



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 767**

51 Int. Cl.:

C12N 15/19 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03720320 .5**

96 Fecha de presentación : **06.03.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1485483**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.2004**

54 Título: **VEGF activo resistente a la proteólisis.**

30 Prioridad: **08.03.2002 EP 02005186**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **Bayer Innovation GmbH**
Merowingerplatz 1
40225 Düsseldorf, DE

72 Inventor/es: **Eming, Sabine;**
Krieg, Thomas;
Sollberg, Stephan y
Lauer, Gereon

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

VEGF activo resistente a la proteólisis.

5 Es objeto de la invención el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en el que la alanina en la posición del aminoácido 111 está intercambiada por prolina. La arginina en la posición del aminoácido 110 puede estar sustituida a este respecto por otro aminoácido. La invención se refiere también a derivados del VEGF según la invención, a ácidos nucleicos, sistemas de expresión, medicamentos y al uso de mutantes de VEGF de la invención para el tratamiento de heridas crónicas.

10 Es un estado importante de la curación de heridas cutáneas la formación de un tejido de granulación. Está estrechamente ligada a esto último la migración de vasos recién formados (neoangiogénesis). Numerosos estudios experimentales y clínicos muestran que las heridas crónicas se caracterizan por una angiogénesis alterada y por tanto por una formación reducida de tejido de granulación.

15 Se conoce un gran número de mediadores que estimulan la angiogénesis durante la curación de heridas. Entre éstos, se cuentan por un lado aquellos factores que además de la estimulación de células endoteliales activan también células mesenquimáticas y/o epidérmicas (bFGF, aFGF, TGF- α , PDGF) y por otro lado los denominados factores específicos de células endoteliales, cuyos receptores están esencialmente limitados a células endoteliales (VEGF, angiopoyetina).
20 Múltiples reacciones fisiológicas y patológicas con participación de los vasos sanguíneos se correlacionan con una expresión elevada de VEGF y sus receptores, de modo que al VEGF le corresponde un papel básico en la angiogénesis de la piel. Se ofrecieron las primeras indicaciones del posible significado del VEGF en las alteraciones en la curación de heridas en el fundamento de experimentos para la expresión de VEGF en ratones diabéticos (ratones db/db) (Frank *et al.*, 1995). En este modelo, podía mostrarse que la alteración de la curación de heridas se correlaciona con una
25 expresión reducida de VEGF. El papel del VEGF en la curación de heridas pudo apoyarse recientemente mediante otro modelo animal transgénico (Fukumura *et al.*, 1998) y la detección de VEGF en la serosidad de heridas humanas agudas (Nissen *et al.*, 1998).

Además, se ha mostrado que los ARNm de VEGF y sus receptores se expresan aumentados en tejidos de heridas
30 crónicas (Lauer *et al.*, 2000). Las investigaciones mediante PAGE-SDS muestran sin embargo una descomposición de la proteína VEGF en entorno de herida crónica, en contraposición con heridas agudas. Esta descomposición conduce a un daño significativo de la actividad biológica y por tanto, a pesar de la expresión elevada de receptores de VEGF, puede motivar una estimulación deficiente de la neoangiogénesis en entorno de herida crónica. Como se ilustra anteriormente, ha podido mostrarse que la plasmina participa en la escisión de VEGF en entorno de herida crónica (Lauer
35 *et al.*, 2000).

La escisión de VEGF₁₆₅ por plasmina conduce a la separación de los dominios carboxiterminales, que se codifican a partir del exón 7. Aunque las propiedades de unión de VEGF a los receptores de VEGF Flt-1 y Flk-1/KDR están determinadas por los exones 3 y 4, el exón 7 posee una importancia crítica en la interacción de VEGF con neuropilina-1 (Keyt *et al.* 1996). La neuropilina-1 es una glucoproteína de 130 kDa de la superficie celular. Hace poco se ha descrito su papel en la potenciación del efecto mitogénico de VEGF sobre células endoteliales (Soker *et al.* 1998). A este respecto, la interacción de neuropilina-1 con Flk-1/KDR parece significativa, ya que la sola unión de VEGF a neuropilina-1 no ejerce ningún efecto de señal.

45 La plasmina pertenece a la clase de las serinproteasas. Estas enzimas son capaces de escindir enlaces peptídicos. La escisión se realiza por la denominada triada catalítica. A este respecto, desempeñan un papel esencial en el centro catalítico particularmente la denominada serina, pero también los aminoácidos histidina y aspartato, ya que el proceso de escisión peptídico se realiza por ellos (Stryer 1987, pág. 231 y siguientes). Aunque el mecanismo de escisión de enlace es idéntico en todas las serinproteasas, se diferencia claramente en su especificidad de sustrato. Así, la plasmina escinde igualmente que la tripsina enlaces peptídicos después de los aminoácidos básicos lisina y arginina.
50 La especificidad de sustrato de la plasmina, que se determina mediante la estructura del centro catalítico, conduce sin embargo a que la plasmina no pueda escindir cada uno de estos enlaces. La catálisis de la escisión de enlace peptídico puede realizarse sólo si los correspondientes segmentos proteicos son capaces de interactuar con el centro catalítico de la enzima (Powers *et al.* 1993; Stryer 1987). Hasta ahora, no es conocida ninguna secuencia de consenso inequívoca
55 para un sitio de corte de plasmina.

El documento WO97/08313 da a conocer 30 mutaciones/variantes de VEGF, su preparación y uso (por ejemplo, para el tratamiento de traumatismos vasculares). Las variantes de VEGF dadas a conocer son, entre otras, VEGF D109A, R110A, R112A y KKDR (107-110)AAAA. Las variantes de VEGF se han expresado recombinantemente
60 (codificadas mediante ADNc con secuencia señal) en células 293 y se han ensayado. El documento WO97/08313 se refiere a la configuración modular de VEGF y a fragmentos de VEGF que se obtienen mediante la escisión con plasmina.

La presente invención se basa en el objetivo de proporcionar mejores agentes para la curación de heridas crónicas.
65 Sorprendentemente, se consigue este objetivo mediante la provisión según la invención de una variante de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que se caracteriza porque la alanina en la posición del aminoácido 111 del factor de crecimiento endotelial vascular nativo está intercambiada por prolina.

Particularmente, en la variante de VEGF según la invención, la arginina en la posición del aminoácido 110 del factor de crecimiento endotelial vascular nativo y la alanina en la posición del aminoácido 111 del factor de crecimiento endotelial vascular nativo están sustituidas por prolina.

5 Los mutantes de VEGF según la invención se presentan preferiblemente como una de las variantes de ajuste VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ o VEGF₂₀₆.

Los mutantes de VEGF según la invención no sólo presentan una estabilidad claramente elevada frente a plasmina, sino también una actividad comparable con VEGF de tipo natural. Sorprendentemente, las variantes de VEGF según la invención presentan además una estabilidad elevada en exudados de herida crónica.

Las mutaciones se llevaron a cabo en uno de los sitios críticos para la actividad biológica de la molécula de VEGF. Por tanto, había de temerse que una modificación de la estructura de proteína en esta zona influyera negativamente en la actividad de VEGF₁₆₅. En el aminoácido prolina, que se introduce según la invención en la posición 111, se trata de un α -iminoácido cíclico. Por la forma cíclica del resto de pirrolidina, posee una conformación rígida que afecta también a la estructura de la proteína respectiva. Así, la prolina funciona, por ejemplo, como un fuerte interruptor de hélice α . Por tanto, es especialmente sorprendente que precisamente mediante la sustitución de la alanina en posición 111 por prolina se produzca un mutante de VEGF que sea estable frente a la proteasa plasmina, estable en exudados de heridas crónicas y además presente una actividad correspondiente a la proteína de tipo natural.

Son objeto de la invención particularmente variantes de VEGF de ambas secuencias SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2.

Son también objeto de la invención variantes de los mutantes de VEGF anteriormente indicados en las que las secuencias de aminoácidos están modificadas o derivatizadas, o contienen mutaciones, inserciones o deleciones. Particularmente, esto se refiere a variantes de VEGF en las que otros aminoácidos individuales están intercambiados y a aquellos que están glucosilados, amidados, acetilados, sulfatados o fosforilados. Preferiblemente, dichas variantes de VEGF tienen una actividad comparable a o mayor que VEGF de tipo natural.

Las variantes de VEGF según la invención pueden presentar también una secuencia señal.

Son también objeto de la invención ácidos nucleicos que codifican los mutantes de VEGF anteriormente citados, y vectores para la expresión de VEGF que contienen dichos ácidos nucleicos.

Es también objeto de la invención un medicamento que contiene los mutantes de VEGF anteriormente citados, así como el uso de mutantes de VEGF para la preparación de un medicamento para el tratamiento de heridas crónicas, causadas por alteraciones vasculares como insuficiencia crónica venosa (ICV), linfedema primario/secundario, oclusión arterial, enfermedades metabólicas como diabetes mellitus, gota o escaras por decúbito, enfermedades inflamatorias crónicas como pioderma gangrenoso, vasculitis, dermatosis perforantes como necrobiosis lipóidica diabética y granuloma anular, enfermedades fundamentales hematológicas como alteraciones de la coagulación, anemia de células falciformes y policitemia vera, tumores como tumores cutáneos primarios y metástasis exulceradas, así como inhibición de plasmina, para la inducción de neoangiogénesis y/o para la inhibición de la degradación de matriz.

La aplicación tópica de factores de crecimiento representa un nuevo concepto terapéutico en la curación de heridas. Ha podido observarse una mejora de la curación de heridas crónicas en un gran número de estudios clínicos con la aplicación de EGF, bFGF, PDWHF y PDGF (Scharffetter-Kochanek *et al.* 2000). Sin embargo, debe señalarse críticamente que los resultados de estos estudios están por debajo de las expectativas que se han creado respecto a la buena eficacia de estos mediadores en modelos animales (Lawrence *et al.* 1994). Es una explicación esencial de esta eficacia limitada de los factores de crecimiento seguramente la actividad proteolítica elevada en el entorno de herida crónica, que conduce a la degradación de factores administrados por vía tópica. Por tanto, se observa claramente que la gestión local de heridas mediante la administración de factores de crecimiento representa una nueva estrategia terapéutica prometedora. Sin embargo, es necesario desarrollar estrategias que controlen la actividad proteolítica en el entorno de herida crónica. La preparación de citocinas patrón con estabilidad elevada en entorno de herida crónica representa seguramente a este respecto un nuevo principio terapéutico. Los mutantes de VEGF según la invención son adecuados en gran medida debido a su alta estabilidad en serosidad para el tratamiento tópico de heridas crónicas.

Ejemplos de realización

Mutagénesis

Mediante mutagénesis dirigida a sitio, se prepararon cuatro mutantes efectuando los intercambios de aminoácido selectivos en Arg₁₁₀ y Ala₁₁₁. Se clonó el ADNc que codifica VEGF₁₆₅ humano en el vector de expresión de replicación pcDNA 3.1 (compañía Invitrogen, De Schelp, Holanda) usando los sitios de corte de BamHI y EcoRI en el sitio de clonación. Para la mutagénesis *in vitro* dirigida a sitio, se usó el sistema Gene Editor™ de la compañía Promega (Mannheim). Éste se basa en la adición de oligonucleótidos que portan la correspondiente mutación a la secuencia de partida. La secuencia de partida del VEGF₁₆₅ en la zona de las mutaciones es:

ES 2 312 767 T3

106 107 108 109 110 111 112 113

GA CCA AAG AAA GAT AGA GCA AGA CAA G

5

Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln

10 Para la introducción de mutaciones, se usaron los siguientes oligonucleótidos “de apareamiento erróneo” como cebadores:

Mutación 1: Mut_{Ala}:

15 GA CCA AAG AAA GAT *GCC* GCA AGA CAA G .

Pro Lys Lys Asp *Ala* Ala Arg Gln

20 Mutación 2: Mut_{Gln}:

GA CCA AAG AAA GAT *CAG* GCA AGA CAA G

25 Pro Lys Lys Asp *Gln* Ala Arg Gln

Mutación 3: Mut_{Pro}:

30 GA CCA AAG AAA GAT *AGG* CCA AGA CAA G

Pro Lys Lys Asp Arg *Pro* Arg Gln

35 Mutación 4: Mut_{Lys-Pro}:

40 GA CCA AAG AAA GAT *AAG* CCA AGA CAA G

Pro Lys Lys Asp *Lys* *Pro* Arg Gln

45 Los cebadores de mutagénesis usados se indican respectivamente con las secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de ellas. Se marcan en cursiva las zonas con bases o aminoácidos modificados frente a la secuencia de tipo natural.

50 En la mutación 1, se intercambió la arginina₁₁₀ por una alanina apolar. En la mutación 2, se introdujo en la misma posición una glutamina polar no cargada. En el mutante 3, no se intercambió la arginina₁₁₀ básica, sino la alanina en posición 111 por una prolina. En el mutante 4, se intercambiaron dos aminoácidos. Aquí, se insertaron, en lugar de arginina₁₁₀ y alanina₁₁₀, lisina y prolina. Después de la práctica de la mutagénesis, se realizó la verificación de las mutaciones mediante análisis de secuencia. Los mutantes de VEGF obtenidos tenían en los aminoácidos 109-112 las siguientes secuencias:

55 VEGF₁₆₅-tipo natural: -Asp₁₀₉ Arg₁₁₀ Ala₁₁₁ Arg₁₁₂-

Mut_{Gln}: -Asp₁₀₉ Gln₁₁₀ Ala₁₁₁ Arg₁₁₂-

60 Mut_{Ala}: -Asp₁₀₉ Ala₁₁₀ Ala₁₁₁ Arg₁₁₂-

Mut_{Pro}: -Asp₁₀₉ Arg₁₁₀ Pro₁₁₁ Arg₁₁₂-

Mut_{Lys-Pro}: -Asp₁₀₉ Lys₁₁₀ Pro₁₁₁ Arg₁₁₂-

65 Los mutantes Mut_{Pro} y Mut_{Lys-Pro} son mutantes según la invención, mientras que Mut_{Gln} y Mut_{Ala} se preparan y ensayan con fines comparativos. Los vectores de expresión de VEGF₁₆₅ obtenidos se usaron en los análisis adicionales.

Preparación de proteína VEGF₁₆₅ recombinante

Se realizó la expresión de proteína VEGF₁₆₅ en células COS-1 eucarióticas. El vector de expresión pcDNA 3.1 usado contiene un origen de replicación de SV-40. Éste sirve para la amplificación del vector en células que expresan un antígeno T grande del virus SV-40. Las células COS-1 usadas poseen un correspondiente elemento integrado en el genoma, de modo que se llega aquí a una replicación episómica del vector. De este modo, se consigue una expresión de la proteína diana VEGF durante varios días sin integración estable (transformación) del vector en el genoma celular. Las células COS-1 se transfectaron con los plásmidos de expresión obtenidos en la mutagénesis. Para ello, se usó el reactivo de transfección Superfect (QIAGEN, Hilden) según las instrucciones del fabricante.

Como un gran número de factores de crecimiento, el VEGF₁₆₅ posee también un sitio de unión a heparina que se localiza en el extremo C básico. La unión a heparina se ha empleado para la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad (Mohanraj *et al.* 1995). El aislamiento de VEGF y variantes de VEGF se realizó mediante las siguientes etapas:

Se cultivaron células COS-1 transformadas con los plásmidos de expresión en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) exento de suero, que contiene 10% de suero fetal bovino (FCS), L-glutamina 2 mM, penicilina (10 U/ml) y estreptomicina (10 µg/ml) y suplemento ITS (Sigma, Deisenhofen). Se combinó después de 48 h con medio acondicionado (200 ml) y se incubó durante 4 horas con 5 ml de heparina-Sepharose (Pharmacia, Freiburg) a 4°C. Se empaquetó en una columna la heparina-Sepharose. Se cargó ésta a un caudal de 25 ml/h con medio de cultivo. Se llevaron a cabo las siguientes etapas:

A: Cromatografía de afinidad con heparina-Sepharose

1. Lavado: NaCl 0,1 M; Tris 20 mM/pH 7,2
2. Lavado: NaCl 0,3 M; Tris 20 mM/pH 7,2
3. Elución: NaCl 0,9 M; Tris 20 mM/pH 7,2

B: Análisis de las fracciones obtenidas mediante análisis de transferencia Western

C: Desalado de las fracciones que contienen VEGF mediante filtración en gel con tampón de elución: Tris 10 mM/pH 7,2

D: Liofilización de la solución y determinación de la concentración mediante ELISA

Se analizó el VEGF obtenido mediante PAGE-SDS. La proteína VEGF obtenida a partir de células COS-1 se diferencia en su comportamiento de elución en PAGE-SDS de la VEGF₁₆₅ usada obtenida comercialmente (compañía R&D Systems). Además de la señal detectable a 42 kDa (figura 1, carril 6), se identifica otra banda con un peso molecular algunos kDa mayor. La razón de esta doble banda de la proteína VEGF expresada en células COS-1 es una glucosilación modificada del factor de crecimiento. En células COS-1, se llega con la expresión de VEGF a la formación de dos proteínas glucosiladas diferentemente. Una forma (42 kDa) es idéntica en su glucosilación a la VEGF₁₆₅ recombinante usada hasta ahora, que se ha producido en células de insecto con un sistema de expresión de baculovirus (R&D Systems, figura 1, carril 1). Presenta en el aminoácido asparagina en posición 74 una N-glucosilación (Gospodarowicz *et al.* 1989; Keck *et al.* 1989). La segunda banda se genera a mayor peso molecular (45 kDa) debido a una glucosilación adicional de la proteína. La diferencia de glucosilación es conocida para la expresión en células COS y no tiene efecto sobre la actividad biológica del factor de crecimiento (R&D Systems).

*Caracterización de las propiedades bioquímicas y biológicas de proteínas VEGF₁₆₅ purificadas*I. Análisis de la estabilidad de la proteína VEGF₁₆₅ y sus mutaciones

a) Incubación en plasmina

Se analizó en primer lugar en las cuatro proteínas de VEGF mutadas purificadas su estabilidad frente a la proteasa plasmina. Se analizó si las mutaciones efectuadas conducían a un comportamiento de degradación modificado en comparación con VEGF de tipo natural.

La Figura 1 muestra los resultados de una incubación de VEGF de tipo natural y de mutantes de VEGF con plasmina. La incubación de VEGF de tipo natural sintetizado en células COS-1 (A, carriles 6-10) mostró ya después de 15 minutos una degradación del factor de crecimiento. A este respecto, es difícil la determinación exacta del tamaño de los fragmentos generados mediante PAGE-SDS, ya que se superponen las señales de ambas bandas de proteínas glucosiladas diferentemente. El patrón de degradación es sin embargo similar al de VEGF₁₆₅ obtenible comercialmente (Figura 1A, carriles 1-5). Así, puede detectarse después de 45 minutos un fragmento con un peso molecular de 38 kDa. Este corresponde al fragmento dimérico 110 de la variante de VEGF menos glucosilada. Estos resultados muestran

claramente que también la proteína VEGF que se ha expresado en células COS-1 se escinde con plasmina en las condiciones seleccionadas.

En la Figura 1B (carriles 1-17), se observan los resultados de la incubación de proteínas mutadas. En primer lugar, se representa la incubación de la mutación de arginina a alanina (carriles 1-5). En el momento cero de la incubación, se detectan, como en el tipo natural, dos bandas de las variantes de proteína VEGF glucosiladas diferentemente. Sin embargo, éstas no están aquí tan inequívocamente diferenciadas entre sí como en VEGF₁₆₅ de tipo natural debido a la mayor intensidad de señal. En contraposición con VEGF de tipo natural, la proteína mutada no muestra hasta 240 minutos después de la incubación ninguna modificación del comportamiento de elución.

Esta observación plantea la suposición de que la mutación arginina₁₁₀ a alanina₁₁₀ ha conducido a la inactivación del sitio de corte de plasmina. Como se representa en la Figura 1B, los otros tres mutantes Mut_{Pro}, Mut_{Gln} y Mut_{Lys-Pro} presentan también después de incubación con plasmina durante 240 minutos una estabilidad comparable de las bandas de señal a 45 y 42 kDa. No se degrada un control en el que se incubó VEGF₁₆₅ de tipo natural durante 4 horas a 37°C con tampón de plasmina (carriles 18 y 19). En total, estos experimentos apuntan a que los mutantes de VEGF producidos y purificados son estables frente a la proteasa plasmina.

b) Incubación en exudado de herida aguda y crónica

En la siguiente etapa, se analizó la degradación de los mutantes de VEGF en exudado de herida de pacientes con heridas agudas y crónicas. En la incubación de VEGF₁₆₅ de tipo natural y todos los mutantes de VEGF en exudado de herida aguda, no era detectable ninguna degradación después de 240 minutos.

La Figura 2 muestra el efecto de exudado de herida crónica sobre la estabilidad de las proteínas VEGF. La incubación de VEGF de tipo natural sintetizado en células COS-1 (Figura 2A, carriles 1-4) durante 240 minutos muestra una degradación del factor de crecimiento con un fragmento de aprox. 38 kDa. Esto corresponde al fragmento dimerico 110 de la variante de VEGF menos glucosilada.

En contraposición con el tipo natural, los mutantes de VEGF₁₆₅ muestran otro comportamiento de degradación en la incubación en exudado de herida crónica. Por un lado, se observa en las mutaciones Mut_{Gln} (Figura 2B, carriles 13-16 y Mut_{Ala} (carriles 5-8) un proceso de degradación que es comparable con el tipo natural. Se generan ya después de 20 min fragmentos con un peso molecular de aprox. 38 kDa.

Por otro lado, el análisis de los mutantes Mut_{Pro} (carriles 9-12) y Mut_{Lys-Pro} (carriles 1-4, 17-20) presenta un comportamiento de degradación divergente del tipo natural y de los mutantes Mut_{Ala} y Mut_{Gln}. Hasta 60 minutos después de la incubación, se muestra en PAGE-SDS una señal estable a 42 y 45 kDa. Esto apunta a una estabilización de las proteínas mutadas Mut_{Pro} y Mut_{Lys-Pro} en el exudado de herida crónica. Esta diferencia en el comportamiento de degradación de los mutantes con aminoácidos neutros/apolares y aquellos con prolina plantea la suposición de que, en entorno de herida crónica, participan además de plasmina otras proteasas en la degradación de VEGF.

240 minutos después de la incubación en exudado de herida crónica, se observa en todas las proteínas mutadas una degradación. A este respecto, no se llega a la formación de fragmentos de degradación claramente definidos, de hecho, se genera después de 240 minutos una señal difusa entre 38 y 45 kDa. Probablemente, se trata a este respecto de proteólisis en la zona de los primeros 20 aminoácidos (sitio de reconocimiento del anticuerpo), ya que la potencia de la señal se reduce claramente después de 240 min.

En resumen, los resultados indican que los mutantes de VEGF con prolina en la posición 111 se estabilizan en primer lugar en exudado de herida crónica, pero se degradan a largo plazo. Se observan resultados comparables en los exudados de heridas de tres pacientes distintos con insuficiencia venosa crónica. Los experimentos para los distintos exudados de heridas se repitieron al menos dos veces (Figura 2B: paciente X, carriles 1-4; paciente Y, carriles 17-20). A este respecto, el patrón de bandas generado permaneció siempre igual.

En la Figura 2C se representa una valoración densitométrica de la degradación de VEGF de tipo natural y Mut_{Lys-Pro}. El objetivo del análisis era la cuantificación de la estabilización de los mutantes de VEGF en exudado de herida crónica. Con este fin, se determinó la modificación dependiente del tiempo de la potencia de la señal en el máximo de la señal de partida (zona de 42-45 kDa) en comparación con la señal en el momento cero. Las densidades densitométricas medidas en distintos momentos se representan como porcentaje de la señal de partida. En este análisis densitométrico, se observa claramente que, en cada momento de la medida, los mutantes de VEGF muestran en comparación con VEGF de tipo natural una señal más potente en la zona de 42-45 kDa y por tanto se presenta la proteína VEGF₁₆₅ intacta. Esta observación plantea la suposición de que esta mutación conduce a una estabilidad y bioactividad mejoradas de la proteína VEGF en entorno de herida crónica. Ya 20 minutos después de la incubación, la diferencia entre tipo natural y mutantes es estadísticamente significativa. Las medidas se llevaron a cabo en tres experimentos independientes con idéntico exudado de herida.

II. Análisis de la actividad biológica de VEGF₁₆₅ de tipo natural y las variantes mutadas

Se analizó si las mutaciones tienen influencia sobre la actividad biológica de la molécula de VEGF. Se ensayó la actividad biológica mediante un ensayo de proliferación de BrdU (Roche Diagnostics, Mannheim) en células en-

doteliales de vena umbilical humanas (células HUVE) según los datos del fabricante. A este respecto, se cultivaron las células HUVE con adición de distintos mutantes de VEGF, después se incubaron durante 6 horas con solución de BrdU y se fijaron, tras de lo cual se llevó a cabo un ELISA usando un anticuerpo específico de BrdU.

5 Se emplearon concentraciones de VEGF entre 1 ng/ml y 25 ng/ml. La proteína VEGF₁₆₅ recombinante obtenible comercialmente (R&D Sytems) y VEGF₁₆₅ de tipo natural sintetizada en células COS-1 mostraron una estimulación semimáxima de la incorporación de BrdU a aprox. 3 ng/ml (Figura 3). Las proteínas VEGF mutadas se caracterizan por una estimulación de la proliferación de células endoteliales comparable a VEGF de tipo natural sintetizada en células COS-1. La estimulación máxima de todas las proteínas sintetizadas en células COS-1 era menor que por VEGF₁₆₅ de tipo natural obtenible comercialmente. La diferencia entre ambos desarrollos de la curva puede justificarse por los diferentes sistemas de expresión y procedimientos de purificación de las proteínas (Mohanraj *et al.* 1995). La actividad biológica de VEGF₁₆₅ no se influye por tanto significativamente por las mutaciones llevadas a cabo.

15 A continuación, se afrontó la pregunta de en qué medida se influye la actividad biológica de VEGF₁₆₅ de tipo natural y mutantes de VEGF después de incubación en plasmina. Con este fin, se incubaron las proteínas VEGF con plasmina y a continuación se ensayó la actividad biológica mediante un ensayo de proliferación de BrdU en células HUVE.

20 En la representación gráfica (Figura 4), se representa la incorporación de BrdU como porcentaje de la señal de partida (momento $t = 0$). La incubación de VEGF de tipo natural (sintetizada en células COS-1 y de R&D Systems), así como de los mutantes de VEGF Mut_{Ala} y Mut_{Lys-Pro} en tampón de plasmina a 37°C no mostró ningún perjuicio de la actividad biológica de las proteínas (Figuras 4 A-D). En contraposición con ello, la incubación de VEGF de tipo natural en plasmina conduce a una clara reducción de la actividad biológica (Figuras 4 A, B). Ya 20 minutos después de la incubación, se muestra una pérdida de actividad de al menos un 20%, que después cae de nuevo aproximadamente a un 50% de la actividad de partida después de 240 minutos. Los mutantes Mut_{Ala} y Mut_{Lys-Pro} no muestran ninguna pérdida significativa de actividad después de incubación con plasmina (Figuras 4 C, D). Estos resultados subrayan la "resistencia a la plasmina" representada en transferencia Western de los mutantes (Figura 1) y muestran que las proteínas mutadas son también estables después de incubación con plasmina.

30 Las mutaciones insertadas tienen por tanto como consecuencia una inhibición de la escisión de VEGF por plasmina. Mediante la mutación de Ala₁₁₁ a Pro₁₁₁, puede inducirse una estabilización de VEGF y por tanto una actividad biológica elevada en entorno de herida crónica.

35 Figura 1: Las mutaciones de VEGF₁₆₅ son resistentes frente a la escisión por plasmina. La Figura muestra la incubación de VEGF₁₆₅ y las proteínas mutadas en una solución de plasmina [0,01 U/ml] o solución tampón (B, carriles 18, 19) durante el periodo dado. El análisis del comportamiento de degradación se realizó mediante transferencia Western e inmunodetección.

40 Figura 2: La mutación de Ala₁₁₁ a Pro₁₁₁ eleva la estabilidad de VEGF en exudado de herida crónica. A) en VEGF₁₆₅ de tipo natural expresado en células COS-1. B) Las variantes de VEGF se incubaron durante los periodos dados en exudado de herida crónica y se representó el comportamiento de degradación mediante inmunodetección. A este respecto, se ensayaron los exudados de herida de dos pacientes distintos: paciente X, carriles 1-16; paciente Y, carriles 17-20. C) representación densitométrica de la degradación de VEGF de tipo natural y Mut_{Lys-Pro} en exudado de herida crónica. Se representa la potencia relativa de señal de tres análisis de transferencia Western llevados a cabo independientemente (PM $\pm$ DE).

50 Figura 3: Los mutantes de VEGF son biológicamente activos. Se incubaron VEGF₁₆₅ de tipo natural y mutantes de VEGF respectivamente a concentraciones crecientes con células HUVE. Se representan las tasas de integración determinadas mediante ELISA de BrdU del análogo de bases en el ADN de células en proliferación (PM $\pm$ DE, $n = 3$).

Figura 4: La plasmina no altera la actividad biológica de los mutantes de VEGF₁₆₅. Se confronta la incorporación relativa de BrdU a células HUVE mediante estimulación con VEGF₁₆₅ de tipo natural (A, B), Mut_{Ala} (C) y Mut_{Lys-Pro} (D) después de la incubación de la proteína dada en tampón o plasmina (valores medios $\pm$ DE; $n = 3$).

55 Referencias

- Frank S., Hübner G., Breier G., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270: 12607-12613, 1995.
- Fukumura D., Xavier R., Sugiura T., *et al.*, *Cell* 94: 715-725, 1998.
- 60 Gospodarowicz D., Abraham J., Schilling J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 7311-7315, 1989.
- Keck P., Hauser S., Krivi G., *et al.*, *Science* 246: 1309-1312, 1989.
- 65 Keyt B., Berleau L., Ngyen H., Chen H *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 7788-7795, 1996.
- Lauer G., Sollberg S., Cole M., Flamme I., Stürzebecher J., Mann K., Krieg T., Eming S., *J. Invest Dermatol.* 115: 12-18, 2000.

ES 2 312 767 T3

Lawrence W., Diegelann R., *Clin. Dermatol.* 12:157-169, 1994.

Mohanraj D., Olson T., Ramakrishnan S., et al., *Growth Factors* 12: 17-27, 1995.

5 **Nissen N., Polverini P., Koch A., et al.,** *Am. J. Path.* 152: 1445-1452, 1998.

Poers J., Otake S., Oleksyszyn J., Hori H. et al., *AAS* 42: 3-18, 1993.

10 **Scharffetter-Kochanek, Meewes C., Eming S., et al.,** *Z. Hautkrankheiten* 74: 239-249, 1999.

Soker S., Takashima S., Miao H., Neufeld G., Klagsbrun M. et al., *Cell* 92: 735-745, 1998.

Stryer T., en “Biochemie” 4ª edición, 1987; Spektrum Akademischer Verlag.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Variante de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), **caracterizada** porque la alanina está intercambiada en la posición del aminoácido 111 de VEGF nativo por prolina.

2. Variante de VEGF según la reivindicación 1, **caracterizada** porque adicionalmente está intercambiado al menos otro aminoácido en una de las posiciones 109 a 112.

3. Variante de VEGF según una de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la variante de VEGF se presenta como una de las variantes de ajuste VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ o VEGF₂₀₆.

4. Variante de VEGF₁₆₅ según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** porque presenta una de las secuencias de aminoácidos

SEC N° 1:

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val
Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu
Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr
Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys
Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn
Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His
Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg
Pro Lys Lys Asp Arg **Pro** Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys
Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys
Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg

o SEC N° ID 2:

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val
Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu
Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr
Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys
Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn

Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His
Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg
Pro Lys Lys Asp **Lys Pro** Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys
Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys
Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg

5. Variante de VEGF según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque la cadena de aminoácidos presenta una secuencia señal.

ES 2 312 767 T3

6. Ácidos nucleicos que codifican variantes de VEGF según una de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Vectores que contienen ácidos nucleicos según la reivindicación 6 para la expresión de variantes de VEGF según una de las reivindicaciones 1 a 5.

8. Medicamento que contiene variantes de VEGF según una de las reivindicaciones 1 a 5, ácidos nucleicos según la reivindicación 6 o vectores según la reivindicación 7.

9. Uso de variantes de VEGF según una de las reivindicaciones 1 a 5, de ácidos nucleicos según la reivindicación 6 o de vectores según la reivindicación 7 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de heridas crónicas, particularmente causadas por alteraciones vasculares como insuficiencia crónica venosa (ICV), linfedema primario/secundario, oclusión arterial, enfermedades metabólicas como diabetes mellitus, gota o escaras por decúbito, enfermedades inflamatorias crónicas como pioderma gangrenoso, vasculitis, dermatosis perforantes como necrobiosis lipoídica diabética y granuloma anular, enfermedades fundamentales hematológicas como alteraciones de la coagulación, anemia de células falciformes y policitemia vera, tumores como tumores cutáneos primarios y metástasis exulceradas, para la inhibición de plasmina, para la inducción de la neoangiogénesis y/o para la inhibición de la degradación de matriz.

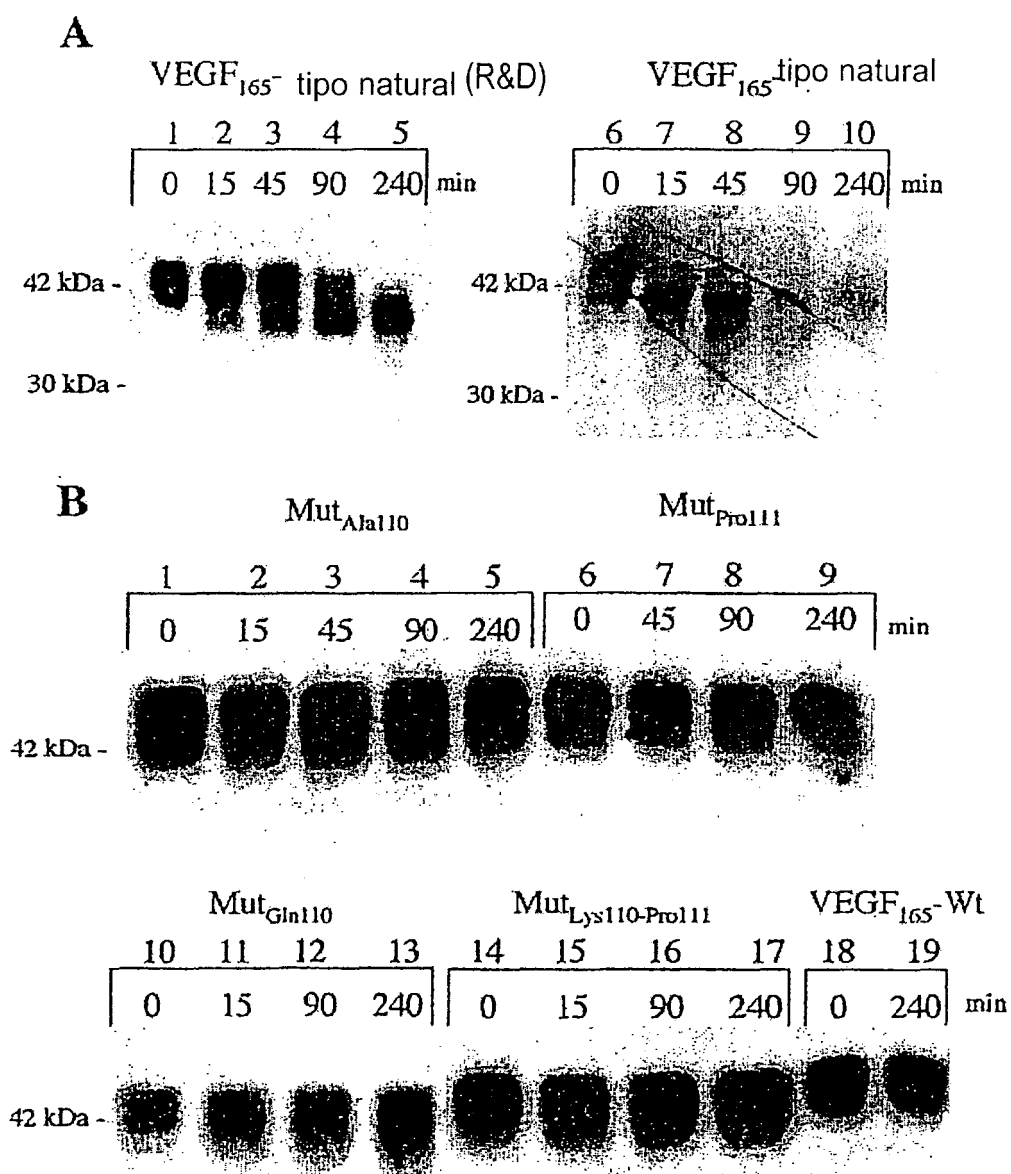
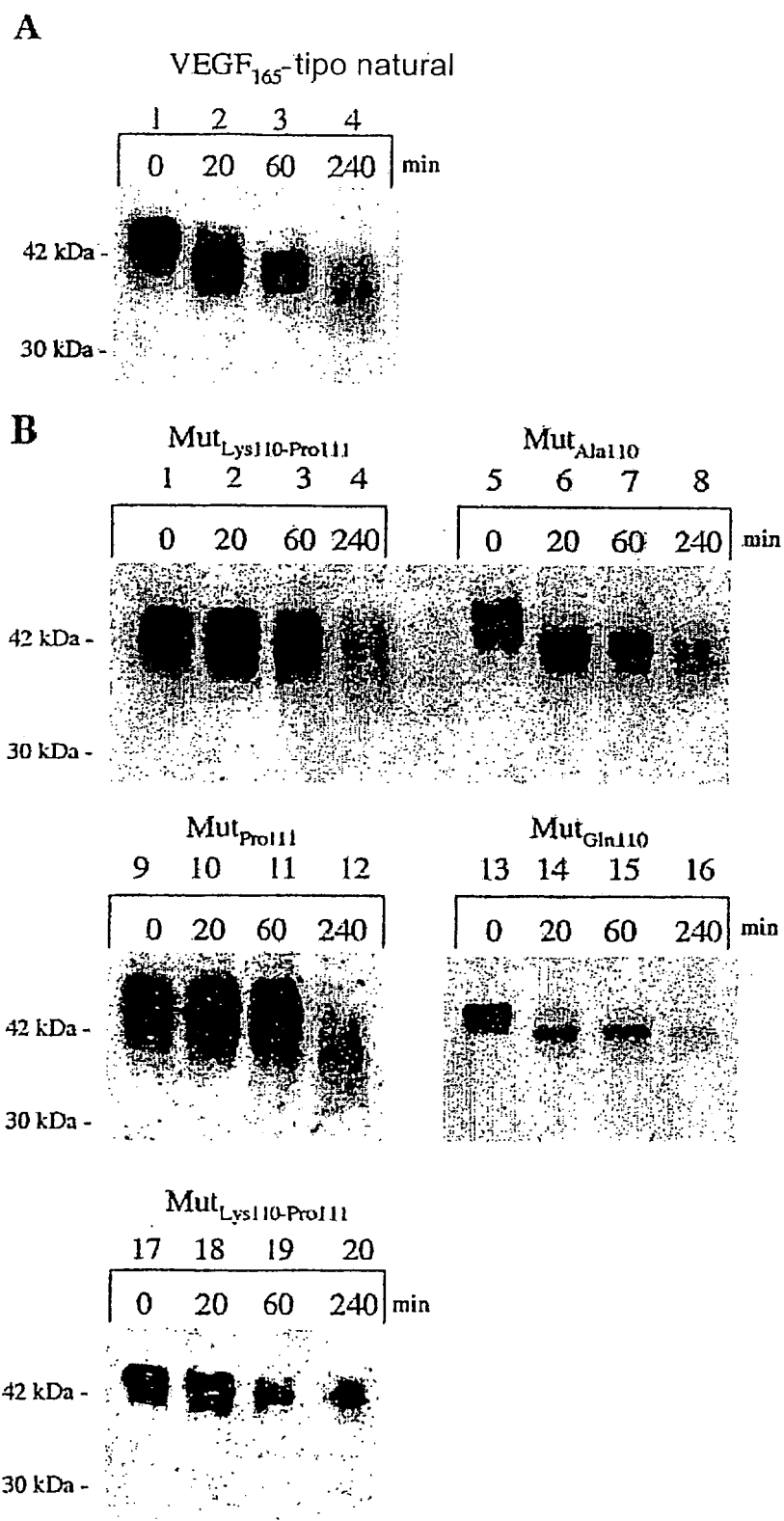


Figura 1



Figuras 2A, B

C

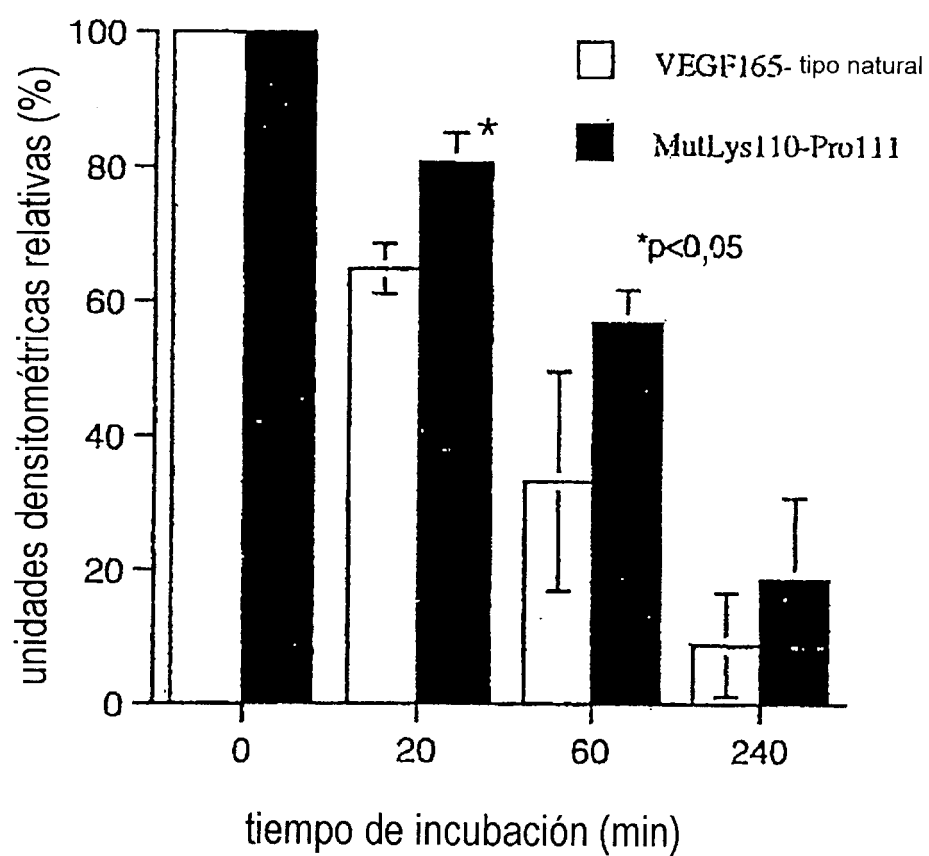


Figura 2C

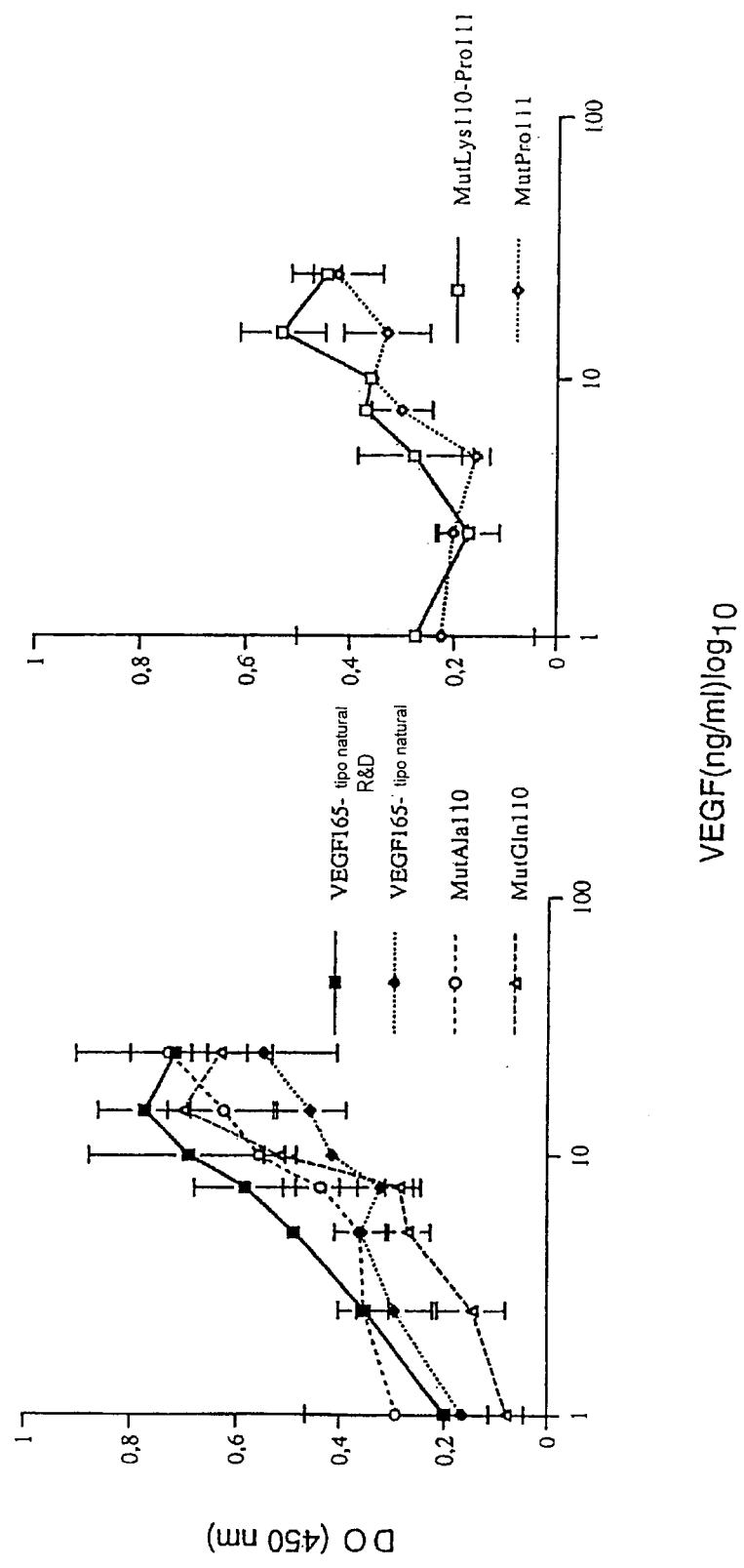


Figura 3

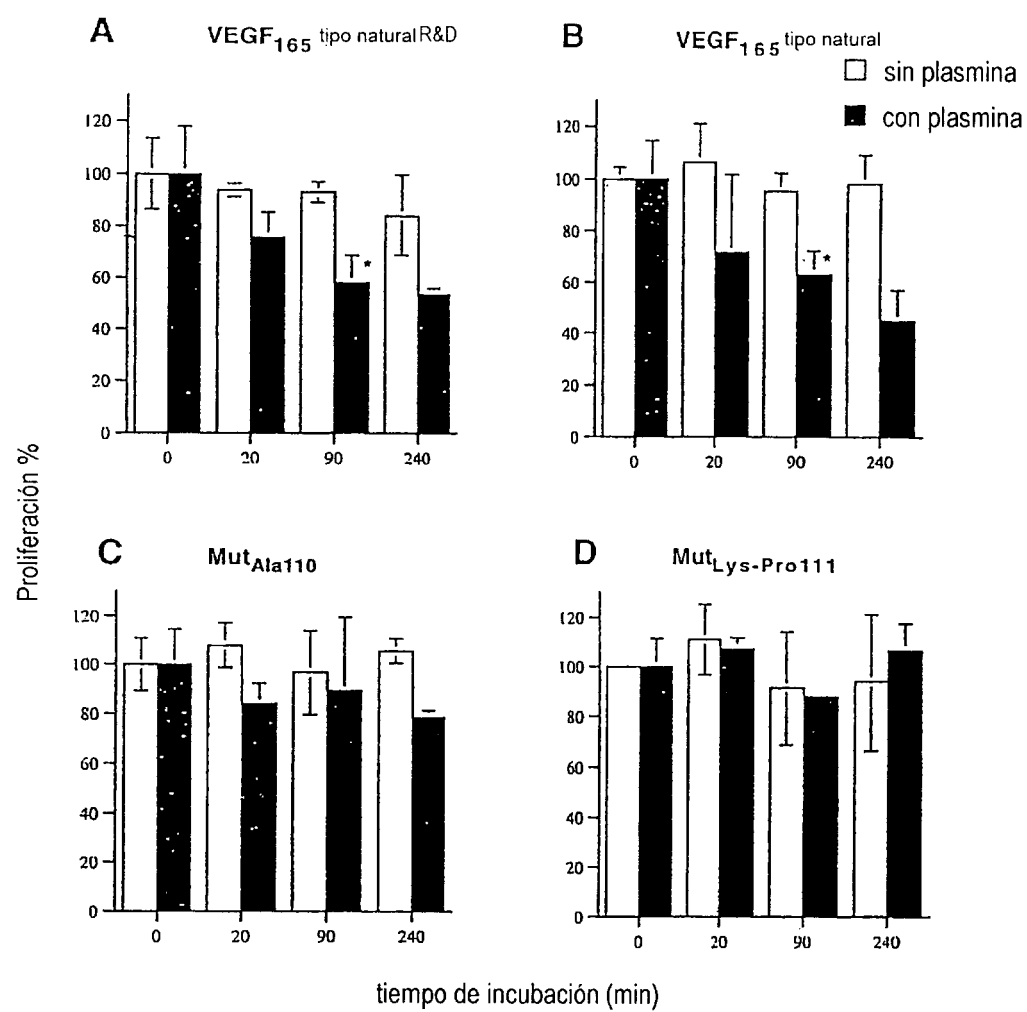


Figura 4

ES 2 312 767 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Eming, Sabine
 <120> VEGF activo resistente a la proteólisis
 5 <130> 030568wo ME/BM
 <140> PCT/EP03/02289
 <141> 03-06-2003
 10 <160> 18
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 165
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: VEGF humano mutado
 <400> 1
 25 Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
 1 5 10 15
 Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
 20 25 30
 30 Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
 35 40 45
 Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
 35 50 55 60
 Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
 65 70 75 80
 40 Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
 85 90 95
 45 Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Pro Arg
 100 105 110
 Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe
 115 120 125
 50 Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser
 130 135 140
 55 Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys
 145 150 155 160
 Asp Lys Pro Arg Arg
 165
 60 <210> 2
 <211> 165
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: VEGF humano mutado

ES 2 312 767 T3

<400> 2

```

5      Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
      1          5          10          15

      Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
          20          25          30

10     Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
          35          40          45

      Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
15          50          55          60

      Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
      65          70          75          80

20     Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
          85          90          95

      Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Lys Pro Arg
25          100          105          110

      Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe
          115          120          125

30     Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser
          130          135          140

      Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys
35          145          150          155          160

      Asp Lys Pro Arg Arg
          165

```

<210> 3

<211> 26

45 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido señal

50

<400> 3

```

55     Met Asn Phe Leu Ser Trp Ser Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
      1          5          10          15

      Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala
          20          25

```

60 <210> 4

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de partida de VEGF₁₆₅ en la que se introducen mutaciones

ES 2 312 767 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (3)..(26)
 5
 <400> 4
 ga cca aag aaa gat aga gca aga caa g 27
 Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln
 10 1 5
 <210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia de partida de VEGF₁₆₅ en la que se introducen
 20 mutaciones
 <400> 5
 Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln
 25 1 5
 <210> 6
 <211> 27
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido “de apareamiento erróneo” Mut_{pro} como cebador para la
 35 mutagénesis
 <220>
 <221> CDS
 <222> (3)..(26)
 40
 <400> 6
 ga cca aag aaa gat gcc gca aga caa g 27
 Pro Lys Lys Asp Ala Ala Arg Gln
 45 1 5
 <210> 7
 <211> 8
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido “con apareamiento erróneo” Mut_{pro} como cebador para
 55 la mutagénesis
 <400> 7
 Pro Lys Lys Asp Ala Ala Arg Gln
 60 1 5
 <210> 8
 <211> 27
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 312 767 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido “con apareamiento erróneo” Mut_{Gln} como cebador para la mutagénesis

 $\langle 220 \rangle$

5 $\langle 221 \rangle$ CDS

<222> (3) .. (26)

 $\langle 400 \rangle$ 8

ga cca aag aaa gat cag gca aga caa g
Pro Lys Lys Asp Gln Ala Arg Gln

1 5

<210> 9

15 $\langle 211 \rangle$ 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido “con apareamiento erróneo” Mut_{Gln} como cebador para la mutagénesis

<400> 9

25 <400> 9

 Pro Lys Lys Asp Gln Ala Arg Gln

 1 5

 $\langle 210 \rangle$ 10

30 $\langle 210 \rangle$ 10
 $\langle 211 \rangle$ 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido “con apareamiento erróneo” Mut_{pro} como cebador para la mutagénesis

 $\langle 220 \rangle$

40 <221> CDS

<222> (3) .. (26)

<400> 10

ga cca aag aaa gat agg cca aga caa g
Pro Lys Lys Asp Arg Pro Arg Gln

1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido “con apareamiento erróneo” Mut_{pro} como cebador para la mutagénesis

<400> 11

Pro Lys Lys Asp Arg Pro Arg Gln
1 5

<210> 12

<211> 27

<212> ADN

ES 2 312 767 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido “con apareamiento erróneo” Mut_{Lys-Pro} como cebador
 5 para la mutagénesis
 <220>
 <221> CDS
 <222> (3)..(26)
 10
 <400> 12
 ga cca aag aaa gat aag cca aga caa g 27
 Pro Lys Lys Asp Lys Pro Arg Gln
 15 1 5
 <210> 13
 <211> 8
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido “con apareamiento erróneo” Mut_{Lys-Pro} como cebador
 25 para la mutagénesis
 <400> 13
 Pro Lys Lys Asp Lys Pro Arg Gln
 30 1 5
 <210> 14
 <211> 4
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: aminoácidos 109-112 de VEGF₁₆₅ de tipo natural
 40
 <400> 14
 Asp Arg Ala Arg
 45 1
 <210> 15
 <211> 4
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: aminoácidos 109-112 de VEGF mutante Mut_{Gln}
 55
 <400> 15
 Asp Gln Ala Arg
 1
 60 <210> 16
 <211> 4
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: aminoácidos 109-112 de VEGF mutante Mut_{Ala}

ES 2 312 767 T3

<400> 16

Asp Ala Ala Arg

1

5

<210> 17

<211> 4

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: aminoácidos 109-112 de VEGF mutante Mut_{Pro}

15 <400> 17

Asp Arg Pro Arg

1

20 <210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: aminoácidos 109-112 de VEGF mutante Mut_{Lys-Pro}

<400> 18

30

Asp Lys Pro Arg

1

35

40

45

50

55

60

65