

m) Y21L, Q22R, Y25S, D63S, G65M y L66R;

60 n) M18E, Y21L, Q22R, Y25S y D63S;

o) M18E, Y21L, Q22R, Y25S y G65M;

p) M18E, Y21L, Q22R, Y25S y L66R;

65 q) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, D63S y G65M;

r) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, D63S y L66R;

# ES 2 265 931 T3

- s) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, G65M y L66R; o
  - t) M18E, Y21L, Q22R, Y25S, D63S, G65M y L66R.
- 5 9. Polinucleótido aislado que codifica para la variante de VEGF de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 10 10. Vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 9.
11. Célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 10.
- 10 12. Composición de comprende la variante de VEGF de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un soporte.
13. Composición de la reivindicación 12, en la que el soporte es un soporte farmacéuticamente aceptable.
- 15 14. Ensayo para detectar un receptor KDR, que comprende la puesta en contacto de una célula o tejido aislado con una variante de VEGF de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y la determinación de la unión de la variante de VEGF a la célula o tejido.
- 20 15. Variante de VEGF de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para ser utilizada en un procedimiento de tratamiento.
16. Uso de la variante de VEGF de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la preparación de un medicamento para estimular la vasculogénesis o la angiogénesis en un mamífero.
- 25 17. Uso según la reivindicación 16, en el que el medicamento está destinado al tratamiento de un traumatismo del sistema vascular.
18. Uso según la reivindicación 17, en el que el medicamento está destinado para el tratamiento de:
- 30 Incisiones quirúrgicas, incluyendo las que implican al corazón; heridas, incluyendo laceraciones, incisiones y penetraciones de vasos sanguíneos; o úlceras superficiales que implican al endotelio vascular, incluyendo úlceras diabéticas, hemofílicas y varicosas.
19. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 16-18, en el que el mamífero es humano.
- 35 20. Procedimiento *in vitro* para estimular la fosforilación de un receptor KDR, la activación de una MAP kinasa, la activación de la PLC-gamma o la activación de la PI3'-kinasa, que comprende la puesta en contacto de una célula que expresa al receptor KDR con una variante de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 40 21. Procedimiento *in vitro* para estimular la proliferación celular endotelial, que comprende la puesta en contacto de una célula que expresa al receptor KDR con una variante de KDR de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 45 22. Procedimiento *in vitro* para favorecer la migración de células endoteliales, que comprende la puesta en contacto de células endoteliales que expresan al receptor KDR con una variante de VEGF de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
23. Artículo de fabricación, que comprende un recipiente que contiene la composición de las reivindicaciones 12 ó 13 y una marca sobre el recipiente que proporciona instrucciones para el uso de la composición *in vitro* o *in vivo*.

50

55

60

65

ES 2 265 931 T3

1 CAGTGTGCTG GCGGCCGGC GCGAGCCGGC CGGGCCCGG TCGGGCCTCC  
 -26

GAAACC ATG AAC TTT CTG CTG TCT TGG GTG CAT TGG AGC  
 M N F L L S W V H W S  
 -26 -20

90 CTC GCC TTG CTG CTC TAC CTC CAC CAT GCC AAG TGG TCC CAG  
 -15 L A L L Y L H H A K W S Q  
 -10

GCT GCA CCC ATG GCA GAA GGA GGA GGG CAG AAT CAT CAC  
 A A P M A E G G G Q N H H  
 -1 +1 → +5 +10

171 GAA GTG GTG AAG TTC ATG GAT GTC TAT CAG CGC AGC TAC TGC  
 13 E V V K F M D V Y Q R S Y C  
 +15 +20 +25

CAT CCA ATC GAG ACC CTG GTG GAC ATC TTC CAG GAG TAC  
 H P I E T L V D I F Q E Y  
 +30 +35

252 CCT GAT GAG ATC GAG TAC ATC TTC AAG CCA TCC TGT GTG CCC  
 40 P D E I E Y I F K P S C V P  
 +40 +45 +50

CTG ATG CGA TGC GGG GGC TGC TGC AAT GAC GAG GGC CTG  
 L M R C G G C C N D E G L  
 +55 +60 +65

333 GAG TGT GTG CCC ACT GAG GAG TCC AAC ATC ACC ATG CAG ATT  
 67 E C V P T E E S N I T M Q I  
 +70 +75 +80

ATG CGG ATC AAA CCT CAC CAA GGC CAG CRC ATA GGA GAG  
 M R I K P H Q G Q H I G E  
 +85 +90 +95

414 ATG AGC TTC CTA CAG CAC AAC AAA TGT GAA TGC AGA CCA AAG  
 94 M S F L Q H N K C E C R P K  
 +95 +100 +105

AAA GAT AGA CCA AGA CAA GAA AAT CCC TGT GGG CCT TGC  
 K D R A R Q E N P C G P C  
 +110 +115 +120

495 TCA GAG CGG AGA AAG CAT TTG TTT GTA CAA GAT CCG CAG ACG  
 121 S E R R K H L F V Q D P Q T  
 +125 +130

TGT AAA TGT TCC TGC AAA AAC ACA GAC TCG CGT TGC AAG  
 C K C S C K N T D S R C K  
 +135 +140 +145

**FIG. 1A**

576 GCG AGG CAG CTT GAG TTA AAC GAA CGT ACT TGC AGA TGT GAC  
148 A R Q L E L N E R T C R C D  
+150 +155 +160

AAG CCG AGG CGG TGA GCCGGCA GGAGGAAGGA GCCTCCCTCA  
K P R R O  
+165

661 GGGTTTCGGG AACCAAGATCT CTCACCAGGA AAGACTGATA CAGAACGATC  
GATACAGAAA CCACGCTGCC GCCACCACAC CATCACCACAC CACAGAACAG

761 TCCTTAATCC AGAAACCTGA AATGAAGGAA GAGGAGACTC TGGCCAGAGC  
ACTTTGGGTC CQGAGGGCGA GACTCCGGCG GAAGCATTCC CGGGCGGGTC

861 ACCCAGCACG GTCCCTCTTG GAATTGGATT CGCCATTITA TTTTCTTGC  
TGCTAAATCA COGAGCCCAG AAGATTAGAG AGTTTATTT CTGGGATTCC

961 TGTAGACACA CGCGGGCCGC CAGCACACTG

FIG. 1B

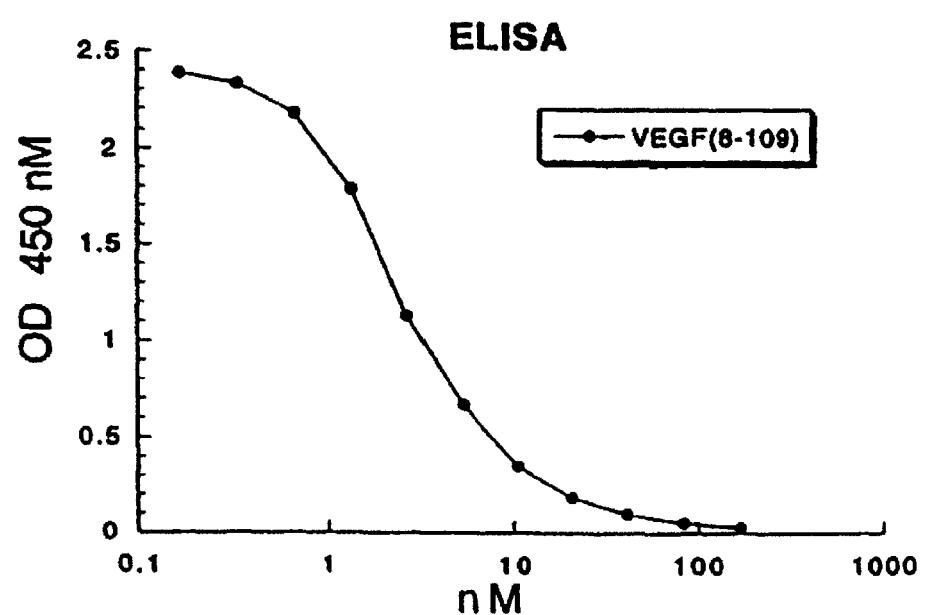


Fig. 2

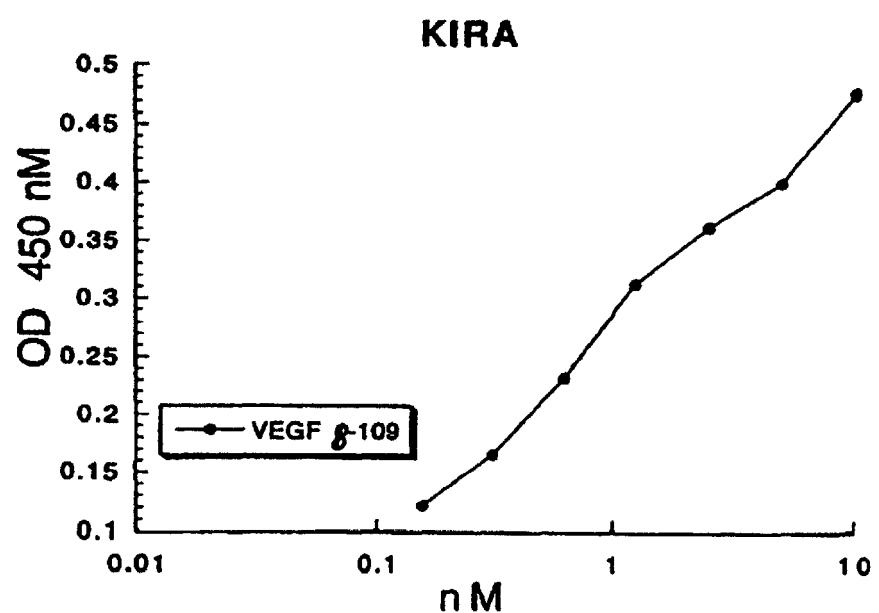


Fig. 3

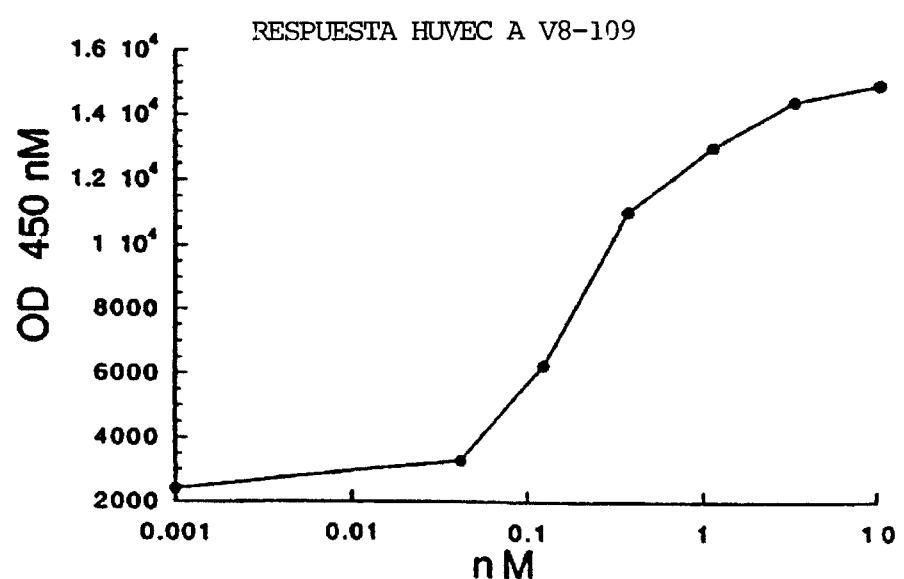


Fig. 4

ES 2 265 931 T3

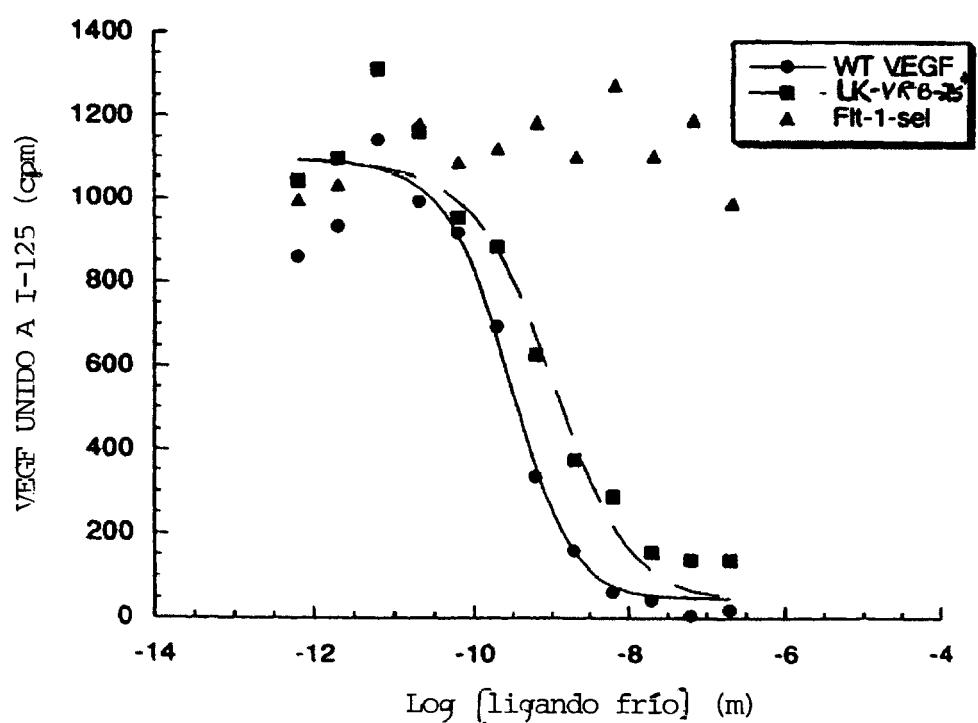


Fig. 5

ES 2 265 931 T3

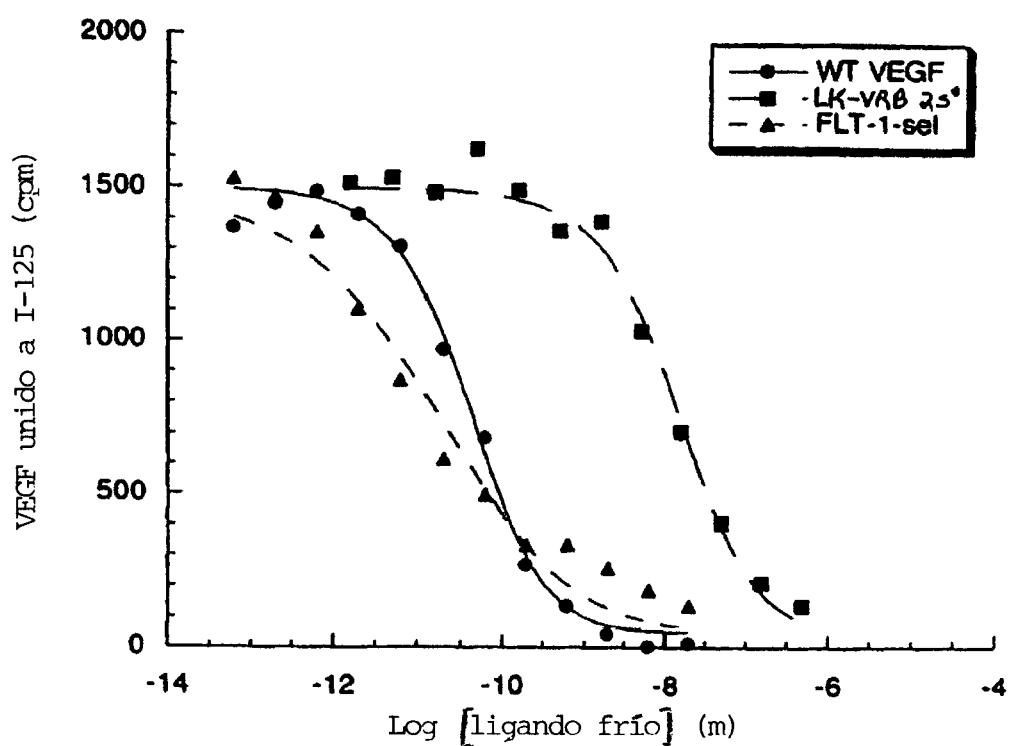


Fig. 6

## Grado de reducción en unión de mutantes de alamina VEGF

Residuo	KDR(1-3)		Flt(1-3)
	VEGF(1-109)	1 (10 nM)	
hélice 20s:			
Lys 16	1		1
Phe 17*	45		34
Met 18**	5		9
Tyr 21**	19		29
Gln 22**	6		15
Tyr 25**	6		7
bucle 40s:			
Ile 43*	21		3
Ile 46*	96		4
Phe 47**	5		3
Lys 48**	1		1
bucle 60s:			
Asp 63**	1		8
Glu 64*	10		5
Gly 65**	1		1
Leu 66**	1		10
bucle 80s:			
Gln 79*	55		3
Met 81**	9		5
Ile 83*	89		7
His 86**	2		1
Gln 89	1		1
Ile 91	1		1
bucle 100s:			
Lys 101	1		1
Glu 103	1		1
Arg 105	1		1
Pro 106	1		1

Fig. 7

ES 2 265 931 T3

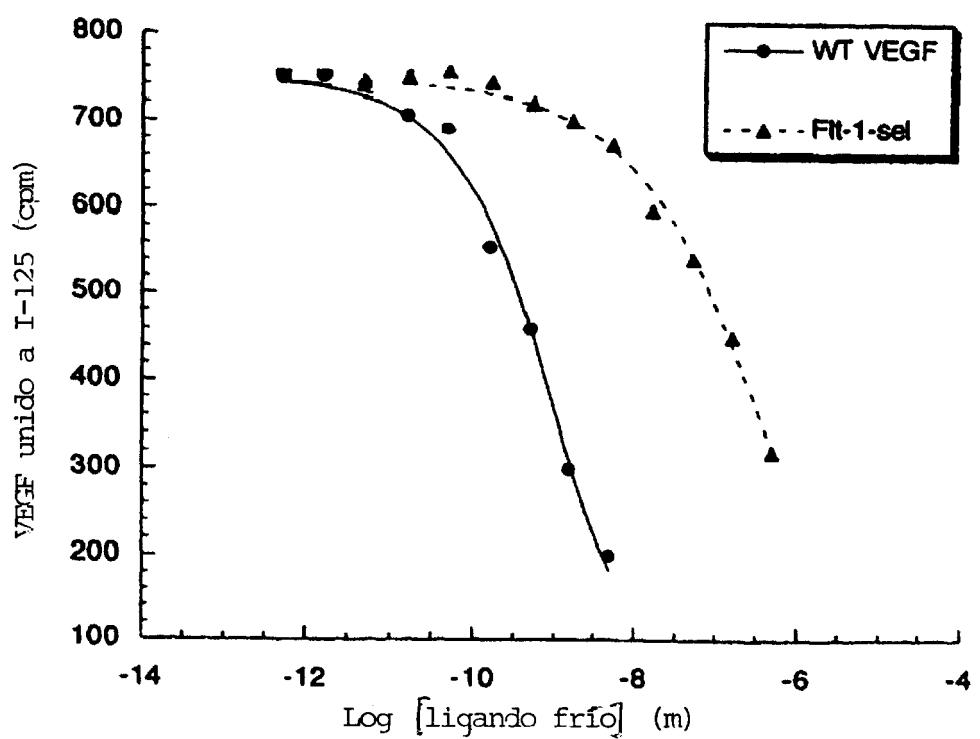


Fig. 8A

ES 2 265 931 T3

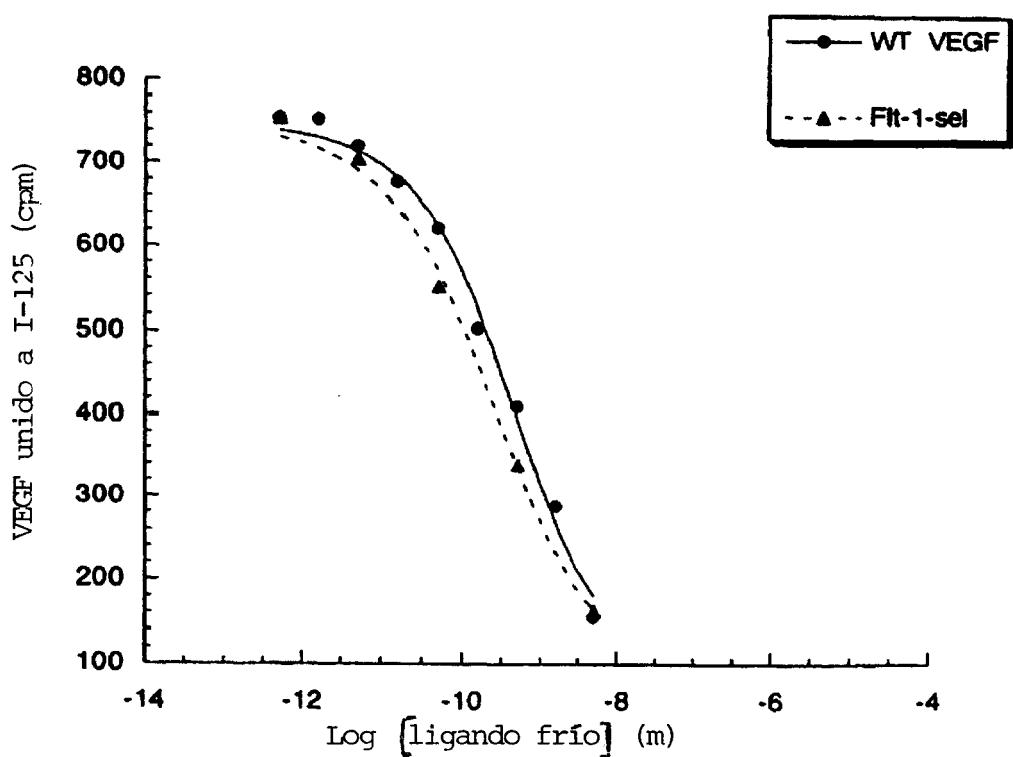


Fig. 8B

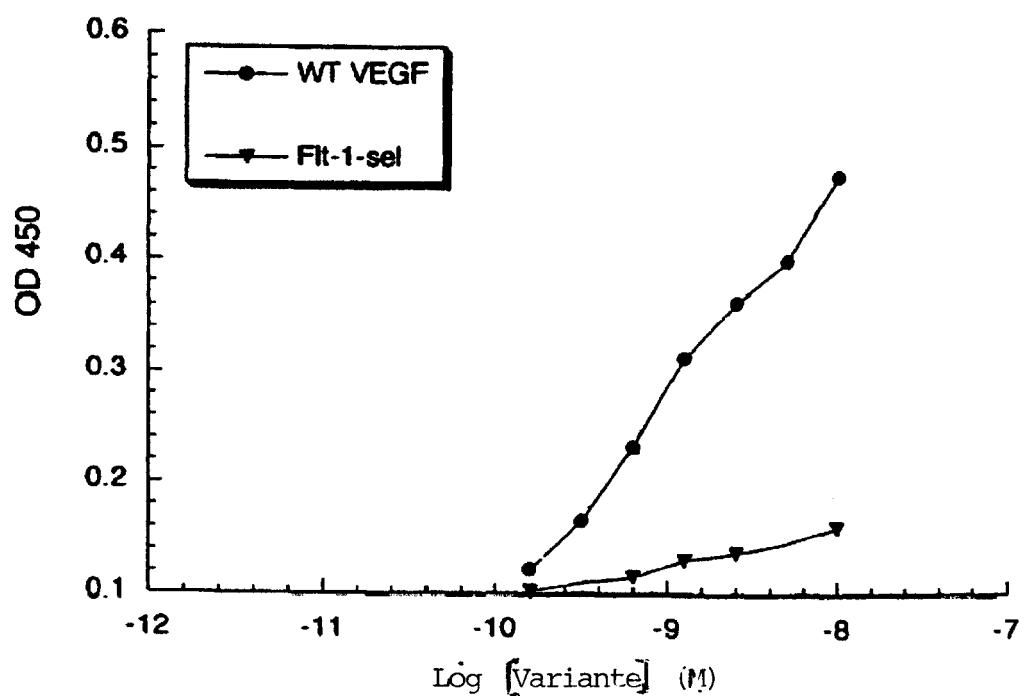


Fig. 9

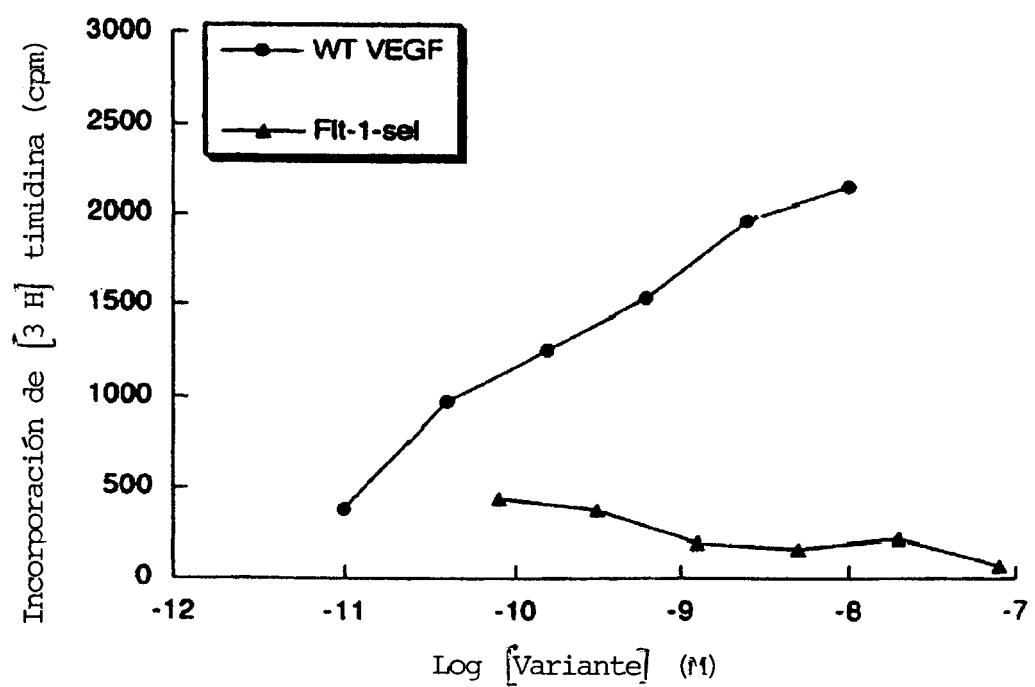


Fig. 10

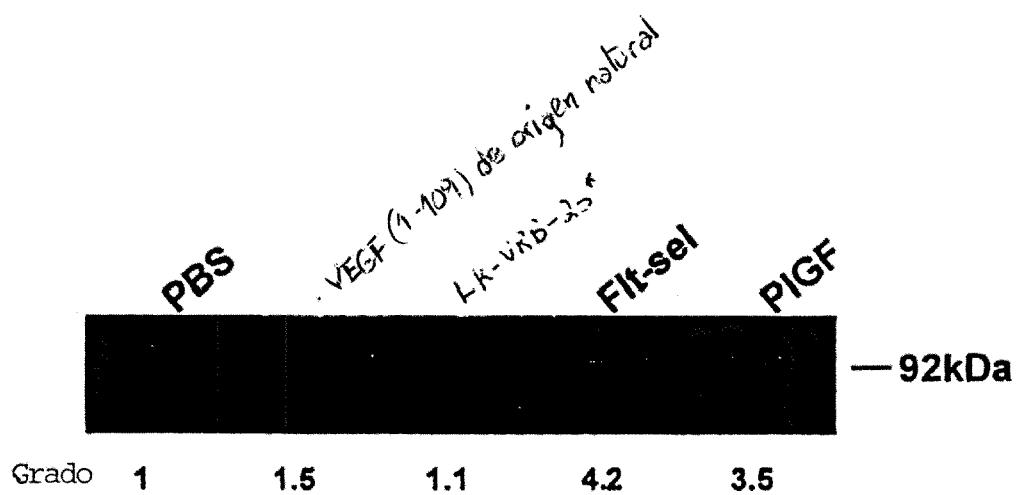


Fig. 11

Figure 12A

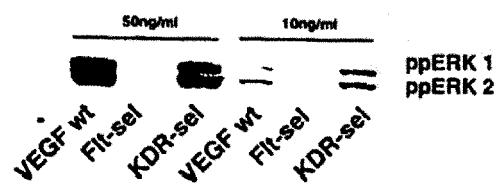


Fig. 12B

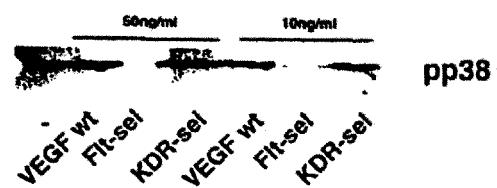


Fig.  
13A

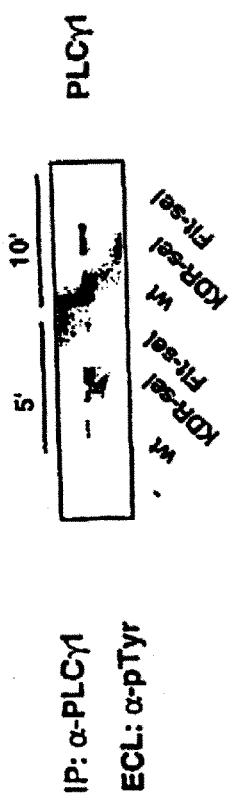


Fig.  
13B

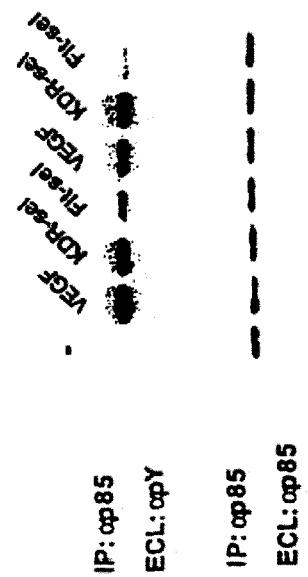


Fig.  
14A

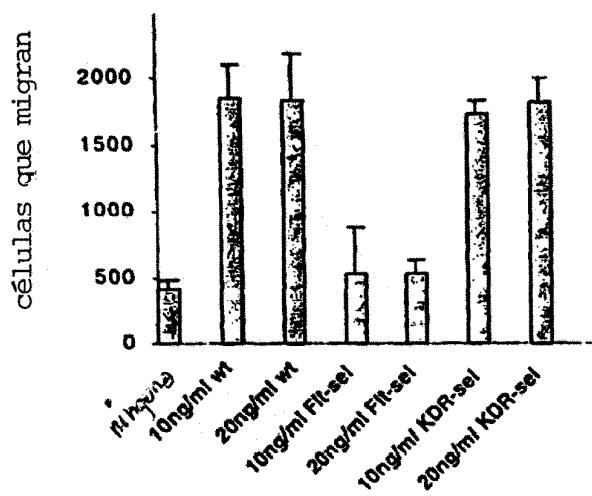


Fig.  
14B

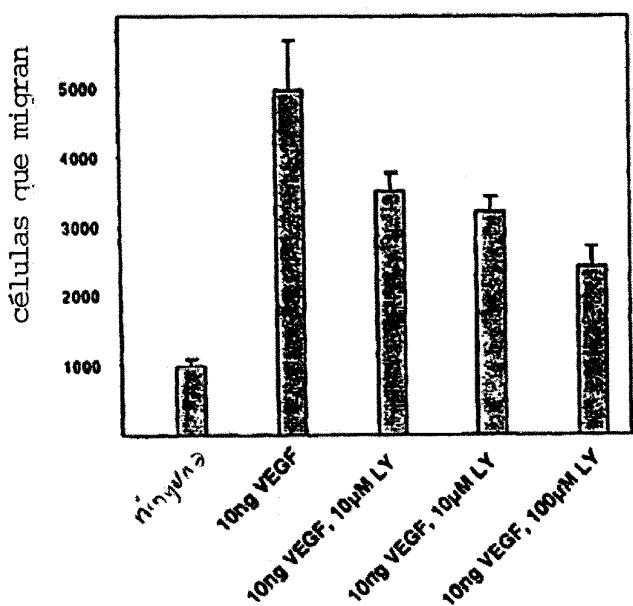
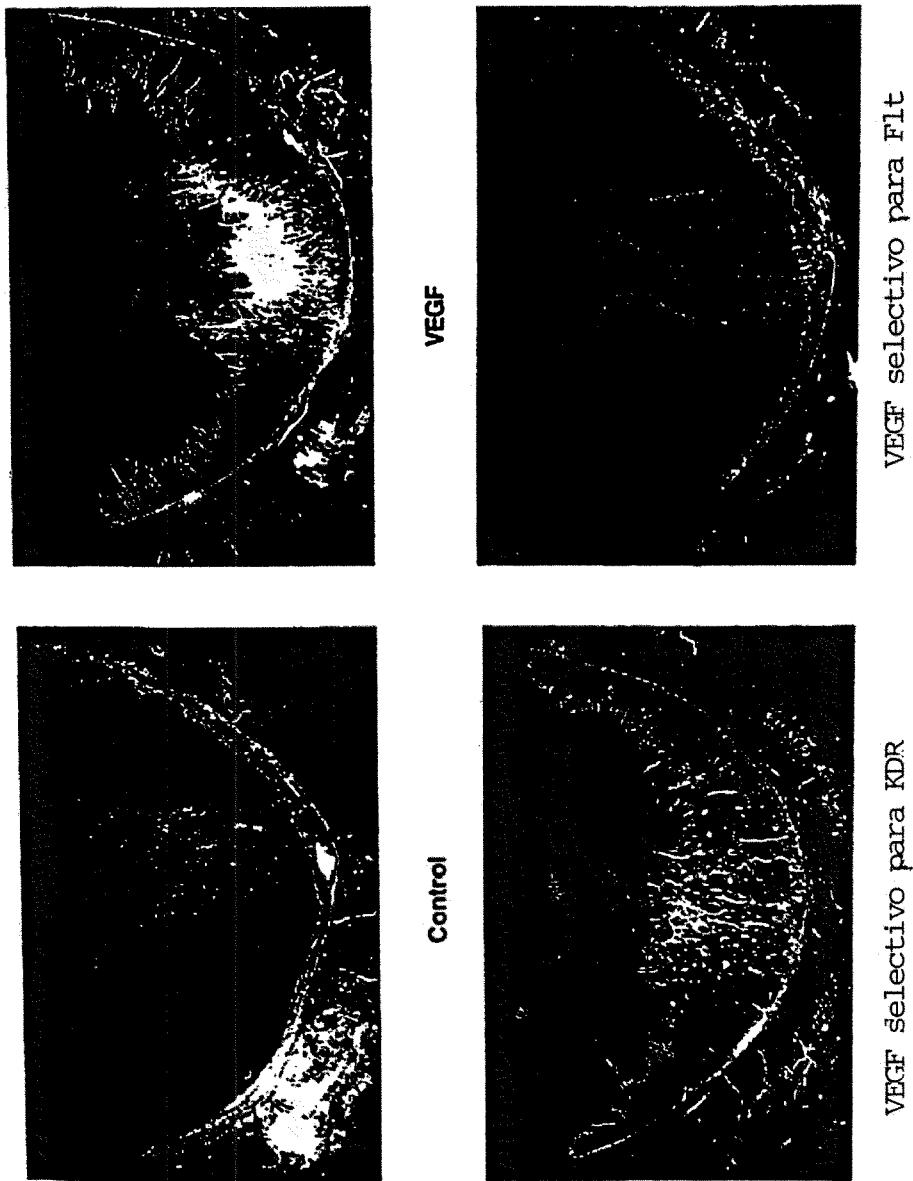


Fig. 15A



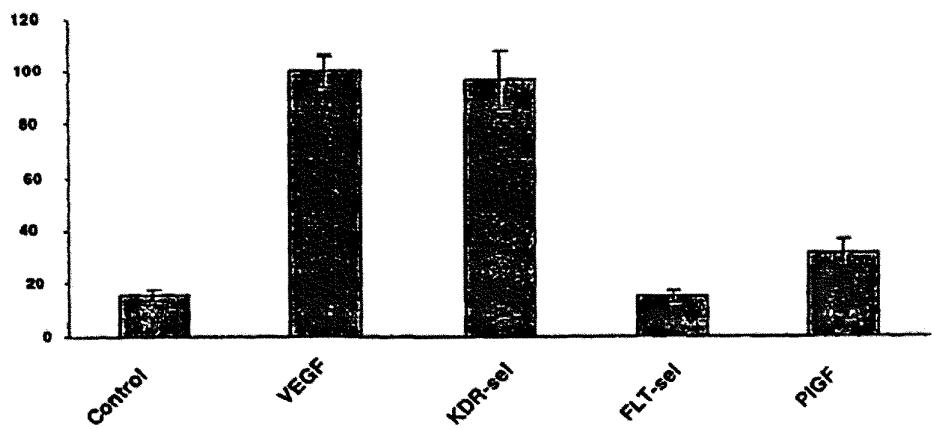


Fig. 15B

# ES 2 265 931 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc.

5 <120> VARIANTES DE FACTOR DE CRECIMIENTO CELULAR ENDOTELIAL VASCULAR Y SUS USOS

<130> P1734R1PCT

10 <140> PCT/US00/09483

<141> 2000-04-10

<150> US 60/129.788

15 <151> 1999-04-16

<150> US 60/184.235

<151> 2000-02-23

20 <160> 4

<210> 1

25 <211> 57

<212> DNA

<213> Artificial

30 <220>

<221> Misc\_feature

<222> 1-57

35 <223> La secuencia es sintetizada

<220>

<221> no seguro

40 <222> 19, 20, 21, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 40, 41, 42

<223> N, en las posiciones indicadas, puede ser G, A, T ó C; S en las posiciones indicadas puede ser C ó G.

<400> 1

45           cacgaagtgg       tgaagttcnn       sgatgtcnns       nnscgcagcn

              nstgccatcc 50 aatcgag 57

50 <210> 2

<211> 42

<212> DNA

55 <213> Artificial

<220>

<221> Misc\_feature

60 <222> 1-42

<223> La secuencia es sintetizada

<220>

<221> no seguro

<222> 16, 17, 18, 22, 23, 24, 25, 26, 27

<223> N, en las posiciones indicadas, puede ser G, A, T ó C; S, en las posiciones indicadas, puede ser C ó G.

# ES 2 265 931 T3

<400> 2

gggggctgct gcaatnnsga gnnsnnsgag tggcgtccca ct

42

5 <210> 3  
 <211> 990  
 <212> DNA  
 10 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

15 **cagtgtgctg** gggcccccgc **gcgagccggc** cggccccgg tcgggcctcc 50  
 gaaaccatga actttctgct **gtctgggtg** cattggagcc **tcgccttgt** 100  
 gctctacctc caccatgcca **agtggtccc** ggctgcaccc atggcagaag 150  
 20 gaggagggca gaatcatcac **gaatggtga** agttcatgga **tgtctatcg** 200  
 cgcagctact **gccatccat** cgagaccctg gtggacatct **tccaggagta** 250  
 ccctgatgag atcgagtaca **tcttcaagcc** atcctgtgtg **cccctgatgc** 300  
 25 **gatgcggggg** ctgtgtcaat **gacgaggccc** tggagtgtgt **gcccactgag** 350  
 gagtccaaaca **tcaccatgca** gattatgcgg atcaaaccctc **accaaggcca** 400  
 30 gcacatagga **gagatgagct** tcttacagca **caacaaatgt** **aatgcagac** 450  
 caaagaaaaga **tagagcaaga** caagaaaatc **cctgtggcc** **ttgtctagag** 500  
 cggagaaaagc **atttgtttgt** **acaagatccg** **cagacgtgt** **aatgttcctg** 550  
 35 caaaaacaca **gactcgcgtt** **gcaaggcgag** **gcagcttgag** **ttaaacgaac** 600  
 gtacttgcag **atgtgacaag** **ccgaggcggt** **gagccggca** **ggaggaagga** 650  
 40 gcctccctca **gggtttcggg** **aaccagatct** **ctcaccagga** **aagactgata** 700  
 cagaacgatc **gatacagaaa** **ccacgctgcc** **gccaccacac** **catcaccatc** 750  
 gacagaacag **tccttaatcc** **agaaaacctga** **aatgaaggaa** **gaggagactc** 800  
 45 tgccgcagagc **actttgggtc** **cgaggggcga** **gactccggcg** **gaagcattcc** 850  
 cgggcggggtg **acccagcag** **gtcccccttg** **gaattggatt** **cgccatttt** 900  
 tttttcttgc **tgctaaatca** **ccgagccccg** **aagatttagag** **agttttat** 950  
 ctgggattec **tgtagacaca** **ccgcggccgc** **cagcacactg** 990

<210> 4

<211> 191

50 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

# ES 2 265 931 T3

Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu  
80 85 90

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln  
95 100 105

Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met  
110 115 120

Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp  
125 130 135

Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gln Pro Cys Ser Glu Arg Arg  
140 145 150

Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys  
155 160 165

Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn  
170 175 180

Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg  
185 190

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65