



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 354 847**

51 Int. Cl.:
C07K 14/71 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08005360 .6**

96 Fecha de presentación : **29.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1947118**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

54 Título: **Trampas de VEGF y usos terapéuticos de las mismas.**

30 Prioridad: **30.06.2003 US 609775**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.03.2011

73 Titular/es: **REGENERON PHARMACEUTICALS, Inc.**
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, New York 10591, US

72 Inventor/es: **Daly, Thomas J.;**
Fandl, James P. y
Papadopoulos, Nicholas J.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 354 847 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).

DESCRIPCION

Campo de la Invención

5 La invención se refiere a polipéptidos de fusión capaces de unirse al factor de crecimiento celular del endotelio vascular (VEGF), a los miembros de la familia VEGF, y cortar y empalmar variantes con características específicamente deseables.

Breve Descripción de la Invención

10 La invención proporciona una molécula aislada de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de fusión que se une e inhibe al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que consiste en una fusión de un dominio R1R2 a un segundo dominio R1R2 ((R1R2)₂), donde la fusión es directa o mediante un espaciador de aminoácidos y donde R1 es el dominio 2 de Ig de un componente del receptor del VEGF de Flt-1 y R2 es el dominio 3 de Ig de Flk-1.

15 La invención se dirige a una trampa del VEGF o polipéptido de fusión que comprende componentes del receptor del VEGF (R1R2)_x donde X es 2 y R1 y R2 son como se ha definido previamente. Los componentes del receptor del VEGF R1 y R2 se pueden conectar directamente el uno al otro o mediante una o más secuencias de separación. En una realización más específica, la trampa de VEGF monomérica es SEQ ID NO:24 o una variante de aminoácido funcionalmente equivalente del mismo.

La invención también proporciona un polipéptido de fusión codificado por la molécula de ácido nucleico de la invención.

20 La invención también proporciona un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención, unida de forma operativa a una secuencia de control de la expresión.

La invención también proporciona un método para producir un polipéptido de fusión que se une e inhibe al VEGF, que comprende las etapas de introducir en un sistema de expresión adecuado el vector de expresión de la invención y llevar a cabo la expresión del polipéptido de fusión .

25 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 La invención también proporciona un polipéptido de fusión que puede unirse e inhibir al VEGF de la invención, para usar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno que se mejora, alivia o se inhibe por la eliminación de la inhibición de VEGF, donde dicha enfermedad o trastorno es: enfermedad de la retina; o una enfermedad ocular seleccionada entre neovascularización coroidal, edema macular diabético, retinopatía diabética proliferativa, neovascularización corneal/ rechazo de trasplante, y degeneración macular asociada a la edad.

35 La presente invención proporciona además un polipéptido de fusión que puede unirse e inhibir al VEGF de la invención para usar como un adyuvante en la cirugía de glaucoma, para tratar o prevenir la hemangiogénesis y linfangiogénesis temprana y reclutamiento de macrófagos en la ampolla de filtrado tras la cirugía del glaucoma.

40 En todas las realizaciones de la trampa de VEGF de la invención, una secuencia señal (S) puede estar incluida al comienzo (o extremo N-terminal) del polipéptido de fusión de la invención. La secuencia señal puede ser natural de la célula, recombinante, o sintética. Cuando una secuencia señal está unida al extremo N-terminal de un primer componente receptor, entonces un péptido de fusión puede llamarse como, por ejemplo, S-(R1R2)₂.

45 Los componentes del polipéptido de fusión se pueden conectar directamente uno a otro o mediante espaciadores. En realizaciones específicas, se conectan uno o más componentes coparticipes receptores y/o de fusión del polipéptido de fusión directamente uno a otro sin espaciadores. En otras realizaciones, uno o más componentes coparticipes receptores y/o de fusión se conectan con espaciadores.

50 La invención abarca vectores que comprenden las moléculas de ácidos nucleicos de la invención, incluyendo vectores de expresión que comprenden la molécula de ácido nucleico unida de forma operativa a una secuencia de control de la expresión. La invención además abarca sistemas hospedador-vector para la producción de un polipéptido de fusión que comprende el vector de expresión, en una célula hospedadora adecuada; sistemas hospedador-vector donde la célula hospedadora adecuada es una bacteria, levadura, célula de insecto, célula de mamífero; una célula de *E. coli*, o una célula COS o CHO. Adicionalmente, están abarcadas las trampas de VEGF de la invención modificadas

por acetilación o pegilación. Los métodos para acetilar o pegilar una proteína son bien conocidos en el estado de la técnica.

5 La invención también se refiere a un método para producir una trampa de VEGF de la invención, que comprende cultivar una célula hospedadora transfectada con un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la invención, bajo condiciones adecuadas para la expresión de la proteína a partir de la célula hospedadora, y recuperar los polipéptidos de fusión así obtenidos.

10 Las trampas de VEGF de la invención son terapéuticamente útiles para tratar cualquier enfermedad o trastorno que mejora, se alivia, o se inhibe por separación, inhibición, o reducción de VEGF. Una lista no exhaustiva de condiciones específicas mejoradas por inhibición o reducción de VEGF incluye, por ejemplo, pérdida de plasma no deseado o permeabilidad vascular, crecimiento no deseado del vaso sanguíneo, por ejemplo, tal como un tumor, edema asociado a enfermedades inflamatorias tales como psoriasis o artritis, incluyendo artritis reumatoide; asma; edema generalizado asociado a quemaduras; ascitis y efusión pleural asociadas a tumores; inflamación o trauma; inflamación crónica de las vías aéreas; asma; síndrome de pérdida capilar; sepsis; enfermedad renal asociada a aumento de pérdida proteica; adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) y enfermedades del ojo tales como la degeneración macular relacionada con la edad y la retinopatía diabética. La mini-trampa de VEGF es particularmente útil en el tratamiento de enfermedades del ojo, y como un adyuvante para la cirugía ocular, incluyendo cirugía de glaucoma; y el tratamiento de tumores intraoculares, tales como por ejemplo, melanoma coroideo (o uveal), retinoblastoma, liberación vía intra-vítreo.

20 Por consiguiente, La invención puede ser usada en un método terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con VEGF, que comprende administrar una trampa de VEGF de la invención a un individuo que padece una enfermedad o trastorno relacionado con VEGF.

El individuo es preferiblemente un paciente humano.

25 Además, la invención además se puede usar en métodos de diagnóstico y pronóstico, así como en kits para detectar, cuantificar, y/o monitorizar VEGF con las mini-trampas de la invención.

30 Las composiciones farmacéuticas que comprenden una trampa de VEGF de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable pueden comprender una trampa dimérica del polipéptido de fusión, o ácidos nucleicos que codifican el polipéptido de fusión. Las mini-trampas de la invención encuentran usos específicos en condiciones en las que es deseable una trampa de VEGF de semi-vida en suero reducida (por ejemplo, evacuación más rápida) y/o una penetración en tejido aumentada debido a un tamaño más pequeño. Las aplicaciones específicas para la mini-trampa de VEGF incluyen, por ejemplo, enfermedades donde es deseable la administración local a un tejido o célula específico. Ejemplos de tal trastorno o enfermedad son las enfermedades oculares del ojo.

35 Otros objetos y ventajas serán evidentes a partir de una revisión de la subsiguiente memoria descriptiva detallada.

Descripción Detallada de la Invención

40 Antes de describir los presentes métodos, se ha de entender que esta invención no está limitada a métodos en particular, y las condiciones experimentales descritas, tales como métodos y condiciones, pueden variar. También se ha de entender que la terminología usada en la presente memoria sólo tiene el propósito de describir realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención sólo estará limitada por las reivindicaciones añadidas.

45 Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones añadidas, las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen referencia en plural a no ser que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a "un método" incluye uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito en la presente memoria y/o que serán evidentes para aquellas personas expertas en la materia al leer esta descripción y etc.

50 A no ser que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia al que pertenece esta invención. Aunque se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen ahora.

Descripción General

5 La invención abarca una trampa de VEGF capaz de unir e inhibir la actividad de VEGF, que es un monómero o multímero de uno o más polipéptidos de fusión. Las moléculas de la invención se unen e inhiben la acción biológica de VEGF y/o la reacción o respuesta fisiológica. Para una descripción de antagonistas de trampas de VEGF basadas en el receptor de VEGF Flt1D2.Flk1D3.Fc□C1 (a) (SEQ ID NOs: 7-8) y VEGFR1R2-Fc□C1(a) (SEQ ID NOs: 9-10), véase PCT WO/0075319.

Construcciones de Ácido Nucleico y Expresión

10 La presente invención proporciona la construcción de moléculas de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de fusión de la invención. Las variantes de secuencias de aminoácidos de los componentes de receptor R1 y R2 de las trampas de la invención también se pueden preparar por creación de mutaciones en las moléculas de ácidos nucleicos codificadas. Dichos variantes incluyen, por ejemplo, deleciones de, o inserciones o sustituciones de, restos de aminoácidos dentro de la secuencia aminoacídica de R1 o R2. Se puede hacer cualquier combinación de deleción, inserción, y sustitución para llegar a una construcción final, siempre que la construcción final posea la capacidad de unir e inhibir VEGF.

20 Estas moléculas de ácidos nucleicos están insertadas en un vector que es capaz de expresar polipéptidos de fusión cuando se introducen en una célula hospedadora apropiada. Células hospedadoras apropiadas incluyen, pero no se limitan a, bacterias, levaduras, células de insecto, y células de mamífero. Se puede usar cualquiera de los métodos conocidos por un experto en la materia para la inserción de fragmentos de ADN en un vector para construir vectores de expresión que codifiquen los polipéptidos de fusión de la invención bajo el control de señales de control de la transcripción/traducción.

25 La expresión de moléculas de ácidos nucleicos de la invención puede ser regulada por una segunda secuencia de ácidos nucleicos de tal forma que la molécula se expresa en un hospedador transformado con la molécula de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión puede estar controlada por cualquier elemento promotor/potenciador conocido en el estado de la técnica. Los promotores que pueden utilizarse para controlar la expresión de moléculas polipeptídicas quiméricas incluyen, pero no se limitan a, una repetición terminal larga (Squinto et al. (1991) Cell 65:1-20); la región promotora temprana de SV40, CMV, M-MuLV, el promotor de timidina quinasa, las secuencias reguladoras del gen de la metalotionina; vectores de expresión procariótica tales como el promotor de b-lactamasa, o el promotor tac (véase también Scientific American (1980) 242:74-94); elementos promotores de levadura u otro hongo tal como el promotor Gal 4, ADH, PGK, fosfatasa alcalina, y las regiones de control de la transcripción específicas de tejido derivadas de genes tales como elastasa I.

35 Los vectores de expresión capaces de ser replicados en un hospedador bacteriano o eucariótico que comprenden las moléculas de ácidos nucleicos de la invención son usados para transfectar al hospedador y así dirigir la expresión de dichos ácidos nucleicos para producir los polipéptidos de fusión de la invención, que forman trampas capaces de unirse a VEGF. Las células transfectadas pueden expresar, de forma transitoria o, preferiblemente, de forma constitutiva, las trampas de VEGF de la invención.

40 Las trampas de la invención pueden ser purificadas por cualquier técnica que permita la posterior formación de una trampa estable biológicamente activa. Por ejemplo, y no como limitación, los factores pueden recuperarse de células tanto como proteínas solubles o como cuerpos de inclusión, de los que se puede extraer cuantitativamente por hidrocioruro de guanidinio 8M o por diálisis (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. No. 5.663.304). Además, con el fin de purificar los factores, se puede usar una cromatografía convencional de intercambio iónico, una cromatografía de interacción hidrofóbica, una cromatografía en fase inversa o filtración en gel.

Componentes del Receptor de VEGF

50 Los componentes del receptor de VEGF de la mini-trampa de VEGF de la invención consisten en el dominio 2 de Ig de Flt-1 (Flt1D2) (R1) y del dominio 3 de Ig de Flk-1 (Flk1D3) (R2) (juntos, R1R2). El término "dominio Ig" de Flt-1, Flt-4, o Flk-1 pretende abarcar no sólo el dominio salvaje completo, sino también variantes de inserción, de deleción, y/o de sustitución de los mismos que sustancialmente conservan las características funcionales del dominio intacto. Será fácilmente evidente para un experto en la materia que se pueden obtener numerosas variantes de los dominios Ig de más arriba, que sustancialmente conservarán las mismas características funcionales que el dominio salvaje.

55 El término "equivalentes funcionales", cuando se usa en referencia a R1 o R2, pretende abarcar un dominio R1 o R2 con al menos una alteración, por ejemplo, una deleción, adición, y/o sustitución, que

conserva sustancialmente las mismas características funcionales que el dominio salvaje R1, R2, o R3, esto es, una unión a VEGF sustancialmente equivalente. Se apreciará que varias sustituciones aminoácidas se pueden hacer en R1 o R2 sin salirse del espíritu de la invención con respecto a la capacidad de estos componentes del receptor para unirse e inactivar VEGF. Las características funcionales de las trampas de la invención pueden determinarse por cualquier ensayo de escrutinio apropiado conocido en el estado de la técnica para medir la característica deseada. Ejemplos de dichos ensayos están descritos en la sección experimental de más abajo que permiten la determinación de las características de unión de las trampas para VEGF (Kd), así como su semi-vida de disociación del complejo trampa-ligando ($T_{1/2}$). Otros ensayos, por ejemplo, un cambio en la capacidad para unirse de forma específica a VEGF puede medirse por un ensayo de unión a VEGF de tipo competición. Las modificaciones de las propiedades de la proteína, tales como estabilidad térmica, hidrofobicidad, susceptibilidad a degradación proteolítica, o tendencia a agregarse, pueden ser medidas por métodos conocidos por aquellos expertos en la materia.

Los componentes del polipéptido de fusión pueden conectarse directamente entre sí o conectarse vía separadores. Generalmente, el término "separador" (o enlazador) significa una o más moléculas, por ejemplo, ácidos nucleicos o aminoácidos, o restos no peptídicos, tales como polietilenglicol, que pueden ser insertados entre uno o más dominios de componente. Por ejemplo, se pueden usar secuencias separadoras para proporcionar un lugar de interés deseado entre componentes para facilitar la manipulación. Un separador también se puede proporcionar para mejorar la expresión del polipéptido de fusión a partir de la célula hospedadora, para disminuir el impedimento estérico de forma que el componente puede asumir su estructura terciaria óptima y/o interaccionar de forma apropiada con su molécula diana. Para separadores y métodos para identificar separadores deseables, véase, por ejemplo, George et al. (2003) Protein Engineering 15:871-879. Una secuencia separadora puede incluir uno o más aminoácidos conectados de forma natural a un componente receptor, o puede ser una secuencia añadida usada para potenciar la expresión de los péptidos de fusión, proporcionar lugares de interés específicamente deseados, permitir que dominios de componentes formen estructuras terciarias óptimas y/o potenciar la interacción de un componente con su molécula diana. En una realización, el separador comprende una o más secuencias peptídicas entre uno o más componentes que está (están) entre 1-100 aminoácidos, preferiblemente 1-25.

En las realizaciones más específicas, R1 es los aminoácidos 27-126 de la SEQ ID NO: 8, o 1-126 de la SEQ ID NO: 8 (incluyendo la secuencia señal 1-26); o los aminoácidos 27-129 de la SEQ ID NO: 10, o 1-129 de la SEQ ID NO: 10 (incluyendo la secuencia señal 1-26). En las realizaciones más preferidas, R2 es los aminoácidos 127-228 de la SEQ ID NO: 8, o los aminoácidos 130-231 de la SEQ ID NO: 10. Cuando, por ejemplo, R2 es colocado en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión, una secuencia señal puede preceder al componente receptor. El/los componente/s de receptor unido/s al componente multimerizante puede/n además comprender un componente separador, por ejemplo, la secuencia GPG de los aminoácidos 229-231 de la SEQ ID NO: 7.

Generación de Mini-trampas de VEGF

La invención proporciona mini-trampas de VEGF que tienen uno o más dominios de componentes de receptor (R1R2)_X, donde X es 2 y R1 y R2 son como se han definido más arriba.

Usos Terapéuticos

Las mini-trampas de VEGF de la invención son terapéuticamente útiles para tratar cualquier enfermedad o trastorno que se mejora, alivia o inhibe por eliminación o inhibición de VEGF. Una lista no exhaustiva de condiciones específicas mejoradas por inhibición o reducción de VEGF incluyen, condiciones clínicas caracterizadas por proliferación excesiva de células del endotelio vascular, permeabilidad vascular, edema o inflamación tal como edema cerebral asociado a daños, golpes o tumor; edema asociado a enfermedades inflamatorias tal como psoriasis o artritis, incluyendo artritis reumatoide; asma; edema generalizado asociado a quemaduras; ascitis y efusión pleural asociadas a tumores, inflamación o trauma; inflamación crónica de las vías aéreas; síndrome de pérdida capilar; sepsis; enfermedad renal asociada a aumento de pérdida proteica; y trastornos del ojo tales como la degeneración macular relacionada con la edad y la retinopatía diabética.

Las composiciones de la invención son terapéuticamente útiles para tratar una amplia variedad de enfermedades asociadas a aumento en los niveles de VEGF. La inflamación exagerada de Th2 y la remodelación de las vías aéreas son características en la patogénesis del asma (véase, por ejemplo, Elias et al. (1999) J. Clin. Invest. 104:1001-6). Se han detectado elevados niveles de VEGF en tejidos y muestras biológicas de pacientes con asma, que se correlaciona directamente con la actividad de la enfermedad (Lee et al. (2001) J. Allergy Clin. Immunol. 107:1106-1108).e inversamente con el calibre de

la vía aérea y la respuesta de la vía aérea. Además, Se ha postulado que VEGF contribuye al edema asmático de tejido.

5 Otra enfermedad asociada al aumento de VEGF es el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC). Este cáncer a menudo exhibe focos potenciados de proliferación de células endoteliales sobre
 10 expresa de forma frecuente VEGF (Ferrara (1991) J. Mol. Med. 77:527-543). PDAC es responsable de un 20% de las muertes debidas a cáncer gastrointestinal, haciéndola la cuarta causa más común de mortalidad relacionada con el cáncer en Estados Unidos y otros países industrializados. La evidencia experimental confirma un importante papel de VEGF en cáncer pancreático, así se ha prometido un inhibidor de VEGF como terapia para atenuar el crecimiento del tumor intrapancreático y la metástasis regional y distal.

15 Una mini-trampa no glicosilada y más pequeña, expresada en *E. coli* (Ejemplo 4), una mini-trampa glicosilada expresada en células CHO (Ejemplo 5) o una trampa monomérica basada en receptor (Ejemplo 6) tienen características optimizadas para la liberación local/intra-vítrea, es decir una semi-vida en suero más corta para una evacuación más rápida y reducida exposición sistémica no deseada. Además, debido a su pequeño tamaño, la mini-trampa tiene la capacidad de penetrar a través de la membrana limitante interna (ILM) en el ojo, y difundirse a través del vítreo a la capa epitelial de la retina/pigmento de la retina (RPE) que ayudará a tratar la enfermedad de retina. Adicionalmente, la mini-trampa puede ser usada para administración local para el tratamiento de enfermedad ocular tal como neovascularización coroidal, edema macular diabético, retinopatía diabética proliferativa,
 20 neovascularización de la córnea/rechazo de transplante. Además, la mini-trampa puede ser usada en cualquier situación donde se requiera el bloqueo transitorio (a corto plazo) de VEGF, por ejemplo, para evitar la exposición crónica a bloqueo de VEGF, tal como, por ejemplo, en el tratamiento de la psoriasis.

25 Un serio problema que lleva a fallo tras la cirugía del glaucoma es la inflamación temprana y la angiogénesis, así como curación demasiado agresiva de heridas. Por consiguiente, las trampas de VEGF de la invención pueden ser empleadas de forma útil como un adyuvante en cirugía del glaucoma para prevenir hemangiogénesis y linfangiogénesis temprana y reclutamiento de macrófagos en la ampolla de filtrado tras la cirugía del glaucoma, y mejorar el resultado de la cirugía.

Terapias de Combinación

30 Una trampa de VEGF puede ser administrada en combinación con uno o más componentes o terapias adicionales, incluyendo una segunda molécula de trampa de VEGF, un agente quimioterapéutico, cirugía, dispositivos de catéter, y radiación. La terapia de combinación incluye la administración de una sola formulación farmacéutica posológica que contiene una trampa de VEGF y uno o más agentes adicionales; así como la administración de una trampa de VEGF y uno o más agente(s) adicional(es) en su propia formulación farmacéutica posológica separada. Por ejemplo, una trampa de VEGF y un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento pueden ser administrados a un paciente juntos en una sola composición posológica tal como una formulación combinada, o cada agente puede ser administrado en una formulación posológica separada. Cuando se usan formulaciones posológicas separadas, el polipéptido de fusión específico de VEGF de la invención y uno o más agentes adicionales pueden ser administrados al mismo tiempo, o separados en el tiempo, es decir,
 40 secuencialmente.

45 El término "agente citotóxico" tal como se usa en la presente memoria, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o que causa la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, I^{131} , I^{125} , γ^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de bacterias, hongos, de origen vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

50 Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida (Cytoxan®); sulfonatos de alquilo tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosfaoramida y trimetilolmelamina; mostrazas nitrogenadas tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreuro de óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustinas, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomomicina, potfiromomicina, puromomicina, quelamicina, rodorubicina,
 55

estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores del ácido fólico tales como ácido frolinico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de elliptinio; etoglucida; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazina; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazoico; triaziquona; 2,2',2''-triclortrietilamina; uretano; vindesina; decarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabidasida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos; por ejemplo paclitaxel (Taxol®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y docetaxel (Taxotere®, Aventis Anthony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etoposido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor RFS 2000 de la topoisomerasa; difluorometilomitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capacitabina; y sales. Ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los compuestos de más arriba. También incluidos en esta definición están los agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre el tumor, tales como anti-estrógenos, incluyendo por ejemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, ketoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolina, y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los de más arriba.

Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa tanto *in vitro* como *in vivo*. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de la fase G1 y la detención de la fase M. Bloqueantes clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), Taxol®, e inhibidores de la topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposida, y bleomicina. Aquellos agentes que detienen la fase G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN tales como tamoxifeno, prednisona, decarbazina, mecroretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C.

35 **Métodos de Administración**

La invención puede ser usada en métodos de tratamiento que comprenden administrar a un individuo una cantidad eficaz de una trampa de VEGF de la invención. En un aspecto preferido, la trampa está sustancialmente purificada (por ejemplo, sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o que producen efectos secundarios no deseados). El individuo es, preferiblemente, un mamífero, y más preferiblemente un ser humano.

Se conocen varios sistemas de liberación y pueden ser usados para administrar un agente de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, microparticulas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un retrovirus u otro vector, etc. Los métodos de introducción pueden ser enterales o parenterales e incluyen, pero no se limitan a, rutas intradérmicas, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, intraocular, y oral. Los compuestos pueden ser administrados por cualquier ruta conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de las capas epiteliales o mucocutáneas (por ejemplo, mucosa oral, rectal y mucosa intestinal, etc.) y pueden ser administrados junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. La administración puede ser aguda o crónica (por ejemplo diariamente, semanalmente, mensualmente, etc.) o en combinación con otros agentes. También se puede emplear la administración pulmonar, por ejemplo, por uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente tipo aerosol.

El agente activo puede ser liberado en una vesícula, en particular un liposoma, en un sistema de liberación controlada, o en una bomba. Cuando el agente activo de la invención es un ácido nucleico que codifica una proteína, el ácido nucleico puede ser administrado *in vivo* para promover la expresión de la proteína que codifica, construyéndolo como parte de un vector de expresión apropiado del ácido nucleico y administrándolo de forma que se vuelve intracelular, por ejemplo, usando un vector retroviral (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. No. 4.980.286), por inyección directa, o usando bombardeo de microparticulas, o revistiéndolo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes transfectantes, o

administrándolo unido a un péptido de tipo homeobox que se conoce entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Alternativamente, un ácido nucleico puede ser introducido de forma intracelular e incorporado dentro del ADN de la célula hospedadora para la expresión, por recombinación homóloga.

5 Puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en el área que necesita el tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no como forma de limitación, por infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, por inyección, por medio de un catéter, o por medio de un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialácticas, fibras, o sustitutos de piel comerciales.

10 Una composición útil para practicar los métodos de la invención puede ser un líquido que comprende un agente de la invención en solución, en suspensión, o ambos. El término "solución/suspensión" se refiere a una composición líquida donde una primera porción del agente activo está presente en solución y una segunda porción del agente activo está presente en forma de partícula, en suspensión en una matriz líquida. Una composición líquida también incluye un gel. La composición
15 líquida puede ser acuosa o en forma de un ungüento. Además, la composición puede tomar la forma de un artículo sólido que puede ser insertado en el ojo, tal como por ejemplo entre el ojo y el párpado o en el saco conjuntival, donde la trampa de VEGF es liberada. La liberación a partir de dicho artículo normalmente es a la córnea, tanto vía fluido lacrimal como directamente a la misma córnea, con la que el artículo sólido está generalmente en contacto directo. Los artículos sólidos apropiados para implantación
20 en el ojo están generalmente compuestos principalmente de polímeros biodegradables o no biodegradables. Una solución y/o suspensión acuosa puede estar en forma de gotas oculares. Una posología deseable del agente activo puede medirse por administración de un número conocido de gotas dentro del ojo. Por ejemplo, para un volumen de gota de 25 μ l, la administración de 1-6 gotas administrará 25-150 μ l de la composición.

25 Una suspensión o solución/suspensión acuosa útil para practicar los métodos de la invención puede contener uno o más polímeros como agentes suspensores. Polímeros útiles incluyen polímeros solubles en agua tales como polímeros de celulosa y polímeros insolubles en agua tales como polímeros que contienen carboxilo reticulado. Una solución o solución/suspensión acuosa de la presente invención es preferiblemente viscosa o muco-adhesiva, o incluso más preferiblemente, tanto viscosa como muco-
30 adhesiva.

Una composición útil para practicar los métodos de la invención es una composición acuosa gelatinosa *in situ*. Dicha composición comprende un agente gelificante en una concentración eficaz para promover la gelificación en contacto con el ojo o con el fluido lacrimal. Agentes gelificantes apropiados incluyen, pero no se limitan a, polímeros termoestables. El término "gelificante *in situ*", tal como se usa en
35 la presente memoria, no solo incluye líquidos de baja viscosidad que forman geles en contacto con el ojo o con el fluido lacrimal, sino que también incluyen líquidos más viscosos tales como semi-fluidos y geles tixotrópicos que exhiben viscosidad sustancialmente aumentada o rigidez del gel en la administración al ojo.

Métodos de Diagnóstico y Escrutinio

40 Las trampas de VEGF de la invención pueden usarse de forma diagnóstica y/o en métodos de escrutinio. Por ejemplo, la trampa puede usarse para monitorizar niveles de VEGF durante un estudio clínico para evaluar la eficacia del tratamiento. En otra realización, los métodos y composiciones de la presente invención se usan para escrutar individuos que entran en un estudio clínico para identificar individuos que tienen, por ejemplo, un nivel de VEGF muy alto o muy bajo. Las trampas se pueden usar
45 en métodos conocidos en el estado de la técnica que se relacionan con la localización y actividad de VEGF, por ejemplo, en métodos de formación de imágenes, en métodos para medir niveles del mismo en muestras fisiológicas apropiadas, en métodos de diagnóstico, etc.

Las trampas de la invención se pueden usar en ensayos de escrutinio *in vivo* e *in vitro* para cuantificar la cantidad de VEGF no unido presente, por ejemplo, en un método de escrutinio para
50 identificar agentes de ensayo capaces de disminuir la expresión de VEGF. Más generalmente, las trampas de la invención se pueden usar en cualquier ensayo o proceso en el que se desea la cuantificación y/o el aislamiento de VEGF.

Composiciones Farmacéuticas

55 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprende mini-trampas de VEGF de la invención. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más mini-trampas, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora Federal o un gobierno

estatal o listado en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para el uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Excipientes farmacéuticos aceptables incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulgentes, o agentes tamponantes de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martín.

La mini-trampa de VEGF de la invención se puede formular como formas neutras o sales. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con grupos amino libres tales como aquellos derivados de ácidos hidrocórico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. y aquellos formados con grupos carboxilo libres tales como aquellos derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

Además, las composiciones acuosas útiles para practicar los métodos de la invención tienen pH y osmolalidad oftálmicamente compatibles. Se pueden incluir, en la composición de la invención, uno o más agentes ajustadores de pH y/o agentes tamponantes aceptables oftálmicamente compatibles, que incluyen ácidos tales como ácido acético, bórico, cítrico, láctico, fosfórico e hidrocórico; bases tales como hidróxido sódico, fosfato sódico, borato sódico, citrato sódico, acetato sódico, y lactato sódico; y tampones tales como citrato/dextrosa, bicarbonato sódico y cloruro de amonio. Dichos ácidos, bases y tampones están incluidos en una cantidad necesaria para mantener el pH de la composición en un intervalo oftálmicamente aceptable. Se pueden incluir en la composición una o más sales oftálmicamente aceptables en una cantidad suficiente para llevar la osmolalidad de la composición a un intervalo oftálmicamente aceptable. Dichas sales incluyen aquellas que tienen cationes sodio, potasio o amonio y aniones cloruro, citrato, ascorbato, borato, fosfato, bicarbonato, sulfato, tiosulfato y bisulfito.

La cantidad de la trampa que será eficaz para su previsto uso terapéutico se puede determinar por técnicas clínicas clásicas basadas en la presente descripción. Además, opcionalmente se pueden emplear ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de posología óptimos. Generalmente, los intervalos de posología apropiados para la administración intravenosa son generalmente alrededor de 50-5000 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Los intervalos de posología apropiados para administración intranasal son generalmente aproximadamente 0,01 pg/Kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis eficaces pueden ser extrapoladas a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas *in vitro* o sistemas de ensayo en modelos animales.

Para la administración sistémica, se puede estimar una dosis terapéuticamente eficaz inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración circulante que incluye la IC₅₀ tal como se determinó en cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar de forma más precisa las dosis útiles en seres humanos. Las posologías iniciales también se pueden estimar a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, usando técnicas que son bien conocidas en el estado de la técnica. Un experto en la materia fácilmente puede optimizar la administración a seres humanos basándose en los datos en animales.

La cantidad y el intervalo de posología puede ajustarse individualmente para proporcionar niveles de plasma de los compuestos que son suficientes para mantener el efecto terapéutico. En casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz de los compuestos puede no estar relacionada con la concentración plasmática. Un experto en la materia será capaz de optimizar las posologías locales terapéuticamente eficaces sin excesiva experimentación.

La cantidad de compuesto administrado será, por supuesto, dependiente del individuo a tratar, del peso del individuo, la severidad del mal, de la manera de administración, y del juicio del médico que prescribe. La terapia se puede repetir intermitentemente mientras los síntomas sean detectables o incluso cuando no sean detectables. La terapia se puede proporcionar sola o en combinación con otros fármacos.

55 Transfección Celular y Terapia Génica

La presente invención se refiere al uso de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de fusión de la invención para transfectar células *in vitro*. Estos ácidos nucleicos pueden ser insertados dentro de cualquier número de vectores bien conocidos para la transfección de células diana. Los ácidos

nucleicos se transfectan dentro de las células *ex vivo*, a través de la interacción del vector y de la célula diana. Las composiciones pueden ser administradas (por ejemplo, por inyección en un músculo) a un individuo en una cantidad suficiente para provocar una respuesta terapéutica. Una cantidad adecuada para lograr esto es definida como "una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz".

- 5 En otro aspecto, la invención puede ser usada en un método para reducir los niveles de VEGF en un ser humano u otro animal, que comprende transfectar una célula con un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de la invención, donde el ácido nucleico comprende un promotor inducible unido de forma operativa al ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión o mini-trampa. Para procedimientos de terapia génica en el tratamiento o prevención de enfermedad del ser humano, véase por ejemplo, Van
10 Brunt (1998) *Biotechnology* 6:1149-1154.

Kits

- 15 La invención también se relaciona con un artículo de fabricación que comprende material de empaquetado y un agente farmacéutico contenido dentro del material de empaquetado, donde el agente farmacéutico comprende al menos una trampa de VEGF compuesta por dos o más polipéptidos de fusión de la invención, y donde el material de empaquetado comprende una etiqueta o paquete insertado que indica que el polipéptido de fusión específico de VEGF puede ser usado para tratar una enfermedad o trastorno mediado por VEGF.

Animales Transgénicos

- 20 La invención se refiere a animales transgénicos no humanos que expresan una trampa de la invención. Un animal transgénico puede ser producido introduciendo un ácido nucleico dentro del pro núcleo macho de un oocito fertilizado, por ejemplo, por microinyección, infección retroviral, y permitiendo que el oocito se desarrolle en un animal adoptivo hembra pseudopreñada. Cualquiera de las secuencia reguladoras u otras secuencias útiles en vectores de expresión pueden formar parte de la secuencia transgénica. Una(s) secuencia(s) reguladora(s) específica(s) de tejido puede(n) estar unida(s) de forma
25 operativa al transgén para dirigir la expresión del transgén a células en particular. Un animal transgénico no humano que expresa un polipéptido de fusión o mini-trampa de la invención es útil en una variedad de aplicaciones, incluyendo como un medio de producción de dicho polipéptido de fusión. Además, el transgén puede ser colocado bajo el control de un promotor inducible de forma que la expresión del polipéptido de fusión o mini-trampa puede ser controlada por, por ejemplo, la administración de un
30 molécula pequeña.

Realizaciones Específicas

- 35 En los experimentos abajo descritos, se generaron trampas de VEGF más pequeñas y se investigó su capacidad para unir VEGF. Dichas mini-trampas de VEGF son preferiblemente usadas en aplicaciones específicas. Por ejemplo, ciertas condiciones o enfermedades pueden ser tratadas preferiblemente con administración local de una trampa de VEGF para un órgano, tejido, o célula específicos, en lugar de por administración sistémica. En un experimento, se generó, por escisión, una trampa de VEGF más pequeña por escisión dirigida de una trampa de VEGF dimerizada que tiene una región de escisión (región C) generada en dominios Fc (Ejemplo 2). La trampa truncada exhibía afinidad por VEGF y semi-vida comparables a la trampa parental de tamaño completo. Los Ejemplos 3-5 describen
40 la construcción de polipéptidos de fusión que tienen un componente receptor de VEGF y un componente multimerizante que consiste en uno o más restos de cisteína. Las medidas de afinidad mostraron que los polipéptidos de fusión no glicosilados expresados en *E. coli* o los polipéptidos glicosilados expresados en células CHO tenían afinidad de unión por VEGF comparable a la trampa parental de tamaño completo. El Ejemplo 6 además ilustra una trampa de VEGF monomérica que consiste en (R1R2)₂ que es capaz de unir e inhibir VEGF. El Ejemplo 7 describe la construcción de una mini-trampa de VEGF (SEQ ID NO: 26) que exhibe alta afinidad de unión por VEGF comparable a la trampa de longitud completa (SEQ ID NO: 10).
45

- 50 Otras características de la invención serán evidentes en el curso de las siguientes descripciones de las realizaciones ejemplares que se dan para la ilustración de la invención y que no pretenden limitar la misma.

Ejemplos

- 55 El siguiente ejemplo es propuesto con el fin de proporcionar a aquellos expertos en la materia una revelación y descripción completa de cómo hacer y usar los métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que la invención considera como su invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero se podrían explicar algunos errores y desviaciones experimentales. A

no ser que se indique lo contrario, partes son partes en peso, peso molecular es peso molecular medio, temperatura es en grados Celsius, y presión es la, o está cerca de la atmosférica.

Ejemplo 1. Construcción de Flt1D2.Flk1D3.Fc□C1(a)

5 La construcción de una trampa de VEGF parental, Flt1D2.Flk1D3.Fc□C1(a) (SEQ ID NOs: 7-8), VEGFR1R2. Fc□C1(a) (SEQ ID NOs: 9-10), y Flt1D2.VEGFR3D3. Fc□C1(a) (SEQ ID NOs: 12-13) se describe en detalle en la publicación PCT WO/0075319, incorporada específicamente por referencia en su totalidad en la presente memoria. También se describen en WO/0075319 métodos para construir y expresar construcciones de ácidos nucleicos que codifican trampas de VEGF, métodos para detectar y medir la unión a VEGF de trampas de VEGF, métodos para determinar la estequiometría de unión a VEGF por análisis BIAcore, y análisis farmacocinéticos.

Ejemplo 2. Mini-trampa de VEGF dimérica escindida de Trombina

15 La construcción VEGFR1R2.Fc□C1(a) (SEQ ID NOs: 9-10), se modificó por inserción de una escisión de trombina tras el CPPC del dominio de Fc (SEQ ID NO: 1). La trampa de VEGF purificada (5 □g) se incubó con trombina (Novagen) en Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, NaCl 50 mM, CaCl₂ 2,5 mM durante 16 horas a 37° C. Los controles incluían la proteína de escisión control (CCP) y la proteína parental de la trampa de VEGF incubadas sin trombina. El análisis de SDS-PAGE (gel de Tris-Glicina al 4-20%; 5 □g de proteína por pocillo) verificó la correcta escisión (resultados no mostrados).

20 Determinación de la afinidad: La K_d de unión de cada trampa de VEGF para hVEGF₁₆₅ se determinó tal como se describe en WO/0075319, para la trampa de VEGF parental, la trampa de VEGF no escindida que contiene un lugar de escisión de trombina ("trampa de VEGF no escindida"), la mini-trampa de VEGF escindida y R1R2-myc myc his recombinante monomérico. Más específicamente, la capacidad de las trampas para bloquear la fosforilación del receptor dependiente de VEGF₁₆₅ se determinó usando células primarias de endotelio humano (HUVECs). VEGF₁₆₅ se incubó en presencia de concentraciones variables de las trampas ensayo, y la mezcla se añadió a las HUVECs para estimular la fosforilación en tirosina de VEGF. A concentraciones sub-estequiométricas de la trampa de VEGF, el VEGF no unido indujo la fosforilación del receptor. Sin embargo, a una relación molar 1:1 o superior de una trampa de VEGF al ligando, se observó el bloqueo completo de la señalización del receptor, estableciendo que una sola molécula de un dímero de la trampa es capaz de bloquear una sola molécula de VEGF₁₆₅ humana. Así, la alta afinidad de unión de la trampa de VEGF por VEGF da como resultado 25 la formación de un complejo que impide la interacción de VEGF con los receptores de la superficie celular. Se obtuvieron resultados similares para experimentos idénticos de inhibición de la fosforilación para la trampa de VEGF parental, la trampa de VEGF no escindida, y la mini-trampa de VEGF escindida. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Trampa	Relación de Disociación Cinética (1/s)	T _{1/2} (horas)
Trampa de VEGF parental	5,51 x 10 ⁻⁵ ±0,94%	3,5
Trampa de VEGF no escindida	4,93 x 10 ⁻⁵ ±0,70%	3,9
Mini-trampa de VEGF escindida	5,46 x 10 ⁻⁵ ±0,62%	3,53
Monómero R1R2-myc myc his	6,74 x 10 ⁻³ ±0,38%	0,028

35

Ejemplo 3. Construcción de Plásmidos que Codifican Mini-Trampas de VEGF

40 Se construyeron mini-trampas de VEGF a partir del precursor de la trampa de VEGF parental, VEGFR1R2.Fc□C1(a) (SEQ ID NOs: 9-10), en las que los tres aminoácidos glicina-alanina-prolina servían como un enlace entre Flk1 D3 y Fc□C1(a). Este plásmido, pTE115 se usó en la construcción de las mini-trampas de VEGF porque la secuencia enlazadora de ADN incluía una secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción Srf1 que facilitaba la construcción de la trampa de VEGF. En todos los demás aspectos, la trampa de VEGF codificada por pTE115 es idéntica a la trampa de VEGF, VEGFR1R2. Fc□C1(a) (SEQ ID NOs: 9-10) descrita en detalle en la publicación PCT WO/0075319.

Se construyeron dos mini-trampas de VEGF con dominios de multimerización que consisten tanto de un solo resto de cisteína (R1R2) (SEQ ID NO: 2) como de los aminoácidos ACGC (SEQ ID NO: 4) (R1R2_{ACGC}) (SEQ ID NO: 5) añadidos al extremo C-terminal de los componentes de receptor Flt1D2.Flk1D3. Ambas construcciones son capaces de formar moléculas homodiméricas estabilizadas por un disulfuro intermolecular (R1R2_C) o dos disulfuros intermoleculares (R1R2_{ACGC}).

El plásmido pTE517 se hizo separando el fragmento de 690 pares de bases generado por digestión del ADN de pTE115 con Srf1 y Not I e insertando el fragmento de ADN sintético formado al aparear los oligos R1R2NC (SEQ ID NO: 14) y R1R2CC (SEQ ID NO: 15). El plásmido resultante codifica R1R2_C, que consiste en dominios Flt1D2.Flk1D3 seguidos de un resto de cisteína (SEQ ID NO: 23). De forma similar, el plásmido pTE518 se hizo separando el fragmento de 690 pares de bases generado por digestión del ADN de pTE115 con Srf1 y Not I, seguido de ligación con el fragmento de ADN sintético formado al aparear los oligos R1R2NACGC (SEQ ID NO: 16) y R1R2CACGC (SEQ ID NO: 17). El plásmido resultante codifica R1R2_{ACGC}, que consiste en dominios Flt1D2.Flk1D3 seguidos de los aminoácidos ACGC (SEQ ID NO: 25).

Los Plásmidos también se construyeron para dirigir la expresión de estas mini-trampas en *E. coli*. Los cebadores R1R2N-Nco1 (SEQ ID NO: 18) y R1R2CNot1 (SEQ ID NO: 19) se usaron para amplificar un fragmento de ADN de pTE115 que codifica los aminoácidos G30 a K231, relacionados con la trampa de VEGF parental (SEQ ID NO: 10). La amplificación de esta secuencia dio como resultado la fusión de un codón de iniciación de metionina en el extremo 5' y la fusión del codón para cisteína, seguido de un codón de parada, en el extremo 3' (SEQ ID NO: 2). Luego, este fragmento de ADN se clonó dentro de los lugares Nco I y Not I del plásmido de expresión pRG663 de *E. coli* para producir pRG1102 de forma que la expresión de R1R2_C era dependiente de la transcripción del promotor del fago T7 Φ 1.1. La inducción de la expresión génica a partir de pRG1102 dio como resultado la acumulación de R1R2_{Cys} en el citoplasma de la cepa hospedadora RFJ238 de *E. coli*. De forma similar, los cebadores R1R2N-Nco1 (SEQ ID NO: 18) y R1R2ACGC-Not1 (SEQ ID NO: 20) se usaron para amplificar el fragmento de ADN de pTE115 que codifica los aminoácidos G30 a K231 (SEQ ID NO: 10) dando como resultado la fusión de un codón de iniciación de metionina en el extremo 5' y la fusión de codones para ACGC (SEQ ID NO: 4), seguidos de un codón de parada, en el extremo 3' (SEQ ID NO: 5). Luego, este fragmento se clonó dentro de los lugares Nco I y Not I del plásmido de expresión pRG663 de *E. coli* para producir pRG1103 de forma que la expresión de R1R2_{ACGC} era dependiente de la transcripción del promotor del fago T7 Φ 1.1. La inducción de la expresión génica tanto de pRG1102 como de pRG1103 dio como resultado la acumulación de R1R2_C o R1R2_{ACGC}, respectivamente, en el citoplasma de la cepa hospedadora RFJ238 de *E. coli*.

Ejemplo 4. Purificación y caracterización de mini-trampas de VEGF de *E. coli*

Tanto R1R2_C como R1R2_{ACGC} se expresaron como proteínas citoplásmicas en *E. coli* y se purificaron por el mismo método. La inducción del promotor del fago T7 Φ 1.1 o pRG1102 o pRG1103 en la cepa RFJ238 de *E. coli* K12 dio como resultado la acumulación de la proteína en el citoplasma. Tras la inducción, las células se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 20 mM, y se lisaron al pasarlas por un homogenizador celular Niro-Soavi. Los cuerpos de inclusión se recogieron por centrifugación a partir de las células lisadas, se lavaron una vez en H₂O destilada, luego se solubilizaron en guanidinio-HCl 8 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, sulfato de sodio 100 mM, tetrato de sodio 10 mM y se incubaron a temperatura ambiente durante 16 horas. El sobrenadante aclarado se fraccionó en una columna S300 equilibrada con guanidinio-HCl 6M, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Las fracciones que contienen R1R2_C se agruparon y dializaron frente a Urea 6 M, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. La proteína dializada se diluyó con urea 2M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,5, cisteína 2 mM luego se agitó lentamente durante 7 días a 4^o C. La proteína replegada se dializó frente a Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, luego se cargó en una columna SP-Sepharose equilibrada con Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 y se eluyó con un gradiente de NaCl de 0 a 1M en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Las fracciones que contienen R1R2_C se agruparon, concentraron, y cargaron en una columna Superdex 200 equilibrada con Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM. Las fracciones que contienen el dímero de la mini-trampa se recogieron y agruparon. El peso molecular de la mini-trampa purificada se estimó que fue alrededor de 46 kD en SDS-PAGE.

Se llevaron a cabo ensayos BIAcore (como se describe en WO/0075319) para determinar la afinidad de la trampa por VEGF, y los resultados mostraron que las mini-trampas de R1R2_C y R1R2_{ACGC} tenían una afinidad por VEGF comparable con la trampa de VEGF de longitud completa (Tabla 2).

Tabla 2

Trampa	Relación de disociación Cinética (1/s)	T _{1/2} (horas)
Trampa de VEGF	$4,23 \times 10^{-5}$	4,53
R1R2 _C	$3,39 \times 10^{-5}$	5,68
R1R2 _{ACGC}	$3,41 \times 10^{-5}$	5,65

Ejemplo 5. Expresión de mini-trampas de VEGF en CHO K1

5 La expresión de las mini-trampas de VEGF codificadas por pTE517 y pTE518 es dependiente de la transcripción del promotor humano CMV-MIE y da como resultado la secreción de las mini-trampas en el medio de cultivo cuando se expresan en células CHO. Cuando se expresan como proteínas secretadas en CHO K1, ambas mini-trampas se encontraron en el medio condicionado y la estimación de su peso molecular por SDS-PAGE sugirió, como se esperaba, que las proteínas estaban glicosiladas. El análisis por SDS-PAGE también indicó que las mini-trampas eran capaces de formar moléculas homodiméricas estabilizadas por disulfuro(s) intermolecular(es) entre la(s) cisteína(s) del extremo C-terminal. De forma específica, la mini-trampa R1R2_C formaba, de forma eficaz, dímeros covalentes cuando se expresaba como una proteína secretada en las células CHO.

Ejemplo 6. Construcción y expresión de una mini-trampa de VEGF de cadena sencilla

15 También se construyó una mini-trampa de VEGF que no necesita un dominio de multimerización (SEQ ID NO: 24). Esta mini-trampa se construyó por fusión directa de un dominio Flt1D2.Flk1D3 (R1R2) (aminoácidos 30-231 de la SEQ ID NO: 24) a un segundo dominio Flt1D2.Flk1D3 (R1R2) (aminoácidos 234-435 de la SEQ ID NO: 24) con un enlazador Gly-Pro entre los dominios de receptor tándem (aminoácidos 232-233 de la SEQ ID NO: 24).

20 Para construir un gen que codifique los dominios tándem Flt1D2.Flk1D3, se sintetizó un fragmento de ADN (Blue Heron Biotechnology) que codificaba un dominio Flt1D2.Flk1D3 que minimizaba la homología del ADN con el ADN que codifica el dominio Flt1D2.Flk1D3 encontrado en pTE115. Este fragmento de ADN sintético se clonó como un fragmento Srf I-Not I dentro de los lugares Srf I-Not I de pTE115 para producir pTE570, que expresa la mini-trampa de VEGF R1R2-R1R2 del promotor de CMV-MIE. Cuando este plásmido se transfecta en las células CHO K1 la mini-trampa R1R2-R1R2 se acumula en el medio de cultivo.

Ejemplo 7. Construcción y expresión de una mini-trampa de VEGF

30 Se construyó una mini-trampa de VEGF, tal como se describe más abajo, por fusión directa de un dominio Flt1D2.Flk1D3 (R1R2) (aminoácidos 30-231 de la SEQ ID NO: 26) con una secuencia de nueve aminoácidos que termina en CPPC en el extremo C-terminal. Cuando este plásmido se transfecta dentro de células CHO K1, la mini-trampa de VEGF de la SEQ ID NO: 26 es secretada al medio de cultivo. La purificación posterior por electroforesis no reductora en SDS-PAGE, así como el análisis de dispersión ligera natural identificaron una molécula trampa con peso molecular de aproximadamente 64 kDa. Este peso molecular indica que se formó un dímero covalente entre dos polipéptidos de fusión de SEQ ID NO: 26. Se llevaron a cabo experimentos similares con plásmidos que codifican los polipéptidos de fusión de SEQ ID NOs: 27 y 28, y, de forma similar, mostraron que estas moléculas formaban trampas homodiméricas. Las determinaciones de afinidad para la unión de VEGF-165 humano a trampas de EGF compuesta de dímeros de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 26 se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Trampa de VEGF	ka (1Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
SEQ ID NO: 10	$2,73 \times 10^{+7}$	$1,79 \times 10^{-5}$	$6,55 \times 10^{-13}$
SEQ ID NO: 26	$2,00 \times 10^{+7}$	$6,56 \times 10^{-6}$	$3,28 \times 10^{-13}$
SEQ ID NO: 26	$2,61 \times 10^{+7}$	$5,77 \times 10^{-6}$	$2,21 \times 10^{-13}$

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Daly, Thomas J.
Fandl, James P.
Papadopoulos, Nicholas J.
- <120> TRAMPAS DE VEGF Y USOS TERAPÉUTICOS DE LAS MISMAS
- 10 <130> 710D2-WO
- <140> A ASIGNAR
<141> 2004-06-29
- 15 <150> 10/609,775
<151> 2003-06-30
- <160> 29
- 20 <170> FastSEQ para Windows, Versión 4.0
- <210> 1
<211> 4
<212> PRT
<213> homo sapiens
- 25 <400> 1
Cys Pro Pro Cys
1
- 30 <210> 2
<211> 200
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 2

```

Met Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile
 1          5          10          15
His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser
          20          25          30
Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile
          35          40          45
Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile
          50          55          60
Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr
65          70          75          80
Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr Gln Thr Asn Thr
          85          90          95
Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val
          100          105          110
Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val
          115          120          125
Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys
130          135          140
Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys
145          150          155          160
Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln
          165          170          175
Gly Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
          180          185          190

```

```

Phe Val Arg Val His Glu Lys Cys
          195          200

```

5 <210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 3
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido

<400> 3
Xaa Cys Xaa Cys
 1

15 <210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 4
Ala Cys Gly Cys
 1

20 <210> 5
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 5

```

Met Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile
 1 |          5          10          15
His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser
          20          25          30
Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile
          35          40          45
Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile
          50          55          60
Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr
65          70          75          80
Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr Gln Thr Asn Thr
          85          90          95
Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val
          100          105          110
Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val
          115          120          125
Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys
          130          135          140
Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys
145          150          155          160
Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln
          165          170          175
Gly Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
          180          185          190
Phe Val Arg Val His Glu Lys Ala Cys Gly Cys
          195          200
    
```

<210> 6

<211> 6

5

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 6

```

Leu Val Pro Arg Gly Ser
 1          5
    
```

<210> 7

10

<211> 1453

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 7

```

aagcttgggc tgcaggtcga tcgactctag aggatcgatc cccgggcgag ctcgaattcg 60
caaccacat ggtcagctac tgggacaccg gggctctgct gtgcgcgctg ctcagctgtc 120
tgcttctcac aggatctagt tccggaggta gacctttcgt agagatgtac agtgaaatcc 180
ccgaaattat acacatgact gaaggaaggg agctcgtcat tccctgccgg gttacgtcac 240
ctaacatcac tgttacttta aaaaagtttc cacttgacac tttgatccct gatggaaaac 300
gcataatctg ggacagtaga aagggcttca tcatatcaaa tgcaacgtac aaagaaaatag 360
ggcttctgac ctgtgaagca acagtcaatg ggcatttgta taagacaaac tatctcacac 420
atcgacaaac caatacaatc atagatgtgg ttctgagtcg gtctcatgga attgaactat 480
ctggttgaga aaagcttgtc ttaaattgta cagcaagaac tgaactaaat gtggggattg 540
acttcaactg ggaataccct tcttogaagc atcagcataa gaaacttgta aaccgagacc 600
taaaaaccca gtctgggagt gagatgaaga aatTTTTgag caccttaact atagatgggtg 660
taaccgggag tgaccaagga ttgtacacct gtgcagcatc cagtgggctg atgaccaaga 720
agaacagcac atttgtcagg gtccatgaaa agggcccggg cgacaaaact caacatgcc 780
caccgtgcc agcacctgaa ctctggggg gaccgtcagt cttcctctc ccccaaaaac 840
ccaaggacac cctcatgatc tcccggacc ctaggtcac atgcgtgggtg gtggacgtga 900
gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg 960
ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcctcctca 1020
ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag 1080
ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac 1140
aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct 1200
gcctggtcaa aggttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc 1260
cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct 1320
atagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtctc tcatgctccg 1380
tgatgatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta 1440
aatgagcggc cgc 1453
    
```

<210> 8

<211> 458

5 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 8

```

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

Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	His	Arg	Gln	Thr	Asn	Thr	Ile	Ile	Asp	Val	Val
		115					120					125			
Leu	Ser	Pro	Ser	His	Gly	Ile	Glu	Leu	Ser	Val	Gly	Glu	Lys	Leu	Val
	130					135					140				
Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Asn	Val	Gly	Ile	Asp	Phe	Asn
145					150					155					160
Trp	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Lys	His	Gln	His	Lys	Lys	Leu	Val	Asn	Arg
				165					170					175	
Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	Lys	Lys	Phe	Leu	Ser	Thr
			180					185					190		
Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp	Gln	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys
	195						200					205			
Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Arg
	210					215					220				
Val	His	Glu	Lys	Gly	Pro	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
225					230					235					240
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
				245					250					255	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			260					265					270		
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
		275					280					285			
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
	290					295					300				
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
305					310					315					320
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
				325					330					335	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
			340					345					350		
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
		355					360					365			
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
	370					375					380				
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
385					390					395					400
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				405					410					415	
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
			420					425					430		
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
		435					440					445			
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
	450					455									

- 5 <210> 9
 <211> 1377
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 9

```

atggtcagct actgggacac cggggtcctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgcttctc 60
acaggatcta gttccggaag tgataccggt agacctttcg tagagatgta cagtgaaatc 120
cccgaaatta tacacatgac tgaaggaagg gagctcgtca ttccctgccg ggttacgtca 180
cctaacaatca ctgttacttt aaaaaagtgt ccacttgaca ctttgatccc tgatggaaaa 240
cgcataatct gggacagtag aaagggcttc atcatatcaa atgcaacgta caaagaaata 300
gggcttctga cctgtgaagc aacagtcaat gggcatttgt ataagacaaa ctatctcaca 360
catcgacaaa ccaatacaat catagatgtg gttctgagtc cgtctcatgg aattgaacta 420
tctgttggag aaaagcttgt cttaaattgt acagcaagaa ctgaactaaa tgtggggatt 480
gacttcaact gggaaatacc ttcttcgaag catcagcata agaaacttgt aaaccgagac 540
ctaaaaacc agtctgggag tgagatgaag aaatthttga gcacctaac tatagatggt 600

```

```

gtaaccgga gtgaccaagg attgtacacc tgtgcagcat ccagtgggct gatgaccaag 660
aagaacagca catttgtcag ggtccatgaa aaggacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 720
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa acccaaggac 780
accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtagacgt gagccacgaa 840
gaccctgagg tcaagttaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 900
aagccgctgg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 960
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacia agccctccc 1020
gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1080
accctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 1140
aaaggttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC 1200
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttct ctacagcaag 1260
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1320
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga 1377

```

- 5 <210> 10
- <211> 458
- <212> PRT
- <213> homo sapiens

<400> 10

Met	Val	Ser	Tyr	Trp	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Leu	Ser
1				5					10					15	
Cys	Leu	Leu	Leu	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Gly	Arg	Pro
			20					25					30		
Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Ile	Ile	His	Met	Thr	Glu
		35					40					45			
Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr
	50					55					60				
Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	Asp	Gly	Lys
65					70					75					80
Arg	Ile	Ile	Trp	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe	Ile	Ile	Ser	Asn	Ala	Thr
			85						90					95	
Tyr	Lys	Glu	Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	His
			100					105					110		
Leu	Tyr	Lys	Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	His	Arg	Gln	Thr	Asn	Thr	Ile	Ile
		115					120					125			
Asp	Val	Val	Leu	Ser	Pro	Ser	His	Gly	Ile	Glu	Leu	Ser	Val	Gly	Glu
	130					135					140				
Lys	Leu	Val	Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Asn	Val	Gly	Ile
145					150					155					160
Asp	Phe	Asn	Trp	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Lys	His	Gln	His	Lys	Lys	Leu
			165						170					175	
Val	Asn	Arg	Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	Lys	Lys	Phe
			180					185					190		
Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp	Gln	Gly	Leu
		195					200					205			
Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr
	210					215						220			
Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
225					230					235					240
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			245						250				255		
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			260					265					270		
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
		275					280					285			
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
	290					295					300				
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
305					310					315					320

```

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      325                               330           335
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      340                               345           350
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
      355                               360           365
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      370                               375           380
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385                               390           395           400
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      405                               410           415
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      420                               425           430
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      435                               440           445
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      450                               455

```

5 <210> 11
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> 1, 2, 3, 4
 <223> Xaa = Cualquier Aminoácido

<400> 11
 Xaa Xaa Xaa Xaa
 1

15 <210> 12
 <211> 1444
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 12

```

aagcttgggc tgcaggtcga tgcactctag aggatcgcac cccgggagag ctcgaattcg 60
caaccacccat ggtcagctac tgggacaccg gggctcctgct gtgcgcgctg ctcagctgtc 120
tgcttctcac aggatctagt tccggaggta gacctttcgt agagatgtac agtgaaatcc 180
ccgaaattat acacatgact gaaggaaggg agctcgtcat tccctgccgg gttacgtcac 240
ctaacatcac tgttacttta aaaaagtttc cacttgacac tttgatccct gatggaaaac 300
gcataatctg ggacagtaga aagggttca tcatatcaaa tgcaacgtac aaagaaatag 360
ggcttctgac ctgtgaagca acagtcaatg ggcatattgta taagacaaaac tatctcacac 420
atcgacaaaac caatacaatc atagatatcc agctggtgcc caggaagtgc ctggagctgc 480
tggtagggga gaagctggtc ctcaactgca ccgtgtgggc tgagttaaac tcaggtgtca 540
cctttgactg ggactacca ggaagcagg cagagcgggg taagtgggtg cccgagcgac 600
gctcccaaca gaccacaca gaactctcca gcacctgac catccacaac gtcagccagc 660
acgacctggg ctcgatgtg tgcaaggcca acaacggcat ccagcgattt cgggagagca 720
ccgaggtcat tgtgcatgaa aatggcccgg gcgacaaaac tcacacatgc ccacctgcc 780
cagcacctga actcctgggg ggacctcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca 840
ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgogtggg ggtggacgtg agccacgaag 900
accctgaggt caagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa 960
agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggg cagcgtcctc accgtcctgc 1020
accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggg ctccaacaaa gccctcccag 1080
ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca 1140
ccctgcccc atcccgggat gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgtca 1200
aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca 1260

actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tatagcaagc 1320
tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcagctcc gtgatgcatg 1380
aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aatgagcgg 1440
ccgc

```

5

<210> 13
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 13

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

385					390					395					400
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
				405					410					415	
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
			420					425					430		
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
		435					440					445			
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
	450					455									

5 <210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 14
 gggctgtga gagagagaga gagc 24

10 <210> 15
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 15
 ggccgctctc tctctctc aacagccc 28

15 <210> 16
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

20 <400> 16
 gggcgcagc ggtgttgag agc 23

<210> 17
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

25 <400> 17
 ggccgctctc aacaaccgca tgcgccc 27

30 <210> 18
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 18
 gagagagacc atggtagac cttcgtaga gatgta 36

35 <210> 19
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 19
 agagaggcgg ccgctttatc aacacttttc atggaccctg acaaatgt 48

5 <210> 20
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 20
 agagaggcgg ccgctttatc aacaaccgca tgcctttca tggaccctga caaatgt 57

10 <210> 21
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 21
 agttccggaa gtgccatggg tagaccttc gtagagatg 39

15 <210> 22
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

20 <400> 22
 agagaggcgg ccgctgttat cacttctcgt gcacgcgcac gaag 44

<210> 23
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 23

```

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1          5          10          15
Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Asp Thr Gly Arg Pro
 20          25          30
Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu
 35          40          45
Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr
 50          55          60
Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys
 65          70          75
Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
 85          90          95
Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His
 100         105         110
Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile
 115         120         125
Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
 130         135         140
Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
 145         150         155
Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
 165         170         175
Val Asn Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Arg Asp Leu Lys Lys Phe
 180         185         190
Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
 195         200         205
Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
 210         215         220
Phe Val Arg Val His Glu Lys Gly Pro Gly Cys
 225         230         235

```

<210> 24

<211> 435

5 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 24

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

<210> 25
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

5 <400> 25
 Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Asp Thr Gly Arg Pro
 20 25 30
 Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu
 35 40 45
 Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr
 50 55 60
 Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asn Thr Leu Ile Pro Asn Gly Lys
 65 70 75 80
 Ala Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
 85 90 95
 Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His
 100 105 110
 Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile
 115 120 125
 Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
 130 135 140
 Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
 145 150 155 160
 Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
 165 170 175
 Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
 180 185 190
 Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
 195 200 205
 Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
 210 215 220
 Phe Val Arg Val His Glu Lys Gly Pro Gly Ala Cys Gly Cys
 225 230 235

<210> 26
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

10

<400> 26

```

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

Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
 130         135         140
Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
 145         150         155
Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
 165         170         175
Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
 180         185         190
Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
 195         200         205
Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
 210         215         220
Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225         230         235         240

```

- 5 <210> 27
- <211> 240
- <212> PRT
- <213> homo sapiens

<400> 27

```

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1      5      10      15
Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Asp Thr Gly Arg Pro
      20      25      30
Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu
      35      40      45
Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr
      50      55      60
Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys
 65      70      75      80
Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
      85      90      95
Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His
      100      105      110
Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile
      115      120      125
Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
 130      135      140
Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
 145      150      155      160
Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
      165      170      175
Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
      180      185      190
Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
      195      200      205
Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
 210      215      220
Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys
 225      230      235      240

```

<210> 28

<211> 237

5 <212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 28

```

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1      5      10      15

```

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Asp Thr Gly Arg Pro
 20 25 30
 Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu
 35 40 45
 Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr
 50 55 60
 Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys
 65 70 75 80
 Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
 85 90 95
 Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His
 100 105 110
 Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile
 115 120 125
 Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
 130 135 140
 Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
 145 150 155 160
 Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
 165 170 175
 Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
 180 185 190
 Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
 195 200 205
 Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
 210 215 220
 Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr His Thr Cys
 225 230 235

- <210> 29
- <211> 434
- 5 <212> PRT
- <213> homo sapiens

<400> 29

Ser	Asp	Thr	Gly	Arg	Pro	Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu
1				5					10					15	
Ile	Ile	His	Met	Thr	Glu	Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val
			20					25					30		
Thr	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr
		35				40						45			
Leu	Ile	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	Ile	Ile	Trp	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe
	50					55					60				
Ile	Ile	Ser	Asn	Ala	Thr	Tyr	Lys	Glu	Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu
65					70					75					80
Ala	Thr	Val	Asn	Gly	His	Leu	Tyr	Lys	Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	His	Arg
				85						90				95	
Gln	Thr	Asn	Thr	Ile	Ile	Asp	Val	Val	Leu	Ser	Pro	Ser	His	Gly	Ile
			100					105						110	
Glu	Leu	Ser	Val	Gly	Glu	Lys	Leu	Val	Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Arg	Thr
		115					120						125		
Glu	Leu	Asn	Val	Gly	Ile	Asp	Phe	Asn	Trp	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Lys
		130				135					140				
His	Gln	His	Lys	Lys	Leu	Val	Asn	Arg	Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly
145					150					155					160
Ser	Glu	Met	Lys	Lys	Phe	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr
				165						170				175	
Arg	Ser	Asp	Gln	Gly	Leu	Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met
			180					185						190	
Thr	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr	Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Glu	Ser	Lys

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de fusión que se une e inhibe al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que consiste en una fusión de un dominio R1R2 a un segundo dominio R1R2 ((R1R2)₂), donde la fusión es directa o mediante un espaciador de aminoácidos y donde R1 es el dominio 2 de Ig de un componente del receptor del VEGF de Flt-1 y R2 es el dominio 3 de Ig de Flk-1.
2. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, donde el espaciador es un un enlazador Gly-Pro.
- 10 3. Un polipéptido de fusión codificado por la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 ó 2.
4. El polipéptido de fusión de la reivindicación 3 cuya secuencia de aminoácidos es la de SEQ ID NO: 24.
5. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 ó 2, unida de forma operativa a una secuencia de control de la expresión.
- 15 6. Un método para producir un polipéptido de fusión que se une e inhibe al VEGF, que comprende las etapas de introducir en un sistema de expresión apropiado el vector de expresión de la reivindicación 5 y efectuar la expresión del polipéptido de fusión.
7. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de fusión de la reivindicación 3 ó 4, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 8. Un polipéptido de fusión que se puede unir e inhibir al VEGF de la reivindicación 3 ó 4, para usar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno que es mejorado, aliviado o inhibido por la eliminación o inhibición del VEGF, donde dicha enfermedad o trastorno es: enfermedad de la retina; o una enfermedad ocular seleccionada entre neovascularización coroidal, edema macular diabético, retinopatía diabética proliferativa, neovascularización corneal/ rechazo de trasplante, y degeneración macular asociada a la edad.
- 25 9. Un polipéptido de fusión que se puede unir e inhibir al VEGF de la reivindicación 3 ó 4, para usar como un adyuvante en la cirugía de glaucoma, para tratar o prevenir la hemangiogénesis y linfangiogénesis temprana y reclutamiento de macrófagos en la ampolla de filtrado tras la cirugía del glaucoma.