



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 758**

51 Int. Cl.:
C07K 14/515 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06789808 .0**
96 Fecha de presentación : **15.08.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1919944**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2008**

54 Título: **VEGF y PDGF modificados con propiedades angiogénicas mejoradas.**

30 Prioridad: **15.08.2005 US 708226 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2011

73 Titular/es: **VEGENICS PTY Ltd.**
Level 1 10 Wallace avenue
Toorak, Vic 3142, AU

72 Inventor/es: **Alitalo, Kari;**
Tammela, Tuomas;
Keskitalo, Salla;
Pajusola, Katri;
Jeltsch, Markku, M.;
Yla-Herttuala, Seppo;
Karpanen, Terhi;
Eriksson, Ulf y
Uutela, Marko, J., T.

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 y PDGF modificados con propiedades angiogénicas mejoradas

La presente solicitud reivindica prioridad respecto de la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/708.226 presentada el 15 de agosto de 2005.

5 Campo de la invención

La presente solicitud está dirigida a materiales y procedimientos para promover la angiogénesis.

Antecedentes

La angiogénesis es un proceso fundamental requerido para el crecimiento y el desarrollo normal de tejidos e implica la proliferación de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes. La angiogénesis no sólo participa en el desarrollo embrionario y el crecimiento, la reparación y la regeneración de tejido normal, sino que también participa en el ciclo reproductor femenino, el establecimiento y el mantenimiento del embarazo y en la reparación de heridas y fracturas. Además de la angiogénesis que tiene lugar en el individuo sano, los acontecimientos angiogénicos participan en varios procesos patológicos, notablemente el crecimiento de tumores y metástasis, y otras afecciones en las que se aumenta la proliferación de vasos sanguíneos, especialmente del sistema microvascular, tales como retinopatía diabética, psoriasis y artropatías. La inhibición de la angiogénesis es útil en la prevención o el alivio de estos procesos patológicos.

Debido a la función crucial de la angiogénesis en tantos procesos fisiológicos y patológicos, los factores implicados en el control de la angiogénesis se han investigado exhaustivamente. Se han mostrado varios factores de crecimiento que están implicados en la regulación de la angiogénesis; éstos incluyen factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento α transformante (TGF α) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Véase, por ejemplo, Folkman y col., "Angiogenesis", J. Biol. Chem., 1992 267 10931-10934 para una revisión.

Se ha sugerido que una familia particular de factores de crecimiento específicos de células endoteliales y sus receptores correspondientes es principalmente responsable de la estimulación del crecimiento y diferenciación de células endoteliales, y de ciertas funciones de las células diferenciadas. Estos factores son miembros de la familia PDGF/VEGF y parece que se actúan mediante receptores tirosina-cinasas (RTK).

Hasta la fecha se han identificado varios miembros de la familia de PDGF/VEGF. Éstos incluyen PDGF-A (véase, por ejemplo, nº de acceso de GenBank X06374), PDGF-B (véase, por ejemplo, nº de acceso de GenBank M12783), PDGF-C (publicación internacional nº WO 00/18212), PDGF-D (publicación internacional nº WO 00/027879), VEGF (también conocido como VEGF-A o por la isoforma particular), factor de crecimiento placentario, PIGF (patente de EE.UU. nº 5.919.899), VEGF-B (también conocido como factor relacionado con VEGF (VRF), publicación internacional nº PCT/US96/02597 y el documento WO 96/26736), VEGF-C (patente de EE.UU. nº 6.221.839 y documento WO 98/33917), VEGF-D (también conocido como factor de crecimiento inducido por c-fos (FIGF) (patente de EE.UU. nº 6.235.713, publicación internacional nº WO98/07832), VEGF-E (también conocido como N27 VEGF o OV N27; publicación internacional nº WO00/025805 y publicación de patente de EE.UU. nº 2003/0113870), N22 VEGF (también conocido como OV N22; véase, por ejemplo, nº de acceso de GenBank S67520), proteína similar a VEGF D1701 (véase, por ejemplo, nº de acceso de GenBank AF106020; Meyer y col., EMBO J 18:363-374) y proteína similar a VEGF N210 (descrita en la solicitud de patente internacional PCT/US99/25869) [Stacker y Achen, Growth Factors 17:1-11 (1999); Neufeld y col., FASEB J 13:9-22 (1999); Ferrara, J Mol Med 77:527-543 (1999)].

Los factores de crecimiento endoteliales vasculares actúan uniéndose a receptores tirosina-cinasas. Se han identificado siete receptores tirosina-cinasas, concretamente Flt-1 (VEGFR-1), KDR/Flk-1 (VEGFR-2), Flt4 (VEGFR-3), PDGFR- α , PDGFR- β , Tie y Tek/Tie-2. Todos estos tienen la actividad de tirosina cinasa intrínseca que es necesaria para la transducción de señales. La función específica esencial en la vasculogénesis y la angiogénesis de Flt-1, Flk-1, Tie y Tek/Tie-2 se ha demostrado por mutaciones elegidas como diana que inactivan estos receptores en embriones de ratón. La expresión en exceso de tanto la familia de VEGF/PDGF de factores de crecimiento como de los receptores de VEGF/PDGF puede conducir a desarrollo anormal del sistema vascular (Saaristo y col., FASEB J. 16:1041-9, 2002; Kubo y col., Proc Natl Acad Sci USA. 99:8868-73, 2002.). La actividad de VEGF/VEGFR también promueve la angiogénesis de nuevas células y tejido en desarrollo, facilitándose así la angiogénesis y la vascularización de células tumorales.

Aunque las moléculas de VEGF anteriormente mencionadas han mostrado alguna promesa con respecto al desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y otras propiedades de factores de crecimiento, sigue existiendo la necesidad del desarrollo de soluciones terapéuticas mejoradas para promover la angiogénesis.

Resumen de la invención

La presente invención está dirigida a polinucleótidos y polipéptidos recombinantes de la familia de VEGF/PDGF de

factores de crecimiento que se modifican con secuencias flanqueantes para conferir propiedades mejoradas. Los materiales y procedimientos de los polipéptidos y los polinucleótidos para la estimulación de la angiogénesis están entre las realizaciones preferidas de la invención.

5 La invención se destina a necesidades existentes proporcionando nuevos compuestos, composiciones de materia, materiales, dispositivos y procedimientos para modular procesos tales como angiogénesis, linfangiogénesis y cicatrización, que tienen numerosas aplicaciones terapéuticas y profilácticas.

Un aspecto de la invención es compuestos novedosos, especialmente compuestos proteínicos, con propiedades angiogénicas. Un aspecto de la invención es una construcción quimérica que comprende: un dominio de unión a RTK; al menos un dominio flanqueante heterólogo o dominio CUB; y al menos un enlace que conecta el dominio de unión a RTK con el al menos un dominio flanqueante o dominio CUB; en los que la construcción y el dominio de unión a RTK se unen al dominio extracelular de al menos un receptor tirosina-cinasa seleccionado del grupo que consiste en: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-alfa y PDGFR-beta. Aquellas construcciones que se unen y estimulan el receptor son útiles como agonistas de receptores. Aquellas construcciones que se unen, pero dejan de estimular el receptor, son útiles como antagonistas de receptores. Como se describe en mayor detalle más adelante, algunas realizaciones de la invención se comportan como pro-agonistas, en tanto que un dominio CUB escindible previene la activación del receptor, pero bajo condiciones apropiadas (por ejemplo, administración o estimulación de una proteasa para escindir el dominio CUB), el dominio CUB se escinde, creando un agonista de receptor. El término "heterólogo" en el contexto usado anteriormente se refiere al dominio flanqueante/CUB que es de una proteína diferente de la del dominio de unión a RTK. Por ejemplo, si el al menos un dominio flanqueante comprende un pro-péptido de VEGF-C, entonces dominios de RTK heterólogos a modo de ejemplo incluyen cualquier miembro de la familia de VEGF/PDGF distinto de VEGF-C (por ejemplo, VEGF-A, -B, o -D; PDGF-A, -B, -C, o -D; o P1GF, pero no VEGF-C).

En ciertas realizaciones a modo de ejemplo, la presente invención es una construcción que comprende un dominio de unión a RTK de receptor tirosina-cinasa, al menos un dominio flanqueante y al menos un enlace que conecta el dominio de unión a RTK con el al menos un dominio flanqueante. El término "construcción" generalmente se refiere a una molécula, compuesto o composición de materia y no pretende ser limitante a una estructura o función. El término "dominio" como se usa en este documento es descriptivo del hecho de que puede usarse una parte de una molécula (que puede ser menos de una molécula completa), y también es descriptivo del hecho de que la propia construcción tiene porciones discretas que contribuyen a la funcionalidad global (actividad biológica) de la construcción. En algunas realizaciones, el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos del dominio de unión a RTK seleccionada del grupo que consiste en: VEGF-A de mamífero, VEGF-B de mamífero, VEGF-C de mamífero, VEGF-D de mamífero, VEGF-E de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PIGF, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C y PDGF-D. La construcción y el dominio de unión a RTK se unen a al menos un receptor tirosina-cinasa seleccionado del grupo que consiste en: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-alfa y PDGFR-beta. En realizaciones preferidas, el dominio flanqueante comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en un propéptido del extremo amino de VEGF-C de mamífero; un propéptido del extremo carboxi de VEGF-C de mamífero; un propéptido del extremo amino de VEGF-D de mamífero; un propéptido del extremo carboxi de VEGF-D de mamífero; un péptido LAP TGF- β 1 de mamífero; y fragmentos de los mismos que son eficaces para unir proteínas de la matriz extracelular o proteínas de neuropilina, con la condición de que cuando el dominio de unión a RTK sea idéntico al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-C, la construcción contenga al menos un dominio flanqueante que no sea idéntico al menos el 90% a un propéptido de VEGF-C; y cuando el dominio de unión a RTK sea idéntico al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-D, la construcción contenga al menos un dominio flanqueante que no sea idéntico al menos el 90% a un pro-péptido de VEGF-D. En otras palabras, las construcciones de la invención son compuestos heterólogos cuyos dominios no proceden exclusivamente de VEGF-C o exclusivamente de VEGF-D.

En las construcciones descritas en este documento, un ligador (o ligadores) se usa(n) para unir el (los) dominio(s) de unión a RTK a uno o más dominios flanqueantes (o para unir adicionalmente dominios flanqueantes entre sí o para unir dominios adicionales opcionales tales como un dominio de unión a heparina o un dominio CUB). En algunas realizaciones, el ligador comprende un enlace covalente. En realizaciones relacionadas, el ligador comprende un enlace peptídico.

En algunas variaciones, los dominios constituyen péptidos separados y distintos unidos por el ligador. En otras variaciones, los dominios se unen por enlaces peptídicos para formar una cadena de polipéptidos continua.

55 Por ejemplo, en algunas realizaciones, la construcción es un polipéptido quimérico que comprende una estructura que satisface la fórmula Fn-L-RTK-L-Fc en la que Fn comprende un dominio flanqueante que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: un amino-pro-péptido de VEGF-C de mamífero y un amino-pro-péptido de VEGF-D de mamífero; en la que Fc comprende un dominio flanqueante que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada de un carboxi-pro-péptido de VEGF-C de mamífero y un carboxi-pro-péptido de VEGF-D de mamífero; en la que RTK comprende el dominio de unión a RTK; y en la que L

comprende el enlace entre el dominio flanqueante y el dominio de unión a RTK.

En algunas realizaciones particulares, el al menos un dominio flanqueante del polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de amino-pro-péptidos de VEGF-C de SEQ ID NO: 46; la secuencia de carboxi-pro-péptidos de VEGF-C de SEQ ID NO: 47; la secuencia de amino-pro-péptidos de VEGF-D de SEQ ID NO: 48; y la secuencia de carboxi-pro-péptidos de VEGF-D de SEQ ID NO: 49.

En algunas realizaciones particulares, el polipéptido quimérico que comprende la fórmula Fn-L-RTK-L-Fc se une a VEGFR-1 o VEGFR-2; en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: los aminoácidos 27 a 147 de la secuencia de aminoácidos de VEGF121 de SEQ ID NO: 4 o fragmento de la misma; los aminoácidos 27 a 171 de la secuencia de aminoácidos de VEGF145 de SEQ ID NO: 5 o fragmento de la misma; los aminoácidos 27 a 191 de la secuencia de aminoácidos de VEGF165 de SEQ ID NO: 6 o fragmento de la misma; los aminoácidos 27 a 215 de la secuencia de aminoácidos de VEGF189 de SEQ ID NO: 7 o fragmento de la misma; los aminoácidos 27-232 de la secuencia de aminoácidos de VEGF206 de SEQ ID NO: 3 o fragmento de la misma.

En una realización particularmente preferida, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a la secuencia de aminoácidos de la construcción CAC de SEQ ID NO 27.

En otras realizaciones particulares, el polipéptido quimérico que comprende la fórmula Fn-L-RTK-L-Fc se une a VEGFR-1 o VEGFR-2; en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: los aminoácidos 22 a 188 de la secuencia de aminoácidos de VEGF-B167 de SEQ ID NO: 44 o fragmento de la misma; los aminoácidos 22 a 207 de la secuencia de aminoácidos de VEGF-B186 de SEQ ID NO: 45 o fragmento de la misma; los aminoácidos 19 a 149 de la secuencia de aminoácidos de PIGF-1 de SEQ ID NO: 9 o fragmento de la misma; los aminoácidos 19 a 170 de la secuencia de aminoácidos de PIGF-2 de SEQ ID NO: 42 o fragmento de la misma; y los aminoácidos 19 a 221 de la secuencia de aminoácidos de PIGF-3 de SEQ ID NO: 43 o fragmento de la misma.

En realizaciones alternativas, el polipéptido quimérico que comprende la fórmula Fn-L-RTK-L-Fc se une a PDGFR-alfa o PDGFR-beta; en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: los aminoácidos 87 a 211 de la secuencia de aminoácidos de PDGF-A de SEQ ID NO: 17 o fragmento de la misma; los aminoácidos 82 a 190 de la secuencia de aminoácidos de PDGF-B de SEQ ID NO: 19 o fragmento de la misma; los aminoácidos 230 a 345 de la secuencia de aminoácidos de PDGF-C de SEQ ID NO: 21 o fragmento de la misma; y los aminoácidos 255 a 370 de la secuencia de aminoácidos de PDGF-D de SEQ ID NO: 24 o fragmento de la misma.

En otras realizaciones mas, el polipéptido quimérico que comprende la fórmula Fn-L-RTK-L-Fc se une a VEGFR-3 o VEGFR-2; en el que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: los aminoácidos 103 a 227 de la secuencia de aminoácidos de VEGF-C de SEQ ID NO: 13 o fragmento de la misma; y los aminoácidos 93 a 201 de la secuencia de aminoácidos de VEGF-D de SEQ ID NO: 15 o fragmento de la misma.

En algunas realizaciones, el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: la secuencia de aminoácidos de la construcción CAC de SEQ ID NO 27; la secuencia de aminoácidos de la construcción CDD de SEQ ID NO: 37; la secuencia de aminoácidos de la construcción CDC de SEQ ID NO: 39; y la secuencia de aminoácidos de la construcción DDC de SEQ ID NO: 41.

En otra realización más se proporciona otra construcción quimérica (designada "CUB-VEGF") que comprende un dominio de unión a RTK, un dominio CUB y al menos un enlace que conecta el dominio de unión a RTK con el dominio CUB, en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-A de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-B de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-C de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-D de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-E de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PIGF de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PDGF-A de mamífero; y secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PDGF-B de mamífero, en la que el dominio CUB comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos del dominio CUB de PDGF-C y secuencias de aminoácidos del dominio CUB de PDGF-D; y en la que la construcción y el dominio de unión a RTK se unen al dominio extracelular de al menos un receptor tirosina-cinasa seleccionado del grupo que consiste en: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-alfa y PDGFR-beta. Será evidente que no se requiere que la construcción de esta realización tenga un dominio flanqueante (aunque las construcciones de esta realización comprenden opcionalmente además un dominio flanqueante).

En algunas realizaciones, el dominio CUB está conectado al extremo N del dominio de unión a RTK, mientras que en otras realizaciones el dominio CUB está conectado al extremo C del dominio de unión a RTK. En una realización, el dominio CUB comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a la secuencia de aminoácidos expuesta en tanto SEQ ID NO: 54 como SEQ ID NO: 56.

- 5 En realizaciones particulares, el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a los aminoácidos 27 a 127 de la secuencia de aminoácidos de VEGF109 de SEQ ID NO: 52.

En otras realizaciones particulares, el polipéptido de la construcción quimérica comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 57, 59 y 61.

- 10 En algunas realizaciones, el dominio CUB está unido al dominio de unión a RTK mediante una secuencia de reconocimiento reconocida específicamente por una enzima proteolítica de forma que la enzima proteolítica, si está presente, se escinde en la secuencia de reconocimiento para eliminar el dominio CUB y producir un factor de crecimiento activado.

- 15 Se contempla particularmente que cualquiera de las construcciones y polipéptidos de la invención puedan prepararse para incluir adicionalmente una marca de péptido, por ejemplo, una marca de polihistidina. La inclusión de una marca tal facilita la purificación. En realizaciones adicionales, las construcciones o polipéptidos pueden estar PEGilados con uno o más restos de polietilenglicol (PEG).

- 20 Las construcciones y polipéptidos de la presente invención pueden formularse ventajosamente en composiciones en las que tales composiciones comprenden una construcción de polipéptido de la invención en un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

- 25 Las construcciones de la invención comprenden dominios de polipéptidos y se preparan opcionalmente mediante técnicas recombinantes *in vitro* y/o se expresan *in vivo*. Los polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican toda (o una parte de) una construcción son un aspecto adicional de la invención. Los vectores que incluyen vectores de expresión para la producción *in vitro* y los vectores de terapia génica para la producción/expresión *in vivo* de construcciones también son un aspecto de la invención.

- 30 Por ejemplo, la invención incluye polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquier polipéptido quimérico de la invención que incluye un polipéptido quimérico de fórmula Fn-L-RTK-L-Fc, o un polipéptido quimérico designado "CUB-VEGF", como se trata anteriormente y se describe en más detalle en la descripción más adelante. En realizaciones específicas, el polinucleótido comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal fusionado en marco con los polipéptidos descritos anteriormente. El péptido señal facilita la secreción extracelular de la construcción codificada cuando se expresa en una célula huésped adecuada.

- 35 La invención también incluye un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquier polipéptido quimérico de la invención que incluye un polipéptido quimérico de fórmula Fn-L-RTK-L-Fc, o un polipéptido quimérico designado "CUB-VEGF", ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión o secuencia promotora. En algunas variaciones se usa un promotor específico de tejido para preparar un polinucleótido que codifica una construcción y que se expresa preferencialmente en uno o algunos tejidos de un organismo; tal como piel (para la cicatrización), músculo (para isquemia), células endoteliales, neuronas u otros tejidos. En ciertas realizaciones, la secuencia promotora es un promotor específico de la piel seleccionado del grupo que consiste en K14, K5, K6, K16 y el promotor de colágeno alfa 1 (I). En otras realizaciones, el promotor es un promotor específico de células endoteliales. El vector de expresión puede ser cualquier vector usado para la expresión de un ácido nucleico y puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en vectores adenovíricos deficientes en la replicación, vectores víricos adenoasociados y vectores de lentivirus. Los polinucleótidos y vectores de la invención pueden formularse como composiciones en las que los polinucleótidos o el vector se presentan en un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

- 45 Otros aspectos de la invención incluyen células huésped que han sido transformadas o transfectadas con un polinucleótido o vector de la invención. En algunas variaciones, las células son cualquier célula procariota o eucariota que pueda ser manipulada (por ejemplo, mediante transformación o transfección) para expresar construcciones de polipéptidos de la invención. En algunas variaciones, las células son adecuadas para transfección/transformación *ex vivo* y reimplantación en un organismo huésped. Por ejemplo, en una variación, las células huésped son células endoteliales de mamífero o células precursoras endoteliales de mamífero. En otra variación, las células son células de músculo o neuronales o precursores.

- 50 Otros aspectos de la invención se refieren a procedimientos de modulación del crecimiento de células endoteliales de mamífero o células precursoras endoteliales de mamífero usando construcciones de la invención o usando polinucleótidos/vectores que codifican las construcciones. Un procedimiento a modo de ejemplo comprende poner en contacto las células con una composición que comprende uno o más de lo siguiente: una construcción de polipéptido que comprende un dominio de unión a RTK, al menos un dominio flanqueante y al menos un enlace que conecta el dominio de unión a RTK con el al menos un dominio flanqueante; un polipéptido quimérico que

comprende la fórmula Fn-L-RTK-L-Fc; un polinucleótido que codifica un polipéptido quimérico tal; un vector de expresión que contiene un polinucleótido tal ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y una célula transformada o transfectada con un polinucleótido tal o un vector tal que expresa la construcción de polipéptido. En ciertas realizaciones, el poner en contacto comprende administrar la composición a un sujeto mamífero en una cantidad eficaz para modular el crecimiento de células endoteliales *in vivo*. En realizaciones particulares, el sujeto mamífero es un ser humano.

También se contempla como parte de la invención un procedimiento de modulación de la angiogénesis en un sujeto mamífero que comprende administrar a un sujeto mamífero en necesidad de modulación de la angiogénesis una composición, en una cantidad eficaz para modular la angiogénesis, que comprende uno o más de lo siguiente: cualquier construcción de la invención; un polinucleótido que codifica una construcción tal; un vector de expresión que contiene un polinucleótido tal ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y una célula transformada o transfectada con un polinucleótido tal o un vector tal que expresa la construcción de polipéptido.

Otras realizaciones de la invención se refieren a procedimientos de modulación de la linfangiogénesis en un sujeto mamífero que comprende administrar a un sujeto mamífero en necesidad de modulación de la linfangiogénesis una composición en una cantidad eficaz para modular la linfangiogénesis, que comprende uno o más de lo siguiente: cualquier construcción de la invención; un polinucleótido que codifica una construcción tal; un vector de expresión que contiene un polinucleótido tal ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y una célula transformada o transfectada con un polinucleótido tal o un vector tal que expresa la construcción de polipéptido.

También se contempla en este documento un procedimiento de mejora de la curación de un injerto de piel o colgajo de piel al tejido subyacente de un sujeto mamífero que comprende poner en contacto el injerto de piel o colgajo de piel tejido al tejido subyacente con una composición que comprende un agente de curación que está presente en dicha composición en una cantidad eficaz para reducir el edema o aumentar la perfusión en el injerto de piel o colgajo de piel, mejorando así la curación del injerto de piel o colgajo de piel; en el que el agente de curación comprende uno o más de lo siguiente: cualquier construcción de la invención; un polinucleótido que codifica una construcción tal; un vector de expresión que contiene un polinucleótido tal ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y una célula transformada o transfectada con un polinucleótido tal o un vector tal que expresa la construcción de polipéptido.

También se contempla una mejora en un dispositivo médico para mejorar la circulación, cicatrización o circulación sanguínea que comprende recubrir o impregnar el dispositivo con una composición que comprende uno o más de lo siguiente: cualquier construcción de la invención; un polinucleótido que codifica una construcción tal; un vector de expresión que contiene un polinucleótido tal ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y una célula transformada o transfectada con un polinucleótido tal o un vector tal que expresa la construcción de polipéptido.

Otros aspectos de la invención incluyen un parche que comprende un material de almohadilla que tiene una superficie superior y una superficie inferior, un adhesivo sobre la superficie inferior y una composición terapéutica, en el que la composición comprende uno o más de lo siguiente: cualquier construcción de la invención; un polinucleótido que codifica una construcción tal; un vector de expresión que contiene un polinucleótido tal ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y una célula transformada o transfectada con un polinucleótido tal o un vector tal que expresa la construcción de polipéptido.

Todavía otro aspecto de la invención es un hilo de sutura quirúrgica impregnado con una composición, en el que la composición comprende uno o más de lo siguiente: cualquier construcción de la invención; un polinucleótido que codifica una construcción tal; un vector de expresión que contiene un polinucleótido tal ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y una célula transformada o transfectada con un polinucleótido tal o un vector tal que expresa la construcción de polipéptido.

Otro aspecto de la invención incluye procedimientos y composiciones para antagonizar un receptor para un factor de crecimiento de la familia de PDGF/VEGF, comprendiendo el procedimiento proporcionar una construcción de la invención que inhibe la unión de un factor de crecimiento a su receptor respectivo. En algunas realizaciones, la invención incluye procedimientos para antagonizar en una célula al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- α y PDGFR- β , en el que el procedimiento comprende administrar a la célula un agente seleccionado del grupo que consiste en una construcción de CUB-VEGF; un dímero que comprende dos polipéptidos quiméricos de la invención, un polinucleótido que codifica una construcción tal; un vector de expresión que contiene un polinucleótido tal ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y una célula transformada o transfectada con un polinucleótido tal o un vector tal que expresa la construcción de polipéptido.

En otras realizaciones, la invención incluye un procedimiento para bloquear la unión de PDGF-D a PDGFR- α , pero no a PDGFR- β , en una célula en la que están presentes tanto PDGFR- α como PDGFR- β , comprendiendo el procedimiento administrar a la célula un agente seleccionado del grupo seleccionado del grupo que consiste en una construcción de CUB-VEGF; un dímero que comprende dos polipéptidos quiméricos de la invención, un polinucleótido que codifica una construcción tal; un vector de expresión que contiene un polinucleótido tal ligado

operativamente a una secuencia de control de la expresión; y una célula transformada o transfectada con un polinucleótido tal o un vector tal que expresa la construcción de polipéptido.

Todavía otro aspecto de la invención incluye un procedimiento para modular actividades de un receptor de una célula cuyo receptor se une específicamente a y es activado por un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en PDGF-A, PDGF-B, el dominio de homología con VEGF de PDGF-C, VEGF, VEGF-B, VEGF-C y PIGF, comprendiendo el procedimiento administrar a la célula un agente seleccionado del grupo que consiste en una construcción de CUB-VEGF; un dímero que comprende dos polipéptidos quiméricos de la invención, un polinucleótido que codifica una construcción tal; un vector de expresión que contiene un polinucleótido tal ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y una célula transformada o transfectada con un polinucleótido tal o un vector tal que expresa la construcción de polipéptido; y proveer a la célula de una enzima proteolítica, por lo que se activa el factor de crecimiento.

En este documento también se describe el descubrimiento de que PDGF-D completamente procesado se une a y activa tanto PDGFR- α como PDGFR- β . Por consiguiente, en este documento se describen moléculas de PDGF-D completamente procesadas, composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas y el uso de las mismas para regular PDGFR- α .

Aspectos adicionales de la invención se definen o se resumen en los siguientes párrafos numerados:

1. Una construcción que comprende:

un dominio de unión a RTK, al menos un dominio flanqueante y al menos un enlace que conecta el dominio de unión a RTK con el al menos un dominio flanqueante;

en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-A de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-B de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-C de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-D de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-E de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PIGF de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PDGF-A de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PDGF-B de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PDGF-C de mamífero; y secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PDGF-D de mamífero;

en la que la construcción y el dominio de unión a RTK se unen al dominio extracelular de al menos un receptor tirosina-cinasa seleccionado del grupo que consiste en: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-alfa y PDGFR-beta; y

en la que el al menos un dominio flanqueante comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: un propéptido del extremo amino de VEGF-C de mamífero; un propéptido del extremo carboxi de VEGF-C de mamífero; un propéptido del extremo amino de VEGF-D de mamífero; un propéptido del extremo carboxi de VEGF-D de mamífero; un péptido LAP TGF- β 1 de mamífero; y fragmentos de los mismos que son eficaces para unir proteínas de la matriz extracelular o proteínas de neuropilina;

con la condición de que cuando el dominio de unión a RTK sea idéntico al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-C, el al menos un dominio flanqueante no sea idéntico al menos el 90% a un propéptido de VEGF-C; y cuando el dominio de unión a RTK sea idéntico al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-D, el al menos un dominio flanqueante no sea idéntico al menos el 90% a un pro-péptido de VEGF-D.

2. Una construcción según el párrafo 1, en la que al menos un dominio flanqueante comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: un amino-pro-péptido de VEGF-C de mamífero; un carboxi-pro-péptido de VEGF-C de mamífero; un amino-pro-péptido de VEGF-D de mamífero; y un carboxi-pro-péptido de VEGF-D de mamífero.

3. Una construcción según el párrafo 1 o el párrafo 2 que comprende además un dominio de unión a heparina conectado a la construcción por un enlace.

4. Una construcción según uno cualquiera de los párrafos 1-3 que comprende además un dominio CUB conectado a la construcción por un enlace.

5. Una construcción según uno cualquiera de los párrafos 1-4, en la que cada uno del al menos un enlace comprende un enlace peptídico.

6. Una construcción según el párrafo 5, en la que la construcción comprende además un péptido señal.

7. La construcción del párrafo 5 ó 6, en la que la construcción comprende además una marca de péptido.

8. Una construcción según uno cualquiera de los párrafos 5-7, en la que la construcción comprende al menos dos dominios flanqueantes.

9. Una construcción según uno cualquiera de los párrafos 5-8, en la que la construcción satisface la fórmula:

Fn-L-RTK-L-Fc

5 en la que Fn comprende un dominio flanqueante que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: un amino-pro-péptido de VEGF-C de mamífero y un amino-pro-péptido de VEGF-D de mamífero;

10 en la que Fc comprende un dominio flanqueante que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada de un carboxi-pro-péptido de VEGF-C de mamífero y un carboxi-pro-péptido de VEGF-D de mamífero;

en la que RTK comprende el dominio de unión a RTK; y

en la que L comprende el enlace entre el dominio flanqueante y el dominio de unión a RTK.

10. Una construcción según uno cualquiera de los párrafos 5-9, en la que el al menos un dominio flanqueante comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

la secuencia de amino-pro-péptidos de VEGF-C de SEQ ID NO: 46;
la secuencia de carboxi-pro-péptidos de VEGF-C de SEQ ID NO: 47;
la secuencia de amino-pro-péptidos de VEGF-D de SEQ ID NO: 48; y
la secuencia de carboxi-pro-péptidos de VEGF-D de SEQ ID NO: 49.

20 11. Una construcción según uno cualquiera de los párrafos 5-10,

en la que el polipéptido quimérico se une a VEGFR-1 o VEGFR-2;

en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

25 (a) aminoácidos 27 a 147 de la secuencia de aminoácidos de VEGF121 de SEQ ID NO: 4;
(b) aminoácidos 27 a 171 de la secuencia de aminoácidos de VEGF145 de SEQ ID NO: 5;
(c) aminoácidos 27 a 191 de la secuencia de aminoácidos de VEGF165 de SEQ ID NO: 6;
(d) aminoácidos 27 a 215 de la secuencia de aminoácidos de VEGF189 de SEQ ID NO: 7;
(e) aminoácidos 27-232 de la secuencia de aminoácidos de VEGF206 de SEQ ID NO: 3; y
(f) fragmentos de (a) - (e) que se unen a VEGFR-1 o VEGFR-2.

30 12. Una construcción según uno cualquiera de los párrafos 1-11 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 27.

13. Una construcción según uno cualquiera de los párrafos 5-10,

en la que el polipéptido quimérico se une a VEGFR-1 o VEGFR-2; y

35 en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

40 (a) aminoácidos 22 a 188 de la secuencia de aminoácidos de VEGF-B167 de SEQ ID NO: 44;
(b) aminoácidos 22 a 207 de la secuencia de aminoácidos de VEGF-B186 de SEQ ID NO: 45;
(c) aminoácidos 19 a 149 de la secuencia de aminoácidos de PIGF-1 de SEQ ID NO: 9;
(d) aminoácidos 19 a 170 de la secuencia de aminoácidos de PIGF-2 de SEQ ID NO: 42;
(e) aminoácidos 19 a 221 de la secuencia de aminoácidos de PIGF-3 de SEQ ID NO: 43; y
(f) fragmentos de (a) - (e) que se unen a VEGFR-1 o VEGFR-2.

14. Una construcción según uno cualquiera de los párrafos 5-10,

en la que el polipéptido quimérico se une a PDGFR-alfa o PDGFR-beta; y

45 en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

(a) aminoácidos 87 a 211 de la secuencia de aminoácidos de PDGF-A de SEQ ID NO: 17;
(b) aminoácidos 82 a 190 de la secuencia de aminoácidos de PDGF-B de SEQ ID NO: 19;
(c) aminoácidos 230 a 345 de la secuencia de aminoácidos de PDGF-C de SEQ ID NO: 21;
(d) aminoácidos 255 a 370 de la secuencia de aminoácidos de PDGF-D de SEQ ID NO: 24; y

(e) fragmentos de (a) - (d) que se unen a PDGFR-alfa o PDGFR-beta.

15. Una construcción según uno cualquiera de los párrafos 5-10,

en la que el polipéptido quimérico se une a VEGFR-3 o VEGFR-2; y

en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) aminoácidos 103 a 227 de la secuencia de aminoácidos de VEGF-C de SEQ ID NO: 13;
- (b) aminoácidos 93 a 201 de la secuencia de aminoácidos de VEGF-D de SEQ ID NO: 15; y
- (c) fragmentos de (a) - (b) que se unen a VEGFR-3 o VEGFR-2.

16. Una construcción según el párrafo 15 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en

- (a) la secuencia de aminoácidos de la construcción CDD de SEQ ID NO 37;
- (b) la secuencia de aminoácidos de la construcción CDC de SEQ ID NO: 39; y,
- (c) la secuencia de aminoácidos de la construcción DDC de SEQ ID NO: 41.

17. Una composición que comprende la construcción de uno cualquiera de los párrafos 1-16 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

18. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la construcción de uno cualquiera de los párrafos 1-16, en el que la construcción comprende un polipéptido.

19. Un polinucleótido según el párrafo 18, en el que el polinucleótido comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal fusionado en marco con el polipéptido.

20. Un polinucleótido según el párrafo 18 ó 19 que comprende además una secuencia promotora que promueve la expresión del polinucleótido en una célula de mamífero.

21. Un polinucleótido según el párrafo 20, en el que la secuencia promotora comprende un promotor específico de la piel.

22. Un polinucleótido según el párrafo 21, en el que el promotor se selecciona del grupo que consiste en K14, K5, K6, K16 y promotor del colágeno alfa 1(I).

23. Un polinucleótido según el párrafo 20, en el que el promotor es un promotor específico de células endoteliales.

24. Un vector que comprende el polinucleótido de uno cualquiera de los párrafos 18-23.

25. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de uno cualquiera de los párrafos 18-23 ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión.

26. Un vector de expresión del párrafo 25, en el que la secuencia de control de la expresión comprende un promotor específico de células endoteliales.

27. Un vector de uno cualquiera de los párrafos 24-26 seleccionado del grupo que consiste en vectores adenovíricos deficientes en la replicación, vectores víricos adenoasociados y vectores de lentivirus.

28. Una composición que comprende el polinucleótido de uno cualquiera de los párrafos 18-23 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

29. Una composición que comprende el vector de uno cualquiera de los párrafos 24-27 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

30. Una célula huésped transformada o transfectada con el polinucleótido de uno cualquiera de los párrafos 18-23.

31. Una célula huésped transformada o transfectada con el vector de uno cualquiera de los párrafos 24-27.

32. Una célula huésped según el párrafo 31 que expresa el polipéptido codificado por el polinucleótido.

33. Una célula huésped según uno cualquiera de los párrafos 30-32 que comprende una célula endotelial o célula precursora endotelial de mamífero.

34. Una composición que comprende un miembro seleccionado del grupo que consiste en: (a) la construcción de uno cualquiera de los párrafos 1-16 y 44-54; (b) un polinucleótido que codifica (a); (c) un vector de expresión que contiene (b) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y (d) una célula transformada o transfectada con (b) o (c) y que expresa el polipéptido de (a) para uso en un procedimiento de modulación del

crecimiento de células endoteliales de mamífero o células precursoras endoteliales de mamífero.

36. Un procedimiento del párrafo 34, en el que el sujeto mamífero es un ser humano.

37. Una composición que comprende un miembro seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 (a) la construcción de uno cualquiera de los párrafos 1-16 y 43-54;
(b) un polinucleótido que codifica (a);
(c) un vector de expresión que contiene (b) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y
(d) una célula transformada o transfectada con (b) o (c) y que expresa el polipéptido de (a);

10 en la que la composición se administra en una cantidad eficaz para modular angiogénesis para uso en un procedimiento de modulación de la angiogénesis en un sujeto mamífero.

38. Una composición que comprende un miembro seleccionado del grupo que consiste en:

- 15 (a) la construcción de uno cualquiera de los párrafos 1-16 y 43-54;
(b) un polinucleótido que codifica (a);
(c) un vector de expresión que contiene (b) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y
(d) una célula transformada o transfectada con (b) o (c) y que expresa el polipéptido de (a);

en la que la composición se administra en una cantidad eficaz para modular linfangiogénesis procedimiento de modulación de la linfangiogénesis en un sujeto mamífero.

39. Un agente de curación seleccionado del grupo que consiste en:

- 20 (a) la construcción de uno cualquiera de los párrafos 1-16 y 43-54;
(b) un polinucleótido que codifica (a);
(c) un vector de expresión que contiene (b) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y
(d) una célula transformada o transfectada con (b) o (c) y que expresa el polipéptido de (a)

25 para uso en un procedimiento de mejora de la cicatrización de un injerto de piel o colgajo de piel al tejido subyacente de un sujeto mamífero.

40. Un dispositivo médico para mejorar la circulación, cicatrización o circulación sanguínea que comprende recubrir o impregnar el dispositivo con una composición que comprende un agente angiogénico seleccionado del grupo que consiste en:

- 30 (a) la construcción de uno cualquiera de los párrafos 1-16 y 43-54;
(b) un polinucleótido que codifica (a);
(c) un vector de expresión que contiene (b) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y
(d) una célula transformada o transfectada con (b) o (c) y que expresa el polipéptido de (a).

35 41. Un parche que comprende un material de almohadilla que tiene una superficie superior y una superficie inferior, un adhesivo sobre la superficie inferior y una composición terapéutica,

en el que la composición comprende un agente de cicatrización seleccionado del grupo que consiste en

- 40 (a) la construcción de uno cualquiera de los párrafos 1-16 y 43-54;
(b) un polinucleótido que codifica (a);
(c) un vector de expresión que contiene (b) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y
(d) una célula transformada o transfectada con (b) o (c) y que expresa el polipéptido de (a).

42. Un hilo de sutura quirúrgica recubierto o impregnado con una composición,

en el que la composición comprende un agente de curación seleccionado del grupo que consiste en:

- 45 (a) la construcción de uno cualquiera de los párrafos 1-16 y 43-54;
(b) un polinucleótido que codifica (a);
(c) un vector de expresión que contiene (b) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y
(d) una célula transformada o transfectada con (b) o (c) y que expresa el polipéptido de (a).

50 43. Una construcción que comprende:

un dominio de unión a RTK, un dominio CUB y al menos un enlace que conecta el dominio de unión a RTK con el dominio CUB;

5 en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-A de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-B de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-C de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-D de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-E de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PIGF de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PDGF-A de mamífero; y secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PDGF-B de mamífero;

10 en la que el dominio CUB comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos del dominio CUB de PDGF-C y secuencias de aminoácidos del dominio CUB de PDGF-D; y

15 en la que la construcción y el dominio de unión a RTK se unen al dominio extracelular de al menos un receptor tirosina-cinasa seleccionado del grupo que consiste en: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-alfa y PDGFR-beta.

44. La construcción según el párrafo 43, en la que el dominio CUB está conectado al extremo N del dominio de unión a RTK.

20 45. La construcción según el párrafo 43, en la que el dominio CUB está conectado al extremo C del dominio de unión a RTK.

46. La construcción según uno cualquiera de los párrafos 43-45, en la que el dominio CUB comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 53.

47. La construcción según uno cualquiera de los párrafos 43-45, en la que el dominio CUB comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 55.

25 48. La construcción según uno cualquiera de los párrafos 1-11 y 43-47, en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a los aminoácidos 27 a 127 de la secuencia de aminoácidos de VEGF109 de SEQ ID NO: 52:

49. La construcción según uno cualquiera de los párrafos 43-48 que comprende además un dominio de unión a heparina conectado a la construcción por un enlace.

30 50. Una construcción según uno cualquiera de los párrafos 43-49, en la que el enlace comprende un enlace peptídico, por lo que el dominio de unión a RTK y el dominio CUB comprenden un polipéptido quimérico.

51. La construcción según el párrafo 50, en la que el polipéptido quimérico comprende además un péptido señal.

52. La construcción del párrafo 51, en la que el polipéptido quimérico comprende además una marca de péptido.

35 53. La construcción según el párrafo 48, en la que la construcción comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 57, 59 y 61.

54. La construcción según los párrafos 43-53, en la que el dominio CUB está conectado al factor de crecimiento mediante una secuencia de reconocimiento reconocida específicamente por una enzima proteolítica de forma que la enzima proteolítica, si está presente, se escinde en la secuencia de reconocimiento para eliminar el dominio CUB y producir un factor de crecimiento activado.

40 55. Un dímero que comprende dos polipéptidos de construcción de los párrafos 5-15 y 49-54.

56. El dímero del párrafo 54, que es un homodímero.

57. El dímero del párrafo 54, que es un heterodímero.

58. Un agente seleccionado del grupo que consiste en:

- 45 (a) la construcción de uno cualquiera de los párrafos 43-54;
 (b) el dímero de una cualquiera de las reivindicaciones 55-57;
 (c) un polinucleótido que codifica (a);
 (d) un vector de expresión que contiene (b) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y
 50 (e) una célula transformada o transfectada con (b) o (c) y que expresa el polipéptido de (a) para uso en un procedimiento para antagonizar en una célula al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en

VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- α y PDGFR- β .

59. Un agente seleccionado del grupo que consiste en: (a) la construcción de uno cualquiera de los párrafos 43-54; (b) el dímero de una cualquiera de las reivindicaciones 55-57; (c) un polinucleótido que codifica (a); (d) un vector de expresión que contiene (b) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y (e) una célula transformada o transfectada con (b) o (c) y que expresa el polipéptido de (a) para uso en un procedimiento para bloquear la unión de PDGF-D a PDGFR- α , pero no a PDGFR- β , en una célula cuando están presentes tanto PDGFR- α como PDGFR- β .

60. Un agente seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) la construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 43-54;
 (b) el dímero de una cualquiera de las reivindicaciones 55-57;
 (c) un polinucleótido que codifica (a);
 (b) un vector de expresión que contiene (c) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y
 (e) una célula transformada o transfectada con (c) o (d) y que expresa el polipéptido de (a); y
- proveyendo a la célula de una enzima proteolítica, por lo que el factor de crecimiento se activa para uso en un procedimiento para modular actividades de un receptor de una célula cuyo receptor se une específicamente a y es activado por un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en PDGF-A, PDGF-B, el dominio de homología con VEGF de PDGF-C, VEGF, VEGF-B, VEGF-C y PIGF.

El anterior resumen no pretende definir cada aspecto de la invención, y aspectos adicionales se describen en otras secciones tales como la descripción detallada. Todo el documento pretende referirse a una divulgación unificada, y debe entenderse que se contemplan todas las combinaciones de características descritas en este documento aunque la combinación de características no se encuentren juntas en la misma frase o párrafo o sección de este documento.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y están incluidos para ilustrar adicionalmente aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a los dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en este documento.

- Fig. 1A: Representación esquemática de un polipéptido quimérico en el que un dominio flanqueante (F) está posicionado en el extremo amino con respecto al dominio de unión al receptor tirosina-cinasa (RTK).
 Fig. 1B: Representación esquemática de un polipéptido quimérico en el que un dominio flanqueante está posicionado en el extremo carboxi con respecto al dominio de unión a RTK.
 Fig. 1C: Representación esquemática de un polipéptido quimérico en el que dos dominios flanqueantes (F₁, F₂) están posicionados con un dominio de unión a RTK central.
 Fig. 1D: Representación esquemática de un polipéptido quimérico en el que dos dominios flanqueantes están ambos posicionados en el extremo amino con respecto al dominio de unión a RTK.
 Fig. 1E: Representación esquemática de un polipéptido quimérico en el que dos dominios flanqueantes están ambos posicionados en el extremo carboxi con respecto al dominio de unión a RTK.
 Fig. 1F: Representación esquemática de un polipéptido quimérico en el que dos dominios de unión a RTK están posicionados con un dominio flanqueante central.
 Fig. 1G: Representación esquemática de un polipéptido quimérico en el que tres dominios flanqueantes están alternando con dos dominios de unión a RTK.
 Figs. 2A-2C: Fotografía que representa los efectos de vectores adenovíricos que codifican tanto VEGF-CAC (Fig. 2A), VEGF-A165 (Fig. 2B) como control (LacZ, Fig. 2C) en la vasculatura sanguínea de piel de ratón.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La invención incluye nuevos materiales (por ejemplo, biomoléculas, composiciones, dispositivos médicos) y procedimientos y usos médicos para modular procesos angiogénicos, además de la modulación del crecimiento y la maduración de células progenitoras.

A. Moléculas quiméricas de la presente invención

Un aspecto de la invención son construcciones (por ejemplo, moléculas o compuestos) compuestas por un dominio de unión al receptor de receptor tirosina-cinasa (RTK) unido a al menos un dominio flanqueante (F) que confieren propiedades biológicas novedosas a las construcciones, en comparación con las propiedades del dominio de RTK solo. La unión se denomina genéricamente en lo sucesivo un enlace (L) y puede ser tan sencilla como un enlace peptídico u oligopéptido que enlaza los dominios para formar una única cadena de polipéptidos quimérica, o pueden ser estructuras más complejas descritas en este documento. Debido a que las construcciones comprenden al menos un RTK y una secuencia flanqueante que no se originan a partir del mismo gen, pero que han sido recombinados, las construcciones se denominan en este documento construcciones "quiméricas" o polipéptidos "quiméricos". Las

construcciones quiméricas de polipéptidos de la invención pueden tener una variedad de estructuras, como se representa por las siguientes fórmulas esquemáticas:

- 5 **F-L-RTK** (un dominio flanqueante posicionado en el extremo amino con respecto al dominio de unión a RTK)
- RTK-L-F** (un dominio flanqueante posicionado en el extremo carboxi con respecto al dominio de unión a RTK)
- F₁-L₁-RTK-L₂-F₂** (dos dominios flanqueantes con un dominio de unión a RTK central)
- F₁-L₁-F₂-L₂-RTK** o **RTK-L₁-F₁-L₂-F₂** (dos dominios flanqueantes, ambos en el extremo amino o ambos en el extremo carboxi con respecto al dominio de unión a RTK).
- 10 **RTK₁-L₁-F₁-L₂-RTK₂** (dos dominios de unión a RTK con un dominio flanqueante central)
- F₁-L₁-RTK₁-L₂-F₂-L₃-RTK₂-L₄-F₃** (dos dominios de unión a RTK, tres dominios flanqueantes, alternos)

Otras estructuras que varían de los ejemplos anteriores serán rápidamente evidentes.

1. Dominio de unión al receptor tirosina-cinasa (RTK).

- 15 Todos los polipéptidos de VEGF y PDGF que se producen naturalmente pueden usarse para preparar construcciones de la invención, y numerosas de tales secuencias son conocidas, por ejemplo, por Genbank, bibliografía científica y bibliografía de patentes. Los miembros de la familia de VEGF/PDGF preferidos incluyen aquellos de especies aviares y mamíferas y de especies víricas que infectan especies aviares y mamíferas. Especies mamíferas a modo de ejemplo son primates, roedores, especies bovina, equina, canina, porcina y felina.
- 20 Secuencias a modo de ejemplo incluyen (1) todas aquellas secuencias de miembros de la familia de VEGF y PDGF enumeradas en la base de datos accesible al público GENBANK a partir de la fecha de prioridad de la presente solicitud; (2) todas las secuencias de VEGF y PDGF que se hibridan con secuencias humanas específicas identificadas en este documento bajo condiciones de rigurosidad moderadas o altas; y (3) todas las secuencias de VEGF y PDGF que pueden amplificarse a partir de una biblioteca de ADN genómico o ADNc usando PCR y técnicas
- 25 relacionadas y usando cebadores diseñados a partir de regiones altamente conservadas de las secuencias proporcionadas en este documento. Realizaciones altamente preferidas se preparan usando secuencias humanas de VEGF/PDGF y secuencias víricas tales como aquellas descritas en los siguientes párrafos.

- VEGF-A (o VEGF) se purificó originariamente a partir de varias fuentes basándose en su actividad mitogénica hacia células endoteliales, y también por su capacidad para inducir permeabilidad microvascular, de ahí que también se llame factor de permeabilidad vascular (VPF). Posteriormente se ha mostrado que el VEGF-A induce varios procesos biológicos que incluyen la movilización del calcio intracelular, la inducción del activador de plasminógeno y la síntesis del inhibidor 1 del activador de plasminógeno, la promoción de la migración de monocitos *in vitro*, inducción de la expresión de proteínas antiapoptóticas en células endoteliales humanas, inducción de fenestraciones en células endoteliales, promoción de la expresión de moléculas de adhesión a células en células
- 30 endoteliales e inducción de la vasodilatación y la hipotensión mediada por óxido nítrico [Ferrara, J. Mol. Med. 77: 527-543 (1999); Neufeld y col., FASEB. J. 13:9-22 (1999); Zachary, Intl. J. Biochem. Cell. Bio. 30:1169-74 (1998)].

- VEGF-A (SEQ ID NO: 1 y 2) es una glucoproteína homodimérica ligada por disulfuro secretada compuesta por subunidades de 23 kD. Se han descrito cinco isoformas de VEGF-A humano de 121 (SEQ ID NO: 4), 145 (SEQ ID NO: 5), 165 (SEQ ID NO: 6), 189 (SEQ ID NO: 7) o 206 (SEQ ID NO: 3) aminoácidos de longitud (VEGF₁₂₁₋₂₀₆), codificadas por distintas variantes de corte y empalme de ARNm, pudiendo todas estimular la mitogénesis en células endoteliales. Sin embargo, cada isoforma se diferencia en su actividad biológica, especificidad por receptor y afinidad por proteoglicanos de sulfato de heparano asociados a la superficie celular y a la matriz extracelular que se comportan como receptores de baja afinidad por VEGF-A. VEGF₁₂₁ no se une ni a heparina ni a sulfato de heparano; VEGF₁₄₅ y VEGF₁₆₅ (nº de acceso de GenBank M32977) pueden unirse ambos a heparina; y VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆
- 40 muestran la afinidad más fuerte por heparina y sulfatos de heparano. VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, y VEGF₁₆₅ son secretados en una forma soluble, aunque la mayoría del VEGF₁₆₅ está confinado en proteoglicanos de la superficie celular y de la matriz extracelular, mientras que VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ siguen asociados a la matriz extracelular. Tanto VEGF₁₈₉ como VEGF₂₀₆ pueden liberarse mediante tratamiento con heparina o heparinasa, que indica que estas isoformas están unidas a la matriz extracelular mediante proteoglicanos. El VEGF₁₈₉ unido a células también puede escindirse por proteasas tales como plasmina, produciendo la liberación de un VEGF₁₁₀ soluble activo. Se observa que la mayoría de los tejidos que expresan VEGF expresan simultáneamente varias isoformas de VEGF, aunque VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅ son las formas predominantes, mientras que VEGF₂₀₆ es raramente detectado (Ferrara, J Mol Med 77:527-543, 1999). VEGF₁₄₅ se diferencia en que se expresa principalmente en células derivadas de órganos reproductores (Neufeld y col., FASEB J 13:9-22, 1999).

- 55 Como se observa anteriormente, el gen VEGF-A humano se expresa como numerosas isoformas, que incluyen VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆. Una secuencia humana de VEGF₂₀₆ obtenida de la base de datos Swiss

Prot (nº de acceso P15692) se expone a continuación y en SEQ ID NO: 3:

```

1  mnflslswvhw slalllylhh akwsqaapma eggqgnhhev vkfmdvyqrs ychpietlvd
61  ifqeypdeie yifkpscpl mrcggccnde glecvtptes nitmqimrik phggghigem
121 sflqhnkcec rpkkdrarqe kksvrgkgkg qkrkrkksry kswsvyvgar cclmpwslpg
181 phpcgpcser rkhlfvqdpq tckscskntd srckarqllel nertcrckdp rr

```

Los aminoácidos 1-26 de esta secuencia representan el péptido señal y VEGF₂₀₆ maduro comprende los aminoácidos 27-232. Con referencia a la misma secuencia, el péptido señal y los aminoácidos 142-226 están ausentes en la isoforma madura VEGF₁₂₁ (SEQ ID NO: 4). El péptido señal y los aminoácidos 166-226 están ausentes en la isoforma madura VEGF₁₄₅ (SEQ ID NO: 5). El péptido señal y los aminoácidos 142-182 están ausentes en la isoforma madura VEGF₁₆₅ (SEQ ID NO: 6). El péptido señal y los aminoácidos 166-182 están ausentes en la isoforma madura VEGF₁₈₉ (SEQ ID NO: 7).

VEGF₁₀₉, que sólo comprende el dominio de homología con VEGF (es decir, el dominio de unión al receptor mínimo), se ha probado para la actividad angiogénica en un ensayo de CAM de pollo, pero los resultados indicaron que era menos angiogénico que VEGF₁₆₅ (Jeltsch y col., J. Biol. Chem., 281, 12187-95, 2006).

VEGF-A es un ligando para VEGFR-1/Flt-1 (tirosina cinasa 1 similar a *fms*) y VEGFR-2/Kdr/Flk-1 (dominio de inserto de cinasa que contiene receptor/cinasa 1 de hígado fetal). La expresión de receptores de VEGF se produce principalmente en células endoteliales vasculares, aunque algunos pueden estar presentes en monocitos y células de melanoma. Sólo se ha informado que las células endoteliales proliferan en respuesta a VEGF, y las células endoteliales de diferentes fuentes muestran diferentes respuestas. Por tanto, las señales mediadas por VEGFR-1 y VEGFR-2 parecen ser específicas del tipo de célula.

PlGF (SEQ ID NO: 8 y 9), un segundo miembro de la subfamilia de VEGF, es generalmente un mal estimulador de la angiogénesis y proliferación de células endoteliales en comparación con VEGF-A, y la función *in vivo* de PlGF no se entiende bien. Su aislamiento y características se describen en detalle en Maglione y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9267-9271, 1991. PlGF-2 (SEQ ID NO: 42) y PlGF-3 (SEQ ID NO: 43) se producen por corte y empalme alternativo de ARNm (Hauser y col., Growth Factors 9:259-268, 1993; Maglione y col., Oncogene 8:925-931, 1993). PlGF forma tanto homodímeros como heterodímeros ligados por disulfuro con VEGF-A. Los heterodímeros de PlGF-VEGF-A son más eficaces en la inducción de la proliferación de células endoteliales y la angiogénesis que los homodímeros de PlGF. PlGF se expresa principalmente en la placenta, y también se coexpresa con VEGF-A durante la embriogénesis temprana en las células gigantes trofoblásticas del saco vitelino parietal (Stacker y Achen, Growth Factors 17:1-11, 1999).

VEGF-B (SEQ ID NO: 10 y 11), descrito en detalle en la publicación de patente internacional nº WO 96/26736 y las patentes de EE.UU. 5.840.693 y 5.607.918, incorporados en este documento por referencia, comparte aproximadamente el 44% de identidad de aminoácidos con VEGF-A. Aunque las funciones biológicas de VEGF-B *in vivo* siguen sin entenderse completamente, se ha mostrado que tiene propiedades angiogénicas y también puede participar en la adhesión y migración de células y en la regulación de la degradación de la matriz extracelular. VEGF-B se expresa como dos isoformas de 167 y 186 residuos de aminoácidos generadas por corte y empalme alternativo. VEGF-B₁₆₇ (SEQ ID NO: 44) está asociado a la superficie celular o matriz extracelular mediante un dominio de unión a heparina, mientras que VEGF-B₁₈₆ (SEQ ID NO: 45) es secretado. Tanto VEGF-B₁₆₇ como VEGF-B₁₈₆ pueden formar homodímeros o heterodímeros ligados por disulfuro con VEGF-A. La asociación a la superficie celular de los heterodímeros VEGF₁₆₅-VEGF-B₁₆₇ parece estar determinada por el componente de VEGF-B, sugiriendo que la heterodimerización puede ser importante para secuestrar VEGF-A. VEGF-B se expresa principalmente en tejidos de músculo cardíaco y esquelético embrionario y adulto (Joukov y col., J Cell Physiol 173:211-215, 1997; Stacker y Achen, (antes). Los ratones que carecen de VEGF-B sobreviven, pero tienen corazones más pequeños, vasculatura coronaria disfuncional y presentan recuperación alterada de isquemia cardíaca (Bellomo y col., Circ Res., E29-E35, 2000).

VEGF-B tiene propiedades angiogénicas y otras propiedades similares a las de VEGF, pero está distribuido y se expresa en los tejidos de forma diferente a VEGF. En particular, VEGF-B se expresa muy fuertemente en el corazón, y sólo débilmente en el pulmón, mientras que la inversa es el caso para VEGF. Esto sugiere que VEGF y VEGF-B, a pesar del hecho de que se coexpresen en muchos tejidos, pueden tener diferencias funcionales.

VEGF-C (SEQ ID NO: 12 y 13) se aisló de medios condicionados de la línea de células de adenocarcinoma de próstata PC-3 (CRL1435) seleccionando un componente del medio que produjo la fosforilación de la tirosina del receptor tirosina-cinasa Flt4 específico de células endoteliales (VEGFR-3) usando células transfectadas para expresar Flt4. El aislamiento de VEGF-C y las características se describen en detalle en Joukov y col., EMBO J. 15 290-298, 1996 y las patentes de EE.UU. nº 6.221.839; 6.235.713; 6.361.946; 6.403.088; y 6.645.933 y las publicaciones de patente internacional nº WO 97/05250, WO 98/07832 y WO 98/01973, incorporados en este documento por referencia. En embriones de ratón, el ARNm de VEGF-C se expresa principalmente en el alantoides, el área yugular y el metanefros. (Joukov y col., J Cell Physiol 173:211-215, 1997), y parece que participa en la

regulación de la angiogénesis linfática (Jeltsch y col., Science, 276:1423-1425, 1997). Como se describe más adelante en mayor detalle, el dominio de unión a RTK de VEGF-C maduro se corresponde con los residuos 103-227 de SEQ ID NO: 14.

VEGF-D (SEQ ID NO: 14 y 15) se expresa inicialmente como un prepro-péptido que experimenta la eliminación de un péptido señal (residuos 1-21 de SEQ ID NO: 15), procesamiento proteolítico del extremo N (residuos 22-92 de SEQ ID NO: 15) y del extremo C (residuos 202-354 de SEQ ID NO: 15) y forma dímeros ligados no covalentemente. VEGF-D estimula respuestas mitogénicas en células endoteliales *in vitro*. Durante la embriogénesis, VEGF-D se expresa en un complejo patrón temporal y espacial, y su expresión persiste en el corazón, pulmón y los músculos esqueléticos en adultos. El aislamiento de un fragmento biológicamente activo de VEGF-D designado VEGF-D Δ N Δ C se describe en la publicación de patente internacional nº WO 98/07832 (PCT/US97/14696). VEGF-D Δ N Δ C consiste en los residuos de los aminoácidos 93 a 201 de VEGF-D (SEQ ID NO: 15) y se une a VEGFR-2 y VEGFR-3. Las formas parcialmente procesadas de VEGF-D se unen a VEGFR-3.

Los fragmentos preferidos de VEGF-C o -D para uso en la preparación de las moléculas quiméricas de la invención son fragmentos continuos que se unen a uno o más de los receptores de VEGF. Sin embargo, se ha demostrado que la unión a VEGFR puede lograrse con moléculas que incorporan fragmentos discontinuos discretos de VEGF-C fusionados, por ejemplo, con fragmentos de VEGF-A u otras secuencias de aminoácidos. Tales ligandos de VEGFR quiméricos se describen en la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 09/795.006 presentada el 26 de febrero de 2001 y la publicación de patente internacional nº WO 01/62942, .

PDGF-A (SEQ ID NO: 16 y 17) y PDGF-B (SEQ ID NO: 19 y 20) pueden homodimerizarse o heterodimerizarse para producir tres isoformas diferentes: PDGF-AA, PDGF-AB o PDGF-BB. PDGF-A solo puede unirse al receptor de PDGF- α (PDGFR- α que incluye homodímeros de PDGFR- α/α). PDGF-B puede unirse tanto a PDGFR- α como a un segundo receptor de PDGF (PDGFR- β). Más específicamente, PDGF-B puede unirse a homodímeros PDGFR- α/α y PDGFR- β/β , además de a heterodímeros PDGFR- α/β .

PDGF-AA y -BB son los principales mitógenos y quimioatrayentes para células de origen mesenquimatoso, pero no tienen efecto, o tienen poco efecto, sobre células de linaje endotelial, aunque tanto PDGFR- α como - β se expresan en células endoteliales (EC). Se ha mostrado que PDGF-BB y PDGF-AB participan en la estabilización/maduración de vasos recientemente formados (Isner y col., Nature 415:234-9, 2002; Vale y col., J Interv Cardiol 14:511-28, 2001); Heldin y col., Physiol Rev 79:1283-1316, 1999; Bethsholtz y col., Bioassays 23:494-507, 2001). Sin embargo, otros datos mostraron que PDGF-BB y PDGF-AA inhibieron la angiogénesis inducida por bFGF *in vivo* mediante la señalización de PDGFR- α . PDGF-AA está entre los estímulos más potentes de la migración de células mesenquimatosas, pero ni estimula o estimula mínimamente la migración de EC. En ciertas condiciones, PDGF-AA incluso inhibe la migración de EC (Thommen y col., J Cell Biochem. 64:403-13, 1997; De Marchis y col., Blood 99:2045-53, 2002; Cao y col., FASEB. J. 16:1575-83, 2002). Además, se ha mostrado que PDGFR- α antagoniza la migración de SMC inducida por PDGFR- β (Yu y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 282:697-700, 2001) y anticuerpos neutralizantes contra PDGF-AA potencian la migración de células de músculo liso (SMC) (Palumbo, R. y col., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 22:405-11, 2002). Por tanto, la actividad angiogénica/arteriogénica de PDGF-A y -B, especialmente cuando se señalizan mediante PDGFR- α , ha sido controvertida y enigmática.

Se ha informado de que PDGF-AA y -BB desempeñan funciones importantes en la proliferación y diferenciación de tanto células madre/progenitoras cardiovasculares como nerviosas. PDGF-BB indujo la diferenciación de Flk1 + citoblastos embrionarios en células murales vasculares (Carmeliet, P., Nature 408:43-45, 2000; Yamashita y col., Nature 408:92-6, 2000) y posiblemente aumentó la supervivencia de neuronas derivada de neuroesferas (Caldwell y col., Nat Biotechnol. 19:475-479, 2001); mientras que PDGF-AA estimuló la proliferación de precursores de oligodendrocitos mediante integrinas $\alpha\beta_3$ (Baron y col., Embo. J. 21:1957-66, 2002).

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para PDGF-C se exponen en SEQ ID NO: 20 y 21, respectivamente, y el nucleótido y aminoácido para PDGF-D se expone en SEQ ID NO: 22 y 23, respectivamente. PDGF-C se une a homodímeros PDGFR- α/α y PDGF-D se une a homodímeros PDGFR- β/β y se ha informado que ambos se unen a heterodímeros PDGFR- α/β . Los polipéptidos y polinucleótidos de PDGF-C fueron caracterizados por Eriksson y col. en la publicación de patente internacional nº WO 00/18212, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2002/0164687 A1 y la solicitud de patente de EE.UU. nº 10/303.997 [publicada como la publicación de patente de EE.UU. nº 2003/0211994]. Los polinucleótidos y polipéptidos de PDGF-D fueron caracterizados por Eriksson y col. en la publicación de patente internacional nº WO 00/27879 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2002/0164710 A1. Como se describe en su interior, PDGF-C y -D se unen a receptores alfa y beta de PDGF, respectivamente. Sin embargo, una distinción notable entre estos polipéptidos y PDGF-A y -B es que PDGF-C y -D poseen cada uno un dominio CUB del extremo amino que puede escindirse proteolíticamente dando un dominio del extremo carboxi biológicamente activo (de unión a receptor) con homología de secuencias con otros miembros de la familia de PDGF. PDGF-C (SEQ ID NO: 21) requiere la eliminación proteolítica del dominio CUB del extremo N para la unión al receptor y la activación del receptor.

Una forma preferida de PDGF-C comprende el dominio de homología con PDGF/VEGF (PVHD) de PDGF-C y retiene las funciones de unión al y activación del receptor. El dominio mínimo tiene aproximadamente los residuos 230-345 de SEQ ID NO: 21. Sin embargo, el dominio puede extenderse hacia el extremo N hasta el residuo 164. El

PVHD de PDGF-C también se denomina en lo sucesivo PDGF-C truncado. El PDGF-C truncado es una forma activada de PDGF-C. Un sitio proteolítico putativo en PDGF-C se encuentra en los residuos 231-234 de SEQ ID NO: 21, un motivo dibásico. El sitio proteolítico putativo también se encuentra en PDGF-A, PDGF-B, VEGF-C y VEGF-D. En estas cuatro proteínas, el sitio proteolítico putativo también se encuentra justo antes del dominio mínimo para el dominio de homología con PDGF/VEGF. El dominio CUB de PDGF-C representa aproximadamente los residuos de aminoácidos 23-159 de SEQ ID NO: 21 (publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº: 2002/0164687).

Similar a PDGF-C, PDGF-D tiene una estructura de dos dominios con un extremo N. El dominio CUB (descrito como aproximadamente los residuos 67-167 ó 54-171 de SEQ ID NO: 23) y un dominio de homología con PDGF/VEGF del extremo C (PVHD). Un sitio proteolítico putativo en PDGF-D se encuentra en los residuos 255-258 de SEQ ID NO: 23. Un polipéptido de PDGF-D preferido comprende el dominio de homología con PDGF/VEGF (PVHD) de PDGF-D y retiene las funciones de unión al y activación del receptor. El dominio mínimo de PDGF-D es aproximadamente los residuos 272-362 ó 255-370 de SEQ ID NO: 23. Sin embargo, PVHD de PDGF-D se extiende hacia el extremo N hasta el residuo 235 de SEQ ID NO: 23. El PDGF-D truncado es la forma activada putativa de PDGF-D (publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2002/0164710.)

PDGF-C y PDGF-D también poseen un inserto de tres aminoácidos (NCA) entre las cisteínas 3 y 4 conservadas en el dominio de homología con VEGF. El VHD de PDGF-C y PDGF-D se parece mucho al de VEGF-C y VEGF-D. PDGF-C requiere la eliminación proteolítica del dominio CUB del extremo N para la unión al receptor y la activación del receptor. Esto indica que es probable que los dominios CUB bloqueen estéricamente los epítopes de unión al receptor del dímero sin procesar. Las proteínas proteolíticamente procesadas *in vitro* e *in vivo* carecen de porciones del extremo N correspondientes a más de 14-16 kDa como se determina por análisis de SDS-PAGE que está de acuerdo con una pérdida del dominio CUB de 110 aminoácidos de longitud y una parte de la región bisagra entre los dominios CUB y de núcleo que varían de longitud.

Esta quinta cisteína "invariante" encontrada en los otros miembros de la familia de PDGF/VEGF no está conservada en PDGF-D. Esta característica es única para PDGF-D. El VHD de PDGF-D se parece mucho al de VEGF-C y VEGF-D. La expresión del ARNm de PDGF-D fue la más alta en el corazón, ovarios y el páncreas, y se expresó a niveles más bajos en los testículos, riñón, hígado, placenta, próstata e intestino delgado.

Durante el desarrollo, PDGF-C se expresa en células progenitoras de músculo y células de músculo liso diferenciadas en la mayoría de los órganos, incluyendo el corazón, pulmón y riñón (Aase y col., Mech. Dev. 110:187-91, 2002). En la edad adulta, PDGF-C se expresa ampliamente en la mayoría de los órganos, con el mayor nivel de expresión en el corazón y el riñón (Li y col., Nat. Cell. Biol. 2:302-09, 2000). PDGF-CC es secretado como un homodímero inactivo de aproximadamente 95 kD. Tras la eliminación proteolítica del dominio CUB, PDGF-CC puede unirse a y activar su receptor, PDGFR- α (Li y col., Cytokine & Growth Factor Reviews 244:1-8, 2003). En células que coexpresan tanto PDGFR- α como - β , PDGF-CC también puede activar el heterodímero PDGFR- α/β , pero no el homodímero PDGFR- β/β (Cao y col., FASEB. J. 16:1575-83, 2002; Gilbertson y col., J. Biol. Chem. 276:27406-14, 2001).

El PDGF-CC activo es un potente mitógeno para células de fibroblasto y de músculo liso vascular (Li y col., Nat. Cell. Biol. 2:302-09, 2000; Cao y col., FASEB. J. 16:1575-83, 2002; Uutela y col., Circulation 103:2242-7, 2001). Tanto PDGF-AA como PDGF-CC se unen a PDGFR- α , pero sólo PDGF-CC estimula potentemente la angiogénesis en ensayos en la bolsa de la córnea de ratón y membrana corioalantoidea de pollo (CAM) (Cao y col., FASEB. J. 16:1575-83, 2002). PDGF-CC también promueve la cicatrización estimulando la vascularización de tejido (Gilbertson y col., antes). Sin embargo, estos estudios no tratan si PDGF-CC estimuló el crecimiento de vasos afectando las células endoteliales o de músculo liso ni examinaron si PDGF-CC promovió o no la maduración de vasos recientemente formados (incluyendo vasculogénesis, angiogénesis, neoangiogénesis y arteriogénesis).

Cuatro miembros adicionales de la subfamilia de VEGF denominados conjuntamente en lo sucesivo factores VEGF-E se han identificado en poxvirus, que infectan seres humanos, oveja y cabras. El VEGF-E codificado por el virus orf (SEQ ID NO: 24 y 25) y NZ2 VEGF son potentes mitógenos y factores que potencian la permeabilidad. Ambos muestran aproximadamente el 25% de identidad de aminoácidos con VEGF-A de mamífero y se expresan como homodímeros ligados por disulfuro. Otra variante de la proteína similar a VEGF-E del virus orf de la cepa NZ10 se describe en el documento WO 00/25805, incorporado aquí por referencia. La infección por estos virus se caracteriza por dermatitis pustular que puede implicar la proliferación de células endoteliales y la permeabilidad vascular inducida por estas proteínas víricas de VEGF (Ferrara, J Mol Med 77:527-543, 1999; Stacker y Achen, Growth Factors 17:1-11, 1999). Las proteínas similares a VEGF también se han identificado a partir de dos cepas adicionales del virus orf, D1701 (nº de acceso de GenBank AF106020; descrito en Meyer y col., EMBO J 18:363-374, 1999) y NZ10 [descrito en la solicitud de patente internacional WO 00/25805]. Se ha mostrado que estas proteínas víricas similares a VEGF se unen a VEGFR-2 presente en endotelio de huésped, y esta unión es importante para el desarrollo de infección e inducción vírica de angiogénesis (Meyer y col., EMBO J 18:363-374, 1999; solicitud de patente internacional WO 00/25805).

Nombre	SEQ ID NO	Ligando natural completamente procesado (RTK)	Dominio de unión a heparina
--------	-----------	---	-----------------------------

VEGF-A	2	véanse las isoformas	
VEGF109	52	27-127	
VEGF206	3	27-232	142-226
VEGF121	4	27-147	N/A
VEGF145	5	27-171	142-165
VEGF165	6	27-191	183-226
VEGF189	7	27-215	142-215
PIGF-1	9	19-149	N/A
PIGF-2	42	19-170	142 a 162
PIGF-3	43	19-221	193-213
VEGF-B	11	véanse las isoformas	
VEGF-B167	44	22-188	138 a 182
VEGF-B186	45	22-207	N/A
VEGF-C	13	103-227	N/A
VEGF-D	15	93-201	N/A
PDGF-A	17	87-211	N/A
PDGF-B	19	82-190	N/A
PDGF-C	21	230-345	N/A
PDGF-D	23	272-362 ó 255-370	N/A
VEGF-E	25		N/A

Fragmentos más pequeños de la mayoría o todos de la familia de VEGF y PDGF también pueden unirse a sus receptores respectivos y la identidad de tales fragmentos más pequeños se determina por ensayos de unión a RTK tales como aquellos descritos en este documento o en la bibliografía.

5 2. Dominio flanqueante

Un dominio flanqueante usado para preparar las construcciones de la invención comprende una secuencia de péptidos o de polipéptidos similar a o idéntica a un propéptido de un miembro de la familia de VEGF o PDGF. En preproteínas nativas, los propéptidos flanquean el dominio de homología con VEGF (dominio de unión a RTK), es decir, están posicionados adyacentes al dominio de homología con VEGF (VHD). En una realización preferida descrita en los siguientes párrafos, el dominio flanqueante comprende propéptidos del extremo N (F_N) y del extremo C (F_C) de VEGF-C o VEGF-D (en los que "del extremo" se refiere a la localización del propéptido con respecto al VHD).

VEGF-C comprende un VHD que es idéntico aproximadamente el 30% al nivel de aminoácidos a VEGF-A. La proteína de VEGF-C secretada consiste en un homodímero no covalentemente ligado, conteniendo cada monómero el VHD. Las formas intermedias de VEGF-C producidas por el procesamiento proteolítico parcial muestran una afinidad creciente por el receptor VEGFR-3, y la proteína madura también puede unirse al receptor VEGFR-2 [véanse los documentos WO 97/05250; WO 98/33917; WO 00/24412, las patentes de EE.UU. n° 6.221.839, 6.361.946, 6.645.933, 6.730.658 y 6.245.530; y Joukov y col., EMBO J., 16(13):3898-3911 (1997), incorporándose todos en este documento por referencia]. También se ha demostrado que un VEGF-C mutante, en el que una única cisteína en la posición 156 está tanto sustituida con otro aminoácido como delecionada, pierda la capacidad para unirse a VEGFR-2, pero sigue pudiendo unirse a y activar VEGFR-3 [véase la publicación de patente internacional n° WO 98/33917 y las patentes de EE.UU. n° 6.130.071 y 6.361.946, cada una de las cuales se incorporan en este documento por referencia].

VEGF-C (SEQ ID NO: 12 y 13) se expresa originariamente como una proteína precursora grande, prepro-VEGF-C,

que tiene secuencias de péptidos extensivas del extremo amino y carboxi que flanquean un dominio de homología con VEGF (VHD), conteniendo el péptido del extremo C residuos de cisteína repetidos en tándem en un motivo típico de la proteína 3 del anillo de Balbiani. El polipéptido de prepro-VEGF-C se procesa en múltiples etapas para producir un polipéptido de VEGF-C maduro y más activo ($\Delta N\Delta C$ VEGF-C) de aproximadamente 21-23 kD (como se evalúa por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras). Tal procesamiento incluye escisión de un péptido señal (SEQ ID NO: 13, residuos 1-31); escisión de un péptido del extremo carboxilo (SEQ ID NO: 47, que se corresponde aproximadamente con los residuos 228-419 de SEQ ID NO: 13) para producir una forma parcialmente procesada de aproximadamente 29 kD; y escisión (aparentemente extracelularmente) de un péptido del extremo amino (SEQ ID NO: 46, que se corresponde aproximadamente con los residuos 32-102 de SEQ ID NO: 13) para producir una forma madura completamente procesada de aproximadamente 21-23 kD. La evidencia experimental demuestra que las formas parcialmente procesadas de VEGF-C (por ejemplo, la forma de 29 kD) pueden unirse al receptor de Flt4 (VEGFR-3), mientras que la alta unión por afinidad a VEGFR-2 sólo se produce con las formas completamente procesadas de VEGF-C. Además, se ha demostrado que los aminoácidos 103-227 de SEQ ID NO: 13 no son todos críticos para mantener las funciones de VEGF-C. Un polipéptido que consiste en los aminoácidos 112-215 (y que carece de los residuos 103-111 y 216-227) de SEQ ID NO: 13 retiene la capacidad para unirse a y estimular receptores de VEGF-C, y se espera que un polipéptido que abarca de aproximadamente el residuo 131 a aproximadamente el residuo 211 de SEQ ID NO: 13 retendrá la actividad biológica de VEGF-C. Se ha mostrado que el residuo de cisteína en la posición 156 es importante para la capacidad de unión a VEGFR-2. Parece que los polipéptidos de VEGF-C se asocian naturalmente como dímeros ligados por no disulfuro. Recientemente se estudió la interacción de propéptidos de VEGF-C con neuropilina 1 (NP-1) y neuropilina 2 (NP-2) y se encontró que el dominio del extremo N de los propéptidos de VEGF-C era un mediador importante en la unión a NP-1 y NP-2 (Karpenen y col., FASEB J., 20:1462-1472, 2006).

VEGF-D está estructuralmente y funcionalmente muy estrechamente relacionado con VEGF-C [véase la publicación de patente internacional nº WO 98/07832, incorporada en este documento por referencia]. Al igual que VEGF-C, VEGF-D (SEQ ID NO: 14 y 15) se expresa inicialmente como un prepro-péptido que se somete a eliminación de un péptido señal (residuos 1-21 de SEQ ID NO: 10), procesamiento proteolítico de propéptidos del extremo amino (SEQ ID NO: 48, que se corresponde con los residuos 22-92 de SEQ ID NO: 15) y propéptidos del extremo carboxi (SEQ ID NO: 49, que se corresponde con los residuos 202-354 de SEQ ID NO: 15), y forma dímeros ligados no covalentemente. VEGF-D estimula respuestas mitogénicas en células endoteliales *in vitro*. Durante la embriogénesis, VEGF-D se expresa en un complejo patrón temporal y espacial, y su expresión persiste en el corazón, pulmón y los músculos esqueléticos en adultos. El aislamiento de un fragmento biológicamente activo de VEGF-D designado VEGF- $\Delta N\Delta C$ se describe en la publicación de patente internacional nº WO 98/07832. VEGF- $\Delta N\Delta C$ consiste en los residuos de aminoácidos 93 a 201 de VEGF-D (SEQ ID NO: 15) y se une a VEGFR-2 y VEGFR-3. Formas parcialmente procesadas de VEGF-D se unen a VEGFR-3.

Además, VEGF-D se describe en mayor detalle en la publicación de patente internacional nº WO 98/07832 y la patente de EE.UU. nº 6.235.713, y describe polipéptidos de VEGF-D y variantes de los mismos que son útiles en la producción de quimeras de la presente invención. Las moléculas relacionadas con VEGF-D también se describen en la publicación de patente internacional nº WO 98/02543 y WO 97/12972, y la patente de EE.UU. nº 6.689.580, y la solicitud de patente de EE.UU. nº 09/219.345 y 09/847.524.

El dominio de LAP (proteína asociada a la latencia) de TGF- β 1 también puede servir de secuencia flanqueante (SEQ ID NO: 50). Se ha mostrado que LAP proporciona una interacción que impide la envuelta ligada por disulfuro de la citocina de TGF- β 1 con sus receptores celulares, confiriendo una semivida muy larga de 55 horas *in vivo* (Adams y col., Nature Biotechnol., 21, 1314-1320, 2003). Sin ceñirse a ningún mecanismo de acción se contempla que la presencia de un dominio de LAP en construcciones de la invención aumenta la semivida en suero de construcciones *in vivo* y/o ayuda en la localización de las construcciones en la matriz extracelular para aumentar la eficiencia de unión de las construcciones a sus receptores de la superficie celular respectivos, aumentando así la biodisponibilidad y potencia como terapéutico.

Estas y otras moléculas que pueden servir de secuencias flanqueantes se describen en más detalle en este documento.

3. Dominio de unión a heparina

Las moléculas quiméricas de la invención pueden incluir adicionalmente un dominio de unión a heparina. Sin ceñirse a ningún mecanismo de acción se contempla que la presencia de un dominio de unión a heparina en los factores de crecimiento facilita la unión de los factores de crecimiento a heparina y permite la concentración de los factores de crecimiento en la matriz extracelular para aumentar la eficiencia de unión de los factores de crecimiento a sus receptores de la superficie celular respectivos, aumentando así la biodisponibilidad de los factores de crecimiento en un sitio dado.

Mulloy y col., (Curr Opin Struct Biol. 11(5):623-8, 2001) describen propiedades de muchas estructuras de dominios de unión a heparina e identifican muchos ejemplos de dominios de unión a heparina, y se incorpora en este documento por referencia. Cualquier dominio de unión a heparina tal puede usarse en las moléculas quiméricas de la presente invención. En otra realización, las moléculas quiméricas de la presente invención pueden comprender el

dominio de unión a heparina de P1GF-2 (véase, Hauser y Weich, *Growth Factors*, 9 259-68, 1993). Los dominios de unión a heparina de otros factores de crecimiento también pueden usarse en los presentes polipéptidos quiméricos tales como, por ejemplo, el dominio de unión a heparina del factor de crecimiento similar a EGF (Shin y col., *J Pept Sci.* 9(4):244-50, 2003); el dominio de unión a heparina del factor de crecimiento similar a la proteína de unión a insulina (Shand y col., *J Biol Chem.* 278(20):17859-66, 2003) y similares. Otros dominios de unión a heparina que pueden usarse en este documento incluyen, pero no se limitan a, los dominios de unión a heparina de pleiotrofina y anfoterina (*Matrix Biol.* 19(5):377-87, 2000); CAP37 (Heinzelmann y col., *Int J Surg Investig.* 2(6):457-66, 2001); y el fragmento de unión a heparina de fibronectina (Yasuda y col., *Arthritis Rheum.* 48(5):1271-80, 2003).

La inclusión de un dominio de unión a heparina en una molécula quimérica de VEGF se ha descrito previamente en la publicación de patente de EE.UU. de propiedad común nº 2005/0032697 y la publicación PCT nº WO 20051016963. Los dominios de unión a heparina preferidos se encuentran en moléculas de VEGF/PDGF nativas. VEGF-C y VEGF-D, al igual que VEGF₁₂₁, carecen de un dominio de unión a heparina. Sin embargo, se sabe que VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ comprenden dominios de unión a heparina (Keck y col., *Arch. Bioch. Biophys.*, 344:103-113, 1997; Fairbrother y col., *Structure* 6:637-648, 1998). Los exones 6 (21 aminoácidos) y 7 (44 aminoácidos) contienen dos dominios de unión a heparina independientes (Poltorak y col., *Herz*, 25:126-9, 2000). En una realización preferida, el dominio de unión a heparina está codificado por el exón 6 y/o el exón 7 de VEGF. El dominio de unión a heparina puede comprender adicionalmente los aminoácidos codificados por el exón 8 de VEGF. Las secuencias de los diversos exones de VEGF son ampliamente conocidas y pueden encontrarse, por ejemplo, en los números de acceso de GenBank M63976-M63978, en los que M63976 es el exón 6, M63977 es el exón 7; y M63978 es el exón 8.

En otras realizaciones, el dominio de unión a heparina puede ser de otros factores de crecimiento de VEGF, por ejemplo, puede usarse el dominio de unión a heparina de VEGF-B. Makinen y col. (*J. Biol. Chem.*, 274:21217-22, 1999) han descrito diversas isoformas de VEGF-B y han mostrado que el exón 6B codificado por la secuencia de VEGF-B₁₆₇ se parece al dominio de unión a heparina y a NRP1 codificado por el exón 7 de VEGF₁₆₅. Por tanto, el exón 6B de VEGF-B₁₆₇ (o un fragmento de unión a heparina del mismo) puede usarse como dominio de unión a heparina de las moléculas quiméricas de la presente invención. La publicación de Makinen y col., *J. Biol. Chem.*, 274: 21217-22, 1999, proporciona una descripción detallada de la construcción de la secuencia codificada por el exón 6B de VEGF-B. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducidas para VEGF-B están depositadas en GenBank bajo el nº de acceso U48801, incorporadas en este documento por referencia. En este documento también se incorpora por referencia Olofsson y col., *J. Biol. Chem.* 271 (32), 19310-19317 (1996), que describe la organización genómica de los genes de ratón y humanos para VEGF-B, y su entrada en Genbank relacionada en AF468110, que proporciona una secuencia genómica a modo de ejemplo de VEGF-B.

El dominio de unión a heparina de miembros de VEGF/PDGF puede unirse al polipéptido de la invención en cualquier extremo del dominio de unión a RTK o al dominio flanqueante.

4. Dominio CUB

Las moléculas quiméricas de la invención pueden incluir adicionalmente un dominio CUB. Sin ceñirse a ningún mecanismo de acción se contempla que la presencia de un dominio CUB en los factores de crecimiento proporciona un sitio de unión para enzimas proteolíticas que procesan los factores en condiciones biológicas adecuadas a las que necesitan activarse.

El dominio CUB de PDGF-C y/o PDGF-D puede unirse al polipéptido quimérico de la invención en cualquier extremo del dominio de unión a RTK o al dominio flanqueante.

En otra realización mas, las moléculas quiméricas de la invención pueden comprender el dominio CUB unido al dominio de unión a RTK de un miembro de la familia de VEGF/PDGF (tanto directamente como mediante un ligador), en las que la construcción resultante no incluye necesariamente adicionalmente un dominio flanqueante como se define anteriormente. Por ejemplo, el dominio CUB de PDGF-C y/o PDGF-D puede unirse a VEGF-A para producir una proteína quimérica designada CUB-VEGF, y también se contempla como un aspecto de la invención. Se contempla que la propiedad de activación proteolítica de las formas latentes de PDGF-C y PDGF-D que contienen dominios CUB podría transferirse a factores de la familia de VEGF/PDGF preparando proteínas quiméricas que contienen el dominio CUB fusionado con los dominios de factores de crecimiento de otro de los ligandos de la familia de VEGF/PDGF, conteniendo el dominio CUB o estando unido por un enlace que es proteolíticamente escindible.

CUB-VEGF (o CUB unido a cualquier dominio de unión a RTK de la familia de VEGF/PDGF) se contempla para uso en la restricción de la actividad biológica de estos factores hasta que se activan de un modo deseado *in vivo*. En algunas realizaciones, la adición del dominio CUB al dominio de unión a RTK introduciría un sitio de escisión de proteasas para la posible activación de estos factores. Adicionalmente, el sitio sensible a proteasa puede sustituirse por un sitio de escisión para una enzima proteolítica no disponible en el sistema biológico, pero que podría proporcionarse *in trans* como proteína o vector de expresión génica para la activación de las quimeras del ligando latente. En otra variación, el enlace y la construcción es no escindible y la construcción resultante es una forma latente que se une, pero que no activa receptores y es útil como inhibidor.

5. Ligadores

Para preparar moléculas de la invención se usa un ligador, preferentemente un ligador covalente, para unir el dominio de unión a RTK a uno o más dominios flanqueantes (o para unir adicionalmente dominios flanqueantes entre sí o para unir dominios adicionales opcionales tales como un dominio de unión a heparina). En algunas realizaciones, el ligador es simplemente un enlace covalente. Por ejemplo, en una realización preferida, si F_N -L-RTK- $L-F_C$ ("L" denota un ligador) comprende un único polipéptido continuo, el ligador puede denotar un enlace amida (péptido) entre el aminoácido del extremo C de F_N y el aminoácido del extremo N del dominio de unión a RTK, o entre el aminoácido del extremo N de F_C y el aminoácido del extremo C del dominio de unión a RTK.

El ligador puede ser un resto orgánico construido para contener un esqueleto alquilo, arilo y puede contener un enlace amida, éter, éster, hidrazona, disulfuro o cualquier combinación de los mismos. Enlaces que contienen componentes unidos por aminoácido, éter y amida serán estables en condiciones de pH fisiológico, normalmente 7,4 en suero y 4-5 tras la captación en células (endosomas). Se prefieren enlaces disulfuro debido a que son sensibles a la escisión reductora; los ligadores de aminoácido pueden diseñarse para ser sensibles a la escisión por enzimas específicas en el órgano diana deseado. Ligadores a modo de ejemplo se explican en Blattler y col. *Biochem.* 24:1517-1524, 1985; King y col. *Biochem.* 25:5774-5779, 1986; Srinivasachar y Nevill, *Biochem.* 28:2501-2509, 1989.

En todavía otras realizaciones, la entidad L es un enlace químicamente, o de otro modo, escindible que bajo condiciones apropiadas permite la liberación de la subunidad F_N de la subunidad F_C . Por ejemplo, los dominios F_N y el dominio de unión a RTK pueden ligarse covalentemente por uno o más puentes disulfuro que ligan residuos de cisteína de F_N y el dominio de unión a RTK; o por unión mutua con un entidad química distinta tal como un resto carbohidrato.

El ligador es opcionalmente un polipéptido de proteína heteróloga. En realizaciones particulares, el ligador comprende un ligador de péptidos que comprende de 1 a aproximadamente 500 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el ligador tiene de 1 a 10 residuos. En algunas realizaciones, el ligador tiene de 1 a 50 residuos. En algunas realizaciones, el ligador tiene 1-100 residuos. Se prefieren ligadores de 4-50 aminoácidos, y 4-15 son altamente preferidos. Los ligadores de péptidos preferidos son péptidos lineales unidos en el extremo N y en el extremo C a dominios F_N y al dominio de unión a RTK para formar un único polipéptido continuo. En ciertas realizaciones, el ligador de péptidos comprende un sitio de escisión de proteasa tal como un sitio de escisión del factor Xa, un sitio de escisión de enterocinasa (New England Biolabs), un sitio de escisión de trombina, un sitio de escisión de TEV proteasa (Life Technologies) y un sitio de escisión PreScission (Amersham Pharmacia Biotech). Se conocen numerosas otras proteasas y sus sitios de escisión. Preferentemente, la proteasa y el ligador se seleccionan de manera que la proteasa escinda el enlace, pero no el dominio de RTK de la construcción.

En otras variaciones, el ligador puede comprender un dominio de horquilla que se deriva de PDGF-C o PDGF-D. El dominio de horquilla puede separar el dominio CUB del dominio de unión a RTK de la construcción.

El ligador puede afectar tanto si el (los) polipéptido(s) al (a los) que está fusionado puede(n) dimerizarse con otro polipéptido idéntico como si puede(n) dimerizarse con otro polipéptido. Cuando el ligador comprende un péptido, la construcción es expresable como una molécula recombinante de un único polipéptido. Los ligadores pueden elegirse de forma que sea menos probable que induzcan una reacción alérgica o antigénica.

Se usa más de un ligador por molécula de construcción cuando se unen más de dos dominios distintos, tal como en construcciones que satisfacen la fórmula F_N -L-RTK-L- F_C en la que en F_N y F_C denotan una secuencia flanqueante del extremo N y del extremo C, respectivamente. El ligador puede seleccionarse para la óptima libertad (estérica) conformacional entre el factor de crecimiento (dominio de unión a RTK) y dominios flanqueantes y de unión a heparina o CUB opcionales para permitir que interactúen con componentes de unión. El ligador puede ser lineal de forma que F_N y RTK estén ligados en serie, o el ligador puede servir de un andamiaje al que se unen dos o más unidades de unión a F_N o RTK. Un ligador también puede tener múltiples ramas. Por ejemplo, usando ligadores desvelados en Tam, J. *Immunol. Methods* 196:17 (1996). F_N y RTK puede unirse entre sí o al andamiaje del ligador mediante grupos amino del extremo N, grupos carboxilo del extremo C, cadenas laterales, grupos químicamente modificados, cadenas laterales, u otros medios.

Cuando comprende péptidos, el ligador puede diseñarse para tener secuencias que permitan características deseadas. Por ejemplo, el uso de residuos de glicilo permite un grado de libertad conformacional relativamente grande, mientras que una prolina tendería a tener el efecto opuesto. Los ligadores de péptidos pueden elegirse de manera que consigan estructuras secundarias y terciarias particulares, por ejemplo, hélices alfa, hojas beta y barriles beta. La estructura cuaternaria también puede utilizarse para crear ligadores que unen juntas no covalentemente dos unidades de unión. Por ejemplo, la fusión de un dominio de proteína con una cara hidrófoba a cada unidad de unión puede permitir la unión de dos unidades de unión mediante la interacción hidrófoba de las dos moléculas. En algunas realizaciones, el ligador puede proporcionar interacciones polares. Por ejemplo, puede usarse un dominio de cremallera de leucina de las proto-oncoproteínas Myc y Max, respectivamente. Luscher y Larsson, *Oncogene* 18:2955-2966 (1999). En algunas realizaciones, el ligador permite la formación de un puente de sal o enlace disulfuro. Los ligadores pueden comprender aminoácidos que se producen no naturalmente, además de

Preferentemente, si se usa la sustitución de aminoácidos, la sustitución es conservativa, es decir, un aminoácido es sustituido por uno de tamaño similar y con propiedades de carga similares. Como se usa en este documento, el término "sustitución conservativa" denota la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar. Ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina, alanina, cisteína, glicina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina, norleucina o metionina por otro, o la sustitución de un residuo similarmente cargado o polar por otro, tal como la sustitución de lisina por arginina, ácido aspártico por ácido glutámico, o asparagina por glutamina, y similares. Los aminoácidos hidrófilos neutros que pueden sustituirse por otros incluyen asparagina, glutamina, serina y treonina. El término "sustitución conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido sin sustituir.

- 10 Alternativamente, los aminoácidos conservativos pueden agruparse como se describe en Lehninger, (Biochemistry, segunda edición; Worth Publishers, Inc. NY:NY, pág. 71-77 (1975)) como se explica a continuación:

No polar (hidrófobo)

- 15 A. Alifático: A, L, I, V, P,
B. Aromático: F, W,
C. Que contiene azufre: M,
D. Límite: G.

Sin carga - polar

- 20 A. Hidroxilo: S, T, Y,
B. Amidas: N, Q,
C. Sulfhidrido: C,
D. Límite: G.

Positivamente cargado (básico): K, R, H.

Negativamente cargado (ácido): D, E.

- 25 Con referencia al dominio de unión a RTK, los análogos que retienen la actividad biológica de la unión al receptor de VEGF/PDGF se contemplan para uso en construcciones de la presente invención. En una realización preferida, los análogos que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 modificaciones tales y que retienen la actividad de unión al receptor de VEGF/PDGF se contemplan para inclusión en construcciones de la presente invención. Los polinucleótidos que codifican tales análogos se generan usando PCR convencional, mutagénesis dirigida a sitio y técnicas de síntesis química. Se prefieren análogos que se unen y estimulan la fosforilación de uno o más receptores que el polipéptido de RTK natural estimula (por ejemplo, VEGFR-1 y/o VEGFR-2, en el caso de VEGF-A).

B. Procedimientos de preparación de polipéptidos químicos de VEGF

- 35 Las construcciones de la invención o porciones de las mismas pueden sintetizarse en disolución o sobre un soporte sólido según técnicas convencionales. Tales polipéptidos pueden sintetizarse como pequeños fragmentos de la construcción completa o como una secuencia completa de longitud completa. Están disponibles diversos sintetizadores automáticos y pueden usarse según protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, Stewart y Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed., Pierce Chemical Co., (1984); Tam y col., J. Am. Chem. Soc., 105:6442, (1983); Merrifield, Science, 232: 341-347, (1986); y Barany y Merrifield, The Peptides, Gross y Meienhofer, eds, Academic Press, New York, 1-284, (1979), cada uno incorporado en este documento por referencia. Los polipéptidos químicos de VEGF de la invención pueden sintetizarse fácilmente y luego cribarse usando distintos ensayos que identifican los polipéptidos para actividad similar a VEGF-A, similar a VEGF-C, similar a VEGF-D u otra similar a PDGF u otra similar a VEGF tal como, por ejemplo, unión a VEGFR-1, VEGFR-2, o VEGFR-3, inducción de permeabilidad vascular, actividad en un ensayo de proliferación de células endoteliales, inducción del crecimiento de vasos linfáticos o sanguíneos, promoción del crecimiento y diferenciación de células progenitoras CD34+ *in vitro*, actividad en ensayos de CAM, y similares. Estos y otros ensayos para determinar la actividad de la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular se describen en solicitudes de propiedad común, la publicación de patente de EE.UU. nº 2002/0151680 y WO 01/62942,

- 50 Ejemplos de tecnología en fase sólida que puede usarse en la presente invención incluyen un sintetizador de péptidos modelo 433A de Applied Biosystems, Inc. Los procedimientos de uso de tales sintetizadores en fase sólida automatizados para producir polipéptidos puros son muy conocidos.

- 55 Como alternativa a la síntesis de péptidos automatizada puede emplearse tecnología de ADN recombinante en la que una secuencia de nucleótidos que codifica una construcción de la invención que es un polipéptido químico o que codifica una porción de polipéptido de una construcción se inserta en un vector de expresión, se transforma o se transfecta en una célula huésped apropiada y se cultiva en condiciones adecuadas para la expresión. Los procedimientos recombinantes son especialmente preferidos para producir polipéptidos más largos de la invención. Las construcciones de la invención también pueden producirse por una combinación de técnicas por las que los

dominios se sintetizan recombinantemente o sintéticamente en dos o más etapas y se unen juntos con un ligador.

Puede utilizarse una variedad de sistemas de vectores de expresión/huésped para contener y expresar la secuencia que codifica la construcción. Éstos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN recombinante de bacteriófago, plásmido o cósmido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células de plantas transfectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmido Ti o pBR322); o sistemas de células de animal. Las células de mamífero que son útiles en las producciones de proteínas recombinantes incluyen, pero no se limitan a, células VERO, células HeLa, líneas de células de ovario de hámster chino (CHO), células COS (tales como COS-7), células W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562 y 293. Protocolos a modo de ejemplo para la expresión recombinante de los polipéptidos en bacterias, levadura y otros invertebrados se describen en este documento más adelante.

Los vectores de expresión para uso en huéspedes procariotas comprenden generalmente uno o más genes de marcadores de selección fenotípicos. Tales genes codifican generalmente, por ejemplo, una proteína que confiere resistencia a antibióticos o que satisface un requisito auxotrópico. Están fácilmente disponibles una amplia variedad de tales vectores de fuentes comerciales. Ejemplos incluyen vectores pSPORT, vectores pGEM (Promega), vectores pPROEX (LTI, Bethesda, MD), vectores Bluescript (Stratagene), vectores pET (Novagen) y vectores pQE (Qiagen). La secuencia de ADN que codifica un dominio de péptido o polipéptido quimérico se clona en un vector tal, por ejemplo, pGEX 3X (Pharmacia, Piscataway, NJ) diseñado para producir una proteína de fusión que comprende glutatión S transferasa (GST), codificada por el vector, y una proteína codificada por un fragmento de ADN insertado en el sitio de clonación del vector. Se espera que el tratamiento de la proteína de fusión recombinante con trombina o factor Xa (Pharmacia, Piscataway, NJ) escinda la proteína de fusión, liberando el polipéptido de interés de la porción de GST. La construcción de pGEX 3X/polipéptido quimérico de VEGF se transforma en células XL 1 Blue de *E. coli* (Stratagene, La Jolla CA), y se aislaron y se cultivaron transformantes individuales. El ADN de plásmido de transformantes individuales se purifica y se secuencian parcialmente usando un secuenciador automatizado para confirmar la presencia del inserto de ácido nucleico que codifica el péptido o polipéptido deseado en la orientación apropiada.

La inducción de la proteína de fusión de GST/sustrato se logra cultivando el cultivo de XL 1 Blue transformado a 37°C en medio LB (complementado con carbenicilina) a una densidad óptica a la longitud de onda de 600 nm de 0,4, seguido de incubación adicional durante 4 horas en presencia de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido 0,5 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis MO).

La proteína de fusión de GST, que se espera que se produzca como un cuerpo de inclusión insoluble en las bacterias, puede purificarse del siguiente modo. Las células se recogen por centrifugación; se lavan en NaCl 0,15 M, Tris 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM; y se tratan con 0,1 mg/ml de lisozima (Sigma Chemical Co.) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El lisado se depura por sonicación y el residuo celular se sedimenta por centrifugación durante 10 minutos a 12.000 X g. El sedimento que contiene la proteína de fusión se resuspende en Tris 50 mM, pH 8, y EDTA 10 mM, se deposita en capas sobre glicerina al 50% y se centrifuga durante 30 min a 6000 X g. El sedimento se resuspende en solución salina tamponada con fosfato (PBS) patrón libre de Mg^{2+} y Ca^{2+} . La proteína de fusión se purifica adicionalmente fraccionando el sedimento resuspendido en un gel de SDS-poliacrilamida desnaturalizante (Sambrook y col., arriba). El gel se pone en remojo en KCl 0,4 M para visualizar la proteína, que se corta y se electroeluye en tampón de electroforesis en gel que carece de SDS. Si la proteína de fusión de GST/polipéptido quimérico de VEGF se produce en bacterias como una proteína soluble, puede purificarse usando el módulo de purificación GST (Pharmacia Biotech).

La proteína de fusión puede someterse a digestión con trombina para escindir el GST del polipéptido de la construcción. La reacción de digestión (20-40 μ g de proteína de fusión, 20-30 unidades de trombina humana (4000 U/mg (Sigma) en 0,5 ml de PBS) se incuba 16-48 h a temperatura ambiente y se carga sobre un gel de SDS-PAGE desnaturalizante para fraccionar los productos de reacción. El gel se pone en remojo en KCl 0,4 M para visualizar las bandas de proteína. La identidad de la banda de proteína correspondiente al peso molecular esperado del polipéptido de la construcción puede confirmarse por el análisis parcial de secuencias de aminoácidos usando un secuenciador automatizado (modelo 473A de Applied Biosystems, Foster City, CA).

Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de la construcción o porción del mismo puede clonarse en un plásmido que contiene un promotor deseado y, opcionalmente, una secuencia conductora (véase, por ejemplo, Better y col., Science, 240: 1041-43, 1988). La secuencia de esta construcción puede confirmarse por secuenciación automatizada. Entonces, el plásmido se transforma en *E. coli* usando procedimientos convencionales empleando incubación con $CaCl_2$ y tratamiento por choque térmico de las bacterias (Sambrook y col., antes). Las bacterias transformadas se cultivan en medio LB complementado con carbenicilina, y la producción de la proteína expresada se induce por crecimiento en un medio adecuado. Si está presente, una secuencia conductora efectuará la secreción del polipéptido de la construcción y se escindirán durante la secreción. La proteína recombinante secretada puede entonces purificarse usando técnicas convencionales de purificación de proteínas.

Similarmente, las células huésped de levadura de los géneros que incluyen *Saccharomyces*, *Pichia* y *Kluyveromyces* pueden emplearse para generar el péptido recombinantemente. Los huéspedes de levadura preferidos son *S. cerevisiae* y *P. pastoris*. Los vectores de levadura frecuentemente contendrán un origen de la secuencia de replicación de un plásmido de levadura 2T, una secuencia autónomamente replicante (ARS), una región promotora, secuencias para la poliadenilación, secuencias para la terminación de la transcripción y un gen marcador de selección. También puede usarse vectores replicables en tanto levadura como *E. coli* (llamados vectores lanzadera). Además de las características anteriormente mencionadas de los vectores de levadura, un vector lanzadera también incluirá secuencias para la replicación y la selección en *E. coli*. La secreción directa de polipéptidos expresados en huéspedes de levadura puede llevarse a cabo mediante la inclusión de la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia conductora del factor de levadura I en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el sustrato.

Generalmente, un polipéptido se expresa recombinantemente en levadura usando un sistema de expresión comercialmente disponible, por ejemplo, el sistema de expresión de *Pichia* (Invitrogen, San Diego, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema también se basa en la secuencia pre pro alfa para dirigir la secreción, pero la transcripción del inserto es accionada por el promotor de la alcohol-oxidasa (AOX1) tras la inducción por metanol.

El polipéptido recombinante secretado se purifica a partir del medio de crecimiento de levadura por, por ejemplo, los procedimientos usados para purificar polipéptidos a partir de sobrenadantes de células bacterianas y de mamífero.

Alternativamente, los polipéptidos quiméricos de la invención pueden expresarse en un sistema de insecto. Los sistemas de insecto para la expresión de proteínas son muy conocidos. En un sistema tal, el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se usa como vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o en *Trichoplusia larvae*. La secuencia codificante de polipéptidos se clona en una región no esencial del virus, tal como el gen poliedrina, y se coloca bajo el control del promotor de poliedrina. La inserción satisfactoria inactivará el gen poliedrina y producirá virus recombinante que carece de cápside de proteína. Entonces, los virus recombinantes se usan para infectar células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en las que se expresa el polipéptido deseado (Smith y col., J Virol 46: 584, 1983; Engelhard EK y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91: 3224-7, 1994). Por ejemplo, el ADN que codifica un polipéptido de la invención puede clonarse en el vector de expresión de baculovirus pVL1393 (PharMingen, San Diego, CA; Luckow y Summers, Bio/Technology 6:47 (1988)). Entonces, este vector resultante se usa según las indicaciones del fabricante (PharMingen) para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en medios libres de proteína SF9 y para producir proteína recombinante. La proteína o péptido se purifica y se concentra a partir de los medios usando una columna de heparina-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) y columnas de tamaño molecular secuencial (Amicon, Beverly, MA), y se resuspende en PBS. El análisis de SDS-PAGE muestra una única banda y confirma el tamaño de la proteína, y la secuenciación de Edman en un secuenciador de péptidos Porton 2090 confirma su secuencia del extremo N.

Los sistemas huésped de mamífero para la expresión de proteínas recombinantes también son muy conocidos. Las cepas de células huésped pueden elegirse para una capacidad particular para procesar la proteína expresada o producir ciertas modificaciones postraduccionales que serán útiles en proporcionar actividad de proteína. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento postraduccionales que escinde una forma "prepro" de la proteína también puede ser importante para corregir la inserción, el plegamiento y/o la función. Diferentes células huésped tales como CHO, HeLa, MDCK, 293, WI38 y similares tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraduccionales y pueden elegirse para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña introducida.

Se prefiere que las células transformadas se usen para la producción de proteínas de alto rendimiento a largo plazo y como tal se desea expresión estable. Una vez se transforman tales células con vectores que contienen marcadores de selección junto con el casete de expresión deseado, puede dejarse que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarse a medios selectivos. El marcador de selección se diseña para conferir resistencia a la selección y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan satisfactoriamente las secuencias introducidas. Los grupos resistentes de células establemente transformadas pueden proliferar usando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas para la célula.

Pueden usarse varios sistemas de selección para recuperar las células que han sido transformadas para la producción de proteínas recombinantes. Tales sistemas de selección incluyen, pero no se limitan a, genes HSV timidina-cinasa, hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa y adenina-fosforribosiltransferasa, en células tk, hprt o aprt, respectivamente. Por tanto, puede usarse resistencia a antimetabolitos como la base de selección para dhfr, que confiere resistencia a metotrexato; gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G418; als que confiere resistencia a clorsulfurón; e hyg, que confiere resistencia a higromicina. Genes de selección adicionales que pueden usarse incluyen trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina. Los marcadores que dan un indicación visual de la identificación de transformantes incluyen antocianinas, b-glucuronidasa y su sustrato, GUS, y luciferasa y su sustrato, luciferina.

C. Purificación de proteínas.

Para muchas aplicaciones se desea purificar las construcciones, tales como los polipéptidos quiméricos de VEGF, de la presente invención. Las técnicas de purificación de proteínas son muy conocidas. Estas técnicas implican, a un nivel, el fraccionamiento bruto del medio celular en fracciones de polipéptidos y no polipéptidos. Habiendo separado el péptido o polipéptidos de la invención de otras proteínas, los polipéptidos o péptidos de interés pueden purificarse adicionalmente usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para lograr la purificación parcial o completa (o purificación hasta homogeneidad).

Generalmente, "purificado" se referirá a una composición de polipéptido, proteína o péptido que ha sido sometida a fraccionamiento para eliminar diversos otros componentes, y cuya composición retiene sustancialmente su actividad biológica. Si se usa el término "sustancialmente purificado", esta designación se referirá a una composición en la que el polipéptido, proteína o péptido forma el componente principal de la composición, tal como constituyendo aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95% o más de las proteínas en la composición.

Los diversos procedimientos para cuantificar el grado de purificación del polipéptido, proteína o péptido serán evidentes. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad específica de una fracción activa o evaluar la cantidad de polipéptidos dentro de una fracción por análisis de SDS/PAGE. Un procedimiento preferido para evaluar la pureza de una fracción es calcular la actividad específica de la fracción, compararla con la actividad específica del extracto inicial y, por tanto, calcular el grado de pureza, evaluada en este documento por un "número de purificación de -veces". Las unidades reales usadas para representar la cantidad de actividad dependerán, por supuesto, de la técnica de ensayo particular elegida para seguir la purificación y de si el polipéptido, proteína o péptido expresado presenta una actividad detectable o no.

Diversas técnicas conocidas para uso en la purificación de proteínas también son adecuadas para moléculas de la presente invención. Éstas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares, o por desnaturalización por calor, seguido de centrifugación; etapa de cromatografía tal como cromatografía de intercambio iónico, de filtración en gel, en fase inversa, de hidroxilapatita, de exclusión y de afinidad; enfoque isoelectrico; electroforesis en gel (incluyendo electroforesis en gel de poliacrilamida); y combinaciones de tales y otras técnicas. El orden de realización de las diversas etapas de purificación puede variarse, y ciertas etapas pueden omitirse, y todavía producir un procedimiento adecuado para la preparación de un polipéptido, proteína o péptido sustancialmente purificado.

No hay requisito general de que el polipéptido, proteína o péptido siempre se proporcione en su estado más purificado. De hecho, se contempla que productos sustancialmente menos purificados tendrán utilidad en ciertas realizaciones. La purificación parcial puede llevarse a cabo usando menos etapas de purificación en combinación, o utilizando formas diferentes, del mismo esquema de purificación general. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía en columna de intercambio catiónico realizada utilizando un aparato de HPLC producirá generalmente una purificación de "-veces" mayor que la misma técnica utilizando un sistema de cromatografía a baja presión. Los procedimientos que presentan un menor grado de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total del producto de proteína, o en el mantenimiento de la actividad de una proteína expresada.

Se sabe que la migración de un polipéptido puede variar, algunas veces significativamente, con diferentes condiciones de SDS/PAGE (Capaldi y col., Biochem. Biophys. Res. Comm., 76:425, 1977). Por tanto, se apreciará que bajo condiciones de electroforesis diferentes puedan variar los pesos moleculares aparentes de los productos de expresión purificados o parcialmente purificados.

En otra realización relacionada adicional, la invención proporciona un procedimiento para producir una construcción de proteína que comprende las etapas de cultivar una célula huésped de la invención en un medio nutritivo y aislar el polipéptido de la construcción de la célula o el medio. El aislamiento del polipéptido de las células o del medio en el que se cultivan las células se lleva a cabo por procedimientos de purificación conocidos en la técnica, por ejemplo, procedimientos cromatográficos convencionales que incluyen cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía de afinidad por receptor, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad por lectina, filtración por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio catiónico o aniónico, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), HPLC de fase inversa y similares. Todavía otros procedimientos de purificación incluyen aquellos en los que la proteína deseada se expresa y se purifica como una proteína de fusión que tiene una marca específica, etiqueta o resto quelante que es reconocido por un componente o agente de unión específica. La proteína purificada puede escindirse para dar la proteína deseada, o quedarse como una proteína de fusión intacta. La escisión del componente de fusión puede producir una forma de la proteína deseada que tiene residuos de aminoácidos adicionales como resultado del proceso de escisión.

En realizaciones preferidas, la purificación de los polipéptidos quiméricos de la presente invención puede lograrse usando purificación por afinidad usando un dominio extracelular de uno o más de la familia de PDGF/VEGF de receptores tales como VEGFR-1 (Flt1) o VEGFR-2 (KDR/flk-1), u otras porciones de un receptor a las que puedan unirse los polipéptidos quiméricos de la invención. Una purificación por afinidad a modo de ejemplo de composiciones relacionadas con VEGF se describe en, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6.342.219, incorporada en este documento por referencia. En un procedimiento de purificación por afinidad a modo de ejemplo usando el dominio extracelular de VEGFR-2, la composición que va a purificarse que contiene el polipéptido se concentra

inicialmente 30-50 veces usando cartuchos de filtración Centrprep y se carga en una columna de dominio extracelular de VEGFR inmovilizado (EC). Se preparan dos matrices de afinidad. En el primer caso, la proteína de fusión VEGFR-EC-6xHis está reticulada con Sepharose 4B activada con CNBr (Pharmacia) y en el segundo caso la proteína de fusión VEGFR-EC-Ig se acopla a proteína A-Sepharose usando pimelidato de dimetilo (Schneider y col., J. Biol. Chem. 257: 10766-10769, 1982). El material eluido de la columna de afinidad se somete a más purificación usando cromatografía de intercambio iónico y a alta presión en fase inversa y electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Un protocolo de purificación por afinidad usando el dominio de EC de VEGFR-3 se describe en la patente de EE.UU. nº 5.776.755.

Otro procedimiento de purificación por cromatografía por afinidad que puede usarse para purificar los polipéptidos quiméricos de la presente invención emplea cromatografía de inmutafinidad usando anticuerpos específicos para uno o más de los dominios de unión a RTK, un dominio flanqueante, o un dominio adicional, si está incluido, tal como un dominio de unión a heparina, marca de epítoto o secuencia ligadora. Los anticuerpos para diversos factores de crecimiento VEGF y PDGF son muy conocidos y también se producen fácilmente usando técnicas convencionales. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para VEGF-A son útiles para la purificación de construcciones que incluyen el dominio de unión a RTK de VEGF-A. Además, la purificación de los polipéptidos quiméricos de la presente invención puede lograrse usando procedimientos para la purificación de VEGF-A o VEGF-A que se describen en la patente de EE.UU. nº 5.332.671.

D. Ácidos nucleicos y composiciones relacionadas.

La invención engloba polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención y también polinucleótidos que se hibridan bajo condiciones moderadamente restrictivas o de alta rigurosidad con la cadena no codificante completa, o complemento, de tales polinucleótidos. Las moléculas complementarias son útiles como moldes para sintetizar moléculas codificantes y para preparar polinucleótidos batenarios estables. Debido a la muy conocida degeneración del código genético universal, pueden sintetizarse numerosas secuencias de polinucleótidos que codifican cada polipéptido quimérico de la presente invención. Todos aquellos polinucleótidos se contemplan como parte de la invención. Tales polinucleótidos son útiles para la expresión recombinante de polipéptidos de la invención *in vivo* o *in vitro* (por ejemplo, para terapia génica). Los polinucleótidos también son útiles para la manipulación para diseñar construcciones de la invención con dominios funcionales introducidos o mutaciones o similares.

Este género de polinucleótidos engloba polinucleótidos que codifican polipéptidos con una o algunas diferencias de aminoácidos (adiciones, inserciones o deleciones) con respecto a secuencias de aminoácidos específicamente representadas en este documento. Tales cambios se introducen fácilmente realizando, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio.

Los polinucleótidos de la invención (y polipéptidos así codificados) puede definirse por moléculas que se hibridan bajo condiciones especificadas con una secuencia de polinucleótidos complementaria a una secuencia que codifica una construcción de la invención.

Condiciones de hibridación altamente restrictivas a modo de ejemplo son las siguientes: hibridación a 65°C durante al menos 12 horas en una disolución de hibridación que comprende 5X SSPE, 5X Denhardt, SDS al 0,5% y 2 mg de ADN no homólogo sonificado por 100 ml de disolución de hibridación; lavar dos veces durante 10 minutos a temperatura ambiente en una disolución de lavado que comprende 2X SSPE y SDS al 0,1%; seguido de lavado una vez durante 15 minutos a 65°C con 2X SSPE y SDS al 0,1%; seguido de un lavado final durante 10 minutos a 65°C con 0,1X SSPE y SDS al 0,1%. Los lavados de rigurosidad moderada pueden lograrse lavando con 0,5X SSPE en lugar de 0,1X SSPE en el lavado de 10 minutos final a 65°C. Los lavados de baja rigurosidad pueden lograrse usando 1X SSPE durante el lavado de 15 minutos a 65°C, y omitiendo el lavado de 10 minutos final. Se entiende en la materia que las condiciones de rigurosidad equivalente pueden lograrse mediante la variación de la temperatura y el tampón, o la concentración de sales como se describe Ausubel y col. (Eds.), *Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1994), pág. 6.0.3 a 6.4.10. Las modificaciones en las condiciones de hibridación pueden determinarse empíricamente o calcularse con precisión basándose en la longitud y el porcentaje del apareamiento de bases guanosa/citosina (GC) de la sonda. Las condiciones de hibridación pueden calcularse como se describe en Sambrook y col., (Eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Nueva York (1989), pág. 9.47 a 9.51.

Por ejemplo, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones de hibridación moderadamente restrictivas o de alta rigurosidad con el complemento de cualquier secuencia de nucleótidos específica de la invención, y que codifica un polipéptido quimérico como se describe en este documento que se une al menos a uno de los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular o factor de crecimiento derivado de plaquetas que se producen naturalmente.

En una realización relacionada, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que es idéntica al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o el 99% a cualquier secuencia de nucleótidos específica de la invención y que codifica un polipéptido que se une al menos a uno de los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular o factor de crecimiento derivado de plaquetas que se producen naturalmente.

En una realización relacionada, la invención proporciona vectores que comprenden un polinucleótido de la invención. Tales vectores son útiles, por ejemplo, para amplificar los polinucleótidos en células huésped para crear cantidades útiles de los mismos y para expresar polipéptidos de la invención usando técnicas recombinantes. En realizaciones preferidas, el vector es un vector de expresión en el que el polinucleótido de la invención está ligado operativamente a un polinucleótido que comprende una secuencia de control de la expresión. Se contemplan específicamente construcciones de expresión recombinantes que se replican autónomamente tales como vectores de ADN de plásmido y vírico que incorporan polinucleótidos de la invención. Las secuencias de control de la expresión de ADN incluyen promotores, potenciadores y operadores y generalmente se seleccionan basándose en los sistemas de expresión en los que va a utilizarse la construcción de expresión. Las secuencias promotoras y potenciadoras preferidas se seleccionan generalmente por la capacidad para aumentar la expresión génica, mientras que las secuencias operadoras se seleccionan generalmente por la capacidad para regular la expresión génica. Los vectores de expresión son útiles para la producción recombinante de polipéptidos de la invención. Las construcciones de expresión de la invención también pueden incluir secuencias que codifican uno o más marcadores de selección que permiten la identificación de células huésped que llevan la construcción. Las construcciones de expresión también pueden incluir secuencias que facilitan, y preferentemente promueven, la recombinación homóloga en una célula huésped. Las construcciones preferidas de la invención también incluyen secuencias necesarias para la replicación en una célula huésped.

En realizaciones preferidas, los polinucleótidos de la invención comprenden además secuencias adicionales para facilitar la terapia génica. En una realización, un transgén "desnudo" que codifica un polipéptido de la invención (es decir, un transgén sin un vector vírico, liposómico u otro vector para facilitar la transfección) se emplea para terapia génica. En esta realización, el polinucleótido de la invención comprende preferentemente una secuencia promotora y/o potenciadora adecuada (por ejemplo, promotor/potenciador del citomegalovirus [Lehner y col., J. Clin. Microbiol., 29:2494-2502 (1991); Boshart y col., Cell, 41:521-530 (1985)]; promotor del virus del sarcoma de Rous [Davis y col., Hum. Gene Ther., 4:151 (1993)]; promotor de Tie [Korhonen y col., Blood, 86(5): 1828-1835 (1995)]; o promotor del virus simio 40) para la expresión en las células de mamífero diana, estando el promotor ligado operativamente aguas arriba (es decir, 5') de la secuencia codificante del polipéptido. En una realización preferida, la secuencia promotora comprende un promotor específico de la piel. Secuencias promotoras preferidas incluyen los promotores K14, K5, K6, K16 para la epidermis y el promotor del colágeno alfa 1(I) para la dermis (Diamond, I. y col., J. Invest. Dermatol., 115(5):788-794 (2000); Galera, P. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(20):9372-9376 (1994); Wawersik, M. J. y col., Mol. Biol. Cell, 12(11):3439-3450 (2001)). Los polinucleótidos de la invención también incluyen preferentemente adicionalmente una secuencia de poliadenilación adecuada (por ejemplo, la secuencia de poliadenilación del gen SV40 o de la hormona de crecimiento humana) ligada operativamente aguas abajo (es decir, 3') de la secuencia codificante del polipéptido. Los polinucleótidos de la invención también comprenden preferentemente una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal secretor fusionado en marco con la secuencia de polipéptidos. El péptido señal secretor dirige la secreción del polipéptido de la invención mediante las células que expresan el polinucleótido, y es escindido por la célula del polipéptido secretado. La secuencia de péptidos señal puede ser la de otra proteína secretada, o puede ser una secuencia señal completamente sintética eficaz para dirigir la secreción en células del sujeto mamífero.

El polinucleótido puede comprender adicionalmente opcionalmente secuencias cuya única función prevista es facilitar la producción a gran escala del vector, por ejemplo, en bacterias tal como un origen de replicación bacteriano y una secuencia que codifica un marcador de selección. Sin embargo, en una realización preferida, tales secuencias superfluas son separadas por escisión al menos parcialmente antes de la administración a seres humanos según procedimientos de la invención. Tales polinucleótidos pueden prepararse y administrarse para terapia génica usando procedimientos que se han descrito en la bibliografía para otros transgenes. Véase, por ejemplo, Isner y col., Circulation, 91: 2687-2692 (1995); e Isner y col., Human Gene Therapy, 7: 989-1011 (1996).

Los vectores también son útiles para pautas de tratamiento de "terapia génica", en las que un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención se introduce en un sujeto en necesidad de tratamiento que implica la modulación (estimulación o bloqueo) de receptores del factor de crecimiento endotelial vascular en una forma que haga que las células en el sujeto expresen el polipéptido de la invención *in vivo*. Los aspectos de la terapia génica que se describen en la publicación de patente de EE.UU. de propiedad común nº 2002/0151680 y WO 01/62942 también son aplicables en este documento.

Cualquier vector adecuado puede usarse para introducir un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención que codifica uno de los polipéptidos de la invención en el huésped. Vectores a modo de ejemplo que se han descrito en la bibliografía incluyen vectores retrovíricos deficientes en la replicación que incluyen, pero no se limitan a, vectores de lentivirus [Kim y col., J. Virol., 72(1): 811-816 (1998); Kingsman & Johnson, Scrip Magazine, octubre, 1998, pág. 43-46.]; vectores víricos adeno-asociados (AAV) [patente de EE.UU. nº 5.474.935; patente de EE.UU. nº 5.139.941; patente de EE.UU. nº 5.622.856; patente de EE.UU. nº 5.658.776; patente de EE.UU. nº 5.773.289; patente de EE.UU. nº 5.789.390; patente de EE.UU. nº 5.834.441; patente de EE.UU. nº 5.863.541; patente de EE.UU. nº 5.851.521; patente de EE.UU. nº 5.252.479; Gnatenko y col., J. Invest. Med., 45: 87-98 (1997)]; vectores adenovíricos (AV) [véanse, por ejemplo, patente de EE.UU. nº 5.792.453; patente de EE.UU. nº 5.824.544; patente de EE.UU. nº 5.707.618; patente de EE.UU. nº 5.693.509; patente de EE.UU. nº 5.670.488; patente de EE.UU. nº 5.585.362; Quantin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 2581-2584 (1992); Stratford Perricadet y col., J. Clin. Invest., 90: 626-630 (1992); y Rosenfeld y col., Cell, 68: 143-155 (1992)]; una quimera vírica adenoasociada

adenovírica (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. nº 5.856.152) o una variolovacuna vírica o un herpesvírico (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. nº 5.879.934; patente de EE.UU. nº 5.849.571; patente de EE.UU. nº 5.830.727; patente de EE.UU. nº 5.661.033; patente de EE.UU. nº 5.328.688); transferencia de genes mediada por lipofectina (BRL); vectores liposómicos [véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.631.237 (liposomas que comprenden proteínas del virus Sendai)]; y combinaciones de los mismos. Los vectores adenovíricos deficientes en la replicación constituyen una realización preferida.

La terapia génica con ADN desnudo de plásmido es otro vehículo para administrar los polipéptidos quiméricos de la invención. Un ensayo actual, GENASIS (Estudio en investigación de la estimulación angiogénica genética), está siendo realizado por Corautus Genetics, Inc., para evaluar la seguridad y la eficacia de un miembro de la familia de VEGF para el tratamiento de pacientes con angina grave. El ensayo emplea según se informa dosis definidas del transgén en forma de ADN "desnudo" de plásmido, un vector de administración no vírico, administrado a tejido del músculo cardíaco enfermo mediante el sistema de catéter por inyección directa Stiletto™ (Boston Scientific Corporation). Una vez administrado, el plásmido de ADN parece ser captado y expresado por el miocardio cercano al sitio de inyección. El ensayo clínico espera ver el crecimiento terapéutico de nuevos vasos sanguíneos.

En otra realización relacionada, la invención proporciona células huésped que incluyen células procariotas y eucariotas que se transforman o se transfectan (estable o transitoriamente) con polinucleótidos de la invención o vectores de la invención. Los polinucleótidos de la invención pueden introducirse en la célula huésped como parte de un plásmido circular, o como ADN lineal que comprende una región codificante de proteínas aislada o un vector vírico. Los procedimientos para introducir ADN en la célula huésped, que son muy conocidos y puestos rutinariamente en práctica en la materia, incluyen la transformación, transfección, electroporación, inyección nuclear o fusión con vehículos tales como liposomas, micelas, células fantasma y protoplastos. Como se establece anteriormente, tales células huésped son útiles para amplificar los polinucleótidos y también para expresar los polipéptidos de la invención codificados por el polinucleótido. La célula huésped puede aislarse y/o purificarse. La célula huésped también puede ser una célula transformada *in vivo* para producir expresión transitoria o permanente del polipéptido *in vivo*. La célula huésped también puede ser una célula aislada transformada *ex vivo* e introducida después de la transformación, por ejemplo, para producir el polipéptido *in vivo* para fines terapéuticos. La definición de célula huésped excluye explícitamente un ser humano transgénico.

Tales células huésped son útiles en ensayos como se describen en este documento. Para la expresión de polipéptidos de la invención es aceptable cualquier célula huésped que incluye, pero no se limita a, células huésped bacterianas, de levadura, de planta, de invertebrado (por ejemplo, insecto), de vertebrados y de mamífero. Para desarrollar las preparaciones terapéuticas se prefiere la expresión en líneas de células de mamífero, especialmente líneas de células humanas. Se espera que el uso de células huésped de mamífero proporcione tales modificaciones postraduccionales (por ejemplo, glicosilación, truncación, lipidación y fosforilación), ya que puede desearse conferir actividad biológica óptima a productos de expresión recombinantes de la invención. Las formas glicosiladas y no glicosiladas de los polipéptidos están englobadas por la presente invención. Similarmente, la invención engloba adicionalmente polipéptidos descritos anteriormente que han sido covalentemente modificados para incluir una o más uniones de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, polioxietilenglicol o polipropilenglicol.

Similarmente, la invención proporciona el uso de polipéptidos o polinucleótidos o células huésped de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos descritos en este documento que incluyen, pero no se limitan a, trastornos caracterizados por proliferación de células endoteliales insuficiente o no deseable y/o trastornos caracterizados por isquemia y/u oclusión de vasos, deseándose la neovascularización.

En una realización relacionada, la invención proporciona un kit que comprende un polinucleótido, polipéptido o composición de la invención envasado en un recipiente tal como un vial o frasco y que comprende además una etiqueta unida a o embalada con el recipiente describiendo la etiqueta el contenido del recipiente y proporcionando indicaciones y/o instrucciones referentes al uso del contenido del recipiente para tratar uno o más estados de enfermedad como se describen en este documento.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona procedimientos de producción de polipéptidos que tienen novedosas propiedades de unión al receptor de VEGF y de estimulación, y procedimientos para producir polinucleótidos que codifican tales polipéptidos.

Como se usa en este documento, "modular el crecimiento de células endoteliales de mamífero" significa estimular tal crecimiento induciendo una señal mitogénica mediante receptores de la superficie celular de unión expresados en células endoteliales vasculares, o inhibiendo tal crecimiento. La inhibición puede ser debida al bloqueo de los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular o linfático o a la formación de heterodímeros con factores de crecimiento endógenos que previenen la estimulación de receptores endógenos por los factores de crecimiento endógenos. La inhibición también puede lograrse conjugando agentes citotóxicos con polipéptidos de la invención que se unen a receptores de VEGF. Toxinas a modo de ejemplo son conocidas en la técnica y se describen en cualquier parte en este documento. Los polipéptidos de la invención conjugados con agentes citotóxicos u otros agentes que modulan el crecimiento celular se contemplan como otro aspecto de la invención. Las moléculas agonistas de la invención que estimulan el crecimiento de células endoteliales son una clase preferida de agentes. También se prefieren antagonistas que inhiben el crecimiento de células endoteliales.

E. Procedimientos de uso de construcciones tales como polipéptidos quiméricos de VEGF

En otra realización más, la invención proporciona numerosos procedimientos *in vitro* e *in vivo* de uso de los polipéptidos y polinucleótidos quiméricos de la invención. En términos generales, los polipéptidos quiméricos de la invención son útiles para modular (estimular o inhibir) procesos celulares que están mediados por cualquiera de la familia de PDGF/VEGF de receptores. Estos receptores pueden participar singularmente en ciertos procesos y en combinación, a grados variables, en otros procesos.

Por tanto, en una variación, la invención es un procedimiento de modulación de la señalización de uno o más de los receptores de VEGF. En una variación se contempla la modulación para activar la señalización (estimulación), y la célula se pone en contacto con un polipéptido de la invención que estimula la señalización del receptor en una cantidad suficiente para unirse a uno o más receptores e inducir la señalización del receptor. Preferentemente se emplea una cantidad tal que es eficaz para estimular una respuesta celular tal como una proliferación *in vitro* o *in vivo* de células endoteliales y/o reclutamiento o angiogénesis o linfangiogénesis. Los objetivos terapéuticos deseados incluyen cicatrización y mejora de la circulación en tejidos que padecen isquemia o enfermedad oclusiva.

En otra variación se contempla la modulación para inhibir la señalización. La célula se pone en contacto con un polipéptido que inhibe la activación del receptor inducida por ligando en una cantidad suficiente para inhibir la señalización que es inducida por los polipéptidos del factor de crecimiento del ligando del receptor que existen endógenamente en el entorno de la célula. En una realización relacionada, la inhibición se logra administrando una construcción de la invención que está conjugada con una citotoxina o precursor de citotoxina con el fin de detener el crecimiento de (o destruir) una célula que expresa un receptor diana.

Los estudios de dosis-respuesta permiten la determinación precisa de una cantidad apropiada de polipéptido quimérico a emplear. Cantidades eficaces pueden estimarse a partir de mediciones de la afinidad de unión de un polipéptido por un receptor diana, de la cantidad de receptor presente en células diana, del volumen de dilución esperado (por ejemplo, peso del paciente y volumen en sangre para realizaciones *in vivo*) y de las velocidades de eliminación del polipéptido. La bibliografía existente referente a la dosificación de ligandos de VEGFR conocidos también facilita orientación para la dosificación de moléculas de la invención.

En términos generales, las realizaciones descritas en este documento en el contexto de la administración de polipéptidos también pueden ponerse en práctica administrando polinucleótidos que codifican los polipéptidos. La terapia con polinucleótidos (por ejemplo, usando vectores de terapia génica) puede producir la producción sostenida de una construcción *in vivo*, reduciendo o eliminando la necesidad de la dosificación repetida de polipéptidos.

Sin pretender limitarse a ninguna teoría particular, un atributo de las construcciones de la invención relevante para la eficacia terapéutica puede ser velocidades de eliminación reducidas y una mejor elección de diana en comparación con polipéptidos de ligandos de RTK naturales (VEGF/PDGF nativos).

Los polipéptidos de la invención que pueden activar VEGFR-1 y VEGFR-2 pueden usarse para promover las funciones endoteliales de la vasculatura y tejidos de la sangre tales como para tratar pérdida de vasos sanguíneos, oclusión de vasos sanguíneos y tejidos isquémicos. En una realización preferida, los polipéptidos quiméricos descritos en este documento se usan para tratar un sujeto humano al que se le ha diagnosticado una enfermedad cardiovascular.

El VEGF-A ha desempeñado una función terapéutica en diversos trastornos cardiovasculares. Se ha mostrado que la administración intraarterial o intramuscular de VEGF-A aumenta significativamente la perfusión y el desarrollo de vasos colaterales en un modelo de conejo en el que se creó isquemia crónica mediante la extirpación quirúrgica de la arteria femoral (Takeshita y col., J. Clin. Invest., 93:662-670, 1994; Takeshita y col., Circulation, 90:228-234, 1994). Estos estudios proporcionaron evidencia angiográfica de neovascularización en las extremidades isquémicas. Otros estudios han mostrado que la administración de VEGF-A también conduce a una recuperación de reactividad endotelial normal en endotelio disfuncional (Sellke y col., Am. J. Physiol., 262:H1669-1675, 1992; Bauters y col., Circulation, 91:2793-2801, 1995). Isner y col. (Hum. Gene Ther., 7:859-888, 1996) probaron la hipótesis de que el tratamiento con VEGF-A produce angiogénesis terapéuticamente significativa en un ensayo de terapia génica en pacientes con isquemia grave de extremidades. Las transferencia de genes arteriales de ADN desnudo de plásmido que codifica VEGF-A aplicada al recubrimiento polimérico de hidrogel de un balón de angioplastia produjo una evidencia angiográfica e histológica en la rodilla, parte central de la tibia y el tobillo. Bauters y col. (Am. J. Physiol., 267:H1263-1271, 1994) han mostrado que tanto la velocidad de flujo máxima como la circulación sanguínea máxima aumentan significativamente en extremidades isquémicas después de la administración de VEGF-A. También se ha demostrado que después de la administración de VEGF-A se produjo un aumento de la circulación sanguínea en un modelo de perro de insuficiencia coronaria (Banai y col., Circulation, 89:2189-2199, 1994). Estas observaciones proporcionan una indicación de que los polinucleótidos o polipéptidos según la invención pueden usarse para tratar o prevenir diversos trastornos cardiovasculares mediante angiogénesis terapéutica.

Los polipéptidos de la invención que pueden activar VEGFR-3 pueden usarse para promover las funciones endoteliales de vasos y tejidos linfáticos tales como para tratar la pérdida de vasos linfáticos, oclusiones de vasos linfáticos, linfangiomas y linfedemas idiopáticos primarios que incluyen enfermedad de Milroy y linfedema precoz,

además de linfedemas secundarios que incluyen aquellos resultantes de la extirpación de ganglios y vasos linfáticos, radioterapia y cirugía en el tratamiento de cáncer, traumatismo e infección.

Los polinucleótidos o polipéptidos de la invención pueden administrarse puramente como un tratamiento profiláctico para prevenir linfedema en sujetos en riesgo de desarrollar linfedema o como un tratamiento terapéutico para sujetos aquejados de linfedema con el fin de mejorar sus síntomas (por ejemplo, hinchazón debida a la acumulación de linfa).

Los polinucleótidos y polipéptidos de la invención que activan VEGFR-3 también pueden usarse para promover el recrecimiento o la permeabilidad de vasos linfáticos en pacientes cuyos vasos linfáticos auxiliares se extirparon durante intervenciones quirúrgicas en el tratamiento de cáncer (por ejemplo, cáncer de mama). Los polinucleótidos y polipéptidos de la invención pueden usarse para tratar la vascularización en, por ejemplo, pacientes con trasplante de órganos. Una composición que contiene el (los) polipéptido(s) o polinucleótido(s) de la invención puede administrarse directamente al segmento de vaso aislado antes de ser injertado *in vivo* para minimizar el rechazo del material trasplantado y para estimular la vascularización de los materiales trasplantados.

Los polipéptidos de la invención que activan la actividad del receptor de VEGF pueden usarse para tratar heridas, incisiones quirúrgicas, llagas y otras indicaciones en las que se espera razonablemente que se promueva la curación si el proceso de neovascularización puede inducirse y/o acelerarse. En ciertas realizaciones, tales polipéptidos pueden usarse para mejorar la curación de colgajos de piel o injertos de piel tras la cirugía como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. copresentada de propiedad común nº 10/868.549 presentada el 14 de junio de 2004 y la solicitud de patente internacional nº PCT/US2004/019197 presentada el 14 de junio de 2004.

Además, se ha observado la expresión de receptores para factores de crecimiento endoteliales vasculares en ciertas células progenitoras tales como células progenitoras hematopoyéticas y/o endoteliales, y se ha observado que VEGF-C tiene actividad mielopoyética. Estas observaciones proporcionan una indicación de que los polinucleótidos o polipéptidos según la invención pueden usarse para tratar o prevenir la inflamación, infección o trastornos inmunitarios mediante la modulación de la proliferación, diferenciación y maduración, o migración de células inmunitarias o células hematopoyéticas. Los polinucleótidos o polipéptidos según la invención también puede ser útiles para promover o inhibir el tráfico de leucocitos entre tejidos y vasos linfáticos y la migración dentro y fuera del timo. Véase la publicación de patente internacional nº WO 98/33917.

Los polinucleótidos y polipéptidos de la invención pueden usarse para estimular la mielopoyesis (especialmente el crecimiento de granulocitos neutrófilos) o inhibirla. Véase la publicación de patente internacional nº WO 98/33917. Por tanto, la invención incluye un procedimiento para modular la mielopoyesis en un sujeto mamífero que comprende administrar a un sujeto mamífero en necesidad de modulación de la mielopoyesis una cantidad de un polipéptido de la invención que es eficaz para modular mielopoyesis. En una realización se selecciona un sujeto mamífero que padece granulocitopenia, y el procedimiento comprende administrar al sujeto una cantidad de un polipéptido eficaz para estimular mielopoyesis. En particular, un polipéptido de la invención se administra en una cantidad eficaz para aumentar el número de neutrófilos en sangre del sujeto.

En una realización relacionada, la invención incluye un procedimiento de aumentar el número de neutrófilos en la sangre de un sujeto mamífero que comprende la etapa de expresar en una célula en un sujeto en necesidad de un aumento del número de neutrófilos en sangre un ADN que codifica un polinucleótido de la invención que puede activar la señalización mediante receptores de VEGF, el ADN ligado operativamente a un promotor u otra secuencia de control que promueva la expresión del ADN en la célula. Similarmente, la invención incluye un procedimiento de modulación del crecimiento de granulocitos neutrófilos *in vitro* o *in vivo* que comprende la etapa de poner en contacto citoblastos de mamífero con un polipéptido de la invención en una cantidad eficaz para modular el crecimiento de células endoteliales de mamífero.

La invención también incluye un procedimiento para modular el crecimiento de células progenitoras CD34+ de mamífero (especialmente células progenitoras hematopoyéticas y células progenitoras endoteliales, más preferentemente células CD34+VEGFR-2+ y CD34+VEGFR-3+, todavía más preferentemente CD133+VEGFR2+ y CD133+VEGFR3+) *in vitro* o *in vivo* que comprende la etapa de poner en contacto células progenitoras CD34+ de mamífero con un polipéptido de la invención en una cantidad eficaz para modular el crecimiento y/o la diferenciación de tales células (Peichev y col., Blood, 95:952-958; 2000; Salven y col., Blood, 168-172, 2003). Para procedimientos *in vitro* se contemplan específicamente células progenitoras CD34+ aisladas de sangre del cordón umbilical o médula ósea. También se contempla el aislamiento posterior de subfracciones de CD133+VEGFR2+ y CD133+VEGFR-3+. Los procedimientos *in vitro* e *in vivo* de la invención para estimular el crecimiento de células precursoras CD34+ también incluyen procedimientos en los que se emplean polipéptidos de la invención junto (simultáneamente o secuencialmente) con otros factores de polipéptido con el fin de modular la hematopoyesis/mielopoyesis o proliferación de células endoteliales. Tales otros factores incluyen, pero no se limitan a, factores estimulantes de colonias "CSF", por ejemplo, CSF de granulocitos (G-CSF), CSF de macrófagos (M-CSF) y CSF de granulocitos-macróforos (GM-CSF), interleucina 3 (IL-3, también llamado factor estimulante de múltiples colonias), otras interleucinas, factor de citoblasto (SCF), otros factores de polipéptido, y sus análogos que se han descrito y se conocen en la técnica. Véanse generalmente The Cytokine Handbook, segunda ed., Angus Thomson (editor), Academic Press (1996); Callard y Gearing, The Cytokine FactsBook, Academic Press Inc. (1994); y Cowling y

Dexter, TIBTECH, 10(10):349-357 (1992). El uso de un polipéptido de la invención como célula progenitora o factor o cofactor mielopoyético del crecimiento celular con uno o más de los anteriores factores puede potenciar efectos mielopoyéticos que no podían obtenerse previamente y/o potenciar efectos mielopoyéticos que podían obtenerse previamente a la vez que se usa menos de los factores anteriores que serían necesarios en ausencia de un polipéptido de la invención.

Los polinucleótidos y polipéptidos de la invención también pueden usarse en el tratamiento de trastornos pulmonares para mejorar la circulación de la sangre en el pulmón y/o el intercambio gaseoso entre los pulmones y la circulación sanguínea; para mejorar la circulación de la sangre al corazón y la permeabilidad del gas O₂ en casos de insuficiencia cardíaca; para mejorar la circulación sanguínea y el intercambio gaseoso en enfermedad crónica obstructiva de las vías respiratorias; y para tratar afecciones tales como insuficiencia cardíaca congestiva que implica acumulaciones de fluido en, por ejemplo, el pulmón resultante del aumento en la permeabilidad vascular, ejerciendo un efecto de compensación sobre la permeabilidad vascular con el fin de contrarrestar la acumulación de fluido.

Los polipéptidos de la invención que se unen, pero que no estimulan la señalización mediante uno o más de los receptores de VEGF, pueden usarse para tratar inflamación crónica producida por el aumento de la permeabilidad vascular, retinopatía asociada a diabetes, artritis reumatoide y psoriasis. Los polinucleótidos o polipéptidos según la invención que pueden inhibir la función de uno o más receptores de VEGF también pueden usarse para tratar edema, enfermedad arterial periférica, sarcoma de Kaposi o desarrollo retiniano anormal en recién nacidos prematuros.

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento para modular el crecimiento de células endoteliales en un sujeto mamífero que comprende las etapas de exponer células endoteliales de mamífero a un polipéptido según la invención en una cantidad eficaz para modular el crecimiento de las células endoteliales de mamífero. En una realización, la modulación del crecimiento se afecta usando un polipéptido que puede estimular la fosforilación de tirosina de receptores de VEGF en una célula huésped que expresa los receptores de VEGF. En la modulación del crecimiento de células endoteliales, la invención contempla la modulación de trastornos relacionados con células endoteliales. En una realización preferida, el sujeto, y las células endoteliales, son humanos. Las células endoteliales pueden proporcionarse *in vitro* o *in vivo* y pueden estar contenidas en un injerto de tejido. Una cantidad eficaz de un polipéptido es una cantidad necesaria para lograr un cambio reproducible en la tasa de crecimiento celular (como se determina por visualización microscópica o macroscópica y estimación del tiempo de duplicación de células, o ensayos de síntesis de ácidos nucleicos).

Como la angiogénesis y la neovascularización son esenciales para el crecimiento tumoral, la inhibición de la actividad angiogénica puede prevenir adicionalmente el crecimiento e incluso conducir a una regresión de tumores sólidos. Asimismo, la inhibición de la linfangiogénesis puede jugar un papel decisivo en la prevención de metástasis. Véase, por ejemplo, la publicación internacional n° WO 02/060950 y WO 00/21560. Los polinucleótidos y polipéptidos de la invención, cuando están conjugados con un agente citotóxico, pueden usarse para tratar neoplasias que incluyen sarcomas, melanomas, carcinomas y gliomas inhibiendo la angiogénesis tumoral.

Por tanto, se contempla que pueda tratarse una amplia variedad de cánceres usando los péptidos de la presente invención que incluyen cánceres de cerebro (glioblastoma, astrocitoma, oligodendroglioma, ependimomas), pulmón, hígado, bazo, riñón, ganglio linfático, páncreas, intestino delgado, glóbulos sanguíneos, colon, estómago, mama, endometrio, próstata, testículo, ovario, piel, cabeza y cuello, esófago, médula ósea, sangre u otro tejido.

En muchos contextos no es necesario que la célula tumoral sea destruida o inducida para que experimente una muerte celular normal o "apoptosis." Más bien, para realizar un tratamiento significativo, todo lo que se requiere es que el crecimiento tumoral se ralentice a un cierto grado o se localice en un área específica y se inhiba la diseminación a sitios dispares. Sin embargo, puede ser que el crecimiento tumoral sea completamente bloqueado, o que se logre algo de regresión tumoral. Terminología clínica como "remisión" y "reducción de la carga tumoral" también se contemplan dado su uso normal. En el contexto de la presente invención el efecto terapéutico puede resultar de una inhibición de la angiogénesis y/o una inhibición de la linfangiogénesis.

VEGF-C y VEGF-D de la familia de VEGF de factores de crecimiento tienen utilidad para prevenir estenosis o reestenosis de vasos sanguíneos. Véase la solicitud de patente internacional n° PCT/US99/24054 (documento WO 00/24412), "Uso de gen o proteína de VEGF-C o VEGF-D para prevenir reestenosis", presentada el 26 de octubre de 1999. Como se trata ahí, el VEGF-A también se ha probado para inhibir reestenosis. El VEGF-A acelera la reendotelización y se ha encontrado que atenúa la hiperplasia de la íntima en arteria carótida de rata o arteria de conejo lesionada por balón (Asahara y col., Circulation, 92:2802-2809, 1995; Callow y col., Growth Factors, 10:223-228, 1994). Los polipéptidos y polinucleótidos de la invención también tendrán utilidad para estas indicaciones y pueden sustituir (o usarse junto con) VEGF-C y VEGF-D con respecto a los materiales y procedimientos descritos en su interior. Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar un sujeto mamífero para prevenir estenosis o reestenosis de un vaso sanguíneo que comprende la etapa de administrar a un sujeto mamífero en necesidad de tratamiento para prevenir estenosis o reestenosis de un vaso sanguíneo una composición que comprende uno o más polipéptido(s) o polinucleótido(s) de la invención en una cantidad eficaz para prevenir estenosis o reestenosis del vaso sanguíneo. En una realización preferida, la administración comprende implantar

una prótesis intravascular en el sujeto mamífero, en la que la prótesis está recubierta o impregnada con la composición. Materiales a modo de ejemplo para construir una prótesis recubierta de fármaco o impregnada de fármaco se describen en bibliografía citada anteriormente y revisada en Lincoff y col., *Circulation*, 90: 2070-2084 (1994). En otra realización preferida, la composición comprende micropartículas compuestas por polímeros biodegradables tales como PGLA, polímeros no degradables o polímeros biológicos (por ejemplo, almidón) cuyas partículas encapsulan o están impregnadas de un polipéptido(s) de la invención. Tales partículas se administran a la pared intravascular usando, por ejemplo, un catéter de angioplastia para infusión. Otras técnicas para lograr la administración de fármaco localmente sostenida se revisan en Wilensky y col., *Trends Cardiovasc. Med.*, 3:163-170 (1993). Tales materiales y dispositivos son por sí mismos aspectos de la invención.

También se contempla la administración mediante una o más inyecciones intravenosas simultáneas a o posteriores a la angioplastia o procedimiento de derivación. La localización de los polipéptidos de la invención en el sitio del procedimiento se produce debido a la expresión de receptores de VEGF en células endoteliales proliferantes. La localización se facilita adicionalmente expresando recombinantemente los polipéptidos de la invención como un polipéptido de fusión (por ejemplo, fusionado con un oligopéptido de apolipoproteína B-100 como se describe en Shih y col., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 87:1436-1440 (1990). También se contempla la coadministración de polinucleótidos y polipéptidos de la invención.

Asimismo, la invención también proporciona dispositivos quirúrgicos que se usan para tratar trastornos circulatorios tales como prótesis intravasculares o endovasculares (patentes de EE.UU. nº 6.846.323 y 4.580.568), catéteres con balón (patente de EE.UU. nº 6.238.401), catéteres de infusión-perfusión (patente de EE.UU. nº 5.713.860), collares extravasculares (publicaciones de patente internacional WO 98/20027 y WO 99/55315), membranas elastoméricas y similares que se han mejorado recubriendo con, impregnando con, adhiriendo a o encapsulando dentro del dispositivo una composición que comprende un polinucleótido de polipéptido de la invención.

Los polinucleótidos o polipéptidos de la invención pueden administrarse puramente como un tratamiento profiláctico para prevenir estenosis, o poco antes, y/o simultáneamente a, y/o poco después de un procedimiento de angioplastia coronaria transluminal percutánea, con el fin de prevenir reestenosis del vaso objeto. En otra realización preferida, el polinucleótido o polipéptido se administra antes, durante y/o poco después de un procedimiento de derivación (por ejemplo, un procedimiento de derivación coronaria) para prevenir estenosis o reestenosis en o próxima al vaso trasplantado (injertado), especialmente estenosis en la localización del propio injerto. En otra realización más, el polinucleótido o polipéptido se administra antes, durante, o después de un trasplante vascular en la periferia vascular que se ha realizado para tratar isquemia periférica o claudicación intermitente. Por prevención de estenosis o reestenosis se indica tratamiento profiláctico para reducir la cantidad/gravedad de, y/o eliminar sustancialmente, la estenosis o reestenosis que frecuentemente se produce en tales procedimientos quirúrgicos. El polinucleótido o polipéptido se incluye en la composición en una cantidad y en una forma eficaz para promover la estimulación de receptores de VEGF en un vaso sanguíneo del sujeto mamífero, previniéndose así la estenosis o reestenosis del vaso sanguíneo.

En una realización preferida, el sujeto mamífero es un sujeto humano. Por ejemplo, el sujeto es una persona que padece enfermedad de las arterias coronarias que ha sido identificada por un cardiólogo como candidato que podría beneficiarse de un procedimiento de angioplastia por balón terapéutico (con o sin inserción de una prótesis intravascular) o de un procedimiento de derivación coronaria. También se contempla la práctica de los procedimientos de la invención en otros sujeto mamíferos, especialmente mamíferos que se usan convencionalmente como modelos para demostrar la eficacia terapéutica en seres humanos (por ejemplo, animales primates, porcinos, caninos o conejos).

Los polipéptidos de la invención pueden usarse para modular el crecimiento de células aisladas o líneas celulares. Por ejemplo, ciertos estados de enfermedad neoplásica se caracterizan por la aparición de receptores de VEGF sobre las superficies celulares [Valtola y col., *Am J Path* 154:1381-90 (1999)]. Los polipéptidos de la invención pueden cribarse para determinar la capacidad del polipéptido para modular el crecimiento de las células neoplásicas. Otros estados de enfermedad se caracterizan probablemente por mutaciones en receptores de VEGF [Ferrell y col., *Hum Mol Genetics* 7:2073-78 (1998)]. Los polipéptidos de la invención que modulan la actividad de las formas mutantes del receptor de VEGF de un modo diferente al de los factores de crecimiento endoteliales vasculares que se producen naturalmente serán útiles en la modulación de los síntomas y la gravedad de tales estados de enfermedad.

Los polipéptidos de la invención pueden usarse para modular el crecimiento de citoblastos, células progenitoras para diversos tejidos y cepas aisladas de células primarias que expresan el receptor para los polipéptidos.

Como se indica en este documento anteriormente y se trata adicionalmente en la solicitud de patente de EE.UU. nº 10/669.176 presentada el 23 de septiembre de 2003, las composiciones de VEGF-C son útiles en el tratamiento de trastornos neurológicos. Las composiciones de la invención son útiles en el tratamiento de tales trastornos tanto solas como conjuntamente con agentes terapéuticos adicionales tales como un factor de crecimiento neural. Factores de crecimiento neural a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, interferón gamma, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF), neurogenina, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), hormona tiroidea, proteínas morfogénicas óseas

(BMP), factor inhibidor de leucemia (LIF), sonic hedgehog y factor neurotrófico derivado de la línea de células de la glía (GDNF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucinas, interferones, factor de citoblasto (SCF), activinas, inhibinas, quimiocinas, ácido retinoico y factor neurotrófico ciliar (CNTF). En un aspecto, la invención contempla una composición que comprende un ligando de VEGFR-3 de unión a heparina de la invención y un factor de crecimiento neural en un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, o polinucleótidos que comprenden al mismo.

Diversas células neurales expresan uno o más de los receptores de VEGF (por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2 y neuropilina 1) y, por tanto, pueden responder directamente al VEGF-A liberado por células neurales vecinas (Oosthuysen y col., Nat. Genet., 28:131-138, 2001; Sundell y col., J. Neurosci., 19:5731-5740, 1999; Sundell y col., Neuroreport, 12:105-108, 2001). Por ejemplo, VEGF-A estimula la excrecencia axonal en cultivos de explante de ganglios retinianos o de la raíz cervical o dorsal superior. Además, en condiciones de estrés hipóxico, excitotóxico u oxidativo, el VEGF-A aumenta la supervivencia de neuronas hipocámpicas, corticales, de los gránulos cerebelosos, dopaminérgicas, autonómicas y sensoriales. El VEGF-A también estimula el crecimiento y la supervivencia de células de Schwann en condiciones hipóxicas y aumenta la proliferación y la migración de astrocitos y células de la microglía (Platanou y col., Neuroscience, 90:1529-1541, 1999; Krum y col., Neuroscience, 110:589-604, 2002; y Forstreuter y col., J. Neuroimmunol., 132:93-98, 2002). Estas observaciones proporcionan una indicación para el uso de los polinucleótidos o polipéptidos según la invención para tratar o prevenir o ralentizar la progresión de trastornos neurodegenerativos.

Los procedimientos de la invención se realizan preferentemente en el sujeto que tiene una enfermedad o afección caracterizada por crecimiento aberrante de células neuronales, cicatrización y lesión neuronal o degeneración neural. Una enfermedad o trastorno médico se considera que es una lesión nerviosa si se compromete la supervivencia o la función de las células nerviosas y/o sus procesos axonales. Tal lesión nerviosa se produce como resultado de condiciones que incluyen: lesión física que produce la degeneración de los procesos axonales y/o cuerpos de células nerviosas próximos al sitio de la lesión; isquemia como un accidente cerebrovascular; exposición a neurotoxinas tales como los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer y el SIDA tales como cisplatino y didesoxicitidina (ddC), respectivamente; enfermedades metabólicas crónicas tales como diabetes o disfunción renal; y enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (ELA) que producen la degeneración de poblaciones neuronales específicas. Las afecciones que implican lesión nerviosa incluyen enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, accidente cerebrovascular, polineuropatía diabética, neuropatía tóxica, cicatrización de la glía y lesión física al sistema nervioso tal como la producida por lesión física del cerebro y médula espinal o lesiones por choque o corte al brazo y la mano u otras partes del cuerpo que incluyen cese temporal o permanente de la circulación sanguínea a partes del sistema nervioso, como en accidente cerebrovascular.

En una realización, la enfermedad o afección que está tratándose es un trastorno neurodegenerativo en el que el trastorno neurodegenerativo se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de las neuronas motoras, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia y parálisis cerebral. En otra realización, la enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en traumatismo neural o lesión neural. Los procedimientos de la invención también pueden realizarse para tratar o mejorar los efectos del traumatismo o la lesión neural tales como lesión relacionada con accidente cerebrovascular, lesión de la médula espinal, lesión posoperatoria, isquemia cerebral y otros traumatismos.

La invención puede usarse para tratar una o más consecuencias adversas de la lesión del sistema nervioso central que se producen a partir de una variedad de afecciones. Trombo, émbolo e hipotensión sistémica están entre las causas más comunes de accidente cerebrovascular. Otras lesiones pueden producirse por hipertensión, enfermedad vascular cerebral hipertensiva, rotura de una aneurisma, un angioma, discrasia sanguínea, insuficiencia cardíaca, parada cardíaca, choque cardiogénico, insuficiencia renal, choque séptico, traumatismo craneal, traumatismo de la médula espinal, convulsión, hemorragia de un tumor u otra pérdida de volumen o presión de sangre. Estas lesiones conducen a un trastorno de la función fisiológica, posterior muerte de neuronas y necrosis (infarto) de las áreas afectadas. El término "accidente cerebrovascular" connota las deficiencias neurológicas repentinas y dramáticas resultantes asociadas a cualquiera de las lesiones anteriores.

Los términos "isquemia" o "episodio isquémico", como se usan en este documento, significan cualquier circunstancia que produzca un aporte deficiente de sangre a un tejido. Por tanto, un episodio isquémico del sistema nervioso central resulta de una insuficiencia o interrupción en el suministro de sangre a cualquier sitio del cerebro tal como, pero no se limita a, un sitio del cerebro, cerebelo o tronco encefálico. La médula espinal, que también es una parte del sistema nervioso central, es igualmente susceptible a isquemia resultante de la disminución de circulación sanguínea. Un episodio isquémico puede producirse por una constricción u obstrucción de un vaso sanguíneo, como se produce en el caso de un trombo o émbolo. Alternativamente, el episodio isquémico puede resultar de cualquier forma de función cardíaca alterada que incluye parada cardíaca, como se ha descrito anteriormente. Si la deficiencia es suficientemente grave y prolongada puede conducir a la interrupción de la función fisiológica, posterior muerte de neuronas y necrosis (infarto) de las áreas afectadas. El grado y el tipo de anomalía neurológica resultante de la lesión dependen de la localización y el tamaño del infarto o el foco de isquemia. Si la isquemia está asociada a un accidente cerebrovascular, puede ser de un grado tanto global como focal.

Los polipéptidos y las composiciones de polinucleótidos de la invención también serán útiles para tratar lesiones traumáticas al sistema nervioso central que se producen por fuerzas mecánicas tales como un golpe en la cabeza. El traumatismo puede implicar una agresión del tejido seleccionada de abrasión, incisión, contusión, punción, compresión, etc., tal como puede producirse a partir del contacto traumático de un objeto extraño con cualquier sitio de o complementario a la cabeza, cuello o columna vertebral del mamífero. Otras formas de lesión traumática pueden producirse a partir de la constricción o compresión del tejido del SNC del mamífero por una acumulación inapropiada de fluido (por ejemplo, un bloqueo o disfunción de la producción normal de líquido cefalorraquídeo o fluido del humor vítreo, recambio o regulación del volumen, o un hematoma o edema subdural o intracraneal). Similarmente, la constricción o compresión traumática puede producirse a partir de la presencia de una masa de tejido anormal tal como un tumor metastásico o primario.

Se contempla adicionalmente que los procedimientos de la invención dirigidos a indicaciones neurológicas pueden ponerse en práctica coadministrando un polipéptido quimérico de la presente invención con un agente neuroterapéutico. Por "agente neuroterapéutico" se indica un agente usado en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas o para tratar traumatismo neural y lesión neural. Agentes neuroterapéuticos a modo de ejemplo incluyen inhibidores de tacrina (Cognex), donepezilo (Aricept), rivastigmina (Exelon), galantamina (Reminil) y colinesterasa y fármacos antiinflamatorios que son útiles en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, además de otras enfermedades neurodegenerativas.

Agentes neuroterapéuticos adicionales incluyen anticolinérgicos, agonistas de la dopamina, catecol-O-metiltransferasas (COMT), amantadina (Symmetrel), Sinemet®, selegilina, carbidopa, ropinirol (Requip), coenzima Q10, pramipexol (Mirapex) y levodopa (L-dopa), que son útiles en el tratamiento de enfermedad de Parkinson, además de otras enfermedades neurodegenerativas. Otros agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos neurológicos serán conocidos para aquellos expertos en la materia y pueden ser útiles en las terapias de combinación contempladas en este documento.

F. Receptores de VEGF/PDGF y ensayos de unión a receptor

Las abundantes pruebas demuestran que la familia de VEGF/PDGF de factores de crecimiento ejerce sus actividades de factor de crecimiento, maduración celular, migración de células y otras actividades mediante la unión y estimulación de la fosforilación de receptores tirosina-cinasas (RTK) de la superficie celular (las pruebas indican que un dímero de polipéptido del factor de crecimiento se une a y estimula un dímero de receptor). Las construcciones de la invención que se unen a y estimulan la fosforilación de RTK son útiles como agonistas de los RTK. Por otra parte, las construcciones que se unen a, pero dejan de estimular, son útiles como agonistas de la actividad de factores de crecimiento VEGF/PDGF endógenos. Las propiedades de unión a RTK de factores de crecimiento nativos se describen más adelante.

Se han identificado al menos siete receptores de la superficie celular que interactúan con los miembros de la familia de PDGF/VEGF descritos anteriormente. Éstos incluyen PDGFR- α [véase, por ejemplo, nº de acceso de GenBank NM006206; Swiss Prot No. P16234], PDGF- β [véase, por ejemplo, nº de acceso de GenBank NM002609; Swiss Prot. No. P09619], VEGFR-1/Flt-1 (tirosina cinasa 1 similar a fms) [nº de acceso de GenBank X51602; De Vries y col., Science 255:989-991 (1992)]; VEGFR-2/KDR/Flk-1 (dominio de inserto de cinasa que contiene receptor/cinasa 1 de hígado fetal) [nº de registro de GenBank X59397 (Flk-1) y L04947 (KDR); Terman y col., Biochem. Biophys. Res. Comm. 187:1579-1586 (1992); Matthews y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9026-9030 (1991)]; VEGFR-3/Flt4 (tirosina cinasa 4 similar a fms; algunas veces citada en este documento como "R-3") [la patente de EE.UU. nº 5.776.755 y nº de acceso de GenBank X68203 y S66407; Pajusola y col., Oncogene 9:3545-3555 (1994)], neuropilina 1 [nº de acceso de Gen Bank NM003873] y neuropilina 2 [nº de acceso de Gen Bank NM003872; SwissProt O60462]. Los receptores alfa y beta de PDGF median en la señalización de PDGF.

VEGF121, VEGF165, VEGF-B, P1GF-1 y P1GF-2 se unen a VEGF-R1; VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF-C (maduro completamente procesado), VEGF-D (maduro completamente procesado), VEGF-E y NZ2 VEGF se unen a VEGFR-2; VEGF-C y VEGF-D se unen a VEGFR-3; VEGF165, VEGF-C, P1GF-2 y NZ2 VEGF se unen a neuropilina 1; y VEGF165 y VEGF-C se unen a neuropilina 2 [Neufeld y col., FASEB. J. 13:9-22 (1999); Stacker y Achen, Growth Factors 17:1-11 (1999); Ortega y col., Fron. Biosci. 4:141-152 (1999); Zachary, Intl. J. Biochem. Cell. Bio. 30:1169-1174 (1998); Petrova y col., Exp. Cell. Res. 253:117-130 (1999); publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 20030113324]. PDGF-A, PDGF-B y PDGF-C se unen a PDGFR- α . PDGF-B y PDGF-D se unen a PDGFR- β .

La expresión de VEGFR-1 se produce principalmente en células endoteliales vasculares, aunque algunas pueden estar presentes en monocitos, células de trofoblasto y células mesangiales renales [Neufeld y col., FASEB. J. 13:9-22 (1999)]. También se detectan altos niveles de ARNm de VEGFR-1 en órganos adultos, sugiriendo que VEGFR-1 tiene una función en el endotelio inactivo de vasos maduros no relacionados con el crecimiento celular. Ratones VEGFR-1-/- mueren en el útero entre el día 8,5 y 9,5. Aunque las células endoteliales se desarrollaron en estos animales, la formación de vasos sanguíneos funcionales estuvo gravemente alterada, sugiriendo que VEGFR-1 puede participar en las interacciones célula-célula o célula-matriz asociadas a la migración de células. Se ha demostrado que los ratones que expresan un VEGFR-1 mutado, en el que sólo faltaba el dominio de tirosina cinasa, muestran angiogénesis y supervivencia normales, sugiriendo que la capacidad de señalización de VEGFR-1 no es

esencial. [Neufeld y col., FASEB. J. 13:9-22 (1999); Ferrara, J. Mol. Med. 77:527-543 (1999)].

La expresión de VEGFR-2 es similar a la de VEGFR-1 porque se expresa ampliamente en el endotelio vascular, pero también está presente en citoblastos hematopoyéticos, megacariocitos y células progenitoras retinianas [Neufeld y col., FASEB. J. 13:9-22 (1999)]. Aunque el patrón de expresión de VEGFR-1 y VEGFR-2 se solapan ampliamente, las pruebas sugieren que en la mayoría de los tipos de células VEGFR-2 es el principal receptor mediante el cual la mayoría de los VEGF ejercen sus actividades biológicas. El examen de embriones de ratón deficientes en VEGFR-2 indica adicionalmente que este receptor se requiere para tanto la diferenciación de células endoteliales como el desarrollo de células hematopoyéticas [Joukov y col., J. Cell. Physiol. 173:211-215 (1997)].

VEGFR-3 se expresa ampliamente en células endoteliales durante la embriogénesis temprana. Durante etapas posteriores del desarrollo, la expresión de VEGFR-3 se restringe al desarrollo de vasos linfáticos [Kaipainen, A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3566-70 (1995)]. En adultos, los endotelios linfáticos y algunas vénulas de endotelio alto expresan VEGFR-3, y el aumento de la expresión se produce en senos linfáticos en ganglios linfáticos metastásicos y en linfangioma. VEGFR-3 también se expresa en un subconjunto de células hematopoyéticas CD34⁺ que pueden mediar en la actividad mielopoyética de VEGF-C demostrada por estudios de expresión en exceso [documento WO 98/33917]. El trastorno elegido como diana del gen VEGFR-3 en embriones de ratón conduce a fallo de la remodelación de la red vascular primaria, y muerte después del día embrionario 9,5 [Dumont y col., Science 282:946-49 (1998)]. Estos estudios sugieren una función esencial para VEGFR-3 en el desarrollo de la vasculatura embrionaria, y también durante la linfangiogénesis.

La neuropilina 1 se clonó originariamente como un receptor para la familia de colapsina/semaforina de proteínas que participan en la orientación de axones [Stacker y Achen, Growth Factors 17:1-11 (1999)]. Se expresa tanto en endotelios como en conjuntos específicos de neuronas durante la embriogénesis, y se cree que participa en la coordinación del sistema neuronal y vascular en desarrollo. Aunque la activación de neuropilina 1 no parece provocar respuestas biológicas en ausencia de los receptores tirosina-cinasa de la familia de VEGF, su presencia en células conduce a una unión más eficiente de respuestas mediadas por VEGF165 y VEGFR-2 [Neufeld y col., FASEB. J. 13:9-22 (1999)]. Los ratones que carecen de neuropilina 1 muestran anomalías en el sistema cardiovascular embrionario en desarrollo [Neufeld y col., FASEB. J. 13:9-22 (1999)].

La neuropilina 2 se identificó clonando por expresión y es un receptor de colapsina/semaforina estrechamente relacionado con la neuropilina 1. La neuropilina 2 es un receptor de VEGF específico de isoforma porque sólo se une a VEGF165. Al igual que la neuropilina 1, la neuropilina 2 se expresa tanto en endotelios como en neuronas específicas, y no se predice que funcione independientemente debido a su dominio intracelular relativamente corto. La función de la neuropilina 2 en el desarrollo vascular es desconocida [Neufeld y col., FASEB. J. 13:9-22 (1999); documento WO 99/30157]. La NP-2 se expresa principalmente en el sistema linfático y también se expresa a bajos niveles en las venas [Karpanen y col., FASEB J., 20:1462-1472 (2006)].

PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C y PDGF-D se unen a y activan, con distinta selectividad, complejos diméricos de los receptores tirosina cinasas PDGFR- α y PDGFR- β [Heldin, C.H. & Westermark, B. Physiol Rev 79, 1283-1316 (1999)]. Se ha informado que la expresión de PDGFR- α en células endoteliales vasculares cardíacas participa en la comunicación local entre distintas células en el corazón [Edelberg y col., J. Clinical Inves. 102:837-43 (1998)]. Los PDGF regulan la proliferación celular, supervivencia celular y quimiotaxis de muchos tipos de células *in vitro* (revisado en [Heldin y col., Biochimica et Biophysica Acta 1378:F79-113 (1998); Carmeliet P y col. Nature 380, 435-9 (1996); Hellström, M. y col. J Cell Biol 153, 543-53. (2001).] PDGF-A y PDGF-B pueden homodimerizarse o heterodimerizarse para producir tres isoformas diferentes: PDGF-AA, PDGF-AB o PDGF-BB. PDGF-A sólo puede unirse al receptor de PDGF- α (PDGFR- α que incluye homodímeros PDGR- α/α). PDGF-B puede unirse tanto a PDGFR- α como a PDGFR- β . Más específicamente, PDGF-B puede unirse a homodímeros PDGFR- α/α y PDGFR- β/β , además de heterodímeros PDGFR- α/α . PDGF-C se une a homodímeros PDGR- α/α y PDGF-D se une a homodímeros PDGFR- β/β y se ha informado que ambos se unen a heterodímeros PDGFR- α/β .

Tanto los ligandos como los receptores existen generalmente como dímeros, que incluyen tanto homodímeros como heterodímeros. Tales dímeros pueden influir en la unión. Por ejemplo, para PDGF, PDGF-AA se une a PDGFR- α/α . PDGF-AB y PDGF-CC se unen a PDGFR- α/α y PDGFR- α/β . PDGFR-BB se une tanto a los homodímeros como al receptor de PDGF heterodimérico. PDGF-DD se une a heterodímeros del receptor de PDGF y homodímeros del receptor beta [véase, por ejemplo, Pietras y col., Cancer cells, 3:439-443 (2003).] VEGF-A puede heterodimerizarse con VEGF-B y PIGF. VEGF, PDGF y PIGF pueden existir como dos o más isoformas, por ejemplo, variantes de corte y empalme, y no todas las isoformas de un factor de crecimiento particular compartirán el mismo perfil de unión o capacidad para dimerizarse con moléculas particulares. Ciertas isoformas del mismo factor de crecimiento pueden también dimerizarse entre sí. Por ejemplo las isoformas 167 y 186 de VEGF-B pueden heterodimerizarse entre sí.

Los ensayos de unión a receptor para determinar la unión de tales moléculas quiméricas a uno o más de los receptores de VEGF/PDGF son muy conocidos en la técnica. Ejemplos de tales ensayos de unión a receptor se enseñan, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE.UU. nº 09/795.006, documento WO 01/62942; Thuringer y col., J. Biol. Chem., 277:2028-2032 (2002) y Cao y col., FASEB J., 16:1575-1583 (2002) (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3 de la solicitud de patente de EE.UU. nº 09/795.006, y documento WO 01/62942, que detalla ensayos de unión de VEGF-C y ligandos del receptor de VEGF relacionados a proteínas de fusión de Fc del receptor de VEGF

soluble. El Ejemplo 5 de aquellos documentos detalla análisis de activación o inhibición del receptor por tales ligandos. El Ejemplo 6 describe análisis de afinidades de unión al receptor de tales ligandos. Además, Achen y col., Proc Natl Acad Sci USA 95:548 53 (1998), incorporado por referencia en su totalidad, enseña ensayos de unión a modo de ejemplo. Thuringer y col., J. Biol. Chem., 277:2028-2032 (2002) detalla ensayos de unión (activación e inhibición) para VEGF-A a VEGFR-2. Los ensayos de unión para PDGFR- α y PDGF- β se describen en Cao y col., FASEB J., 16:1575-1583 (2002). La unión de los polipéptidos quiméricos de VEGF descritos anteriormente a VEGFR-1 y VEGFR-2 puede analizarse usando tales ensayos a modo de ejemplo.

Se apreciará que tales ensayos de unión pueden realizarse con cualquier forma de receptores de VEGF/PDGF que se produzcan naturalmente que retengan la capacidad para unir sus ligandos respectivos que incluyen, pero no se limitan a, células completas que expresan naturalmente un receptor o que se han modificado recombinantemente para expresar el receptor; dominios de unión a ligando extracelular solubilizado truncado de receptores; fusiones que comprenden dominios extracelulares de receptores fusionados con otras proteínas tales como fosfatasa alcalina (por ejemplo, AP de VEGFR-2 descrita en Cao y col., J. Biol. Chem. 271:3154-62,1996) o secuencias de inmunoglobulina; y fusiones que comprenden dominios extracelulares de receptores fusionados con secuencias de marca (por ejemplo, una marca de polihistidina) útiles para capturar la proteína con un anticuerpo o con un soporte sólido; y dominios extracelulares de receptores químicamente unidos a soportes sólidos tales como perlas de Sepharose activadas con CNBr. Ensayos de unión de receptores a modo de ejemplo pueden realizarse según el procedimiento expuesto en el Ejemplo 3 de, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. nº 09/795.006 y el documento WO 01/62942,

a) Análisis de activación o inhibición de receptores por las proteínas quiméricas de VEGF.

En otro conjunto de ensayos, los polipéptidos quiméricos de la presente invención se evalúan para aplicaciones terapéuticas en las que se desea tanto la activación como la inhibición de uno o más receptores de VEGF. Por ejemplo, una proteína quimérica candidata puede añadirse a líneas celulares estables que expresan un receptor de VEGF particular cuya activación es necesaria para la supervivencia celular. La supervivencia de la línea celular indica que la proteína del polipéptido quimérico candidato puede unirse a y activar ese receptor de VEGF particular. Por otra parte, la muerte de la línea celular indica que el polipéptido quimérico candidato deja de activar el receptor. Ejemplos a modo de ejemplo de tales ensayos de supervivencia celular se han descrito en la publicación de patente internacional nº WO 98/07832 y en Achen y col., Proc Natl Acad Sci USA 95:548 553 (1998), incorporados en este documento por referencia. Este ensayo emplea células Ba/F3 NYK EpoR, que son células pre B de Ba/F3 que han sido transfectadas con un plásmido que codifica un receptor quimérico que consiste en el dominio extracelular de VEGFR-2 y el dominio citoplásmico del receptor de eritropoyetina (EpoR). Estas células son sometidas rutinariamente a pases en interleucina 3 (IL-3) y morirán en ausencia de IL-3. Sin embargo, si la señalización se induce a partir del dominio citoplásmico del receptor quimérico, estas células sobreviven y proliferan en ausencia de IL-3. Tal señalización se induce por ligandos que se unen al dominio extracelular de VEGFR-2 del receptor quimérico. Por ejemplo, la unión de VEGF-A o VEGF-D al dominio extracelular de VEGFR-2 hace que las células sobrevivan y proliferen en ausencia de IL-3. Las células Ba/F3 parentales que carecen del receptor quimérico no son inducidas ni por VEGF-A ni por VEGF-D para proliferar en ausencia de IL-3, que indica que las respuestas de las células Ba/F3-NYK-EpoR a estos ligandos son totalmente dependientes del receptor quimérico.

Los polipéptidos quiméricos candidatos de la presente invención pueden probarse para la unión al dominio extracelular de VEGFR-2 y la posterior activación de un receptor quimérico ensayando la supervivencia celular en ausencia de IL-3. Por otra parte, los polipéptidos quiméricos que interfieren con la unión de ligandos de VEGFR-2, tales como VEGF-A o VEGF-D, al dominio extracelular, o con la activación del dominio citoplásmico, producirán muerte celular en ausencia de IL-3.

b) Ensayos de autofosforilación de VEGFR-1 (flt1), VEGFR-2 (KDR), VEGFR-3 (Flt4), PDGFR- α y PDGFR- β .

Como un indicador alternativo de actividad también puede examinarse la capacidad de un polipéptido quimérico de la invención para estimular la autofosforilación de un receptor de VEGF o PDGF particular. Un polipéptido quimérico candidato se añade a células que expresan un receptor de VEGF o PDGF particular. Entonces, las células se lisan y se inmunoprecipitan con antisuero del receptor anti-VEGF o anti-PDGF y se analizan por transferencia Western usando anticuerpos anti-fosfotirosina para determinar la fosforilación inducida por el polipéptido quimérico del receptor de VEGF o PDGF.

La capacidad de un polipéptido quimérico para estimular la autofosforilación (detectada usando los anticuerpos anti-fosfotirosina) se puntúa como la estimulación del receptor. El nivel de estimulación observado para diversas concentraciones de polipéptido quimérico, con respecto a concentraciones conocidas de moléculas VEGF y PDGF, proporciona una indicación de la potencia de la estimulación de receptores. Los polipéptidos que se ha mostrado que se unen al receptor, pero que son incapaces de estimular la fosforilación de receptores, se puntúan como inhibidores. La actividad inhibitoria puede ensayarse adicionalmente mezclando un agonista conocido del receptor tal como VEGF-A o VEGF-C recombinante con tanto medios solos como con medios condicionados concentrados para determinar si los medios condicionados concentrados inhiben la fosforilación del receptor mediada por VEGF-A o mediada por VEGF-C.

c) Ensayos para la unión a neuropilina.

Los resultados indican que NRP-1 es un co-receptor para la unión a VEGF₁₆₅, formando un complejo con VEGFR-2, que produce una potenciación de la señalización de VEGF₁₆₅ mediante VEGFR-2, pasando por la unión de VEGF₁₆₅ a VEGFR-2 solo, potenciando así las respuestas biológicas a este ligando (Soker y col., Cell 92: 735-45. 1998). Un fenómeno similar puede aplicarse a la señalización de VEGF-C mediante posibles complejos del receptor VEGFR-3/NRP-2. Las composiciones de la presente invención se prueban usando ensayos de unión a neuropilina. Aquellos ejemplos a modo de ejemplo se describen en detalle en, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. nº 10/669.176 presentada el 23 de septiembre de 2003, la patente de EE.UU. nº 6.428.965 y 6.515.105.

Tales ensayos pueden emplear células transformadas con construcciones de expresión que codifican neuropilinas. Los anticuerpos y reactivos que pueden usarse en ensayos de unión a neuropilina son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sema3A=AP que reconoce neuropilina. Los ensayos de unión competitiva usando Sema3 AP y las composiciones de la invención demuestran si las composiciones descritas en este documento poseen o no actividad de unión a neuropilina.

d) Análisis de las afinidades de unión a receptor de polipéptidos quiméricos.

Los polipéptidos quiméricos de la presente invención pueden unirse a más de un VEGFR. Pueden realizarse ensayos para determinar esa actividad de unión a receptor de estos polipéptidos quiméricos. Para tales experimentos, el polipéptido quimérico puede expresarse en un sistema de célula de insecto, por ejemplo, células SF9, para eliminar la contaminación con VEGF-A endógeno encontrada en células de mamífero. Para medir las afinidades de unión relativa del polipéptido quimérico seleccionado se usa una solución de tipo ELISA. Por ejemplo, para examinar la afinidad de unión por VEGFR-2, diluciones seriadas de proteínas de fusión VEGFR-2-IgG competentes y una concentración inferior a la de saturación del polipéptido quimérico candidato marcado con el epítipo myc se añaden a placas de microtitulación recubiertas con VEGFR-2, y se incuban hasta que se establece el equilibrio. Entonces, las placas se lavan para eliminar las proteínas sin unir. Las moléculas de polipéptido quimérico que siguen unidas a las placas recubiertas con VEGFR-2 se detectan usando un anticuerpo anti-myc conjugado con una marca fácilmente detectable, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante. Las afinidades de unión (CE50) pueden calcularse como la concentración de proteína de fusión VEGFR-2-IgG competente que produce la mitad de la unión máxima. Estos valores pueden compararse con aquellos obtenidos a partir del análisis de VEGF-A o VEGF-C para determinar cambios en la afinidad de unión de uno o más de los VEGFR. Similarmente, la unión a VEGFR-3 se lleva a cabo usando una proteína de fusión VEGFR-3-IgG y la unión a VEGFR-1 se determina usando una proteína de fusión VEGFR-1-IgG.

G. Formulaciones farmacéuticas y vías de administración

Los polipéptidos y/o polinucleótidos de la invención pueden administrarse en cualquier modo adecuado usando un vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado, por ejemplo, un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Se prefieren diluyentes líquidos, semisólidos o sólido que sirven de vehículos, excipientes o medios farmacéuticos. Puede usarse cualquier diluyente conocido en la técnica. Diluyentes a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, monolaurato de polioxietilensorbitano, estearato de magnesio, hidroxibenzoato de metilo y propilo, talco, alginatos, almidones, lactosa, sacarosa, dextrosa, sorbitol, manitol, glicerina, fosfato de calcio, aceite mineral y manteca de cacao. Tales formulaciones son útiles, por ejemplo, para la administración de polipéptidos o polinucleótidos de la invención a sujetos mamíferos (incluyendo seres humanos) en pautas terapéuticas.

La composición que va a administrarse según procedimientos de la invención comprende preferentemente (además del polinucleótido o vector) una disolución de vehículo farmacéuticamente aceptable tal como agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, glucosa u otros vehículos convencionalmente usados para administrar agentes terapéuticos intravascularmente. También se contempla terapia multigénica, en cuyo caso la composición comprende opcionalmente tanto el polinucleótido de la invención/vector como otro polinucleótido/vector seleccionado para prevenir reestenosis u otro trastorno mediado por la acción de un receptor de VEGF. Genes/vectores candidatos a modo de ejemplo para la co-transfección con transgenes que codifican polipéptidos de la invención se describen en la bibliografía citada anteriormente que incluye genes que codifican factores citotóxicos, factores citostáticos, factores de crecimiento endotelial e inhibidores del crecimiento/migración de células de músculo liso.

La "administración" que se realiza según el presente procedimiento puede realizarse usando cualquier medio médicamente aceptado para introducir un agente terapéutico directa o indirectamente en la vasculatura de un sujeto mamífero que incluye, pero no se limita a, inyecciones (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, subcutánea o catéter); ingestión oral; administración intranasal o tópica; y similares. En una realización preferida, la administración de la composición que comprende un polinucleótido de la invención se realiza intravascularmente tal como por inyección intravenosa, intra-arterial o arterial intracoronaria. La composición terapéutica puede administrarse al paciente en múltiples sitios. Las múltiples administraciones pueden convertirse simultáneamente o pueden administrarse durante un periodo de varias horas. En ciertos casos puede ser beneficioso proporcionar un flujo continuo de la composición terapéutica. Puede administrarse terapia adicional periódicamente, por ejemplo, diariamente, semanalmente o mensualmente. Para minimizar los efectos secundarios angiogénicos en tejidos no

diana, procedimientos preferidos de administración son procedimientos de administración local tales como administración por inyección intramuscular.

En general, las formas farmacéuticas perorales para la administración terapéutica de polipéptidos son ineficaces ya que para que una formulación sea eficaz el péptido debe protegerse del entorno enzimático del tracto gastrointestinal. Adicionalmente, el polipéptido debe formularse de forma que sea fácilmente absorbido por la barrera de células epiteliales en concentraciones suficientes para efectuar un resultado terapéutico. Los polipéptidos quiméricos de la presente invención pueden formularse con potenciadores de la captación o absorción para aumentar su eficacia. Tal potenciador incluye, por ejemplo, salicilato, glicocolato/linoleato, glicolato, aprotinina, bacitracina, caprato de SDS y similares. Una discusión detallada adicional de formulaciones orales de péptidos para la administración terapéutica se encuentra en Fix, J. Pharm. Sci., 85(12) 1282 1285, 1996, y Oliyai y Stella, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:521 544, 1993,

Las cantidades de péptidos en una dosificación dada variarán según el tamaño del individuo al que está siendo administrada la terapia, además de las características del trastorno que está tratándose. En tratamientos a modo de ejemplo puede ser necesario administrar aproximadamente 50 mg/día, 75 mg/día, 100 mg/día, 150 mg/día, 200 mg/día, 250 mg/día. Estas concentraciones pueden administrarse como una forma farmacéutica individual o como dosis múltiples.

En realizaciones de terapia génica empleando administración vírica, la dosis unitaria puede calcularse en términos de la dosis de partículas víricas que se administran. Las dosis víricas incluyen un número particular de partículas víricas o unidades formadoras de placa (ufp). Para realizaciones que implican adenovirus, dosis unitarias particulares incluyen 10^3 , 10^1 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} ó 10^{14} ufp. Las dosis de partículas pueden ser algo mayores (10 a 100 veces) debido a la presencia de partículas defectivas en una infección.

Los polipéptidos también pueden emplearse según la presente invención mediante la expresión de tal polipéptido *in vivo*, que se denomina frecuentemente en lo sucesivo terapia génica. La presente invención proporciona un vector de ADN recombinante que contiene un segmento heterólogo que codifica un polipéptido quimérico de la invención que puede insertarse en un microorganismo o célula eucariota y que puede expresar la proteína quimérica codificada.

En una realización preferida, la composición se administra localmente. Por tanto, en el contexto de tratar reestenosis o estenosis se prefiere la administración directamente al sitio de angioplastia o derivación. Por ejemplo, la administración comprende una transferencia mediada por catéter del transgén que contiene la composición en un vaso sanguíneo del sujeto mamífero, especialmente en una arteria coronaria del sujeto mamífero. Materiales y procedimientos a modo de ejemplo para la administración local se revisan en Lincoff y col., Circulation, 90: 2070 2084 (1994); y Wilensky y col., Trends Cardiovasc. Med., 3:163 170 (1993), ambos incorporados en este documento por referencia. Por ejemplo, la composición se administra usando catéteres con balón de infusión-perfusión (preferentemente catéteres con balón microporosos) tales como aquellos que se han descrito en la bibliografía para infusiones de fármacos intracoronarios. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.713.860 (Catéter intravascular con matriz de infusión); la patente de EE.UU. nº 5.087.244; la patente de EE.UU. nº 5.653.689; y Wolinsky y col., J. Am. Coll. Cardiol., 15: 475 481 (1990) (catéter de infusión de Wolinsky); y Lambert y col., Coron. Artery Dis., 4: 469 475 (1993). El uso de tales catéteres para la terapia génica de células somáticas dirigidas a sitio se describe, por ejemplo, en Mazur y col., Texas Heart Institute Journal, 21: 104 111 (1994), incorporado en este documento por referencia. En una realización en la que el transgén que codifica un polipéptido quimérico de la invención se administra en un vector de adenovirus, el vector se administra preferentemente en un vehículo farmacéuticamente aceptable a una dosis de 10^7 a 10^{13} partículas víricas, y más preferentemente a una dosis de 10^9 a 10^{11} partículas víricas. La composición de vector adenovírico se infunde preferentemente durante un periodo de 15 segundos a 30 minutos, más preferentemente 1 a 10 minutos.

Por ejemplo, en pacientes con angina de pecho debida a una única o múltiples lesiones en arterias coronarias y para los que se prescribe PTCA basándose en hallazgos de angiograma coronario primario, un protocolo a modo de ejemplo implica realizar PTCA mediante un catéter guía de 7F según la práctica clínica convencional usando el enfoque femoral. Si no se consigue un resultado óptimo con PTCA sola, entonces también se implanta una prótesis endovascular (un resultado no óptimo se define como estenosis residual de > 30% del diámetro luminal según un cálculo aproximado visual, y disección de tipo B o C). La transferencia génica arterial en el sitio de dilatación del balón se realiza con un vector adenovírico deficiente en la replicación que expresa un polipéptido de la invención inmediatamente después de la angioplastia, pero antes de la implantación de la prótesis, usando un catéter con balón de infusión-perfusión. El tamaño del catéter se seleccionará para ajustarse al diámetro de la arteria como se mide a partir del angiograma, variable, por ejemplo, de 3,0 a 3,5F de diámetro. El globo se infla a la presión óptima y la transferencia génica se realiza durante una infusión de 10 minutos a la tasa de 0,5 ml/min con título de virus de $1,15 \times 10^{10}$ ufp/ml.

En otra realización se contempla la administración intravascular con un catéter recubierto de gel como se ha descrito en la bibliografía para introducir otros transgenes. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.674.192 (Catéter recubierto con polímero de hidrogel hinchable tenazmente adherido); Riessen y col., Human Gene Therapy, 4: 749 758 (1993); y Steg y col., Circulation, 96: 408 411 (1997) y 90: 1648 1656 (1994); todos incorporados en este

documento por referencia. Brevemente, el ADN en disolución (por ejemplo, un polinucleótido de la invención) se aplica una o más veces *ex vivo* a la superficie de un balón del catéter de angioplastia inflado recubierto con un polímero de hidrogel (por ejemplo, Slider con Hydroplus, Mansfield Boston Scientific Corp., Watertown, MA). El recubrimiento de Hydroplus es un polímero de ácido poliacrílico hidrófilo que está reticulado al balón para formar un hidrogel de alto peso molecular fuertemente adherido al balón. Se deja que el hidrogel cubierto de ADN se seque antes de desinflar el balón. El volver a inflar el balón intravascularmente, durante un procedimiento de angioplastia, produce la transferencia del ADN a la pared del vaso.

En otra realización más, una membrana elástica expandible o estructura similar montada a o integral con un catéter de angioplastia de balón o prótesis se emplea para administrar el transgén que codifica un polipéptido de la invención. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.707.385, 5.697.967, 5.700.286, 5.800.507 y 5.776.184.

En otra realización más, la composición que contiene los polipéptidos o polinucleótidos de la invención se administran por inyección intramuscular. Véanse, por ejemplo, Shyu y col., *Am. J. Med.*, 114:85-92 (2002); Freedman y col., *Hum. Gene Ther.*, 13:1595-1603 (2002).

Los polipéptidos y polinucleótidos de la invención pueden administrarse por un parche transdérmico. El espesor del parche transdérmico depende de los requisitos terapéuticos y, por consiguiente, puede adaptarse. Los parches transdérmicos representan una alternativa a las formas líquidas de administración. Estos dispositivos pueden venir en una variedad de formas, teniendo todas la capacidad de adherirse a la piel, y permitiendo así el contacto prolongado entre la composición terapéutica y el área diana. También tienen la ventaja de ser relativamente compactos y portátiles, y de permitir una administración muy precisa de una composición al área que va a tratarse. Estos parches vienen en una variedad de formas, conteniendo algunas depósitos de fluido para el componente activo, conteniendo otros componentes secos que son liberados tras el contacto con la humedad en la piel. Muchas requieren alguna forma de adhesivo para retenerlos en conexión con la piel durante un periodo adecuado. Un tipo diferente de parche se aplica seco, aplicado con agua para humedecer el parche para formar una película adhesiva que es retenida sobre la piel.

Como se usa en este documento, "parche" comprende al menos una composición tópica según la invención y una capa de cubierta de forma que el parche puede colocarse sobre una herida quirúrgicamente cerrada, incisión, colgajo de piel, injerto de piel o quemadura, colocándose así el parche/composición adyacente a la superficie de tejido dañado. Preferentemente, el parche se diseña para maximizar la administración de la composición mediante el estrato córneo, la epidermis superior y en la dermis, y para minimizar la absorción en el sistema circulatorio, reducir el tiempo de retardo, promover la absorción uniforme y reducir el frotamiento mecánico.

Los parches preferidos incluyen (1) el parche tipo matriz; (2) el parche tipo depósito; (3) el parche tipo fármaco en adhesivo multilaminado; y (4) el parche tipo fármaco en adhesivo monolítico; (Ghosh, T. K. y col., *Transdermal and Topical Drug Delivery Systems*, Interpharm Press, Inc. pág. 249-297 (1997). Estos parches son muy conocidos en la técnica y generalmente están comercialmente disponibles.

En otra realización se proporciona un vendaje para la administración de una composición que comprende los polipéptidos o polinucleótidos de la invención. El término "vendaje" como se usa en este documento significa una cubierta diseñada para proteger y o administrar una composición (previamente aplicada). "Vendaje" incluye cubiertas tales como un vendaje que puede ser poroso o no poroso y diversas cubiertas inertes, por ejemplo, una envoltura de película de plástico u otra película no absorbente. El término "vendaje" también engloba cubiertas no tejidas o tejidas, particularmente cubiertas elastoméricas, que permiten el transporte de calor y vapor. Estos vendajes permiten enfriar el sitio de dolor, que proporciona mayor comodidad.

En otra realización se proporciona un hilo de sutura quirúrgica impregnado con los polipéptidos o polinucleótidos de la invención.

En otra variación, la composición que contiene el transgén que codifica un polipéptido de la invención se administra extravascularmente, por ejemplo, usando un dispositivo para rodear o encapsular una parte del vaso. Véase, por ejemplo, la publicación de patente internacional WO 98/20027 que describe un collar que se coloca alrededor del exterior de una arteria (por ejemplo, durante un procedimiento de derivación) para administrar un transgén a la pared arterial mediante un vector de plásmido o de liposoma.

En otra variación adicional, células endoteliales o células progenitoras endoteliales se transfectan *ex vivo* con el transgén que codifica un polipéptido de la invención, y las células transfectadas se administran al sujeto mamífero. Procedimientos a modo de ejemplo para sembrar un injerto vascular con células endoteliales genéticamente modificadas se describen en la patente de EE.UU. n° 5.785.965.

Otros mecanismos de administración no vírica contemplados incluyen precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973; Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987; Rippe y col., *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990) DEAE-dextrano (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985), electroporación (Tur-Kaspa y col., *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986; Potter y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984), microinyección directa (Harland y Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.), liposomas cargados de ADN (Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982; Fraley y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979; Felgner,

Sci Am. 276(6):102 6, 1997; Felgner, Hum Gene Ther. 7(15):1791 3, 1996), sonicación de células (Fechheimer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987), bombardeo de genes usando microproyectiles de alta velocidad (Yang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:9568-9572, 1990) y transfección mediada por receptor (Wu y Wu, J. Biol. Chem., 262:4429-4432, 1987; Wu y Wu, Biochemistry, 27:887-892, 1988; Wu y Wu, Adv. Drug Delivery Rev., 12:159-167, 1993).

La construcción de expresión (o la propia construcción de polipéptido) puede atraparse en un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilaminares tienen múltiples capas de lípidos separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de disolución acuosa. Los componentes de lípidos se someten a auto-transposición antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas de lípidos (Ghosh y Bachhawat, en: Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands, Wu G, Wu C ed., New York: Marcel Dekker, pág. 87-104, 1991). La adición de ADN a liposomas catiónicos produce una transición topológica de liposomas a glóbulos condensados líquido-cristalinos ópticamente birrefringentes (Radler y col., Science, 275(5301):810 4, 1997). Estos complejos de ADN-lípido son posibles vectores no víricos para uso en terapia génica y administración.

La administración de ácido nucleico mediado por liposoma y la expresión de ADN extraño *in vitro* ha sido satisfactoria. En la presente invención también se contemplan diversos enfoques comerciales que implican tecnología de "lipofección". En ciertas realizaciones de la invención, el liposoma puede conjugarse con un virus hemaglutinante (HVJ). Esto se ha mostrado para facilitar la fusión con la membrana celular y promover la entrada celular de ADN encapsulado en liposoma (Kaneda y col., Science, 243:375-378, 1989). En otras realizaciones, el liposoma puede complejarse o emplearse conjuntamente con proteínas cromosómicas de no histona nucleares (HMG-1) (Kato y col., J. Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991). En todavía otras realizaciones, el liposoma puede complejarse o emplearse conjuntamente con tanto HVJ como HMG-1. Debido a que tales construcciones de expresión se han empleado satisfactoriamente en la transferencia y expresión de ácido nucleico *in vitro* e *in vivo*, son aplicables a la presente invención.

Otros sistemas de administración de vectores que pueden emplearse para administrar un ácido nucleico que codifica un gen terapéutico en células incluyen vehículos de administración mediados por receptor. Esto aprovecha la captación selectiva de macromoléculas por endocitosis mediada por receptor en casi todas las células eucariotas. Debido a la distribución específica del tipo de célula de diversos receptores, la administración puede ser altamente específica (Wu y Wu, 1993, antes).

En otras realizaciones, el vehículo de administración puede comprender un ligando y un liposoma. Por ejemplo, Nicolau y col. (Methods Enzymol., 149:157-176, 1987) emplearon lactosil-ceramida, un asialgangliósido del extremo de galactosa, incorporada en liposomas y observaron un aumento en la captación del gen de insulina por hepatocitos. Por tanto, es factible que un ácido nucleico que codifica un gen terapéutico también pueda administrarse específicamente en un tipo de célula particular por cualquier número de sistemas de receptor-ligando con o sin liposomas.

En otra realización de la invención, la construcción de expresión puede consistir simplemente en ADN desnudo recombinante o plásmidos. La transferencia de la construcción puede realizarse por cualquiera de los procedimientos mencionados anteriormente que permeabilizan físicamente o químicamente la membrana celular. Esto es particularmente aplicable para la transferencia *in vitro*; sin embargo, también puede aplicarse para uso *in vivo*. Dubensky y col. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81:7529-7533, 1984) inyectaron satisfactoriamente ADN del virus del poliovirus en forma de precipitados de CaPO_4 en hígado y bazo de ratones adultos y recién nacidos demostrando replicación vírica activa e infección aguda. Benvenisty y Neshi (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83:9551-9555, 1986) también demostraron que la inyección intraperitoneal directa de plásmidos precipitados con CaPO_4 produce la expresión de los genes transfectados.

Otra realización de la invención para transferir una construcción de expresión de ADN desnudo en células puede implicar el bombardeo de partículas. Este procedimiento depende de la capacidad para acelerar los microproyectiles recubiertos de ADN a una alta velocidad permitiendo que atraviesen membranas celulares y entren en células sin destruirlas (Klein y col., Nature, 327:70-73, 1987). Se han desarrollado varios dispositivos para acelerar pequeñas partículas. Un dispositivo tal se basa en una descarga a alto voltaje para generar una corriente eléctrica, que a su vez proporciona la fuerza móvil (Yang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:9568-9572, 1990). Los microproyectiles usados han consistido en sustancias biológicamente inertes tales como perlas de tungsteno o de oro.

En realizaciones que emplean un vector vírico, polinucleótidos preferidos todavía incluyen una secuencia promotora y de poliadenilación adecuada como se ha descrito anteriormente. Además, será rápidamente evidente que, en estas realizaciones, el polinucleótido incluye adicionalmente secuencias de polinucleótidos del vector (por ejemplo, secuencias de polinucleótidos adenovíricas) conectadas operativamente con la secuencia que codifica un polipéptido de la invención.

Similarmemente, la invención incluye kits que comprenden compuestos o composiciones de la invención envasados de un modo que facilita su uso para poner en práctica los procedimientos de la invención. En una realización más

simple, un kit tal incluye un compuesto o composición descrito en este documento como útil para poner en práctica la invención (por ejemplo, polinucleótidos o polipéptidos de la invención) envasado en un recipiente tal como un frasco o recipiente cerrado con una etiqueta pegada al recipiente o incluida en el envase que describe el uso del compuesto o composición para poner en práctica el procedimiento de la invención. Preferentemente, el compuesto o composición está envasado en una forma farmacéutica unitaria. En otra realización, un kit de la invención incluye una composición de tanto un polinucleótido como un polipéptido envasado junto con un dispositivo físico útil para implementar los procedimientos de la invención tal como una derivación, un catéter, un collar extravascular, una película de polímero, un vendaje, una sutura o similares. En otra realización, un kit de la invención incluye composiciones de tanto un polinucleótido como un polipéptido de la invención envasado junto con un polímero de hidrogel, o polímeros de micropartículas, u otros vehículos descritos en este documento como útiles para la administración de los polinucleótidos o polipéptidos al paciente.

EJEMPLO 1

CONSTRUCCIÓN QUIMÉRICA DE VEGF-CAC

El presente ejemplo describe la generación de una molécula de polipéptido quimérico designada VEGF-CAC (o simplemente "CAC") que comprende propéptidos de VEGF-C del extremo amino y carboxi (dominios flanqueantes de la invención) fusionados con un dominio de unión a receptor tirosina-cinasa (RTK) de VEGF-A. Se generó un polinucleótido codificante para expresar recombinantemente el VEGF-CAC.

Clonación: Un polinucleótido que codifica la proteína de fusión CAC se produjo por amplificación por PCR y subclonación del extremo N y extremo C de un ADNc de VEGF-C humano y el dominio de unión a RTK de un ADNc de VEGF-A humano. Se añadió una marca His al extremo C y se añadió un péptido señal IgG_K al extremo N. El ADNc resultante (SEQ ID NO. 26) se secuenció y se codificó la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 27. Este ADNc se insertó en el vector pSecTagI-ACAswap como un fragmento BamHI-NotI. Para las transfecciones transitorias y los ensayos de unión, el promotor K14 se eliminó de la construcción. El polinucleótido de VEGF-CAC se cortó con enzimas de restricción AgeI y ClaI, se desmochó y se ligó en el plásmido psub-CMV-WPRE.

Transfección e inmunoprecipitación. La secreción y el procesamiento de la proteína recombinante se analizó por transfección en células 293T, que luego se marcaron con aminoácidos radiactivos. Las células 293T se transfectaron con psub-CMV/CAC o el vector pEBS7/psub-CMV usando liposomas (FuGENE 6, Roche) o polímeros catiónicos (jetPEI, Qbiogene). Las células transfectadas se cultivaron durante 24 ó 48 horas y luego se marcaron metabólicamente en medio modificado Eagle sin metionina y sin cisteína complementado con [³⁵S]metionina/[³⁵S]cisteína (Promix, Amersham Pharmacia Biotech) a 100 µCi/ml durante 8 h. Entonces, el medio condicionado se recogió, se purificó de material particulado por centrifugación y se incubó con las fusiones de dominio extracelular del receptor soluble-inmoglobulina VEGFR1-Ig, VEGFR2-Ig, VEGFR3-Ig; anticuerpo anti-VEGF-A (R&D); anticuerpo anti-VEGF-C (R&D); y anticuerpos policlonales contra VEGF-C (Joukov y col., Embo J 16: 3898-911, 1997). Los inmunocomplejos y los complejos ligando-receptor-Ig formados se unieron a proteína A-Sepharose y proteína G-Sepharose (Pharmacia Biotech) respectivamente, que luego se lavaron dos veces con albúmina de suero bovino al 0,5%/Tween 20 al 0,02% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y una vez con PBS, y se analizaron en electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras. También se prepararon muestras sin reducir a partir de algunas uniones. Se determinó que los medios de células transfectadas que expresaban psub-CMV/CAC y psub-CMV/VEGF-A165 activaron VEGFR-1 y VEGFR-2 en diluciones similares, pero no activaron VEGFR-3.

Bioensayo para la supervivencia celular mediada por factor de crecimiento: Las células 293T que expresaban psub-CMV/CAC se sembraron en placas de 96 pocillos a 15.000 células/pocillo por triplicado suministradas con medio condicionado (0, 1, 5, 10 ó 20 µl) como se describe en la solicitud PCT de propiedad común n° PCT/US2004/019122 o el vector pREP7. La viabilidad celular se midió por un ensayo colorimétrico. Se añadió MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Sigma), 0,5 mg/ml) a cada pocillo y se incubaron durante 4 h a 37°C. La reacción se terminó añadiendo 100 µl de tampón de lisis (SDS al 10%, HCl 10 mM) y los productos de formazano resultantes se solubilizaron durante la noche a 37°C en una atmósfera húmeda. La absorbancia a 540 nm se midió con un lector de placas de microtitulación Multiscan (Labsystems).

El polipéptido quimérico de VEGF-CAC se produjo como se describe, y la secreción y el procesamiento de la proteína resultante se analizó por transfección en células 293T, que luego se marcó con aminoácidos radiactivos. Los medios condicionados se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-VEGF-C o anti-VEGF-A o VEGFR-1 soluble. Bajo condiciones no reductoras, los polipéptidos de VEGF-CAC tuvieron pesos moleculares aparentes de 94 kDa, 66 kDa, mientras que VEGF-C migró a 58 kDa. El dominio del factor de crecimiento de VEGF migró como un doblete a 56 kDa y 50 kDa.

Para el análisis de seguimiento de pulso, células 293T transfectadas con VEGF-CAC y VEGF-C se marcaron durante 30 minutos con aminoácidos radiactivos y luego se siguieron en medio de crecimiento no radiactivo durante 30 minutos, 6 horas y 24 horas. Los medios condicionados se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-VEGF-C y se analizaron en SDS-PAGE. La electroforesis en gel indicó la secreción de una forma principal de 66 kDa de VEGF-CAC y doblete de 68 kDa para VEGF-C, como era de esperar (Joukov y col., Embo J., 16:3898-3911, 1997). Éstos

se escindieron después de un periodo de seguimiento de 30 minutos en dobletes de aproximadamente 30 kDa. La forma de 66 kDa sin procesar ya no se detectó a las 24 horas, mientras que en este momento de tiempo también se generaron pequeñas cantidades de la forma madura de 20 kD que contenía el dominio del factor de crecimiento a partir de ambos polipéptidos. Para concluir, el procesamiento de VEGF-CAC se produjo similarmente al procesamiento de VEGF-C natural, escindiéndose aparentemente cada propéptido en el orden extremo C, luego extremo N.

EJEMPLO 2

CONSTRUCCIONES QUIMÉRICAS DE VEGF-CDD, VEGF-CDC Y VEGF-DDC

El presente ejemplo describe la generación de moléculas de polinucleótidos y polipéptidos quiméricos designadas VEGF-CDD, VEGF-CDC y VEGF-DDC que comprenden diversas combinaciones del extremo amino y carboxi de los propéptidos de VEGF-C o VEGF-D fusionados con un dominio de unión a receptor tirosina cinasa de VEGF-D.

Un polinucleótido que codifica la proteína quimérica CDD (SEQ ID NO: 36 y 37) que combina el propéptido del extremo N de VEGF-C humano con el dominio de homología con VEGF (VHD) de VEGF-D y el propéptido del extremo C de VEGF-D humano se construyó mediante PCR usando los cebadores 5'-GCGGATCCGTTTCGAGTC CGGACTCGACCTCTCGGAC-3' (SEQ ID NO: 28) (cebador I, que contiene el sitio BamHI) y 5'-CTTTTAGTGTTCCTCA TGTCATAGAAAAGTTGCAGCAAATTTTAT AGTCTCTTCTGTCCTTGAGTTG AGG-3' (SEQ ID NO: 29) para amplificar el F_N de VEGF-C humano y los cebadores 5'-GGACAGAAGAGACTATAAAATTT GCTGCAACTTTCTATGACATTGA AACACTAAAAGTTATAGATGAAG AATGGCA-3' (SEQ ID NO: 30) y 5'-CGGATCCTCAAGGATTCTTTCCGGCT GTGGGGCC-3' (SEQ ID NO: 31) (cebador II, que contiene un sitio BamHI) para amplificar el VHD y CT de VEGF-D humano. Estos fragmentos de PCR se hibridaron y se usaron como molde para amplificar la quimera de CDD con los cebadores I y II, el fragmento de PCR obtenido se ligó en el vector pCRII (Invitrogen), se cortó con BamHI y se ligó en el sitio BamHI del vector pSecTaql en marco con la secuencia señal.

Un polinucleótido que codifica la proteína quimérica DDC (SEQ ID NO: 40 y 41) que contiene el propéptido del extremo N y el dominio de homología con VEGF de VEGF-D humano combinado con el propéptido del extremo C de VEGF-C humano se construyó mediante PCR usando los cebadores 5'-GCGGATCCGTCCAGTAATGAACA TGGACCACTGAGGCGA TCATC-3' (SEQ ID NO: 32) (cebador III, que contiene un sitio BamHI) y 5'-GCCTGACACTGTGGTAGTGTGCTGGCAGGGATCTT CTGATAATT GAGTATGGATGGCGGGGGG-3' (SEQ ID NO: 33) para amplificar el AT y el VHD de VEGF-D humano y los cebadores 5'-GCCATCCATACTCA ATTATCAGAAGATCCCTGCCAGCA AACTACCACAGTGTGAC-3' (SEQ ID NO: 34) y 5'-GCGGATCC TTAGCTCATTTGTGGTCTTTTCCAATATGA AGGGAC ACAAC-3' (SEQ ID NO: 35) (cebador IV, que contiene un sitio BamHI) para amplificar el F_N de VEGF-C humano. Estos fragmentos de PCR se hibridaron y se usaron como molde para amplificar la quimera de DDC con los cebadores III y IV, el fragmento de PCR obtenido se ligó en el vector pCRII (Invitrogen), se cortó con BamHI y se ligó en el sitio BamHI del vector pSecTaql en marco con la secuencia señal.

El ADNc para la proteína quimérica CDC (SEQ ID NO: 38 y 39) se construyó ligando el fragmento NdeI - EcoRV de 954 pb de CDD/pSecTaql con el plásmido DDC/pSecTaql cortado con NdeI (en la secuencia del promotor del CMV) y EcoRV (en el VHD de VEGF-D).

Transfección y marcado metabólico

Se transfectaron células 293T con plásmidos DDC/pSecTaql, CDC/pSecTaql o CDD/pSecTaql usando el reactivo de transfección JetPEI. 48 horas después de la transfección, las células se lavaron dos veces con PBS y se marcaron metabólicamente en medio MEM que contenía 100 µCi/ml de ³⁵S-metionina y ³⁵S-cisteína (Promix, Amersham) y 10 U/ml de heparina durante la noche. Los plásmidos que codifican neuropilina 1-Ig (Mäkinen y col., J Biol Chem 274(1999):21217-21222) o neuropilina 2-Ig (Karkkainen y col., PNAS 98(2001): 12677-12682) se transfectaron similarmente con células 293T y 48 horas después de la transfección las células se lavaron y las proteínas de fusión de Ig se produjeron en medio de privación. Los medios condicionados se recogieron y se purificaron por centrifugación.

El medio condicionado se complementó con BSA y Tween 20 a concentraciones finales del 0,5% y el 0,02%, respectivamente. Las quimeras de CDD, CDC y DDC se unieron tanto con 200 ng de proteínas de fusión VEGFR-1-Ig (Mäkinen y col., Nat Med 7(2001): 199-205), VEGFR-2-Ig (Uutela y col., Blood 104(2004): 3198-3204) o VEGFR-3-Ig (Mäkinen y col., Nat Med 7(2001): 199-205) como con los medios condicionados con NP-1-Ig o NP-2-Ig. Entonces, los complejos se precipitaron con proteína A-Sepharose y se lavaron tres veces con 1 x tampón de unión (BSA al 0,5%, Tween 20 al 0,02% en PBS) y una vez con PBS a 4°C. Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE en un gel al 12,5% bajo condiciones reductoras.

Resultados:

Todas las proteínas quiméricas CDD (SEQ ID NO: 37), CDC (SEQ ID NO: 39) y DDC (SEQ ID NO: 41) se expresaron, aunque CDD y CDC bastante débilmente, y se procesaron de una forma similar a VEGF-C y VEGF-D natural. Al igual que VEGF-C y VEGF-D naturales, todas las quimeras de CDD, CDC y DDC se unen a neuropilina 1

y DDC se une también a neuropilina 2. La unión de CDD y CDC a neuropilina 2 no pudo detectarse en estos experimentos, posiblemente debido a los menores niveles de expresión de estas quimeras.

La actividad de los polipéptidos quiméricos descritos en este ejemplo puede evaluarse realizando experimentos como se describe en los siguientes ejemplos.

5 EJEMPLO 3

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS DE LA TERAPIA GÉNICA CON VEGF-CAC

Materiales y procedimientos: Los procedimientos descritos en el Ejemplo 1 también se usan en el presente ejemplo. Los estudios descritos en el presente ejemplo también emplearon los siguientes protocolos experimentales adicionales.

10 *Producción y administración in vivo de VEGF-CAC por vectores víricos:* El vector AAV psub-CAG-WPRE se clonó sustituyendo el fragmento del promotor del CMV de psub-CMV-WPRE (Paterna y col., Gene Ther., 7(15):1304-1311, 2000) con el inserto de beta-actina de pollo del CMV (Niwa y col., Gene, 108(2):193-199, 1991). La longitud completa del casete de expresión de CAC se clonó en el sitio NheI del plásmido del vector psub-CMV-WPRE como un fragmento de AgeI-Clal. El ADNc que codifica VEGF-CAC se clonó en el vector pAdBgIII (AdCAC) y se
15 produjeron adenovirus recombinantes como se describen en Laitinen y col., Hum. Gene Ther., 9(10):1481-1486, 1998. Se usaron células Hela para el análisis de expresión y se infectaron con un adenovirus (MOI 100). La expresión de la proteína recombinante se examinó por marcado metabólico, inmunoprecipitación seguida de SDS-PAGE.

20 Los adenovirus (AdVEGF-CAC o AdLacZ, aproximadamente 3×10^8 ufp) se inyectaron en las pieles de ratones NMRI nu/nu, mientras que los AAV se inyectaron estereotáxicamente en el cerebro de ratón (volumen 3 μ l). Los tejidos se recogieron para el análisis histológico dos semanas después de la transducción adenovírica o tres semanas después de la transducción con AAV.

25 *Inmunohistoquímica.* Para la tinción del portaobjetos completo, los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 4% (PFA), se bloquearon con suero de cabra al 5% en Triton-X1000 al 0,3% que contenía PBS y se incubaron con anticuerpos policlonales para LYVE-1 (Karkkainen y col., Nat. Immunol., 5:74-80, 2004) y/o anticuerpos monoclonales contra PECAM-1 (PharMingen), nidogen (Chemicon) y α -actina de músculo liso (SMA, conjugado de Cy2). Para la tinción de secciones de tejido, los tejidos se fijaron en PFA al 4% durante la noche a 4°C y las secciones en parafina o congeladas (6-20 μ m) se inmunotifieron con anticuerpos monoclonales anti-LYVE-1 contra PECAM-1 o PDGFR- β . Se usaron anticuerpos secundarios conjugados con Alexa594 y Alexa488 (Molecular Probes)
30 para la tinción, y entonces las muestras se montaron con Vectashield (Vector Laboratories) y se analizaron con un microscopio confocal Zeiss LSM510. Parte de los ratones experimentales se perfundieron con lectina de *Lycopersicon esculentum* conjugada con FITC, seguido de fijación por perfusión con PFA al 1% y lavados con PBS.

35 *Resultados.* La transducción de VEGF-CAC adenovírico de la piel de la oreja del ratón produjo eritema, hinchazón y engrosamiento de la oreja, mientras que tales efectos fueron leves en orejas transducidas con AdVEGF-A165 e inexistentes en orejas LacZ de control (Fig. 2 y Figs. 3A-3C). La transducción de AdVEGF-CAC condujo a una masiva respuesta angiogénica caracterizada por láminas endoteliales de sangre con una falta parcial de estructuras lumenales, AdVEGF-A165 indujo una destacada respuesta angiogénica que sin embargo fue más débil cuando se comparó con AdVEGF-CAC. Se ha mostrado que VEGF-A165 induce angiogénesis mediante un mecanismo dependiente del gradiente, caracterizado por proliferación endotelial, germinación y migración guiada (Ruhrberg y col., Genes Dev., 16:2684-2698, 2002). Esta acción coordinada es evidentemente debida a las propiedades de difusión intermedias de VEGF165. La VEGF-CAC quimérica es un inductor muy potente de angiogénesis. Esto sugiere que los propéptidos de VEGF-C se asocian de forma diferente con el entorno extracelular cuando se compararon con los dominios de unión a heparina de VEGF165 y produjeron el aumento de la disponibilidad del dominio del núcleo de VEGF. Se hincharon los capilares linfáticos en las orejas de ratones tratados con AdVEGF-CAC o AdVEGF-A165, y sus luces se alargaron en comparación con los controles. Previamente también se ha observado dilatación vascular linfática similar en respuesta a expresión en exceso adenovírica de VEGF-A165 en la piel de la oreja de ratón (Saaristo y col., FASEB J., 16:1041-1049, 2002).

40 Tanto las vasculaturas sanguíneas como linfáticas permanecieron inafectadas por el tratamiento con el adenovirus de control que codifica LacZ. También se observó hiperplasia circunferencial marcada de vasos sanguíneos grandes de la oreja en orejas transducidas con AdVEGF-CAC, mientras que ni AdVEGF-A165 ni AdLacZ tuvieron efectos similares. La tinción para nidogen mostró un aumento masivo en los vasos que estaban rodeados por la membrana basal en orejas transducidas con AdVEGF-CAC cuando se comparó con el control, sugiriendo que los vasos recientemente formados fueron maduros y estables. Además, la perfusión de los ratones con lectina de *Lycopersicon esculentum* conjugada con FITC, un marcador para células endoteliales, mostró que la mayoría de los
45 vasos recientemente formados en orejas transducidas con AdVEGF-CAC se perfundieron, y su número había aumentado cuando se comparó con las orejas de control. De forma interesante, la mayoría de los vasos de calibre medio y grande formados en respuesta a la transducción con AdVEGF-CAC se rodearon por pericitos positivos de actina de músculo liso, mientras que sólo los nuevos vasos nacientes en orejas transducidas con AdVEGF-A165

fueron rodeados por tales células. Se encontró una jerarquía normal de vasos sanguíneos, caracterizada por vasos de tamaño medio y grande cubiertos por SMA en orejas con AdLacZ. Esto sugiere que los vasos formados en respuesta a la estimulación con VEGF-CAC son más estables que aquellos sin cubierta de pericitos formados después de la estimulación con VEGF-A165. La germinación de pericitos positivos para SMA se observó tanto en orejas transducidas con AdVEGF-CAC como con AdVEGF165, sugiriendo que la angiogénesis estimulada por estos factores también conduce a la movilización de pericitos. Se ha mostrado que la transducción de genes mediada por adenovirus o AAV de VEGF-C induce linfangiogénesis en varios tejidos, mientras que VEGF-C víricamente expresado es un estimulador débil de la angiogénesis (Rissanen y col., *Circ. Res.* 30;92(10):1098-106, 2003 y Saaristo y col. *J. Exp. Med.*, 16;196(6):719-30,2002).

EJEMPLO 4

ESTIMULACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES

Tanto VEGF-A como VEGF-C estimulan la migración de células endoteliales en gel de colágeno. Las construcciones de polipéptido quimérico de la invención se examinan para determinar si también pueden estimular la migración de células endoteliales en gel de colágeno, proporcionando así otro indicio de actividad biológica. Experimentos a modo de ejemplo de tales ensayos de migración de células se han descrito en la publicación de patente internacional nº WO 98/33917, incorporada en este documento por referencia. Brevemente, células endoteliales de capilares bovinos (BCE) se siembran en la parte superior de una capa de colágeno en placas de cultivo de tejido. Se coloca medio condicionado de las células transfectadas con un vector de expresión que produce el polipéptido quimérico candidato en pocillos hechos en gel de colágeno aproximadamente 4 mm separados de la localización de las células BCE unidas. Entonces se cuenta el número de células BCE que han migrado desde el área original de unión en el gel de colágeno hacia los pocillos que contienen el polipéptido quimérico para evaluar la capacidad del polipéptido quimérico para inducir migración de células.

Las células BCE (Folkman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:5217 5221 (1979)) se cultivan como se describe en Pertovaara y col., *J. Biol. Chem.*, 269:6271 74 (1994). Los geles de colágeno se preparan mezclando disolución madre de colágeno tipo I (5 mg/ml en HCl 1 mM) con un volumen igual de 2x MEM y 2 volúmenes de MEM que contiene suero de bovino recién nacido al 10% para dar una concentración de colágeno final de 1,25 mg/ml. Las placas de cultivo de tejido (5 cm de diámetro) están recubiertas con aproximadamente 1 mm de espesor de capa de la disolución, que se deja polimerizar a 37°C. Las células BCE se siembran encima de esta capa.

Para los ensayos de migración, las células se dejan que se unan dentro de un anillo de plástico (1 cm de diámetro) situado en la parte superior de la primera capa de colágeno. Después de 30 minutos, el anillo se quita y las células sin unir se eliminan aclarando. Se añaden una segunda capa de colágeno y una capa de medio de crecimiento (suero de bovino recién nacido al 5% (NCS)), solidificada por agar al 0,75% de bajo punto de fusión (FMC BioProducts, Rockland, ME). Se perfora un pocillo (3 mm de diámetro) a través de todas las capas a ambos lados de la mancha de células a una distancia de 4 mm, y el medio que contiene un polipéptido quimérico de VEGF tal como VEGF-CAC (o medio solo o medio que contiene VEGF-A o VEGF-C para servir de controles) se pipetea diariamente en los pocillos. Se toman fotomicrografías de las células que migran fuera del borde de la mancha, por ejemplo, después de seis días, mediante un microscopio invertido Olympus CK 2 equipado con óptica de contraste de fase. Se cuentan las células que migran después de la tinción nuclear con el colorante fluorescente bisbencimida (1 mg/ml, Hoechst 33258, Sigma).

El número de células que migran a diferentes distancias del área original de unión hacia pocillos que contienen medio condicionado por las células no transfectadas (control) o transfectadas (con vector vacío; polipéptido quimérico; VEGF-C; o VEGF A) se determinan 6 días después de la adición del medio. El número de células que migran fuera del anillo original de unión se cuentan en cinco cuadrados de 0,5 mm x 0,5 mm adyacentes usando una rejilla de lente ocular de microscopio y aumento de 10x con un microscopio de fluorescencia. Las células que migran más de 0,5 mm se cuentan de un modo similar moviendo la rejilla en etapas de 0,5 mm.

La capacidad de un polipéptido quimérico para inducir migración de las células BCE es indicativa de actividad agonista de receptor. El número de células que migran en presencia de un polipéptido quimérico frente a una concentración similar de VEGF-A o VEGF-C proporciona una indicación de la potencia de la actividad agonista. Los polipéptidos que se ha mostrado que se unen a los receptores expresados sobre las células BCE, pero que son incapaces de estimular la migración, se puntúan como posibles inhibidores. La actividad inhibitoria puede ensayarse adicionalmente mezclando un agonista de receptor conocido tal como VEGF-A o VEGF-C recombinante con tanto medio solo como con medio condicionado concentrado para determinar si el medio condicionado concentrado inhibe la migración de BCE mediada por VEGF-A o mediada por VEGF-C.

EJEMPLO 5

EFFECTOS *IN VIVO* DE FACTORES ANGIOGÉNICOS

El ensayo en membrana corioalantoidea (CAM) descrito en, por ejemplo, Oh y col., *Dev Biol* 188:96 109 (1997), incorporado en este documento en su totalidad, es un procedimiento comúnmente usado para examinar los efectos *in vivo* de factores angiogénicos. Usando este ensayo se ha mostrado que los factores de crecimiento VEGF que

incluyen tanto VEGF-A como VEGF-C inducen el desarrollo de vasos sanguíneos [Oh y col., Dev Biol 188:96-109 (1997)]. Por tanto, este procedimiento puede usarse para estudiar las propiedades angiogénicas de los polipéptidos quiméricos de la invención.

Brevemente, en el día cuatro de desarrollo se corta una ventana en la cáscara de huevo de pollito o codorniz. Los embriones se comprueban para el desarrollo normal, la ventana en la cáscara de huevo se cierra con cinta adhesiva y los huevos se incuban hasta el día 13 de desarrollo. Se añaden aproximadamente 3,3 µg de polipéptido quimérico disuelto en 5 µl de agua destilada a cubreobjetos Thennanox (Nunc, Naperville, IL), que han sido cortados en discos con diámetros de aproximadamente 5 mm, y se secan al aire. Los discos sin proteína añadida se usan como controles. Los discos secados se aplican entonces sobre la membrana corioalantoidea (CAM) de los huevos. Después de 3 días, los discos se quitan y se fijan en glutaraldehído al 3% y formaldehído al 2% y se aclaran en tampón cacodilato de sodio 0,12 M. Los especímenes fijados se fotografían y se incorporan en resina Epon (Serva, Alemania) para seccionamiento medio (0,75 µm) y ultrafino (70 nm). Tanto las secciones medias como las ultrafinas se cortan usando un Ultracut S (Leika, Alemania). Las secciones ultrafinas se analizan por un EM 10 (Zeiss, Alemania). Entonces, los especímenes se analizan para indicios del crecimiento de nuevos capilares, que indicaría que el polipéptido quimérico que se examina puede estimular la angiogénesis. Los polipéptidos naturales de VEGF pueden usarse como controles positivos.

EJEMPLO 6

TRATAMIENTO DE TEJIDO ISQUÉMICO

El uso de polipéptidos quiméricos de la invención en el tratamiento de tejido isquémico tal como isquemia de extremidades debido a circulación insuficiente se analiza usando ensayos reconocidos. La eficacia de los polipéptidos quiméricos en tales indicaciones puede determinarse usando un modelo para isquemia. Previamente se ha descrito un modelo de conejo tal para isquemia en Bauters y col., Am J. Physiol. 267:H1263-1271, 1996; y Pu y col., J. Invest. Surgery, 7:49-60, 1994. Estos animales se anestesian y la arteria femoral de la extremidad posterior se corta de su origen proximal como una rama de la arteria ilíaca externa hasta el punto en el que se bifurca en las arterias safena y poplítea. Como resultado de este procedimiento, la circulación sanguínea a la extremidad isquémica depende de vasos colaterales que se originan a partir de la arteria ilíaca interna (Takeshita y col., Circulation, 90:II-228-II-234, 1994). El animal se deja un periodo de recuperación posoperatoria de 10 días. Durante este periodo se desarrollan vasos colaterales endógenos. Después del periodo de recuperación se determinan parámetros fisiológicos de referencia tales como la tensión arterial, circulación sanguínea intravascular, angiografía ilíaca y densidad de vasos capilares. Los procedimientos para determinar estas características fisiológicas de referencia se detallan en Witzembichler y col. (Am. J. Path. 153:381-394, 1998).

Después de obtenerse las características fisiológicas de referencia del animal, el animal del modelo se trata con un bolo intraarterial de un polipéptido quimérico de la presente invención. Preferentemente, el bolo comprende el equivalente de 500 µg de VEGF-A en un volumen apropiado, por ejemplo, 3 ml, de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene albúmina de suero de conejo (RSA) al 0,1%. La proteína quimérica se administra durante un periodo de 1 a 5 minutos mediante un catéter posicionado en la arteria ilíaca interna de la extremidad isquémica. Entonces, el catéter se lava con un volumen igual de PBS que contienen RSA. Entonces, los parámetros fisiológicos tratados anteriormente se monitorizan a intervalos adecuados después de la administración de los polipéptidos quiméricos.

En una realización alternativa, el modelo isquémico se trata usando terapia génica con tanto ADN desnudo que comprende polinucleótidos que codifican los polipéptidos quiméricos de la presente invención como, preferentemente, con vectores de terapia génica descritos en este documento que codifican un polipéptido quimérico de la presente invención. Se prefieren particularmente los vectores de terapia génica adenovírica. En tales realizaciones de terapia génica, la arteria ilíaca interna de la extremidad isquémica del animal se transfecta con el ADN desnudo o el vector adenovírico u otra terapia génica usando, por ejemplo, un catéter con balón de 2,0 mm (Slider con Hydroplus, Boston Scientific, MA). El balón de angioplastia se prepara preferentemente ex vivo avanzando primero el balón desinflado a través de una vaina de teflón (Boston Scientific) y aplicando la composición de terapia génica a la capa de hidrogel que recubre la superficie externa del balón inflado. Entonces, el balón se retrae dentro de la vaina protectora. La vaina y el catéter de angioplastia se introducen por la arteria carótida derecha y avanzan a la aorta abdominal inferior usando un alambre guía apropiado. El catéter con balón avanza a la arteria ilíaca interna de la extremidad isquémica y se infla para administrar localmente la composición de terapia génica en la extremidad isquémica. Entonces, el catéter con balón se desinfla y se saca.

Los procedimientos anteriores pueden realizarse con controles que comprenden composición no relacionada con VEGF y controles positivos que comprenden VEGF-A, VEGF-C o VEGF-D.

Los estudios anteriores se describen con respecto a un modelo de conejo para isquemia. Estudios similares pueden realizarse en modelos de enfermedad cardíaca isquémica tales como aquellos descritos por Kastrup y col., (Curr. Gene Ther., 3(3):197-206, 2003) y Khan y col., (Gene Ther. 10(4):258-91, 2003).

EJEMPLO 7

TRANSFERENCIA GÉNICA DE VEGF-CAC PARA PREVENIR REESTENOSIS

El siguiente experimento se realiza *in vivo* en un modelo de reestenosis de conejo para demostrar la eficacia de las composiciones para la prevención de reestenosis posangioplastia.

Un primer grupo de conejos se alimenta con una dieta rica en colesterol al 0,25% durante dos semanas, luego se someten a desnudamiento con balón de la aorta, luego se someten tres días después a las composiciones terapéuticas que van a probarse. Los animales se sacrifican 2 ó 4 semanas después del inicio de la terapia. Las composiciones que van a probarse incluyen VEGF-C, o VEGF-D o composiciones quiméricas de la invención tales como VEGF-CAC tanto sola como en combinación con un inhibidor de PDGF (por ejemplo un anticuerpo α -PDGF-A; anticuerpo α -PDGF-B, anticuerpo α -PDGF-C, anticuerpo α -PDGF-D, un anticuerpo α -PDGFR-alfa o un anticuerpo α -PDGFR-beta o una molécula de ARN interferente corta dirigida a uno o más de estas dianas) o con uno o varios inhibidores del crecimiento celular de músculo liso. Se contempla terapia con polipéptidos o terapia génica. Como control de la terapia génica, el vector de elección lleva el gen LacZ.

En el primer grupo de conejos, la aorta completa, empezando desde la punta del arco, se desnudó usando un catéter de embolectomía arterial 4,0 F (Sorin Biomedical, Irvine, CA). El catéter se introduce por la arteria iliaca derecha hasta el arco aórtico y se infla, y la aorta se desnuda dos veces.

Tres horas antes del sacrificio, los animales se inyectan intravenosamente con 50 mg de BrdU disuelto en etanol al 40%. Después del sacrificio se elimina el segmento aórtico en el que se había realizado la transferencia génica, se lava cuidadosamente con solución salina y se divide en cinco segmentos iguales. El segmento proximal se congela criogénicamente en nitrógeno líquido y se guarda a -70°C. El siguiente segmento se fija por inmersión en paraformaldehído al 4% / sacarosa al 15% (pH 7,4) durante 4 horas, se aclara en sacarosa al 15% (pH 7,4) durante la noche y se incorpora en parafina. El segmento medial se fija por inmersión en paraformaldehído al 4% / solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7,4) durante 10 minutos, se aclara 2 horas en PBS, se incorpora en compuesto OCT (Miles) y se guarda a -70°C. El cuarto segmento se fija por inmersión en etanol al 70% durante la noche y se incorpora en parafina. El segmento distal se tiñe directamente para actividad de β -galactosidasa en disolución de tinción X-GAL a +37°C durante 16 horas, se fija por inmersión en paraformaldehído al 4% / sacarosa al 15% (pH 7,4) durante 4 horas, se aclara en sacarosa al 15% durante la noche y se incorpora en parafina. Las secciones de parafina se usan para la detección inmunocitoquímica de células de músculo liso (SMC), macrófagos y endotelio. Las células positivas para BrdU se detectan según instrucciones del fabricante. El análisis morfométrico se realizó usando secciones de parafina teñidas con hematoxilina-eosina usando un software de análisis de imágenes. La relación de íntima/medio (I/M) se usa como parámetro para el engrosamiento de la íntima.

Se realiza el análisis histológico de los ratones desnudados con balón. Las composiciones que son eficaces en la inhibición de reestenosis revelarán que grupos de control (es decir, aquellos grupos sin las composiciones que comprenden las composiciones relacionadas con VEGF-CAC) tienen una relación I/M que es superior a la relación de aquellos animales tratados con las composiciones terapéuticas basadas en VEGF-CAC.

El marcado con BrdU permitirá el análisis de la proliferación de células de músculo liso en animales tratados frente a control. Se espera que se reduzca la proliferación de SMC en la población tratada. Una descripción más detallada de ensayos y composiciones para tratar reestenosis está contenida en la solicitud internacional nº PCT/US99/24054 publicada como el documento WO 00/24412, cuya la divulgación se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

EJEMPLO 8

EFFECTOS DE LA TERAPIA GÉNICA DE VEGF-CAC EN NEURONAS MOTORAS

Este ejemplo demuestra la administración de polipéptidos quiméricos de VEGF tales como VEGF-CAC a un modelo de ratón con esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Los ratones 'con genes activados' para VEGF, en los que está eliminada la secuencia de elementos de respuesta a hipoxia en el promotor de VEGF, tienen un potencial alterado para regular por aumento niveles de VEGF en condiciones de estrés. Estos ratones desarrollan neuropatología similar a ELA (Oosthuysen y col., Nature Genet., 23:131-138 (2001), sugiriendo que las neuronas motoras son particularmente sensibles a reducciones en los niveles de VEGF. También se ha informado que VEGF tiene efectos favorables sobre la neuropatía isquémica en ratones (Schratzberger, P. Nat. Med., 6:405-413 (2000). El siguiente ejemplo se realiza para demostrar los efectos de la transferencia génica de VEGF-CAC a neuronas motoras, que puede ralentizar la degeneración de neuronas motoras en ratones SOD1^{G93A}. El protocolo se realiza como se describe en Azzouz y col., Nature, 429:413-417 (2004), incorporado en este documento por referencia.

Modelo animal. Se usan ratones transgénicos que expresan en exceso SOD1 humano que lleva una mutación Gly93-Ala (Gurney y col., Science, 264:1772-1775, 1994). Esta línea de ratones tiene la forma de alta expresión del SOD 1 mutante y los animales desarrollan la aparición de enfermedad a aproximadamente 90 días de edad y mueren aproximadamente 30 días después. La progenie transgénica se identifica por PCR usando cebadores específicos para SOD1 humano (Gurney y col., antes).

Producción vírica. Se construyen genomas de vectores autoinactivantes de EIAV a partir de vectores pONY8.0Z o pONY8.0G como se ha descrito previamente (Mazarakis y col., Hum. Mol. Genet., 10:2109-2121, 2001; Azzouz y col., J. Neurosci., 22:10302-10312, 2002). El ADN complementario que codifica el gen indicador LacZ o VEGF-CAC se clona en el vector de transferencia de EIAV y se generan EIAV-VEGF-CAC-IRES-GFP. Se prepararon reservas de vectores víricos pseudotipados con glicoproteína G de la rabia usando el sistema transitorio HEK293T como se ha descrito previamente (Mazarakis y col., Hum. Mol. Genet., 10:2109-2121, 2001; Mitrophanous y col., Gene Ther., 6:1808-1818, 1999). Los títulos ($\sim 1 \times 10^9$ TUml⁻¹) de vectores víricos EIAV-LacZ concentrados se estiman por transducción de células D17. Los títulos ($\sim 7 \times 10^8$ a 3×10^9 TUml⁻¹) de los vectores EIAV-VEGF-CAC o EIAV-VEGF-CAC-IRES-GFP se estiman usando reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcripción inversa (RT-PCR) mediante comparación con vectores EIAV-LacZ y se normalizan para ARN vírico (Rohll y col., Methods Enzymol., 346:466-500, 2002; Martin-Rendon y col., Mol. Ther., 566,570, 2002).

ELISA de VEGF. Se transducen células D17 de osteosarcoma de perro en presencia de 8 mg/ml de polibreno como se ha descrito previamente (Mitrophanous, antes). Las células se transducen tanto con vectores EIAV-VEGF-CAC como EIAV-LacZ. Las células transducidas se someten a pases tres veces antes del análisis de expresión transgénica. Una semana después de la transducción, los sobrenadantes se recogen y se miden los niveles de VEGF-CAC por inmunoensayo de adsorción (ELISA) (R&D Systems). Para determinar los niveles de VEGF-CAC en plasma se recoge sangre en tubos a vacío de 10 ml que contienen 100 µl de una disolución de citrato de trisodio al 4%, se centrifugan rápidamente y las fracciones de plasma se guardan a -80°C hasta el análisis. Las mediciones del ensayo de ELISA de VEGF-CAC también se llevaron a cabo usando muestras de tejido de la médula espinal y el tronco encefálico.

Administración de vector vírico. Se inyectan bilateralmente vectores lentivíricos pseudotipados con rabia G que llevan genes VEGF-CAC o LacZ humanos en los músculos gastrocnemio de la extremidad posterior, facial, diagrama, de la lengua e intercostal de ratones transgénicos SOD1 antes de y en la aparición de la enfermedad. El primer grupo de ratones SOD1 recibe inyecciones de EIAV-VEGF-CAC-IRES-GFP (n = 7) a los 21 días de edad. El grupo de control se trata con el vector EIAV-LacZ (n = 6). El segundo conjunto de animales se inyecta en la aparición de la enfermedad (ratones de 90 días de edad) con EIAV-VEGF-CAC (n = 7) y el control EIAV-LacZ (n = 7). Cada ratón se inyecta con una dosificación total de 90 µl de disolución vírica. Se inyectan seis sitios por músculo de la extremidad trasera con 5 µl por sitio.

Histología e inmunohistoquímica. Los animales se perfunden transcárdicamente con disolución de NaCl al 0,9% seguido de paraformaldehído al 4% frío en hielo. Se diseccionan los tejidos de la médula espinal, el cerebro y el músculo y se fijan posteriormente durante la noche en la misma disolución y luego se transfieren a sacarosa al 30%. Los tejidos se analizan por inmunohistoquímica y reacción con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactósido).

Análisis de comportamiento. Una tarea en cilindro rotatorio de los ratones SOD1 por un instrumento Economex Rotarod (Colombus Instruments) se analiza cada diez días durante la fase de luz del ciclo de 12 h de luz / 12 h de oscuridad. Se realizan tres ensayos y se registra la duración más larga en el cilindro para cada ratón. El temporizador se detiene cuando los ratones se caen del cilindro o después de un límite arbitrario de 180 segundos. También se realiza el análisis de las huellas. Las patas traseras del ratón se cubren con tinta para registrar los patrones de marcha durante la locomoción continua, y se mide la longitud del paso.

Se indica un beneficio terapéutico por el aumento de la supervivencia de neuronas motoras en ratones que reciben la terapia génica de VEGF-CAC, en comparación con controles.

EJEMPLO 9

INDUCCIÓN DE CRECIMIENTO *IN VIVO* DE VASOS LINFÁTICOS Y/O SANGUÍNEOS EN PIEL DE RATONES TRANSGÉNICOS

Los experimentos se realizan en ratones transgénicos para analizar los efectos específicos de la expresión en exceso de polipéptidos quiméricos en tejidos. Los efectos fisiológicos *in vivo* proporcionan una indicación del perfil de activación/inhibición de receptores y una indicación de la posible acción terapéutica de un polipéptido quimérico. En una variación, el promotor de queratina K14 humano que es activo en las células basales de epitelios escamosos estratificados [Vassar y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:1563-1567 (1989)] se usa como elemento de control de la expresión en el transgén de polipéptido quimérico recombinante. El vector que contiene el promotor de la queratina K14 se describe en Vassar y col., Genes Dev., 5:714-727 (1991) y Nelson y col., J. Cell Biol. 97:244-251 (1983).

Se aísla un fragmento de ADN que contiene el promotor K14, polipéptido quimérico que codifica ADNc y la señal de poliadenilación de K14 y se inyecta en ovocitos fecundados de la cepa de ratón FVB-NIH. Los cigotos inyectados se trasplantan en oviductos de ratones híbridos C57BL/6 x DBA/2J pseudopreñados. Entonces, los ratones que resultaron positivos resultantes se analizan para la presencia del transgén mediante reacción en cadena de la polimerasa de ADN de la cola usando cebadores apropiados o por análisis de Southern.

Entonces, estos ratones transgénicos se examinan para indicios de angiogénesis o linfangiogénesis en la piel, tal como la linfangiogénesis observada en ratones transgénicos que expresan en exceso VEGF-C [véase, publicación

internacional WO98/33917]. El examen histológico de ratones transgénicos K14-VEGF-C mostró que, en comparación con la piel de compañeros de camada no manipulados genéticamente, la dermis dorsal era atrófica y el tejido conjuntivo estaba sustituido por grandes lagunas carentes de eritrocitos, pero revestido con una fina capa endotelial. Estas estructuras similares a vasos distendidas se parecieron a las observadas en linfangiomas humanos. Se redujo el número de órganos anexos a la piel y folículos pilosos. En la región del hocico también se observó un aumento del número de vasos.

El examen de los vasos en la piel de los ratones transgénicos usando anticuerpos que reconocen proteínas específicas para tanto vasos sanguíneos como linfáticos puede verificar adicionalmente la identidad de estos vasos. Los tipos de colágeno IV, XVIII [Muragaki y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 8763-8776 (1995)] y la laminina se expresan en células endoteliales vasculares, mientras que las desmoplaquinas I y II (Progen) se expresan en células de endotelios linfáticos. Véase Schmelz y col., Differentiation, 57: 97-117 (1994).

Además, las moléculas quiméricas pueden coexpresarse con Ang-1 u otros miembros de la familia de VEGF/PDGF para modular el crecimiento de nuevos vasos.

EJEMPLO 10

15 ENSAYO PARA DETERMINAR LA MODULACIÓN DE MIELOPOYESIS

La expresión en exceso de VEGF-C en la piel de ratones transgénicos de VEGF-C de K14 restablece una correlación con una alteración distinta en poblaciones de leucocitos [véase, publicación internacional WO98/33917, incorporada en este documento por referencia]. Notablemente, las poblaciones medidas de neutrófilos aumentaron marcadamente en los ratones transgénicos. Los efectos de los polipéptidos quiméricos sobre la hematopoyesis pueden analizarse usando análisis de citometría de flujo activada por fluorescencia usando anticuerpos que reconocen proteínas expresadas en poblaciones de células de leucocitos específicas. Las poblaciones de leucocitos se analizan en muestras de sangre tomadas de los ratones transgénicos F1 descritos anteriormente y de sus compañeros de camada no transgénicos. Las alteraciones en las poblaciones de leucocitos tienen numerosas indicaciones terapéuticas tales como estimular una respuesta inmunitaria en patógenos, recuperación del sistema inmunitario tras quimioterapia u otra terapia supresora o, en el caso de inhibidores, inmunosupresión beneficiosa (por ejemplo, para prevenir la enfermedad de injerto frente a huésped o trastornos autoinmunitarios). Se contempla específicamente el uso de moléculas de la invención para estas indicaciones terapéuticas. El uso de anticuerpos que reconocen diversas poblaciones de citoblastos o células progenitoras permite la evaluación del efecto de polipéptidos quiméricos de la invención sobre tales tipos de células.

30 EJEMPLO 11

MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES Y GERMINACIÓN DE MICROVASOS

En este ejemplo se compara el efecto de las construcciones quiméricas de PDGF de la invención sobre la migración y proliferación de células endoteliales (EC) con el de VEGF (que principalmente afecta a células endoteliales [Senger, D. R. y col., Am. J. Patol. 149:293-305. (1996)]), PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC (que principalmente afectan a fibroblastos y células de músculo liso [Heldin, C. H. & Westermark, B. Physiol. Rev. 79:1283-1316 (1999); Li y col., Nat. Cell. Biol., 2:302-309, 2000]) y PDGF-DD. Se realizan ensayos de migración, proliferación y anillo aórtico.

A. Ensayos de migración de células

Los ensayos de migración de células se realizan en células HMVEC o BAEC confluentes de crecimiento detenido. Se hieren monocapas de células con una varilla de vidrio con punta de caucho y se lavan con medio sin suero. Entonces, las placas se incuban durante 20 horas en medio sin suero que contiene las construcciones quiméricas VEGF165, PDGF-AA, -BB, -CC o -DD o PDGF. Cada ensayo incluye dos placas por condición y se repite tres veces independientemente. Las células se fotografían a un aumento de 40x y el porcentaje de migración correspondiente a la relación entre el área de las células y el área total de la herida (Biocom visiol@b 2000 versión 4.52, San Diego). Para el ensayo de migración de células se usa la prueba de Dunett de ANOVA para analizar datos, con $P < 0,05$ considerada estadísticamente significativa. Los datos se presentan como media $\pm$ EEM.

PDGFR- α . La expresión en las células endoteliales microvasculares humanas (HMVEC) se confirma por transferencia Western. Las construcciones quiméricas de VEGF y PDGF, pero no PDGF-AA o PDGF-BB, estimulan la migración de células endoteliales microvasculares humanas (HMVEC) y células endoteliales de aorta bovina (BAEC).

B. Ensayo de proliferación

Para el ensayo de proliferación de HMVEC, las células se siembran en placas de 96 pocillos (5 pocillos por condición) y se incuban con la construcción quimérica PDGF-AA, PDGF-BB o PDGF (50 ng/ml) después de privación de suero. Después de 7 días se cuentan las células viables usando el ensayo viabilidad de células luminiscentes cellTiter-glo (Promega). Para el ensayo de proliferación de NIH-3T3 y hSMC, las células cultivadas en

placas de 96 pocillos se privan de suero durante la noche, seguido de tratamiento con factores de crecimiento a diferentes concentraciones. Dos días después se cuentan los números de células y se calcula el porcentaje de proliferación usando células cultivadas en medio que contiene suero al 10% como control.

C. Ensayo de anillo aórtico

- 5 El ensayo de anillo aórtico es un medio de evaluación de la excrecencia de microvasos a partir de un vaso intacto *in vitro* [Blacher, S. y col., *Angiogenesis* 4:133-42 (2001)]. El ensayo se realiza como se describe en [Blacher, S. y col., *Angiogenesis* 4:133-42 (2001)]. Brevemente, anillos aórticos de un milímetro de largo se incorporan en geles de colágeno intersticial de cola de rata y se cultivan a 37°C complementados con diferente tipo natural de factores de crecimiento quiméricos (50 ng/ml). Los experimentos incluyen tres explantes por condición y se repiten al menos dos veces. Los anillos aórticos se fotografían a un aumento de 25x.

- 10 En el día 9 después del cultivo, los microvasos y la distancia de su excrecencia a partir del anillo aórtico se cuantifican y se evalúan usando la prueba de la t de Student. Específicamente se usa la prueba de la t de Student de dos colas para el análisis de datos, con $P < 0,05$ considerada estadísticamente significativa. Para el ensayo de migración de células se usa la prueba de Dunett de ANOVA para analizar los datos, con $P < 0,05$ considerada estadísticamente significativa. La cuantificación de la excrecencia de brotes microvasculares y células similares a fibroblastos perivasculares se realiza usando morfometría asistida por ordenador.

EJEMPLO 12

USO DE TERAPIA DE VEGF-CAC EN CIRUGÍA RECONSTRUCTIVA TRAS UNA QUEMADURA GRAVE U OTRO TRAUMATISMO DE LA PIEL

- 20 El siguiente ejemplo describe un procedimiento y administración de una construcción quimérica tal como VEGF-CAC a tejido traumatizado por una quemadura para mejorar la curación tras la cirugía reconstructiva. Las víctimas de quemaduras frecuentemente requieren amplias intervenciones quirúrgicas que incluyen injertos de piel sustanciales para restaurar el tejido lesionado. El siguiente ejemplo proporciona un procedimiento para mejorar la curación de tejido tras la cirugía reconstructiva para una quemadura u otro traumatismo de la piel.

25 A. Animales y preparación de la piel

- Se ha mostrado que conejos blancos de Nueva Zelanda son apropiados para estudios de quemaduras (Bucky y col., *Plast. Reconstr. Surg.*, 93(7):1473-1480 (1994)). Además, las características estructurales de las capas de la piel en conejos y seres humanos son similares. Tres días antes de la operación, los lomos de 10 conejos blancos de Nueva Zelanda se depilan con una crema depilatoria. Como el espesor de la piel depende de la fase de su ciclo de crecimiento de pelo, la estimación del patrón de crecimiento de pelo se evalúa cuidadosamente. Inmediatamente antes de causar la lesión por quemadura, el área de operación se depila una segunda vez para lograr una superficie de piel suave y sin pelo.

B. Técnica operativa

- 35 Los conejos se sedan por administración intramuscular de ketamina (25 mg/kg de masa corporal) como se describe en la materia (Knabl y col., *Burns*, 25:229-235 (1999)). Un hierro de soldar con un sello de contacto de aluminio ajustable se usa para causar la quemadura. La temperatura del sello se fija a 80°C y se monitoriza continuamente. Las quemaduras se causan en la piel dorsal de los conejos durante aproximadamente 14 segundos usando sólo el peso del sello (aproximadamente 85 g). Entonces, las heridas se enfrían inmediatamente con termoelementos que proporcionan una temperatura coherente de 10°C durante 30 minutos (Knabl y col., *antes*).

- 40 Para minimizar el hecho de que diferentes partes del cuerpo con diferente espesor de piel tienen diferentes potenciales de re-epitelización y curación se usa el mismo sitio donante en los animales. Por tanto, cualquier diferencia observada podría atribuirse al propio tratamiento en vez de a otras variables. Se usa un Padget Electric Dermatome para recoger un injerto de piel de 0,12 pulgadas (0,3 cm) de grosor del muslo depilado en todos los animales. El injerto se extiende cuidadosamente sobre el área de la quemadura. Se mantiene en el sitio tanto por una ligera presión de un vendaje bien acolchado como por unos pocos puntos pequeños. El área donante bruta se cubre con un vendaje no adherente estéril durante 3-5 días para protegerlo de la infección hasta que se observe la re-epitelización completa.

- Se inyectan intradérmicamente 1×10^9 ufp de AdVEGF, AdVEGF-CAC, AdVEGF-C y AdLacZ en la piel dorsal al sitio de quemadura de los conejos. La construcción de AdVEGF se ha descrito previamente (Makinen y col., *antes*) y los vectores AdVEGF-CAC, AdLacZ se construyen como se describe en este documento. La reducción del edema y el aumento en la perfusión de la piel en un sitio de herida por quemadura como resultado de un aumento en los ganglios linfáticos funcionales se evalúa siguiendo la acumulación de dextrano fluorescente.

- Adicionalmente, la curación se monitoriza evaluando el aspecto cosmético del injerto de piel. El color normal del injerto es similar al del sitio receptor. La temperatura de la superficie del injerto puede monitorizarse usando tiras adhesivas (para un número preciso) o el dorso de la mano (para proporcionar una evaluación comparativa con la piel

de alrededor). Se sugieren problemas con la entrada arterial cuando el injerto está pálido con respecto al sitio donante y/o frío al tacto. Se sugieren problemas con la salida venosa cuando el injerto está congestionado y/o edematoso. El color y el aspecto de los injertos congestionados pueden variar dependiendo de si la congestión es leve o grave, y oscila de un tono tirando a rosa destacado a un color púrpura azulado oscuro.

5 C. Resumen

El modelo anteriormente mencionado demuestra el potencial terapéutico de usar VEGF-CAC para preservar la función de los vasos linfáticos y para mejorar la curación y reducir el edema y complicaciones posquirúrgicas concomitantes en víctimas de quemaduras. Por tanto, los procedimientos y las composiciones descritas en este documento proporcionan una importante necesidad en la materia. Específicamente, la reducción de edema o el aumento en la perfusión en un sitio de quemadura se lleva a cabo, por ejemplo, mediante la administración de AdVEGF-CAC al sitio de la herida.

EJEMPLO 13

TERAPIA CON POLINUCLEÓTIDOS Y POLIPÉPTIDOS DE OTRAS CONSTRUCCIONES QUIMÉRICAS

Los procedimientos descritos en los ejemplos precedentes se repiten usando una composición que comprende otras construcciones químicas que incluyen dominios de unión a RTK de otros miembros de la familia de VEGF/PDGF y tanto propéptidos de VEGF-C como de VEGF-D.

EJEMPLO 14

DATOS EXPERIMENTALES ADICIONALES

Este ejemplo proporciona datos experimentales adicionales para la construcción de CAC descrito en el Ejemplo 1.

20 *Cultivo celular.* Se mantuvieron células 293T y HeLa de ATCC (www.atcc.org) en DMEM (HaartBio, Helsinki, Finlandia) complementado con L-glutamina 2 mM (HaartBio), penicilina al 0,2%/sulfato de estreptomicina y suero bovino fetal al 10% (PromoCell, Heidelberg, Alemania). Se cultivaron células Ba/F3 (Achen y col., Eur. J. Biochem./267:2505-2515, 2000) en DMEM complementado con 200 µg/ml de zeocina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y interleucina 3 de ratón recombinante (Calbiochem, San Diego, CA, EE.UU.).

25 *Construcciones.* Se produjo un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de CAC mediante amplificación por PCR y subclonación del extremo N y extremo C de un ADNc de VEGF-C humano y el dominio de unión a RTK de un ADNc de VEGF-A humano. Se añadió una marca 6xHis al extremo C y se añadió un péptido señal de IgG_k al extremo N. Se verificó la secuencia de ADNc resultante. Este ADNc se insertó en el vector pMosaic (Jeltsch y col., J. Biol. Chem., 281, 12187-95, 2006) como un fragmento BamHI-NotI. El VEGF-CAC se cortó con AgeI y ClaI, se hizo romo y se ligó en el plásmido AAV2 psub-CMV-WPRE (Witzenbichler y col., Am. J. Patol., 153:384-394, 1998; Marconcini y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:9671-9676, 1999).

30 El ADNc para VEGF-A₁₀₉, que comprende 109 aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-A, se amplificó con los cebadores 5'-GCGGATCCGGGGCAGAATCATC ACGAAGTGGTG-3' (SEQ ID NO: 64) y 5'-GCGGATCCCTAATCTTTC TTTGGTCTACATTCACAT-3' (SEQ ID NO: 65) usando el plásmido AAV2 CAC/psub-CMV-WPRE como molde. El fragmento de ADNc obtenido se digirió con BamHI y se clonó en el sitio BamHI del vector pMosaic.

35 *Transfecciones e inmunoprecipitaciones.* Se transfectaron células 293T con psub-CMV/CAC, psub-CMVVEGF-A₁₆₅, psub-CMV/VEGF-A₁₀₉, pEBS7/VEGF-C(fl) o el vector pEBS7/CMV usando JetPEI (Qbiogene, Irvine, CA, EE.UU.). Las células transfectadas se cultivaron durante 48 horas y se marcaron metabólicamente en medio Eagle modificado sin metionina y sin cisteína (HaartBio) complementado con [³⁵S]metionina y [³⁵S]cisteína (Redivue ProMix, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) a 100 µCi/ml durante 16 horas. Entonces se recogió el medio condicionado, se purificó de material particulado por centrifugación, se complementó con BSA al 5% y Tween 20 al 0,02%, y se incubó con anticuerpos anti-hVEGF-A (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) o anticuerpos anti-hVEGF-C (R&D Systems) o 200 ng de VEGFR-1-Ig soluble (Mäkinen y col., EMBO J., 20:4762-4773, 2001) o 200 ng de VEGFR-2-Ig soluble (Uutela, Blood, 104:3198-3204, 2004) o con proteínas de fusión neuropilina-Ig solubles con o sin adición de 10 µg/ml de heparina (Gibco BRL/Invitrogen). Las proteínas de fusión neuropilina-Ig se produjeron en células 293T transitoriamente transfectadas usando NP1-Ig (Karpanen y col., FASEB J., 20:1462-1472 (2006) y NP2-Ig (Karkkainen Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:12677-12682, 2001) como se ha descrito previamente. Entonces, los inmunocomplejos formados se unieron a proteína A-Sepharose o proteína G-Sepharose (Amersham Biosciences), seguido de lavado tres veces con albúmina de suero bovino al 0,5% y Tween 20 al 0,02% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y una vez con PBS. Las proteínas se separaron mediante SDS al 12%-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras y se visualizaron por autorradiografía.

45 *Análisis de seguimiento de pulso.* Células 293T transitoriamente transfectadas se marcaron metabólicamente en medio Eagle modificado sin metionina y sin cisteína complementado con [³⁵S]metionina y [³⁵S]cisteína (Redivue ProMix) a 100 µCi/ml durante 30 min y luego se siguieron en DMEM no radiactivo durante diferentes periodos de

tiempo. Los medios condicionados se complementaron con BSA al 5% y Tween 20 al 0,02% y se inmunoprecipitaron usando anticuerpos anti-VEGF-C humano (R&D Systems). Los inmunocomplejos se analizaron como antes bajo condiciones reductoras. El cultivo transfectado con vector vacío se analizó sólo después de 24 horas del periodo de seguimiento.

5 *Bioensayo para la supervivencia celular mediada por factor de crecimiento.* Para el bioensayo de Ba/F3, células HeLa se transdujeron (MOI 100) con Ad-CAC, Ad-VEGF₁₀₉, Ad-VEGF₁₆₅ y Ad-LacZ. 24 horas después de la transducción, las células se privaron de suero durante 16 horas, tras lo cual se recogió el medio, se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos y se guardó a 4°C. Para comparar niveles de expresión en diferentes construcciones, 100 µl de medio condicionado se mezclaron con 25 µl de 5x LSB, se calentó durante 5 minutos a 95°C y se separó en geles de SDS al 12%-PAGE (Ready-Gel, Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se bloquearon con PBA al 5% y se incubaron con un anticuerpo primario (AF293NA). Como anticuerpos secundarios se usaron HRP de conejo anti-biotina de cabra y biotinilada con estreptavidina. Las proteínas se visualizaron usando el reactivo Femto ECL (Amersham).

15 Se sembraron células Ba/F3 que expresan el receptor quimérico VEGFR-1/EpoR o VEGFR-2/EpoR (Achen y col., Eur. J. Biochem., 267:2505-2515, 2000) en placas de 96 pocillos a 20.000 células/pocillo por triplicado, suministradas con medio condicionado de células HeLa a diferentes diluciones. La viabilidad celular se cuantificó por un ensayo colorimétrico después de 48 horas. Brevemente, se añadieron 0,5 mg/ml de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)) a cada pocillo y se incubaron durante 2 horas a 37°C. La reacción se terminó añadiendo 100 µl de tampón de lisis (SDS al 10%, HCl 10 mM) y los productos de formazano resultantes se solubilizaron durante la noche a 37°C en una atmósfera húmeda. La absorbancia a 540 nm se midió usando un lector de placas de microtitulación Multiscan (Thermo Labsystems, Milford, MA).

20 *Producción y análisis de vectores adenovíricos.* Los ADNc que codifican VEGF-CAC y VEGF-A₁₀₉ se clonaron en el vector pAdBgIII y se produjeron adenovirus recombinantes como se ha descrito previamente (Laitinen y col., Hum. Gene Ther., 9:1481-1486, 1998). Para el análisis de la producción de proteínas, células HeLa se transdujeron con los adenovirus (AdCAC, Ad VEGF-A₁₆₅, AdVEGF-A₁₀₉ o AdLacZ con MOI 100). La expresión de las proteínas recombinantes se examinó por marcado metabólico e inmunoprecipitación seguido de análisis por SDS al 12%-PAGE como se ha descrito anteriormente. Después de SDS-PAGE, las bandas se visualizaron por autorradiografía.

25 *Análisis in vivo de vectores adenovíricos.* Se inyectaron subcutáneamente aproximadamente 2×10⁸ ufp de AdVEGF-CAC, AdVEGF-A₁₆₅, AdVEGF-A₁₀₉ o AdLacZ en las orejas de ratones NMRI nu/nu (Taconic Europe, Møllegaard, Dinamarca). Dos semanas después de la transducción de genes adenovíricos, los ratones se anestesiaron y entonces se perfundieron con PFA al 1% durante 2-3 minutos. Las orejas se recogieron, se sumergieron en paraformaldehído al 4% durante 2 horas y se diseccionaron para la tinción del montaje completo.

30 Alternativamente, las orejas se incorporaron en medio OCT (Tissue Tek, Sakura Finetek, Zoeterwoude, Los Países Bajos), se congelaron y se cortaron en secciones de 20 µm. Los tejidos se bloquearon con suero de cabra o mono normal al 5% en Triton-X100 al 0,3% (Fluka Biochemika, Steinheim, Suiza) en PBS. Para la tinción de vasos sanguíneos en la oreja, los tejidos se incubaron durante la noche con anticuerpos monoclonales de hámster anti-PECAM-1 (CD31) de ratón (clon 2H8, MAB-13982Z, Chemicon, Temecula, CA).

35 Los vasos sanguíneos perfundidos se visualizaron inyectando ratones con 1 mg de lectina de *Lycopersicon esculentum* conjugada con FITC (VectorLabs, Burlingame, CA), seguido de fijación por perfusión con PFA al 1%. Las membranas basales de los vasos sanguíneos se tiñeron con anticuerpos monoclonales de rata contra nidogen/entactina (Chemicon), mientras que los vasos linfáticos se visualizaron con un antisuero de conejo contra LYVE-1 (Karkkainen y col., Nat. Immunol., 5:74-80, 2004). Los anticuerpos para F4/80 (Serotec, Oxfordshire, RU) y CD45 (BD Pharmingen) se usaron para detectar macrófagos y células hematopoyéticas, respectivamente, en secciones congeladas. La incubación con el anticuerpo primario se siguió mediante incubación durante la noche con anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos apropiados (Alexa 488, Alexa594 o Alexa633, Molecular Probes, Eugene, OR; o FITC, Jackson ImmunoResearch, Bar Harbor, ME). Las muestras fluorescentemente marcadas se montaron con Vectashield (VectorLabs) y se analizaron con un microscopio de fluorescencia compuesto (Zeiss 2, Carl Zeiss, Göttingen, Alemania; objetivo 10x con apertura numérica 0,30) o un microscopio confocal (Zeiss LSM 510, objetivos 40x con NA 1,3 y 63x con NA 1,4) usando barrido multicanal en modo de marco. Las proyecciones tridimensionales se construyeron digitalmente a partir de pilas z confocales.

40 Para estudiar colateralmente el crecimiento de arterias, músculos semimembranosos de la extremidad trasera de conejo se transfectaron adenovíricamente con virus con AdCAC, AdA165 y AdLacZ como se ha descrito previamente (Rissanen y col., Circ. Res., 92:1098-1106, 2003). También se llevaron a cabo inyección con azul de Evans y tinción histológica con CD31 como en Rissanen y col.(antes).

45 *Resultados.* Las construcciones de VEGF-CAC que comprenden el dominio de unión a RTK de VEGF-A y los péptidos del extremo amino y carboxilo de VEGF-C se construyeron con el fin de demostrar los efectos de los péptidos de VEGF-C sobre las propiedades de VEGF. Como era de esperar, se encontró que la proteína VEGF-CAC producida por células 293T transitoriamente transfectadas se unía a VEGFR-1 y -2, además de a neuropilina 1 y 2. La heparina afectó enormemente la unión, y la interacción especialmente con neuropilina 2 fue casi inexistente

en ausencia de heparina. La proteína VEGF-A109, que consiste en el dominio de unión al receptor mínimo, pudo unirse a VEGFR-1 y VEGFR-2, pero su unión a receptores de neuropilina fue débil. La heparina potenció algo la unión a neuropilina 1, dejando la interacción todavía extremadamente débil. VEGF-A165 se unió tanto a receptores de VEGF como a neuropilinas como era de esperar. En SDS-PAGE no reductora, el polipéptido de VEGF-CAC de longitud completa migró como 94 kD, que indica que el factor formó dímeros ligados por disulfuro.

La actividad del VEGF-CAC producido se probó en bioensayos de Ba/F3-VEGFR-1 y Ba/F3-VEGFR-2. VEGF-A165 y VEGF-A109 se usaron como controles y su actividad se comparó con la de VEGF-CAC. Los niveles de expresión de estos factores de crecimiento en medio condicionado fueron iguales. El medio de células HeLa transducidas con AdVEGF-CAC y AdVEGF-A165 activó VEGFR-1 y VEGFR-2 en diluciones similares, pero no activó VEGFR-3. VEGF-A109 pareció ser un mejor inductor del crecimiento celular de VEGFR-1/BpoR o VEGFR-2/EpoR que VEGF-CAC o VEGF-A165.

Con el fin de ensayar la actividad biológica de VEGF-CAC *in vivo*, AdCAC se inyectó en las orejas de ratones sin pelo y en el músculo esquelético de la extremidad trasera de conejo. Dos semanas después de la transducción génica se observó un marcado hinchamiento y eritema en las orejas transducidas con AdVEGF-CAC, mientras que tales efectos no se observaron en orejas tratadas con AdLacZ. La tinción fluorescente del montaje completo de orejas transducidas con AdVEGF-CAC reveló una extensa hiperplasia de endotelio positivo para PECAM-1, mientras que los capilares se distendieron y sus luces se alargaron cuando se compararon con controles. También se observó hiperplasia circunferencial de las arterias y venas más grandes de la oreja. No se observaron efectos similares en orejas tratadas con el virus de control. AdVEGF-CAC también produjo un alargamiento de capilares en músculo esquelético de conejo. La inyecciones con azul de Evans en extremidades traseras transducidas revelaron que AdVEGF-CAC indujo vasos menos permeables que AdVEGF-A165.

Como AdVEGF-CAC indujo un destacado aumento en estructuras similares a vasos positivas para PECAM-1, también se estudió el posible aumento en el número de vasos sanguíneos funcionales. Las preparaciones del montaje completo de orejas transducidas con AdVEGF-CAC se tiñeron con anticuerpos para nidogen (también conocido como entactina) y PECAM-1 mostró un aumento masivo en tubos de la membrana basal que contenían células endoteliales cuando se comparó con controles, que indica organización de células endoteliales en vasos.

También se estudió la funcionalidad de los nuevos vasos formados después de AdVEGF-CAC. Los ratones se inyectaron intravenosamente con lectina de *Lycopersicon esculentum* (tomate) fluorescente que se une a N-acetil-D-glicosaminoglicano, un marcador específico para células endoteliales de vasos sanguíneos (BEC) con el fin de visualizar vasos sanguíneos perfundidos. Las orejas transducidas con AdVEGF-CAC mostraron un marcado aumento en el número de vasos positivos para lectina cuando se comparó con control, aunque algo del endotelio positivo para PECAM-1 permaneció negativo para lectina. La cuantificación de la densidad del área (Baffert y col., Circ. Res. 94:984-992; Tammela y col., Blood, 105:4642-4648, 2005) de vasos positivos para lectina de preparaciones de montaje completas mostró un aumento de 2,8 veces en vasos perfundidos en orejas transducidas con AdVEGF-CAC en comparación con el control, mientras que el área de vasos positivos para PECAM-1 aumentó 2,0 veces. La angiogénesis inducida por AdVEGF-CAC estuvo acompañada de hiperplasia de pericitos.

Discusión. El Ejemplo 1 desvela la generación y la caracterización biológica de un VEGF quimérico, VEGF-CAC, que comprende el dominio activador del receptor de VEGF-A y los propéptidos de VEGF-C. VEGF-CAC se secretó y se procesó idénticamente cuando se comparó con VEGF-C, sugiriendo que los sitios de escisión del extremo amino y carboxi también están sometidos a proteólisis en la quimera. VEGF-C no se une a heparina, que se sabe que interactúa con las regiones básicas de las isoformas de corte y empalme largas de VEGF-A. Sin embargo, se contempla que VEGF-C o VEGF-CAC inmaduro se asociará al entorno extracelular mediante interacciones con el propéptido del extremo C que contiene dominios similares a EGF de otras proteínas secretadas que se sabe que participan en interacciones proteína-proteína y proteína-superficie celular (Appella y col., FEBS Lett, 231:1-4, 1988).

Se ha mostrado que VEGF-A165 induce angiogénesis por un mecanismo dependiente del gradiente, caracterizado por proliferación endotelial, germinación y migración guiada (Ruhrberg y col., Gene Dev., 16:2684-2698; Gerhardt y col., J. Cell. Biol., 161:1163-1177, 2003). Esta acción coordinada es evidentemente debida a las propiedades de difusión intermedias de VEGF-A165 (Tammela y col., Cardiovasc. Res., 65:550-563, 2005). Como se indica anteriormente, el VEGF-CAC quimérico era un potente inductor de la proliferación de células quiméricas BaF3 *in vitro*, mientras que la expresión en exceso *in vivo* del factor condujo a una robusta angiogénesis que se mostró que superaba incluso la actividad angiogénica de VEGF-A165. Se contempla que este aumento en la actividad biológica es debido a la mayor solubilidad del VEGF-CAC inmaduro cuando se comparó con VEGF-A165. También se contempla que VEGF-CAC es más susceptible a la proteólisis por proteasas extracelulares tales como plasmina, conduciendo a un aumento de la tasa de liberación del dominio del núcleo de VEGF (McColl y col., J. Exp. Med., 198:863-868, 2003). Simultáneamente, la arquitectura de los vasos formados en respuesta a expresión adenovírica en exceso de VEGF-CAC fue caótica y se pareció a hemangiomas en algunas localizaciones, sugiriendo que, después del procesamiento proteolítico de VEGF-CAC, el dominio del núcleo de VEGF liberado induce proliferación endotelial sin ejemplo de orientación de un modo comparable a ratones que expresan sólo la isoforma VEGF-A120 (homóloga a la isoforma VEGF-A121 humana) (Ruhrberg y col., antes). Sin embargo, en comparación con VEGF-A109, la hiperplasia inducida por VEGF-CAC fue más caótica y extendida.

Además de su actividad angiogénica, se mostró que VEGF-CAC inducía dilatación circunferencial de vasos linfáticos cutáneos. En línea con los resultados se ha mostrado que la expresión en exceso de VEGF-A induce grandes vasos linfáticos hiperplásicos, Saaristo y col., FASEB J., 16:1041-1049, 2002; Nagy y col., J. Exp. Med., 196:1497-1506, 2002 y Hon y col., FASEB J., 10:1111-1113, 2004). Estas señales pueden mediar por VEGFR-2, que también se expresa por vasos linfáticos, Jeltsch y col., Science, 276:1423-1425, 1997 y Veikkola y col., EMBO J., 6:1223-1231, 2001). Es posible que los efectos de VEGF-CAC sobre vasos linfáticos pudieran ser debidos a un aumento del drenaje como resultado de hiperpermeabilidad vascular, y al reclutamiento mediado por VEGFR-1 de células inflamatorias que producen VEGF-C y VEGF-D (Schoppmann y col., Am. J. Patol., 161:947-956, 2002; Cursiefen y col., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 45:2666-2673, 2004; Baluk y col., J. Clin. Invest., 115:247-257, 2005; Veikkola y col., EMBO J., 6:1223-1231, 2001).

EJEMPLO 15

CONSTRUCCIONES QUIMÉRICAS CUB-VEGF

El presente ejemplo describe la generación de una molécula de polipéptido quimérico designada CUB-VEGF que comprende el dominio CUB de PDGF-C o PDGF-D fusionado con un dominio de unión al receptor tirosina-cinasa (RTK) de VEGF-A. El dominio CUB se unió al extremo N de VEGF. Se generó un polinucleótido codificante para expresar el CUB-VEGF recombinantemente.

Vectores de expresión. Se clonaron ADNc humanos para la expresión de PDGF-D de longitud completa (PDGF-D_{FL}) (pb 176-1285 de SEQ ID NO: 22, número de secuencia de Genbank: AF336376) en el vector de expresión de mamífero pcDNA 3.1/V5-His A (Invitrogen) que era el dominio CUB con la región bisagra de PDGF-D (pb 176-988 de SEQ ID NO: 22, número de secuencia de Genbank: AF336376). Los diferentes CUB-VEGF (CUB271; pb 244-988 de SEQ ID NO: 22, CUB256 pb 244-943 de SEQ ID NO: 22; CUB254 pb 244-937 de SEQ ID NO: 22, todos de número de secuencia de Genbank: AF336376, fusionados con VEGF pb 100-402, Genbank NM003376) se clonaron en el vector de expresión de mamífero pSecTagB (Invitrogen).

Cultivo celular, transfección y marcado metabólico. Se cultivaron células 293T en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)-suero bovino fetal al 10% (SBF). Las transfecciones de células se realizaron usando el kit de transfección JetPei (Polyplus) según las instrucciones del fabricante. Se usaron cantidades equivalentes de plásmidos de expresión sin los insertos en transfecciones con vector vacío. El marcado metabólico de las células transfectadas con construcciones de expresión se llevó a cabo mediante la adición de 200 mCi/ml de la mezcla de marcado de células *in vitro* Pro-Mix L-[³⁵S] (Amersham) al medio de cultivo que carecía de cisteína y metionina, pero con SBF al 3%. Después de 6 horas, el medio se recogió, se purificó por centrifugación y se usó para inmunoprecipitación.

Inmunoprecipitación. Las inmunoprecipitaciones de PDGF-D y CUB271-VEGF metabólicamente marcados con ³⁵S se llevaron a cabo usando proteínas de fusión receptor α de PDGF-Ig y receptor β de PDGF-Ig (R&D), anti-PDGF-D (R&D) y anti-myc (Invitrogen). Las proteínas producidas unidas a proteínas de fusión o anticuerpos se precipitaron usando proteína A-Sepharose (Pharmacia). Las proteínas precipitadas se analizaron usando SDS-PAGE en condiciones reductoras.

Resultados. La precipitación de CUB271-VEGF marcado con myc con anti-myc demostró que se produce y se secreta. El medio que contiene CUB271-VEGF se mezcló 1:1 con medio que contiene PDGF-D de longitud completa secretado (residuos 1-370) y después de 3 horas los medios se precipitaron con PDGFR- α o PDGF- β . Los resultados indicaron que la presencia de la proteína quimérica bloqueó la unión de la forma madura de PDGF-D a PDGFR- α , pero no a PDGFR- β . El experimento se repitió con cotransfección de las quimeras PDGF-D_{FL} y CUB271-VEGF y los resultados fueron similares.

EJEMPLO 16

PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA CUB-VEGF

Para determinar si el dominio CUB puede escindirse cuando se liga a otra proteína homóloga se preparó una proteína quimérica PDGF-D-VEGF fusionando el dominio del factor de crecimiento de VEGF con la parte del extremo N del polipéptido de PDGF-D que contenía el dominio CUB de manera que se conservara el sitio de escisión en el extremo C del dominio CUB de PDGF-D natural. Los resultados indicaron que la proteína quimérica se escindió entre el dominio CUB y el dominio de VEGF.

El análisis detallado de las diversas fusiones mostró que la escisión se inhibió fuertemente cuando la secuencia de PDGF-D del extremo N se truncó adicionalmente de manera que se eliminó parcialmente la secuencia tribásica RKSK. Esto sugiere que el sitio de escisión principal en la proteína quimérica se localizó en esta secuencia.

EJEMPLO 17

UN POLIPÉPTIDO DE FUSIÓN DE CUB-VEGF LATENTE Y HOMODÍMEROS DEL MISMO

El dominio CUB del ADNc de PDGF-D de longitud completa se clonó en un vector que contenía el dominio del factor de crecimiento de VEGF. Esta forma de VEGF, llamada VEGF109, se clonó en el vector modificado pSecTag (Invitrogen) y se produjo una forma biológicamente activa de VEGF que puede unirse a y activar VEGFR- y VEGFR-2. Este VEGF también tiene una marca myc unida en su extremo C. Se prepararon tres clones diferentes, uno que contenía el dominio CUB y la región bisagra completa entre él y el dominio de homología con PDGF, el segundo que contenía un dominio CUB que termina en el supuesto sitio de procesamiento y el tercero que termina justo antes de este sitio.

Los clones se prepararon y se transfectaron en células 293T usando el reactivo de transfección FuGene6 (Roche). Dos días después de la transfección, el medio de cultivo se sustituyó con medio sin metionina y sin cisteína que incluía metionina y cisteína radiactivamente marcadas (³⁵S) (Promix, Amersham). Este medio se recogió y 1 ml del mismo se usó para extraer proteínas producidas por las construcciones transfectadas. La extracción se realizó usando los anticuerpos anti-myc (Babco) en inmunoprecipitación. Los productos de proteína extraídos se separaron en geles de PAGE al 12%. Las tres construcciones produjeron productos de proteína de aproximadamente el tamaño predicho a partir de las inmunoprecipitaciones previas de los polipéptidos componentes.

Los polipéptidos observados en los geles son CUB-VEGF109 de longitud completa y VEGF109 procesado a partir del cual se ha escindido el dominio CUB. Este resultado también validó el sitio de procesamiento ya que el producto del clon que incluye el área de bisagra completa es ligeramente más grande que los otros y más grande que la proteína VEGF109 de control. La electroforesis en PAGE al 7% en condiciones no reductoras mostró que estas proteínas también forman dímeros y que parece que las proteínas CUB-VEGF109 sin procesar forman dímeros no sólo consigo mismos, sino también con la forma procesada de VEGF109. El uso de tales formas dimerizantes como inhibidores se contempla específicamente como un aspecto de la invención.

EJEMPLO 18

ACTIVIDAD DE UNIÓN A RECEPTOR DE CUB-VEGF

Los resultados indicaron que los tres productos de proteína quimérica de CUB-VEGF109 se unieron tanto a VEGFR- como a VEGFR-2. Se probó la capacidad de estas proteínas quiméricas para activar los receptores estimulando el crecimiento de células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMEC). El medio condicionado que contiene CUB(248)-VEGF109 se obtuvo para la prueba, mientras que el medio que contiene VEGF109, medio de crecimiento de células endoteliales o medio de privación se usó como controles. La prueba de proliferación celular se llevó a cabo simultáneamente en 10 pocillos, conteniendo cada uno 10.000 células; por pocillo se administraron 100 µl de medio condicionado. Después de 72 horas de incubación a 37°C se añadieron 10 µl de una disolución 5 mg/ml de MTT y los pocillos se incubaron durante 4 horas adicionales después de que las células se lisaran en 100 µl de SDS al 10% /10 mmol/l de HCl durante la noche. La absorbancia se midió a 540 nm.

Los resultados demostraron que aunque CUB(248)-VEGF109 se unió a VEGFR-1 y VEGFR-2, no se indujo proliferación celular mediante estos receptores cuando se comparó con el medio de crecimiento completo o VEGF109. Una posible explicación podría ser que CUB(248)-VEGF109 no puede dimerizar los receptores a pesar de unirse a ellos. Por consiguiente, pueden servir de inhibidores para la activación de receptor mediada por VEGF.

EJEMPLO 19

LA PROTEÍNA QUIMÉRICA CUB-VEGF PROMOVIO LA HETERODIMERIZACIÓN CON PDGF-D

La co-transfección de los vectores de PDGF-D y CUB-VEGF condujo a la heterodimerización de los polipéptidos. Los polipéptidos de CUB-VEGF y PDGF-D marcados con epítipo de Myc y de V5, respectivamente, se expresaron por separado o en las mismas células y se precipitaron con anticuerpos dirigidos contra las marcas de epítopos. No se produjeron dímeros de VEGF procesados. Los polipéptidos que migran a aproximadamente 105 kD representaron una proteína heterodimérica como puede deducirse de su precipitación con ambos antisueros. De forma interesante, a aproximadamente 68 kD hubo polipéptidos que precipitaron tanto con anti-V5 como con anti-myc. Se cree que éste es un dímero en el que una cadena de CUB-VEGF está procesada y la otra cadena no. Las bandas también fueron visibles cuando se precipitó tanto con anti-V5 como con anti-myc.

EJEMPLO 20

ESCISIÓN DEL DOMINIO CUB DEL HETERODÍMERO CUB-VEGF/PDGF-D

Sorprendentemente, cuando las proteínas quiméricas del Ejemplo 16 se analizaron en condiciones no reductoras, muy poco de la proteína de VEGF escindida homodimérica pudo detectarse en los geles. Por el contrario, las especies principales de la proteína de CUB-VEGF fueron el dímero de longitud completa y un heterodímero entre la quimera CUB-VEGF de longitud completa y escindida. Esto sugiere que la primera escisión que separa el dominio CUB del extremo N de PDGF-D y el dominio de VEGF es eficiente, pero la segunda escisión es mucho más ineficiente después de la pérdida del primer dominio CUB. Todas las formas retuvieron la actividad de unión a VEGFR-1 y VEGFR-2.

EJEMPLO 21**LA QUIMERA CUB271-VEGF BLOQUEA LA UNIÓN DE PDGF-D A PDGFR-ALFA, PERO NO A PDGFR-BETA**

La co-transfección de quimeras PDGF-D Δ L y CUB-VEGF demostró que la presencia de la proteína quimérica bloqueó la unión de la forma madura de PDGF-D a PDGFR- α , pero no a PDGFR- β . Los resultados indicaron que la co-expresión de VEGF nativo con PDGF-D no afectó la unión de la forma madura tanto a PDGFR- α como a - β . Este resultado se confirmó produciendo CUB271-VEGF y PDGF-D por separado y mezclando los medios para determinar si CUB-VEGF bloquearía la unión de PDGF-D a PDGFR- α . Después de 3 horas de mezcla se realizó la precipitación con PDGFR- α y PDGFR- β . Los resultados confirmaron la conclusión obtenida a partir de la co-transfección: la presencia de CUB271-VEGF bloquea la unión a PDGFR- α , pero no a PDGFR- β de PDGF-D.

Por tanto, se contempla que las construcciones de CUB-VEGF de la invención actuarán de antagonistas de PDGFR- α y serían útiles para tratar sujetos que padecen ascitis por edema, hidrotórax, hidropericardio, edema cerebral, hidrocefalo, glaucoma y edema pulmonar agudo, y otras enfermedades en las que el edema es un problema clínico significativo.

EJEMPLO 22**PROCESAMIENTO DE LONGITUD COMPLETA Y ACTIVIDAD DE UNIÓN A RECEPTOR DE PDGF-D**

Este ejemplo proporciona los datos que indican que PDGF-D completamente procesado se une a y activa tanto PDGFR- α como PDGF- β .

Vectores de expresión. Los ADNc humanos para la expresión de PDGF-D de longitud completa (pb 176-1285 de SEQ ID NO: 22, secuencia de Genbank AF336376) y el dominio CUB de PDGF-D (pb 176-677 de SEQ ID NO: 22, secuencia de Genbank AF336376, y SEQ ID NO: 55) se clonaron en el vector de expresión de mamífero pcDNA 3.1/V5-His A (Invitrogen), ADNc para PDGF-D Δ N (pb 917-1285 de SEQ ID NO: 22), todos los CUB-VEGF diferentes (CUB271; pb 244-988 de SEQ ID NO: 22; CUB256 pb 244-943 de SEQ ID NO: 22; CUB254 pb 244-937 de SEQ ID NO: 22 fusionados con VEGF pb 100-402, Genbank NM_003376), PDGF-C Δ N (pb 912-1223 de SEQ ID NO: 20, GenBank AF244813) y PDGF-B de longitud completa (pb 1023-2368 de SEQ ID NO: 18, GenBank NM_002608) se clonaron en el vector de expresión de mamífero pSecTagB (Invitrogen).

Cultivo celular, transfecciones y marcado metabólico. Se cultivaron células 293T en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)-suero bovino fetal al 10% (SBF). Las transfecciones de células se llevaron a cabo usando el kit de transfección JetPei (Polyplus) según las instrucciones del fabricante. Se usaron cantidades equivalentes de plásmidos de expresión sin los insertos en transfecciones con vector vacío. El marcado metabólico de las células transfectadas con las construcciones de expresión se hizo mediante adición de 200 mCi/ml de la mezcla de marcado de células *in vitro* Pro-Mix L-[³⁵S] (Amersham) al medio de cultivo que carecía de cisteína y metionina, pero que contenía SBF al 3%. Después de 6 horas, el medio se recogió, se purificó por centrifugación y se usó para inmunoprecipitación.

Inmunoprecipitación. Las inmunoprecipitaciones y las precipitaciones de receptores de PDGF-D metabólicamente marcados con ³⁵S, PDGF-D Δ N, todos los CUB-VEGF diferentes, CUB, PDGF-C Δ N y PDGF-B se llevaron a cabo usando proteínas de fusión receptor α de PDGF-Ig y receptor β de PDGF-Ig (R&D), anti-PDGF-D (R&D), anti-myc (Invitrogen) y anti-V5 (Invitrogen). Las proteínas producidas unidas a proteínas de fusión o anticuerpos se precipitaron usando proteína A-Sepharose (Pharmacia). Las proteínas precipitadas se analizaron usando SDS-PAGE en condiciones tanto reductoras como no reductoras.

Resultados. Previamente se ha mostrado que PDGF-D es secretado como un dímero de polipéptidos de longitud completa de aproximadamente 60 kD, y en presencia de suero, PDGF-D experimenta procesamiento proteolítico para generar el dímero del factor de crecimiento activo de los dominios de homología con PDGF de 23 kD, pero que carecen de los dominios CUB del extremo N (Bergsten, Nat. Cell. Biol., 3:512-516, 2001; LaRochelle, Nat. Cell. Biol., 3:517-521, 2001). Una especie de ARN de PDGF-D alternativamente cortada y empalmada se encontró en corazón de ratón que codifica sólo el dominio CUB, con un codón de terminación en la posición 256 del marco de lectura. Los vectores de plásmido se construyeron para la expresión del dominio CUB, además de las formas de longitud completa y activadas de PDGF-D para probar si esta proteína truncada y el dominio CUB tiene una función en el procesamiento de PDGF-D.

El dominio del factor de crecimiento procesado se escindió del PDGF-D de longitud completa unido a PDGFR- α y - β , mientras que el dominio CUB aislado no se unió a ningún receptor. Esto se detectó precipitando PDGF-D de longitud completa metabólicamente marcado con proteínas de fusión receptor α de PDGF-Ig. De forma interesante, el polipéptido de PDGF-D Δ N que carece del dominio CUB, pero que contiene parte de las secuencias intervinientes, también se unió a PDGFR- β , pero sólo muy débilmente a PDGFR- α . Sin embargo, el polipéptido de PDGF-D Δ N no experimentó procesamiento proteolítico a la forma activa correspondiente a la escindida de la proteína de longitud completa, sugiriendo que la presencia del dominio CUB intacto es necesaria para la correcta escisión proteolítica. Los experimentos de control mostraron que PDGF-C Δ N se une sólo a PDGFR- β y PDGF-B se une a ambos receptores, como se ha informado previamente.

Además, los experimentos de marcado de seguimiento de pulso demostraron que el procesamiento proteolítico se produce en las células productoras de PDGF-D, pero no en el medio de crecimiento después de la secreción. Por tanto, la capacidad de PDGF-D completamente procesado para unirse tanto a PDGFR- α como a β se confirmó adicionalmente por los experimentos de marcado de seguimiento de pulso. Los plásmidos de expresión que codifican las formas de PDGF tratadas anteriormente se transfectaron en células 293T usando el reactivo de transfección JetPei (Polyplus). Dos días después de la transfección, el medio de cultivo se substituyó con medio sin metionina y sin cisteína que incluía metionina y cisteína radiactivamente marcadas (^{35}S) (Promix, Amersham) y suero bovino fetal al 5%. Este medio se recogió después de 24 horas y se usó 1 ml para precipitar proteínas producidas por las construcciones transfectadas. La precipitación se hizo usando proteínas de fusión de receptor de PDGF (R&D) y proteína A-Sepharose. Las proteínas precipitadas se separaron en un gel de PAGE al 12%. Todas las construcciones produjeron polipéptidos del tamaño predicho a partir de las inmunoprecipitaciones previas de los polipéptidos en cuestión.

A diferencia de los informes anteriores, la forma naturalmente procesada de PDGF-D también puede unirse a PDGFR- α . La precipitación con la proteína de fusión receptor α de PDGF-Ig reveló la unión de la forma procesada de PDGF-D. Como control negativo se usó el vector vacío. PDGF-C Δ N y PDGF-B se usaron como controles positivos. Pareció que la forma corta recombinantemente "activada", PDGF-D Δ N, se unía al receptor α muy débilmente. Los resultados indicaron que PDGF-D Δ N, además de PDGF-B y PDGF-D, se unen a PDGF- β , pero no PDGF-C Δ N.

Estos resultados revelan que el sitio de escisión endógeno de PDGF-D se localiza más hacia el extremo C de lo que previamente se pensaba y que la escisión correcta del dominio CUB es esencial para revelar la actividad de unión a PDGFR- α de PDGF-D. También se determinó que PDGF-D completamente procesado podría estimular la fosforilación de tanto los receptores PDGFR- α como PDGFR- β .

Debe entenderse que la anterior descripción se refiere a realizaciones preferidas de la invención y que equivalentes y variaciones que serán evidentes para el lector también están previstas como aspectos de la invención. Las referencias citadas en todo este documento están todas específicamente incorporadas en este documento por referencia.

ÍNDICE DEL LISTADO DE SECUENCIAS

Secuencia nº	Nombre	Tipo de secuencia
1.	VEGF-A	ADN
2.	VEGF-A	AA
3.	VEGF 206	AA
4.	VEGF 121	AA
5.	VEGF 145	AA
6.	VEGF 165	AA
7.	VEGF 189	AA
8.	PIGF	ADN
9.	PIGF	AA
10.	VEGF-B	ADN
11.	VEGF-B	AA
12.	VEGF-C	ADN
13.	VEGF-C	AA
14.	VEGF-D	ADN
15.	VEGF-D	AA
16.	PDGF-A	ADN

(cont.)

Secuencia nº	Nombre	Tipo de secuencia
17.	PDGF-A	AA
18.	PDGF-B	ADN
19.	PDGF-B	AA
20.	PDGF-C	ADN
21.	PDGF-C	AA
22.	PDGF-D	ADN
23.	PDGF-D	AA
24.	VEGF-E	ADN
25.	VEGF-E	AA
26.	CAC	ADN
27.	CAC	AA
28.	CEBADOR	ADN
29.	CEBADOR	ADN
30.	CEBADOR	ADN
31.	CEBADOR	ADN
32.	CEBADOR	ADN
33.	CEBADOR	ADN
34.	CEBADOR	ADN
35.	CEBADOR	ADN
36.	CDD	ADN
37.	CDD	AA
38.	CDC	ADN
39.	CDC	AA
40.	DDC	ADN
41.	DDC	AA
42.	P1GF-2	AA
43.	P1GF-3	AA
44.	VEGFB-167	AA
45.	VEGFB-186	AA
46.	Propéptido del extremo N de VEGF-C	AA
47.	Propéptido del extremo C de VEGF-C	AA
48.	Propéptido del extremo N de VEGF-D	AA
49.	Propéptido del extremo C de VEGF-D	AA

(cont.)

Secuencia nº	Nombre	Tipo de secuencia
50.	LAP-1	AA
51.	VEGF109	ADN
52.	VEGF109	AA
53.	Dominio CUB de PDGF-C	AA
54.	Dominio CUB de PDGF-D	ADN
55.	Dominio CUB de PDGF-D	AA
56.	CUB271-VEGF	ADN
57.	CUB271-VEGF	AA
58.	CUB254-VEGF	ADN
59.	CUB254-VEGF	AA
60.	CUB256-VEGF	ADN
61.	CUB256-VEGF	AA
62.	CUB+V5+His	ADN
63.	CUB+V5+His	ADN
64.	Cebador	ADN
65.	Cebador	ADN

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Alitalo y col.
- <120> VEGF-A modificado con propiedades angiogénicas mejoradas
- <130> 28967/41018A
- 10 <150> US 60/708.226
- <151> 15-08-2005
- 15 <160> 65
- <170> Patent In versión 3.3
- <210> 1
- 20 <211> 649
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 25 <221>
- <223> VEGF-A
- <400> 1

```

tcgggcctcc gaaaccatga actttctgct gtcttgggtg cattggagcc ttgccttget      60
gctctacctc caccatgcca agtgggtccca ggctgcaccc atggcagaag gaggagggca     120
gaatcatcac gaagtgggtga agttcatgga tgtctatcag cgcagctact gccatccaat     180
cgagaccctg gtggacatct tccaggagta ccctgatgag atcgagtaca tcttcaagcc     240
atcctgtgtg cccctgatgc gatgcggggg ctgctgcaat gacgagggcc tggagtgtgt     300
gccactgag gagtccaaca tcaccatgca gattatgcgg atcaaacctc accaaggcca     360
gcacatagga gagatgagct tcctacagca caacaaatgt gaatgcagac caaagaaaga     420
tagagcaaga caagaaaatc cctgtggggc ttgctcagag cggagaaagc atttgtttgt     480
acaagatccg cagacgtgta aatgttcctg caaaaacaca gactcgcgtt gcaaggcgag     540
gcagcttgag ttaaacgaac gtacttgcag atgtgacaag ccgaggcggt gagccgggca     600
ggaggaagga gcctccctca gcgtttcggg aaccagatct ctcaccagg                    649

```

<210> 2
 <211> 191
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221>
 10 <223> VEGF-A

<400> 2

```

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

```

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

<210> 3
 <211> 232
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221>
 10 <223> VEGF206

<400> 3

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

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val
130 135 140

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr
145 150 155 160

Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met Pro Trp
165 170 175

Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys
180 185 190

His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn
195 200 205

Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr
210 215 220

Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
225 230

<210> 4
<211> 147

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221>
 <223> VEGF121

<400> 4

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

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
 20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
 35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
 85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
 115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Cys Asp Lys
 130 135 140

Pro Arg Arg
 145

<210> 5
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221>
 <223> VEGF145

<400> 5

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

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln

35

40

45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val
130 135 140

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr
145 150 155 160

Lys Ser Trp Ser Val Cys Asp Lys Pro Arg Arg
165 170

<210> 6

<211> 191

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro

85

90

95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly
130 135 140

Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr
145 150 155 160

Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
165 170 175

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
180 185 190

<210> 7

<211> 215

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

10 <223> VEGF189

<400> 7

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

Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly
 20 25 30

Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
 35 40 45

Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 50 55 60

Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu
 65 70 75 80

Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro
 85 90 95

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 100 105 110

Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
 115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys Lys Ser Val
 130 135 140

Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr
 145 150 155 160

Lys Ser Trp Ser Val Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His
 165 170 175

Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr
 180 185 190

Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys
 195 200 205

Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 210 215

<210> 8

<211> 1645

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

10 <223> PIGF

<400> 8

```

gggattcggg ccgcccagct acgggaggac ctggagtggc actgggcgcc cgacggacca      60
tccccgggac ccgcctgccc ctcggcgccc cgccccgcgc ggccgctccc cgtcgggttc      120
cccagccaca gccttaccta cgggctcctg actccgcaag gcttccagaa gatgctcgaa      180
ccaccggccg gggcctcggg gcagcagtga gggaggcgtc cagcccccca ctcagctctt      240
ctcctcctgt gccaggggct ccccggggga tgagcatggg ggttttccct cggagcccccc      300
tggctcggga cgtctgagaa gatgcgggtc atgaggctgt tcccttgctt cctgcagctc      360
ctggccgggc tggcgctgcc tgctgtgccc cccagcagtc gggccttgct tgctgggaac      420
ggctcgtcag aggtggaagt ggtacccttc caggaagtgt ggggccgcag ctactgccgg      480
gcgctggaga ggctggtgga cgtcgtgtcc gagtaccca gcgaggtgga gcacatgttc      540
agcccatcct gtgtctccct gctgcgtgc accggctgct gcggcgatga gaatctgcac      600
tgtgtgccgg tggagacggc caatgtcacc atgcagctcc taaagatccg ttctggggac      660
cggccctcct acgtggagct gacgttctct cagcacgttc gctgcgaatg ccggcctctg      720
cgggagaaga tgaagccgga aaggtgcggc gatgctgttc cccggaggta acccaccctt      780
tggaggagag agaccccgca cccggctcgt gtatttatta ccgtcacact cttcagtgc      840
tcttgcctgt acctgccctc tatttattag ccaactgttt ccctgctgaa tgcctcgctc      900
ccttcaagac gaggggcagg gaaggacagg accctcagga attcagtgcc ttcaacaacg      960
tgagagaaag agagaagcca gccacagacc cctgggagct tccgctttga aagaagcaag     1020
acacgtggcc tcgtgagggg caagctaggc cccagaggcc ctggaggtct ccaggggcct     1080
gcagaaggaa agaagggggc cctgctacct gttcttgggc ctcaggctct gcacagacaa     1140
gcagcccttg ctttcggagc tcctgtccaa agtagggatg cggattctgc tggggccgcc     1200
acggcctggt ggtgggaagg ccggcagcgg gcggagggga ttcagccact tccccctctt     1260
cttctgaaga tcagaacatt cagctctgga gaacagtggg tgccctggggg cttttgccac     1320
tccttgtccc ccgtgatctc ccctcacact ttgccatttg cttgtactgg gacattgttc     1380
tttccggccg aggtgccacc accctgcccc cactaagaga cacatacaga gtgggccccg     1440
ggctggagaa agagctgcct ggatgagaaa cagctcagcc agtggggatg aggtcaccag     1500
gggaggagcc tgtgcgtccc agctgaaggc agtggcaggg gagcaggttc cccaagggcc     1560
ctggcacccc cacaagctgt ccctgcaggg ccattctgact gccaaagccag attctcttga     1620
ataaagtatt ctagtgtgga aacgc                                           1645

```

5

<210> 9
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<220>

<221>

<223> PIGF

<400> 9

Met Pro Val Met Arg Leu Phe Pro Cys Phe Leu Gln Leu Leu Ala Gly
1 5 10 15

Leu Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly
20 25 30

Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu
50 55 60

Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu
65 70 75 80

Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro
85 90 95

Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly
100 105 110

Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp
130 135 140

Ala Val Pro Arg Arg
145

5

<210> 10

<211> 755

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221>

<223> VEGF-B

15

<400> 10

```

caccatgagc cctctgctcc gccgcctgct gctcgccgca ctcttgacgc tggcccccgcc 60
ccaggccccct gtctcccagc ctgatgcccc tggccaccag aggaaagtgg tgtcatggat 120
agatgtgtat actcgcgcta cctgccagcc ccgggaggtg gtggtgccct tgactgtgga 180
gctcatgggc accgtggcca aacagctggt gccagctgc gtgactgtgc agcgtgtgg 240
tggctgctgc cctgacgatg gcctggagtg tgtgccact ggcagcacc aagtccggat 300
gcagatcctc atgatccggt acccgagcag tcagctgggg gagatgtccc tggaagaaca 360
cagccagtgt gaatgcagac ctaaaaaaaaa ggacagtgtc gtgaagccag acagggctgc 420
cactccccac caccgtcccc agccccgttc tgttccgggc tgggactctg cccccggagc 480
accctcccca gctgacatca cccatcccac tccagcccca ggcccctctg cccacgctgc 540
accagcacc accagcgccc tgacccccgg acctgccgcc gccgctgccg acgcgcgagc 600
ttcctccgtt gccaagggcg gggcttagag ctcaaccag acacctgcag gtgccggaag 660
ctgcgaaggt gacacatggc ttttcagact cagcaggggtg acttgccctca gaggctatat 720
cccagtgggg gaacaaagag gagcctggta aaaaa 755

```

<210> 11

<211> 207

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

10 <223> VEGF-B

<400> 11

Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu
1 5 10 15

Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
20 25 30

Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
35 40 45

Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
50 55 60

Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
65 70 75 80

Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
85 90 95

Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
100 105 110

Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
115 120 125

Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Arg Ala Ala Thr Pro His His Arg
130 135 140

Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro Gly Trp Asp Ser Ala Pro Gly Ala Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Ile Thr His Pro Thr Pro Ala Pro Gly Pro Ser Ala
165 170 175

His Ala Ala Pro Ser Thr Thr Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala Ala
180 185 190

Ala Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser Ser Val Ala Lys Gly Gly Ala
195 200 205

<210> 12
<211> 2076
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221>
10 <223> VEGF-C

<400> 12

cggggaaggg gagggaggag ggggacgagg gctctggcgg gtttgagggg gctgaacatc	60
gcgggggtgtt ctggtgtccc ccgccccgcc tctccaaaaa gctacaccga cgcggaccgc	120
ggcggcgctcc tccctcgccc tcgcttcacc tcgcgggctc cgaatgcggg gagctcggat	180
gtccgggtttc ctgtgaggct tttacctgac acccgccgcc tttccccggc actggctggg	240
agggcgccct gcaaagttgg gaacgcggag ccccggaacc gctcccgccg cctccggctc	300
gcccgagggg ggtcgccggg aggagccccg gggagagggg ccaggagggg cccgcggcct	360
cgcagggggcg cccgcgcccc caccctcgcc cccgccagcg gaccggtccc ccacccccgg	420
tccttcacc atgcacttgc tgggcttctt ctctgtggcg tgttctctgc tcgccgtgc	480
gctgctcccg ggtcctcgcg aggcgccccg cgcgcgccgc gccttcgagt ccggactcga	540
cctctcggac gcggagcccc acgcgggcga ggccacggct tatgcaagca aagatctgga	600
ggagcagtta cggctctgtgt ccagtgtaga tgaactcatg actgtactct acccagaata	660
ttggaaaatg tacaagtgtc agctaaggaa aggaggctgg caacataaca gagaacaggc	720
caacctcaac tcaaggacag aagagactat aaaatttgct gcagcacatt ataatacaga	780
gatcttgaaa agtattgata atgagtggag aaagactcaa tgcatgccac gggaggtgtg	840
tatagatgtg ggggaaggagt ttggagtcgc gacaaacacc ttctttaaac ctccatgtgt	900
gtccgtctac agatgtgggg gtgctgcaa tagtgagggg ctgcagtgca tgaacaccag	960
cacgagctac ctacgaaga cgttatttga aattacagt cctctctctc aaggccccaa	1020
accagtaaca atcagttttg ccaatcacac ttccctgccg tgcagtgtcta aactggatgt	1080
ttacagacaa gttcattcca ttattagacg ttccctgccg gcaacactac cacagtgtca	1140
ggcagcgaac aagacctgcc ccaccaatta catgtggaat aatcacatct gcagatgcct	1200
ggctcaggaa gattttatgt tttcctcgga tgctggagat gactcaacag atggattcca	1260
tgacatctgt ggaccaaaca aggagctgga tgaagagacc tgtcagtgtg tctgcagagc	1320
ggggcttcgg cctgccagct gtggaccca caaagaacta gacagaaact catgccagtg	1380
tgtctgtaaa aacaaactct tccccagcca atgtggggcc aaccgagaat ttgatgaaaa	1440
cacatgccag tgtgtatgta aaagaacctg cccagaaat caaccctaa atcctggaaa	1500
atgtgcctgt gaatgtacag aaagtccaca gaaatgcttg taaaaggaa agaagttcca	1560

```

ccaccaaaca tgcagctggt acagacggcc atgtacgaac cgccagaagg cttgtgagcc 1620
aggattttca tatagtgaag aagtgtgtcg ttgtgtccct tcatattgga aaagaccaca 1680
aatgagctaa gattgtactg ttttccagtt catcgatttt ctattatgga aaactgtggt 1740
gccacagtag aactgtctgt gaacagagag acccttgtgg gtccatgcta acaaagacaa 1800
aagtctgtct ttcctgaacc atgtggataa ctttacagaa atggactgga gctcatctgc 1860
aaaaggcctc ttgtaaagac tggttttctg ccaatgacca aacagccaag attttctctt 1920
tgtgatttct ttaaaagaat gactatataa tttatttcca ctaaaaatat tgtttctgca 1980
ttcattttta tagcaacaac aattggtaaa actcactgtg atcaatattt ttatatcatg 2040
caaaatatgt ttaaaataaa atgaaaattg tattat 2076

```

<210> 13

<211> 419

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

10 <223> VEGF-C

<400> 13

```

Met His Leu Leu Gly Phe Phe Ser Val Ala Cys Ser Leu Leu Ala Ala
1          5          10          15

```

```

Ala Leu Leu Pro Gly Pro Arg Glu Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Phe
          20          25          30

```

```

Glu Ser Gly Leu Asp Leu Ser Asp Ala Glu Pro Asp Ala Gly Glu Ala
35          40          45

```

```

Thr Ala Tyr Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu Arg Ser Val Ser
50          55          60

```

```

Ser Val Asp Glu Leu Met Thr Val Leu Tyr Pro Glu Tyr Trp Lys Met
65          70          75          80

```

```

Tyr Lys Cys Gln Leu Arg Lys Gly Gly Trp Gln His Asn Arg Glu Gln
85          90          95

```

```

Ala Asn Leu Asn Ser Arg Thr Glu Glu Thr Ile Lys Phe Ala Ala Ala
100          105          110

```

```

His Tyr Asn Thr Glu Ile Leu Lys Ser Ile Asp Asn Glu Trp Arg Lys
115          120          125

```

Thr Gln Cys Met Pro Arg Glu Val Cys Ile Asp Val Gly Lys Glu Phe
 130 135 140
 Gly Val Ala Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Ser Val Tyr
 145 150 155 160
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Ser Glu Gly Leu Gln Cys Met Asn Thr
 165 170 175
 Ser Thr Ser Tyr Leu Ser Lys Thr Leu Phe Glu Ile Thr Val Pro Leu
 180 185 190
 Ser Gln Gly Pro Lys Pro Val Thr Ile Ser Phe Ala Asn His Thr Ser
 195 200 205
 Cys Arg Cys Met Ser Lys Leu Asp Val Tyr Arg Gln Val His Ser Ile
 210 215 220
 Ile Arg Arg Ser Leu Pro Ala Thr Leu Pro Gln Cys Gln Ala Ala Asn
 225 230 235 240
 Lys Thr Cys Pro Thr Asn Tyr Met Trp Asn Asn His Ile Cys Arg Cys
 245 250 255
 Leu Ala Gln Glu Asp Phe Met Phe Ser Ser Asp Ala Gly Asp Asp Ser
 260 265 270
 Thr Asp Gly Phe His Asp Ile Cys Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu
 275 280 285
 Glu Thr Cys Gln Cys Val Cys Arg Ala Gly Leu Arg Pro Ala Ser Cys
 290 295 300
 Gly Pro His Lys Glu Leu Asp Arg Asn Ser Cys Gln Cys Val Cys Lys
 305 310 315 320
 Asn Lys Leu Phe Pro Ser Gln Cys Gly Ala Asn Arg Glu Phe Asp Glu
 325 330 335
 Asn Thr Cys Gln Cys Val Cys Lys Arg Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro
 340 345 350
 Leu Asn Pro Gly Lys Cys Ala Cys Glu Cys Thr Glu Ser Pro Gln Lys
 355 360 365
 Cys Leu Leu Lys Gly Lys Lys Phe His His Gln Thr Cys Ser Cys Tyr
 370 375 380

Arg Arg Pro Cys Thr Asn Arg Gln Lys Ala Cys Glu Pro Gly Phe Ser
385 390 395 400

Tyr Ser Glu Glu Val Cys Arg Cys Val Pro Ser Tyr Trp Lys Arg Pro
405 410 415

Gln Met Ser

<210> 14
<211> 2128
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221>
10 <223> VEGF-D

<400> 14
caagacttct ctgcattttc tgccaaaatc tgtgtcagat ttaagacaca tgcttctgca 60
agcttccatg aagggtgtgc aaaaaagttt caatccagag ttgggttcca gctttctgta 120
gctgtaagca ttggtggcca caccacctcc ttacaaagca actagaacct gcggcataca 180
ttggagagat ttttttaatt ttctggacat gaagtaaatt tagagtgcct tctaatttca 240
ggtagaagac atgtccacct tctgattatt tttggagaac attttgattt ttttcatctc 300
tctctcccca ccctaagat tgtgcaaaaa aagcgtacct tgcctaattg aaataatttc 360
attggatttt gatcagaact gattatttgg ttttctgtgt gaagttttga ggtttcaaac 420
tttccttctg gagaatgcct tttgaaacaa ttttctctag ctgcctgatg tcaactgctt 480
agtaatcagt ggatattgaa atattcaaaa tgtacagaga gtgggtagtg gtgaatgttt 540
tcatgatgtt gtacgtccag ctgggtgcagg gctccagtaa tgaacatgga ccagtgaagc 600
gatcatctca gtccacattg gaacgatctg aacagcagat cagggctgct tctagtttgg 660
aggaactact tcgaattact cactctgagg actggaagct gtggagatgc aggctgaggc 720
tcaaaaagttt taccagtatg gactctcgct cagcatccca tcgggtccact aggtttgcgg 780
caactttcta tgacattgaa acactaaaag ttatagatga agaattggcaa agaactcagt 840
gcagccctag agaaacgtgc gtggaggtgg ccagtgcgct ggggaagagt accaacacat 900
tcttcaagcc cccttgtgtg aacgtgttcc gatgtggtgg ctgttgcaat gaagagagcc 960
ttatctgtat gaacaccagc acctcgtaga tttccaaaca gctctttgag atatcagtgc 1020
ctttgacatc agtacctgaa ttagtgacct ttaaagttgc caatcataca gggtgtaagt 1080
gcttgccaac agccccccgc catccatact caattatcag aagatccatc cagatccctg 1140
aagaagatcg ctgttcccat tccaagaaac tctgtcctat tgacatgcta tgggatagca 1200

```

acaaatgtaa atgtgttttg caggaggaaa atccacttgc tggaacagaa gaccactctc 1260
atctccagga accagctctc tgtgggocac acatgatgtt tgacgaagat cgttgcgagt 1320
gtgtctgtaa aacaccatgt cccaaagatc taatccagca ccccaaaaac tgcagttgct 1380
ttgagtgcaa agaaagtctg gagacctgct gccagaagca caagctatct caccagaca 1440
cctgcagctg tgaggacaga tgcccctttc ataccagacc atgtgcaagt ggcaaaacag 1500
catgtgcaaa gcattgccgc tttccaaagg agaaaagggc tgcccagggg cccacagcc 1560
gaaagaatcc ttgattcagc gttccaagtt ccccatccct gtcattttta acagcatgct 1620
gctttgccaa gttgctgtca ctgttttttt cccaggtgtt aaaaaaaaaa tccattttac 1680
acagcaccac agtgaatcca gaccaacctt ccattcacac cagctaagga gtccctgggt 1740
cattgatgga tgtcttctag ctgcagatgc ctctgcgcac caaggaatgg agaggagggg 1800
acccatgtaa tccttttggt tagttttggt tttgtttttt ggtgaatgag aaaggtgtgc 1860
tggtcatgga atggcaggtg tcatatgact gattactcag agcagatgag gaaaactgta 1920
gtctctgagt cctttgctaa tcgcaactct tgtgaattat tctgattctt ttttatgcag 1980
aatttgattc gtatgatcag tactgacttt ctgattactg tccagcttat agtcttccag 2040
tttaatgaac taccatctga tgtttcatat ttaagtgtat ttaaagaaaa taaacaccat 2100
tattcaagcc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2128

```

<210> 15
 <211> 354
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221>
 10 <223> VEGF-D

<400> 15
 Met Tyr Arg Glu Trp Val Val Val Asn Val Phe Met Met Leu Tyr Val
 1 5 10 15
 Gln Leu Val Gln Gly Ser Ser Asn Glu His Gly Pro Val Lys Arg Ser
 20 25 30
 Ser Gln Ser Thr Leu Glu Arg Ser Glu Gln Gln Ile Arg Ala Ala Ser
 35 40 45
 Ser Leu Glu Glu Leu Leu Arg Ile Thr His Ser Glu Asp Trp Lys Leu
 50 55 60
 Trp Arg Cys Arg Leu Arg Leu Lys Ser Phe Thr Ser Met Asp Ser Arg
 65 70 75 80

Ser Ala Ser His Arg Ser Thr Arg Phe Ala Ala Thr Phe Tyr Asp Ile
 85 90 95

Glu Thr Leu Lys Val Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Thr Gln Cys Ser
 100 105 110

Pro Arg Glu Thr Cys Val Glu Val Ala Ser Glu Leu Gly Lys Ser Thr
 115 120 125

Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe Arg Cys Gly Gly
 130 135 140

Cys Cys Asn Glu Glu Ser Leu Ile Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr
 145 150 155 160

Ile Ser Lys Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro
 165 170 175

Glu Leu Val Pro Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu
 180 185 190

Pro Thr Ala Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln
 195 200 205

Ile Pro Glu Glu Asp Arg Cys Ser His Ser Lys Lys Leu Cys Pro Ile
 210 215 220

Asp Met Leu Trp Asp Ser Asn Lys Cys Lys Cys Val Leu Gln Glu Glu
 225 230 235 240

Asn Pro Leu Ala Gly Thr Glu Asp His Ser His Leu Gln Glu Pro Ala
 245 250 255

Leu Cys Gly Pro His Met Met Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val
 260 265 270

Cys Lys Thr Pro Cys Pro Lys Asp Leu Ile Gln His Pro Lys Asn Cys
 275 280 285

Ser Cys Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Thr Cys Cys Gln Lys His
 290 295 300

Lys Leu Phe His Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu Asp Arg Cys Pro Phe
 305 310 315 320

His Thr Arg Pro Cys Ala Ser Gly Lys Thr Ala Cys Ala Lys His Cys
 325 330 335

Arg Phe Pro Lys Glu Lys Arg Ala Ala Gln Gly Pro His Ser Arg Lys
 340 345 350

Asn Pro

<210> 16
 <211> 2797
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221>
 10 <223> PDGF-A

<400> 16
 acgcgcgccc tgcggagccc gcccaactcc ggcgagccgg gcctgcgcct actcctcctc 60
 ctctctctccc ggcggcggct gcggcggagg cgcgcactcg gccttgcgcc cgccctcagg 120
 cccgcgcggg cggcgcagcg agggccccggg cggcgggttg tggctgccag gcggctcggc 180
 cgcgggcgct gcccggcccc ggcgagcgga gggcggagcg cggcgccgga gccgagggcg 240
 cgccgcggag ggggtgctgg gccgcgctgt gcccggccgg gcggcggctg caagaggagg 300
 ccggaggcga gcgcggggcc ggcggtgggc gcgcagggcg gctcgcagct cgagccggg 360
 gccgggcccag gcgttcaggc aggtgatcgg tgtggcggcg gcggcggcgg cggccccaga 420
 ctccctccgg agttcttctt ggggctgatg tccgcaaata tgcagaatta ccggccgggt 480
 cgctcctgaa gccagcgcgg ggagcgagcg cggcggcggc cagcaccggg aacgcaccga 540
 ggaagaagcc cagccccgc cctccgcccc ttccgtcccc accccctacc cggcggccca 600
 ggaggctccc cggctgcggc gcgcactccc tgtttctcct cctcctggct ggcgctgcct 660
 gcctctccgc actcactgct cgccggggcg cgtccgccag ctccgtgctc cccgcgccac 720
 cctcctccgg gccgcgctcc ctaagggatg gtactgaatt tcgccgccac aggagaccgg 780
 ctggagcgcc cgccccgcgc ctgcctctc ctccgagcag ccagcgctc gggacgcgat 840
 gaggaccttg gcttgctgc tgcctcctcg ctgcggatac ctgccccatg ttctggccga 900
 ggaagccgag atcccccgcg aggtgatcga gaggtggcc cgcagtcaga tccacagcat 960
 ccgggacctc cagcgactcc tggagataga ctccgtaggg agtgaggatt ctttggaacac 1020
 cagcctgaga gtcacgggg tccacgccac taagcatgtg cccgagaagc ggccccctgcc 1080
 cattcggagg aagagaagca tcgaggaagc tgtccccgct gtctgcaaga ccaggacggt 1140
 catttacgag attcctcggg gtcaggctga cccacgtcc gccaaacttc tgatctggcc 1200
 cccgtgcgtg gaggtgaaac gctgcaccgg ctgctgcaac acgagcagtg tcaagtgcc 1260
 gccctcccg gcaccacc gcagcgtcaa ggtggccaag gtggaatacg tcaggaagaa 1320

```

gccaaaatta aaagaagtcc aggtgaggtt agaggagcat ttggagtgcg cctgcgcgac . 1380
cacaagcctg aatccggatt atcgggaaga ggacacggga aggcctaggg agtcaggtaa 1440
aaaacggaaa agaaaaaggt taaaaccac ctaagatgtg aggtgaggat gagccgcagc 1500
cctttcctgg gacatggatg tacatggcgt gttacattcc tgaacctact atgtacgggtg 1560
ctttattgcc agtgtgcggt ctttgttctc ctccgtgaaa aactgtgtcc gagaacactc 1620
gggagaacaa agagacagtg cacatttggt taatgtgaca tcaaagcaag tattgtagca 1680
ctcggatgaag cagtaagaag cttccttggt aaaaagagag agagagagag agagagagaa 1740
aacaaaacca caaatgacaa aaacaaaacg gactcacaaa aatatctaaa ctcgatgaga 1800
tgagggggtcg ccccggtgga tggaagtgcg gaggtctcag cagactggat ttctgtccgg 1860
gtggtcacag gtgctttttt gccgaggatg cagagcctgc tttgggaacg actccagagg 1920
gggtgctggtg ggctctgcag ggccgcaggg aagcaggaat gtcttgaaa ccgccacgcg 1980
aactttagaa accacacctc ctgctgtag tatttaagcc catacagaaa ctttcctgag 2040
agccttaagt ggtttttttt tttgtttttg ttttgttttt tttttttttg tttttttttt 2100
tttttttttt ttttacacca taaagtgatt attaagcttc cttttactct ttggctagct 2160
tttttttttt tttttttttt tttttttttt aattatctct tggatgacat ttacaccgat 2220
aacacacagg ctgctgtaac tgtcaggaca gtgcgacggt atttttccta gcaagatgca 2280
aactaatgag atgtattaaa ataaacatgg tatacctacc tatgcatcat ttcctaaatg 2340
tttctggctt tgtgtttctc ccttaccctg ctttatattgt taatttaagc cattttgaaa 2400
gaactatgcg tcaaccaatc gtacgcgcgt cctgcggcac ctgccccaga gcccgtttgt 2460
ggctgagtga caacttggtc cccgcagtgc acacctagaa tgctgtgttc ccacgcggca 2520
cgtgagatgc attgccgctt ctgtctgtgt tgttggtgtg ccctggtgcc gtggtggcgg 2580
tactccctc tgctgccagt gtttggacag aacccaaatt ctttattttt ggtaagatat 2640
tgtgctttac ctgtattaac agaaatgtgt gtgtgtggtt tgtttttttg taaaggtgaa 2700
gtttgtatgt ttacctaata ttacctgttt tgtatacctg agagcctgct atgttcttct 2760
tttgttgatc caaaattaaa aaaaaaatac caccaac 2797

```

<210> 17

<211> 211

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221>

<223> PDGF-A

10

<400> 17

Met Arg Thr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Leu Gly Cys Gly Tyr Leu Ala
1 5 10 15

His Val Leu Ala Glu Glu Ala Glu Ile Pro Arg Glu Val Ile Glu Arg
20 25 30

Leu Ala Arg Ser Gln Ile His Ser Ile Arg Asp Leu Gln Arg Leu Leu
35 40 45

Glu Ile Asp Ser Val Gly Ser Glu Asp Ser Leu Asp Thr Ser Leu Arg
50 55 60

Ala His Gly Val His Ala Thr Lys His Val Pro Glu Lys Arg Pro Leu
65 70 75 80

Pro Ile Arg Arg Lys Arg Ser Ile Glu Glu Ala Val Pro Ala Val Cys
85 90 95

Lys Thr Arg Thr Val Ile Tyr Glu Ile Pro Arg Ser Gln Val Asp Pro
100 105 110

Thr Ser Ala Asn Phe Leu Ile Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Lys Arg
115 120 125

Cys Thr Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Lys Cys Gln Pro Ser Arg
130 135 140

Val His His Arg Ser Val Lys Val Ala Lys Val Glu Tyr Val Arg Lys
145 150 155 160

Lys Pro Lys Leu Lys Glu Val Gln Val Arg Leu Glu Glu His Leu Glu
165 170 175

Cys Ala Cys Ala Thr Thr Ser Leu Asn Pro Asp Tyr Arg Glu Glu Asp
180 185 190

Thr Gly Arg Pro Arg Glu Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu
195 200 205

Lys Pro Thr
210

<210> 18

<211> 3373

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221>

<223> PDGF-B

10

<400> 18

```

ggtggcaact tctcctcctg cggccgggag cggcctgcct gcctccctgc gcacccgcag      60
cctccccgcg tgctcccta gggctccct cggccgccca gcgccattt ttcatccct      120
agatagagat actttgcgcg cacacacata catacgcgcg caaaaaggaa aaaaaaaaaa      180
aaaagcccac cctccagcct cgctgcaaag agaaaaccgg agcagccgca gctcgcagct      240
cgcagctcgc agcccgcagc ccgcagagga cggccagagc ggcgagcagg cgggcagacg      300
gaccgacgga ctgcgcgcgc gtccacctgt cggccggggc cagccgagcg cgcagcgggc      360
acgccgcgcg cgcggagcag ccgtgccgc cggccggggc cggccgagg ggcacacgc      420
tcccgcccc ctaccgggc cggcggggag tttgcacctc tccctgcccg ggtgctcgag      480
ctgccgttgc aaagccaact ttggaaaaag ttttttgggg gagacttggg ccttgagggtg      540
cccagctccg cgctttccga tttggggggc ctttccagaa aatgttgcaa aaaagctaag      600
ccggcgggca gaggaaaacg cctgtagccg gcgagtgaag acgaaccatc gactgccgtg      660
ttccttttcc tcttgagggt tggagtcctc tgggcgcccc cacacggcta gacgcctcg      720
ctggttcgcg acgcagcccc ccggccgtgg atgtgcact cgggctcggg atccgccag      780
gtagccggcc tcggaccag gtctgcgc caggtectcc cctgcccccc agcgacggag      840
ccggggccgg gggcggcggc gccgggggca tgcgggtgag ccgcggctgc agaggcctga      900
gcgcctgatc gccgcggacc tgagccgagc ccacccccct cccagcccc ccaccctggc      960
cgcgggggcg gcgcgctcga tctacgcgtc cggggccccc cggggccggg cccggagtcg     1020
gcatgaatcg ctgctgggcg ctcttctgt ctctctgctg ctacctgctg ctggtcagcg     1080
ccgaggggga cccattccc gaggagcttt atgagatgct gagtgaccac tcgatccgct     1140
cctttgatga tctccaacgc ctgctgcacg gagaccccg agaggaagat ggggcccaggt     1200
tggaacctga catgaccgc tccactctg gaggcgagct ggagagcttg gctcgtggaa     1260
gaaggagcct gggttccctg accattgctg agccggccat gatcgccgag tgcaagacgc     1320
gcaccgaggt gttcgagatc tcccggcgc tcatagaccg caccaacgcc aacttcttg      1380
tgtggccgcc ctgtgtggag gtgcagcgt gctccggctg ctgcaacaac cgcaacgtgc     1440
agtgcgccc caccaggtg cagctgcgac ctgtccaggt gagaaagatc gagattgtgc     1500
ggaagaagcc aatctttaag aaggccacgg tgacgctgga agaccacctg gcatgcaagt     1560
gtgagacagt ggcagctgca cggcctgtga cccgaagccc ggggggttcc caggagcagc     1620
gagccaaaac gcccctaaact cgggtgacca ttcggacggg gcgagtccgc cggccccca     1680
agggcaagca ccggaattc aagcacacgc atgacaagac ggcactgaag gagacccttg     1740
gagcctaggg gcatcggcag gagagtgtgt gggcagggtt atttaatatg gtatttctg     1800

```

```

tattgcccc atgggggcct tggagtgata atattgtttc cctcgccgt ctgtctcgat 1860
gcctgattcg gacggccaat ggtgcttccc ccacccctcc acgtgtccgt ccacccctcc 1920
atcagcgggt ctctcccag cggcctccgg tcttgcccag cagctcaaag aagaaaaaga 1980
aggactgaac tccatcgcca tcttcttccc ttaactccaa gaacttgga taagagtgtg 2040
agagagactg atggggtcgc tctttggggg aaacgggttc cttcccctgc acctggcctg 2100
ggccacacct gagcgctgtg gactgtcctg aggagccctg aggacctctc agcatagcct 2160
gcctgatccc tgaacccctg gccagctctg aggggaggca cctccaggca ggccaggctg 2220
cctcggactc catggctaag accacagacg ggacacaga ctggagaaaa cccctcccac 2280
ggtgccccaa caccagtcac ctctctccc tgggtgcctct gtgcacagtg gcttcttttc 2340
gttttcgttt tgaagacgtg gactcctctt ggtgggtgtg gccagcacac caagtggctg 2400
ggtgcctctc caggtgggtt agagatggag tttgctgttg aggtgggtga gatggtgacc 2460
tggttatccc ctgcctcctg ccaccccttc ctcccatac tccactctga ttcacctctt 2520
cctctggttc ctttcatctc tctacctcca cctgcattt tctcttctg ctggcccttc 2580
agtctgtctc accaaggggc tcttgaaccc cttattaagg cccagatga cccagtcac 2640
tctctcttag ggcagaagac tagaggccag ggcagcaagg gacctgctca tcatattcca 2700
accagccac gactgccatg taagggtgtg cagggtgtgt actgcacaag gacattgtat 2760
gcaggagca ctgttcacat catagataaa gctgatttgt atatttatta tgacaatttc 2820
tggcagatgt aggtaaagag gaaaaggatc cttttcctaa ttcacacaaa gactccttgt 2880
ggactggctg tgcccctgat gcagcctgtg gctggagtgg ccaaatagga gggagactgt 2940
ggtaggggca gggaggcaac actgctgtcc acatgacctc catttcccaa agtcctctgc 3000
tccagcaact gcccttcag gtgggtgtgg gacacctggg agaaggtctc caagggaggg 3060
tgcagccctc ttgccgcac ccctccctgc ttgcacctt ccccatcttt gatccttctg 3120
agctccacct ctggtggctc ctctaggaa accagctcgt gggctgggaa tgggggagag 3180
aagggaaaag atccccaaga cccctgggg tgggatctga gctccacct ccttcccac 3240
ctactgcact tcccccttc ccgccttcca aaacctgctt ccttcagttt gtaaagtcgg 3300
tgattatatt tttgggggt ttccttttat tttttaaatg taaaatttat ttatattccg 3360
tatttaaagt tgt 3373

```

<210> 19

<211> 241

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Ser Leu Cys Cys Tyr Leu Arg

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

Ala

<210> 20

<211> 3007

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

5 <223> PDGF-C

<400> 20

```

gcccgagag cgcacatctat tggcagcttt gttattgatc agaaactgct cgccgcccagac      60
ttggcttcca gtctggctgc gggcaaccct tgagttttcg cctctgtcct gtcccccgaa      120
ctgacagggtg ctcccagcaa cttgctgggg acttctcgcc gctccccgcg gtccccaccc      180
cctcattcct ccctcgccct cccccccacc cccaccactt cgccacagct caggattttgt      240
ttaaaccttg ggaaactggt tcagggtccag gttttgcttt gatccttttc aaaaactgga      300
gacacagaag agggctctag gaaaaagttt tggatgggat tatgtggaaa ctaccctgcg      360
attctctgct gccagagcag gctcggcgct tccacccagc tgcagccttc ccctggcggt      420
ggtgaaagag actcgggagt cgctgcttcc aaagtgcccg ccgtgagtga gctctcacc      480
cagtcagcca aatgagcctc ttccgggcttc tctgctgac atctgccctg gccggccaga      540
gacaggggac tcaggcggaa tccaacctga gtagtaaatt ccagttttcc agcaacaagg      600
aacagaacgg agtacaagat cctcagcatg agagaattat tactgtgtct actaatggaa      660
gtattcacag cccaaggttt cctcactact atccaagaaa tacgggtcttg gtatggagat      720
tagtagcagt agaggaaaat gtatggatac aacttacgtt tgatgaaaga tttgggcttg      780
aagaccaga agatgacata tgcaagtatg atttttaga agttgaggaa ccagtgatg      840
gaactatatt agggcgctgg tgtggttctg gtactgtacc aggaaaacag atttctaaag      900
gaaatcaaat taggataaga tttgtatctg atgaatatat tccttctgaa ccagggttct      960
gcatccacta caacattgtc atgccacaat tcacagaagc tgtgagtcct tcagtgtctac     1020
ccccttcagc tttgccactg gacctgctta ataatgctat aactgccttt agtaccttgg     1080
aagaccttat tcgatatctt gaaccagaga gatggcagtt ggacttagaa gatctatata     1140
ggccaacttg gcaacttctt ggcaaggctt ttgttttttg aagaaaatcc agagtgggtg     1200
atctgaacct tctaacagag gaggtaagat tatacagctg cacacctcgt aacttctcag     1260
tgtccataag ggaagaacta aagagaaccg ataccatttt ctggccaggt tgtctcctgg     1320
ttaaacgctg tgggtgggaac tgtgcctgtt gtctccacaa ttgcaatgaa tgtcaatgtg     1380
tccaagcaa agttactaaa aaataccacg aggtccttca gttgagacca aagaccggtg     1440
tcaggggatt gcacaaatca ctcaccgacg tggccctgga gcaccatgag gagtgtgact     1500
gtgtgtgcag agggagcaca ggaggatagc cgcacacca ccagcagctc ttgcccagag     1560

```

```

ctgtgcagtg cagtggctga ttctattaga gaacgtatgc gttatctcca tccttaatct 1620
cagttgtttg cttcaaggac ctttcatctt caggatttac agtgcattct gaaagaggag 1680
acatcaaaca gaattaggag ttgtgcaaca gctcttttga gaggaggcct aaaggacagg 1740
agaaaaggtc ttcaatcgtg gaaagaaaat taaatgttgt attaaataga tcaccagcta 1800
gtttcagagt taccatgtac gtattccact agctgggttc tgtatttcag ttctttcgat 1860
acggcttagg gtaatgtcag tacaggaaaa aaactgtgca agtgagcacc tgattccggt 1920
gccttgctta actctaaagc tccatgtcct gggcctaaaa tcgtataaaa tctggatttt 1980
tttttttttt tttgctcata ttcacatag taaaccagaa cattctatgt actacaaacc 2040
tggtttttta aaaggaacta tgttgctatg aattaaactt gtgtcgtgct gataggacag 2100
actggatttt tcatatttct tattaataatt tctgccattt agaagaagag aactacattc 2160
atggttttga agagataaac ctgaaaagaa gagtggcctt atcttcactt tatcgataag 2220
tcagtttatt tgtttcattg tgtacatttt tatattctcc ttttgacatt ataactgttg 2280
gcttttctaa tcttggttaa tatacttatt ttaccaaaag gtatttaata ttctttttta 2340
tgacaactta gatcaactat ttttagcttg gtaaattttt ctaaacacaa ttgttatagc 2400
cagaggaaca aagatgatat aaaatattgt tgctctgaca aaaatacatg tatttcattc 2460
tcgtatggtg ctagagttag attaatctgc attttaaaaa actgaattgg aatagaattg 2520
gtaagttgca aagacttttt gaaaataatt aaattatcat atcttcatt cctgttattg 2580
gagatgaaaa taaaaagcaa cttatgaaag tagacattca gatccagcca ttactaacct 2640
attccttttt tggggaaatc tgagcctagc tcagaaaaac ataaagcacc ttgaaaaaga 2700
cttggcagct tcctgataaa gcgtgctgtg ctgtgcagta ggaacacatc ctattttattg 2760
tgatgttggt gttttattat cttaaactct gttccataca cttgtataaa tacatggata 2820
tttttatgta cagaagtatg tctcttaacc agttcactta ttgtactctg gcaattttaa 2880
agaaaatcag taaaatattt tgcttgtaaa atgcttaata tcgtgcctag gttatgtggt 2940
gactatttga atcaaaaatg tattgaatca tcaaataaaa gaatgtggct attttgggga 3000
gaaaatt 3007

```

<210> 21
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221>
 <223> PDGF-C

<400> 21

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

Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys Arg Thr Asp Thr Ile Phe Trp Pro
 260 265 270

Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg Cys Gly Gly Asn Cys Ala Cys Cys Leu
 275 280 285

His Asn Cys Asn Glu Cys Gln Cys Val Pro Ser Lys Val Thr Lys Lys
 290 295 300

Tyr His Glu Val Leu Gln Leu Arg Pro Lys Thr Gly Val Arg Gly Leu
 305 310 315 320

His Lys Ser Leu Thr Asp Val Ala Leu Glu His His Glu Glu Cys Asp
 325 330 335

Cys Val Cys Arg Gly Ser Thr Gly Gly
 340 345

<210> 22

<211> 2253

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

10 <223> PDGF-D

<400> 22

```

cgctcggaaa gttcagcatg caggaagttt ggggagagct cggcgattag cacagcgacc      60
cgggccagcg cagggcgagc gcaggcggcg agagcgcagg gcggcgcggc gtcgggtccc      120
ggagcagaa cccgcttttt cttggagcga cgctgtctct agtcgctgat cccaaatgca      180
ccggctcatc tttgtctaca ctctaactcg cgcaaacttt tgcagctgtc gggacacttc      240
tgcaaccccg cagagcgcac ccatcaaagc tttgcgcaac gccaacctca ggcgagatga      300
gagcaatcac ctacagactc tgtaccgaag agatgagacc atccaggtga aaggaaacgg      360
ctacgtgcag agtcctagat tcccgaacag ctaccccagg aacctgctcc tgacatggcg      420
gcttcactct caggagaata cacggatata gctagtgttt gacaatcagt ttggattaga      480
ggaagcagaa aatgatattc gtaggtatga ttttgtggaa gttgaagata tatcogaaac      540
cagtaccatt attagaggac gatggtgtgg acacaaggaa gttcctccaa ggataaaatc      600
aagaacgaac caaattaaaa tcacattcaa gtccgatgac tactttgtgg ctaaacctgg      660
attcaagatt tattattctt tgctggaaga tttccaaccc gcagcagctt cagagaccaa      720
ctgggaatct gtcacaagct ctatttcagg ggtatcctat aactctccat cagtaacgga      780
tcccactctg attgcggatg ctctggacaa aaaaattgca gaatttgata cagtgggaaga      840

```

```

tctgctcaag tacttcaatc cagagtcattg gcaagaagat cttgagaata tgtatctgga      900
caccctctgg tatcgaggca ggtcatacca tgacccggaag tcaaaagttg acctggatag      960
gctcaatgat gatgccaagc gttacagttg cactcccagg aattactcgg tcaatataag     1020
agaagagctg aagttggcca atgtggtctt ctttccacgt tgccctctcg tgcagcgctg     1080
tggaggaaaat tgtggctgtg gaactgtcaa ctggagggtcc tgcacatgca attcaggga      1140
aaccgtgaaa aagtatcatg aggtattaca gtttgagcct ggccacatca agaggagggg     1200
tagagctaag accatggctc tagttgacat ccagttggat caccatgaac gatgcgattg     1260
tatctgcagc tcaagaccac ctogataaga gaatgtgcac atccttacat taagcctgaa     1320
agaaccttta gtttaaggag ggtgagataa gagacctttt tcctaccagc aaccaaactt     1380
actactagcc tgcaatgcaa tgaacacaag tggttgctga gtctcagcct tgctttgtta     1440
atgccatggc aagtagaaag gtatatcatc aacttctata cctaagaata taggattgca     1500
tttaataata gtgtttgagg ttatatatgc acaaacacac acagaaatat attcatgtct     1560
atgtgtatat agatcaaatg ttttttttgg tatatataac caggtaacac agagcttaca     1620
tatgtttgag ttagactctt aaaatccttt gccaaaataa gggatgggtc aatatatgaa     1680
acatgtcttt agaaaattta ggagataaat ttatttttaa attttgaaac acaaaacaat     1740
tttgaatctt gctctcttaa agaaagcatc ttgtatatta aaaatcaaaa gatgaggctt     1800
tcttacatat acatcttagt tgattattaa aaaaggaaaa aggtttccag agaaaaggcc     1860
aatacctaag cattttttcc atgagaagca ctgcatactt acctatgtgg actgtaataa     1920
cctgtotcca aaaccatgcc ataataatat aagtgtctta gaaattaaat catttgtgtt     1980
tttatgcatt ttgctgagge atccttatlc atttaacacc tatctcaaaa acttacttag     2040
aagggttttt attatagtc taaaaagac aatgtataag ctgtaacaga attttgaatt     2100
gtttttcttt gcaaaacccc tccacaaaag caaatccttt caagaatggc atgggcatc     2160
tgtatgaacc ttccagatg gtgttcagtg aaagatgtgg gtagttgaga acttaaaaag     2220
tgaacattga aacatcgacg taactggaaa ccg                                     2253

```

```

<210> 23
<211> 370
5 <212> PRT
  <213> Homo sapiens

```

```

10 <220>
    <221>
    <223> PDGF-D

```

```

<400> 23
Met His Arg Leu Ile Phe Val Tyr Thr Leu Ile Cys Ala Asn Phe Cys
 1             5             10             15

```

Ser Cys Arg Asp Thr Ser Ala Thr Pro Gln Ser Ala Ser Ile Lys Ala
 20 25 30

Leu Arg Asn Ala Asn Leu Arg Arg Asp Glu Ser Asn His Leu Thr Asp
 35 40 45

Leu Tyr Arg Arg Asp Glu Thr Ile Gln Val Lys Gly Asn Gly Tyr Val
 50 55 60

Gln Ser Pro Arg Phe Pro Asn Ser Tyr Pro Arg Asn Leu Leu Leu Thr
 65 70 75 80

Trp Arg Leu His Ser Gln Glu Asn Thr Arg Ile Gln Leu Val Phe Asp
 85 90 95

Asn Gln Phe Gly Leu Glu Glu Ala Glu Asn Asp Ile Cys Arg Tyr Asp
 100 105 110

Phe Val Glu Val Glu Asp Ile Ser Glu Thr Ser Thr Ile Ile Arg Gly
 115 120 125

Arg Trp Cys Gly His Lys Glu Val Pro Pro Arg Ile Lys Ser Arg Thr
 130 135 140

Asn Gln Ile Lys Ile Thr Phe Lys Ser Asp Asp Tyr Phe Val Ala Lys
 145 150 155 160

Pro Gly Phe Lys Ile Tyr Tyr Ser Leu Leu Glu Asp Phe Gln Pro Ala
 165 170 175

Ala Ala Ser Glu Thr Asn Trp Glu Ser Val Thr Ser Ser Ile Ser Gly
 180 185 190

Val Ser Tyr Asn Ser Pro Ser Val Thr Asp Pro Thr Leu Ile Ala Asp
 195 200 205

Ala Leu Asp Lys Lys Ile Ala Glu Phe Asp Thr Val Glu Asp Leu Leu
 210 215 220

Lys Tyr Phe Asn Pro Glu Ser Trp Gln Glu Asp Leu Glu Asn Met Tyr
 225 230 235 240

Leu Asp Thr Pro Arg Tyr Arg Gly Arg Ser Tyr His Asp Arg Lys Ser
 245 250 255

Lys Val Asp Leu Asp Arg Leu Asn Asp Asp Ala Lys Arg Tyr Ser Cys
 260 265 270

Thr Pro Arg Asn Tyr Ser Val Asn Ile Arg Glu Glu Leu Lys Leu Ala
275 280 285

Asn Val Val Phe Phe Pro Arg Cys Leu Leu Val Gln Arg Cys Gly Gly
290 295 300

Asn Cys Gly Cys Gly Thr Val Asn Trp Arg Ser Cys Thr Cys Asn Ser
305 310 315 320

Gly Lys Thr Val Lys Lys Tyr His Glu Val Leu Gln Phe Glu Pro Gly
325 330 335

His Ile Lys Arg Arg Gly Arg Ala Lys Thr Met Ala Leu Val Asp Ile
340 345 350

Gln Leu Asp His His Glu Arg Cys Asp Cys Ile Cys Ser Ser Arg Pro
355 360 365

Pro Arg
370

<210> 24
<211> 1830
5 <212> ADN
<213> Virus ORF

<220>
<221>
10 <223> VEGF-E

<400> 24

cgccacgcg	gcgcgaact	gcgcgtcgc	gcgcgtggcg	accgcgtga	cggcgcggt	60
gcccgcgagc	cggcacggcc	tcgoggaggg	cggcacgccg	cgtggagcg	tgctgctggc	120
ggtggcgcg	gtggcggtgc	tcggcgtggt	ggcaatttcg	ctgctgcgcc	gcgcgctaag	180
aatacggttt	agatactcaa	agtctatcca	gacacttaga	gtgtaacttt	gagtaaaaaa	240
tgtaaatact	aacgccaaaa	tttcgatagt	tgtaagcaa	tatataacat	ttttaaaacg	300
tcatcaccag	catgaagtta	acagctacgt	tacaagttgt	tggtgcattg	ttaatatgta	360
tgtataattt	gccagaatgc	gtgtctcaga	gtaatgattc	acctccttca	accaatgact	420
ggatgcgtac	actagacaaa	agtggttgta	aacctagaga	tactgttggt	tatttgggag	480
aagaatatcc	agaaagcact	aacctacaat	ataatccccg	gtgcgtaact	gttaaacgat	540
gcagtgggtg	ctgtaacggt	gacggtcaaa	tatgtacagc	ggttgaaaca	agaaatacaa	600
ctgtaacagt	ttcagtaacc	ggcgtgtcta	gttcgtctgg	tactaatagt	ggtgtatcta	660
ctaaccctca	aagaataagt	gttacagaac	acacaaagtg	cgattgtatt	ggtagaacaa	720
cgacaacacc	tacgaccact	agggaaacct	gacgataact	aataacaaaa	aatgtttatt	780
tttgtaaata	cttaattatt	acacacttta	caataatctc	aaaaataaat	tgcggtccccg	840
gacggctgca	gctggtgacg	ctgctgtgtc	acacaactgcg	tattcgattc	aagttcacta	900
acgccactaa	actagttgtg	cgtgtccgag	tgtaaacgt	acgtcaaact	aacatcttac	960
ctgtccgtga	caagaactaa	aacttgaacc	acatatTTTT	aaagtatatt	taacaaaatc	1020
actcacactc	acacaatcat	aaacaccaca	accacaacca	aacacgcgtg	agaattaata	1080
ttcttactta	tcgtaacac	tctatgtgt	acatcaacgc	atcagagcag	tctgagtctg	1140
actaatggcg	gcaaacggga	acgcaggcgc	gacataatca	ctgagaatct	ccgcagcaac	1200
cgtcgaagga	catctctagc	gctaacgggt	gtttgtcatt	ccccgtgtg	ttcatctcac	1260
acgacattgt	gaccgtcgca	aagcacacat	tcaaagtgcc	gcattgtggaa	gaattcaccg	1320
tcgagacaca	caccataatt	aaacaagatc	agtgcataag	agagattagc	attctacagc	1380
acaccacgtg	cgaatacggg	cctcgtaatt	gtttagacta	gaacacctct	ggtctaaaca	1440
acatgtccga	tcttagaaca	gagtttatga	cgcataatgta	actgtgttct	ttatgtagaa	1500
gttatctttt	atgtcaactc	cttgtcttag	atgagttata	catgacatga	tgtatgtgtc	1560
gcccgcggcg	gcgcggggcg	ctcggcggcg	ggcgtgctgc	gcgcggcggg	cccgcgggtg	1620
cggcggctgg	cgcggcgctg	cggccgcggg	cgcgcggcgg	ggtagcggcc	cgcgcggcgg	1680
ggcgcggcgg	gcagcccttg	ccccggacca	ggcgcacagg	agcaaagtga	aaaaggaccg	1740
cctagcagtc	gagaccctcc	cgcgcgagcc	gcgacacccc	acaccgcct	tcaccgcgc	1800
agacgccaac	accacagcca	acaagcatgc				1830

<210> 25
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> Virus ORF
 5
 <220>
 <221>
 <223> VEGF-E
 10 <400> 25
 Met Lys Leu Thr Ala Thr Leu Gln Val Val Val Ala Leu Leu Ile Cys
 1 5 10 15
 Met Tyr Asn Leu Pro Glu Cys Val Ser Gln Ser Asn Asp Ser Pro Pro
 20 25 30
 Ser Thr Asn Asp Trp Met Arg Thr Leu Asp Lys Ser Gly Cys Lys Pro
 35 40 45
 Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Pro Glu Ser Thr Asn
 50 55 60
 Leu Gln Tyr Asn Pro Arg Cys Val Thr Val Lys Arg Cys Ser Gly Cys
 65 70 75 80
 Cys Asn Gly Asp Gly Gln Ile Cys Thr Ala Val Glu Thr Arg Asn Thr
 85 90 95
 Thr Val Thr Val Ser Val Thr Gly Val Ser Ser Ser Ser Gly Thr Asn
 100 105 110
 Ser Gly Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Ile Ser Val Thr Glu His Thr
 115 120 125
 Lys Cys Asp Cys Ile Gly Arg Thr Thr Thr Thr Pro Thr Thr Thr Arg
 130 135 140
 Glu Pro Arg Arg
 145
 15 <210> 26
 <211> 1251
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221>
 20 <223> CAC
 <400> 26

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gacgcggccc aggatccgtt cgagtcggga ctcgacctct cggacgcgga gcccgcgcg 120
ggcgaggcca cggttatgc aagcaaagat ctggaggagc agttacggtc tgtgtccagt 180
gtagatgaac tcatgactgt actctaccca gaatattgga aaatgtacaa gtgtcagcta 240
aggaaaggag gctggcaaca taacagagaa caggccaacc tcaactcaag gacagaagag 300
actataaaat ttgctgcagg gcagaatcat cacgaagtgg tgaaattcat ggatgtctat 360
cagcgcagct actgccatcc gatcgagaca ctggtggaca tcttccagga atacctgat 420
gagatcgagt acatcttcaa gccatcctgc gtgcccctga tgagatgtgg gggttgctgc 480
aatgacgaag ggctggagtg cgttcccacc gaggagtcca acatcaccat gcagattatg 540
agaattaaac ctcaccaagg gcagcacatc ggagagatga gctttctcca gcataacaaa 600
tgtgaatgta gaccaaagaa agatgtttac agacaagttc attccattat tagacgttcc 660
ctgccagcaa cactaccaca gtgtcaggca gcgaacaaga cctgccccac caattacatg 720

tggaataatc acatctgcag atgcctggct caggaagatt. ttatgttttc ctccgatgct 780
ggagatgact caacagatgg attccatgac atctgtggac caaacaagga gctggatgaa 840
gagacctgtc agtgtgtctg cagagcgggg cttcggcctg ccagctgtgg accccacaaa 900
gaactagaca gaaactcatg ccagtgtgtc tgtaaaaaca aactcttccc cagccaatgt 960
ggggccaacc gagaatttga tgaaaacaca tgccagtgtg tatgtaaaag aacctgcccc 1020
agaaatcaac ccctaaatcc tggaaaatgt gcctgtgaat gtacagaaag tccacagaaa 1080
tgcttggtta aaggaaagaa gttccaccac caaacatgca gctgttacag acggccatgt 1140
acgaaccgcc agaaggcttg tgagccagga ttttcatata gtgaagaagt gtgtcgttgt 1200
gtcccttcat attggaaaag accacaaatg agccatcacc atcaccatca c 1251

<210> 27
<211> 418
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221>
10 <223> CAC

<400> 27

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Asp Pro Phe Glu Ser Gly Leu Asp
20 25 30

Leu Ser Asp Ala Glu Pro Asp Ala Gly Glu Ala Thr Ala Tyr Ala Ser
35 40 45

Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu Arg Ser Val Ser Ser Val Asp Glu Leu
50 55 60

Met Thr Val Leu Tyr Pro Glu Tyr Trp Lys Met Tyr Lys Cys Gln Leu
65 70 75 80

Arg Lys Gly Gly Trp Gln His Asn Arg Glu Gln Ala Asn Leu Asn Ser
85 90 95

Arg Thr Glu Glu Thr Ile Lys Phe Ala Ala Gly Gln Asn His His Glu
100 105 110

Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile
115 120 125

Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr
 130 135 140
 Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys
 145 150 155 160
 Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr
 165 170 175
 Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu
 180 185 190
 Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp
 195 200 205
 Val Tyr Arg Gln Val His Ser Ile Ile Arg Arg Ser Leu Pro Ala Thr
 210 215 220
 Leu Pro Gln Cys Gln Ala Ala Asn Lys Thr Cys Pro Thr Asn Tyr Met
 225 230 235 240
 Trp Asn Asn His Ile Cys Arg Cys Leu Ala Gln Glu Asp Phe Met Phe
 245 250 255
 Ser Ser Asp Ala Gly Asp Asp Ser Thr Asp Gly Phe His Asp Ile Cys
 260 265 270
 Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu Glu Thr Cys Gln Cys Val Cys Arg
 275 280 285
 Ala Gly Leu Arg Pro Ala Ser Cys Gly Pro His Lys Glu Leu Asp Arg
 290 295 300
 Asn Ser Cys Gln Cys Val Cys Lys Asn Lys Leu Phe Pro Ser Gln Cys
 305 310 315 320
 Gly Ala Asn Arg Glu Phe Asp Glu Asn Thr Cys Gln Cys Val Cys Lys
 325 330 335
 Arg Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro Leu Asn Pro Gly Lys Cys Ala Cys
 340 345 350
 Glu Cys Thr Glu Ser Pro Gln Lys Cys Leu Leu Lys Gly Lys Lys Phe
 355 360 365
 His His Gln Thr Cys Ser Cys Tyr Arg Arg Pro Cys Thr Asn Arg Gln
 370 375 380

Lys Ala Cys Glu Pro Gly Phe Ser Tyr Ser Glu Glu Val Cys Arg Cys
385 390 395 400

Val Pro Ser Tyr Trp Lys Arg Pro Gln Met Ser His His His His His
405 410 415

His Lys

5 <210> 28
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador sintético

<400> 28
gcggatccgt tcgagtcggg actcgacctc tcggac 36

15 <210> 29
<211> 68
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador sintético

<400> 29
cttttagtgt ttcaatgtca tagaaagttg cagcaaattt tatagtctct tctgtccttg 60
agttgagg 68

25 <210> 30
<211> 76
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador sintético

<400> 30
ggacagaaga gactataaaa ttgctgcaa ctttctatga cattgaaaca ctaaaagtta 60
tagatgaaga atggca 76

35 <210> 31
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador sintético

<400> 31
gcggatctc aaggattctt tcggctgtgg ggcc 34

45 <210> 32
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <210> 33
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 32
 5 gcggatccgt ccagtaatga acatggacca gtgaggcgat catc 44

 <210> 33
 <211> 64
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético

 15 <400> 33
 gcctgacact gtggtagtgt tgctggcagg gatcttctga taattgagta tggatggcgg 60
 gggg 64

 <210> 34
 <211> 56
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético
 25
 <400> 34
 gccatccata ctcaattatc agaagatccc tgccagcaac actaccacag tgtcag 56

 <210> 35
 <211> 49
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético
 35
 <400> 35
 gcggatcctt agctcatttg tggcttttc,caatatgaag ggacacaac 49

 40 <210> 36
 <211> 1110
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 45 <220>
 <221>
 <223> Construcción de CDD

 <400> 36

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60

gacgcggccc aggatccgtt cgagtccgga ctgcacctct cggacgcgga gcccgcgcg 120
 ggcgaggcca cggcttatgc aagcaaagat ctggaggagc agttacggtc tgtgtccagt 180
 gtagatgaac tcatgactgt actctaccca gaatattgga aaatgtacaa gtgtcagcta 240
 aggaaaggag gctggcaaca taacagagaa caggccaacc tcaactcaag gacagaagag 300
 actataaaaat ttgctgcaac tttctatgac attgaaacac taaaagttat agatgaagaa 360
 tggcaaagaa ctcaagtgcag ccctagagaa acgtgctgtg aggtggccag tgagctgggg 420
 aagagtacca acacattctt caagccccct tgtgtgaacg tgttcogatg tgggtggtgt 480
 tgcaatgaag agagccttat ctgtatgaac accagcacct cgtacatttc caaacagctc 540
 tttgagatat cagtgccttt gacatcagta cctgaattag tgctgttaa agttgccaat 600
 catacagggtt gtaagtgtt gccaacagcc ccccgccatc catactcaat tatcagaaga 660
 tccatocaga tccctgaaga agatcgctgt tcccattcca agaaactctg tctattgac 720
 atgctatggg atagcaacaa atgtaaatgt gttttgcagg aggaaaatcc acttgctgga 780
 acagaagacc actctcatct ccaggaacca gctctctgtg ggccacacat gatgtttgac 840
 gaagatcgtt gcgagtgtgt ctgtaaaaca ccatgtccca aagatctaata ccagcacccc 900
 aaaaactgca gttgctttga gtgcaaagaa agtctggaga cctgctgcca gaagcacaag 960
 ctatttcacc cagacacctg cagctgtgag gacagatgcc cctttcatac cagaccatgt 1020
 gcaagtggca aaacagcatg tgcaaagcat tgccgctttc caaaggagaa aagggtgcc 1080
 caggggcccc acagccgaaa gaatccttga 1110

<210> 37

<211> 369

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

10 <223> Construcción de CDD

<400> 37

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Asp Pro Phe Glu Ser Gly Leu Asp
 20 25 30

Leu Ser Asp Ala Glu Pro Asp Ala Gly Glu Ala Thr Ala Tyr Ala Ser
 35 40 45

Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu Arg Ser Val Ser Ser Val Asp Glu Leu
 50 55 60

Met Thr Val Leu Tyr Pro Glu Tyr Trp Lys Met Tyr Lys Cys Gln Leu
 65 70 75 80

Arg Lys Gly Gly Trp Gln His Asn Arg Glu Gln Ala Asn Leu Asn Ser
 85 90 95

Arg Thr Glu Glu Thr Ile Lys Phe Ala Ala Thr Phe Tyr Asp Ile Glu
 100 105 110

Thr Leu Lys Val Ile Asp Glu Glu Trp Gln Arg Thr Gln Cys Ser Pro
 115 120 125

Arg Glu Thr Cys Val Glu Val Ala Ser Glu Leu Gly Lys Ser Thr Asn
 130 135 140

Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe Arg Cys Gly Gly Cys
 145 150 155 160

Cys Asn Glu Glu Ser Leu Ile Cys Met Asn Thr Ser Thr Ser Tyr Ile
 165 170 175

Ser Lys Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro Glu
 180 185 190

Leu Val Pro Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu Pro
 195 200 205

Thr Ala Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln Ile
 210 215 220

Pro Glu Glu Asp Arg Cys Ser His Ser Lys Lys Leu Cys Pro Ile Asp
 225 230 235 240

Met Leu Trp Asp Ser Asn Lys Cys Lys Cys Val Leu Gln Glu Glu Asn
 245 250 255

Pro Leu Ala Gly Thr Glu Asp His Ser His Leu Gln Glu Pro Ala Leu
 260 265 270

Cys Gly Pro His Met Met Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val Cys
 275 280 285

Lys Thr Pro Cys Pro Lys Asp Leu Ile Gln His Pro Lys Asn Cys Ser
 290 295 300

Cys Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Thr Cys Cys Gln Lys His Lys
 305 310 315 320

Leu Phe His Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu Asp Arg Cys Pro Phe His
 325 330 335

Thr Arg Pro Cys Ala Ser Gly Lys Thr Ala Cys Ala Lys His Cys Arg
 340 345 350

Phe Pro Lys Glu Lys Arg Ala Ala Gln Gly Pro His Ser Arg Lys Asn
 355 360 365

<210> 38

<211> 1239

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

10 <223> Construcción de CDC

<400> 38

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacgcggccc aggatccggt cgagtcggga ctcgacctct cggacgcgga gcccgacgcg      120
ggcgaggcca cggttatgac aagcaaagat ctggaggagc agttacggtc tgtgtccagt      180
gtagatgaac tcatgactgt actctaccca gaatattgga aaatgtacaa gtgtcagcta      240
aggaaaggag gctggcaaca taacagagaa caggccaacc tcaactcaag gacagaagag      300
actataaaat ttgctgcaac tttctatgac attgaaacac taaaagttat agatgaagaa      360
tggcaaagaa ctcaagtgcag ccctagagaa acgtgcgtgg aggtggccag tgagctgggg      420
aagagtacca acacattctt caagccccct tgtgtgaacg tgttcgatg tgggtggctgt      480
tgcaatgaag agagccttat ctgtatgaac accagcacct cgtacatttc caaacagctc      540
tttgagatat cagtgccttt gacatcagta cctgaattag tgctgttaa agttgccaat      600
catacagggt gtaagtgcct gccaacagcc ccccgccatc catactcaat tatcagaaga      660
tccttgccag caacactacc acagtgtcag gcagcgaaca agacctgcc caccaattac      720
atgtggaata atcacatctg cagatgcctg gctcaggaag attttatgtt ttctcggat      780
gctggagatg actcaacaga tggattccat gacatctgtg gaccaaaca ggagctggat      840
gaagagacct gtcagtgtgt ctgcagagcg gggcttcggc ctgccagctg tggaccccac      900
aaagaactag acagaaactc atgccagtgt gtctgtaaaa acaaactctt cccagccaa      960
tgtggggcca accgagaatt tgatgaaaac acatgccagt gtgtatgtaa aagaacctgc     1020
cccagaaatc aaccctaaa tcctggaaaa tgtgcctgtg aatgtacaga aagtcacag     1080
aaatgcttgt taaaaggaaa gaagttccac caccaaacat gcagctgtta cagacggcca     1140
tgtacgaacc gccagaaggc ttgtgagcca ggattttcat atagtgaaga agtgtgtcgt     1200
tgtgtccctt catattggaa aagaccacaa atgagctaa                                1239

```

15

<210> 39

<211> 412
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221>
 <223> Construcción de CDC

<400> 39

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

10

Ser Lys Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr Ser Val Pro Glu
180 185 190

Leu Val Pro Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu Pro
195 200 205

Thr Ala Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Leu Pro Ala
210 215 220

Thr Leu Pro Gln Cys Gln Ala Ala Asn Lys Thr Cys Pro Thr Asn Tyr
225 230 235 240

Met Trp Asn Asn His Ile Cys Arg Cys Leu Ala Gln Glu Asp Phe Met
245 250 255

Phe Ser Ser Asp Ala Gly Asp Asp Ser Thr Asp Gly Phe His Asp Ile
260 265 270

Cys Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu Glu Thr Cys Gln Cys Val Cys
275 280 285

Arg Ala Gly Leu Arg Pro Ala Ser Cys Gly Pro His Lys Glu Leu Asp
290 295 300

Arg Asn Ser Cys Gln Cys Val Cys Lys Asn Lys Leu Phe Pro Ser Gln
305 310 315 320

Cys Gly Ala Asn Arg Glu Phe Asp Glu Asn Thr Cys Gln Cys Val Cys
325 330 335

Lys Arg Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro Leu Asn Pro Gly Lys Cys Ala
340 345 350

Cys Glu Cys Thr Glu Ser Pro Gln Lys Cys Leu Leu Lys Gly Lys Lys
355 360 365

Phe His His Gln Thr Cys Ser Cys Tyr Arg Arg Pro Cys Thr Asn Arg
370 375 380

Gln Lys Ala Cys Glu Pro Gly Phe Ser Tyr Ser Glu Glu Val Cys Arg
385 390 395 400

Cys Val Pro Ser Tyr Trp Lys Arg Pro Gln Met Ser
405 410

<210> 40

<211> 1209

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>
<221>
<223> Construcción de DDC

5 <400> 40
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggg 60
gacgcggccc aggatccgtc cagtaatgaa catggaaccag tgaagcgatc atctcagtc 120
acattggaac gatctgaaca gcagatcagg gctgcttcta gtttggagga actacttcga 180
attactcact ctgaggactg gaagctgtgg agatgcaggc tgaggctcaa aagttttacc 240
agtatggact ctgctcagc atcccatcgg tccactaggt ttgcggcaac tttctatgac 300
attgaaacac taaaagttat agatgaagaa tggcaaagaa ctcagtgcag ccctagagaa 360
acgtgcgtgg aggtggccag tgagctgggg aagagtacca acacattctt caagccccct 420
tgtgtgaacg tgttccgatg tggcggtgtg tgcaatgaag agagccttat ctgtatgaac 480
accagcacct cgtacatttc caaacagctc tttgagatat cagtgccttt gacatcagta 540
cctgaattag tgcctgttaa agttgccaat catacagggt gtaagtgcct gccaacagcc 600
ccccgccatc catactcaat tatcagaaga tccctgccag caactactacc acagtgtcag 660
gcagcgaaca agacctgccc caccaattac atgtggaata atcacatctg cagatgcctg 720
gctcaggaag attttatgtt ttctctggat gctggagatg actcaacaga tggattccat 780
gacatctgtg gaccaaaca ggagctggat gaagagacct gtcagtgtgt ctgcagagcg 840
gggcttcggc ctgccagctg tggacccac aaagaactag acagaaactc atgccagtgt 900
gtctgtaaaa acaaactctt cccagccaa tgtggggcca accgagaatt tgatgaaaa 960
acatgccagt gtgtatgtaa aagaacctgc ccagaaatc aaccctaaa tcctggaaaa 1020
tgtgcctgtg aatgtacaga aagtccacag aaatgcttgt taaaaggaaa gaagttccac 1080
caccaaacad gcagctgtta cagacggcca tgtacgaacc gccagaaggc ttgtgagcca 1140
ggattttcat atagtgaaga agtgtgtcgt tgtgtccctt catattggaa aagaccacaa 1200
atgagctaa 1209

<210> 41
<211> 402
10 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221>
15 <223> Construcción de DDC

<400> 41

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

Asp Gly Phe His Asp Ile Cys Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu Glu
260 265 270

Thr Cys Gln Cys Val Cys Arg Ala Gly Leu Arg Pro Ala Ser Cys Gly
275 280 285

Pro His Lys Glu Leu Asp Arg Asn Ser Cys Gln Cys Val Cys Lys Asn
290 295 300

Lys Leu Phe Pro Ser Gln Cys Gly Ala Asn Arg Glu Phe Asp Glu Asn
305 310 315 320

Thr Cys Gln Cys Val Cys Lys Arg Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro Leu
325 330 335

Asn Pro Gly Lys Cys Ala Cys Glu Cys Thr Glu Ser Pro Gln Lys Cys
340 345 350

Leu Leu Lys Gly Lys Lys Phe His His Gln Thr Cys Ser Cys Tyr Arg
355 360 365

Arg Pro Cys Thr Asn Arg Gln Lys Ala Cys Glu Pro Gly Phe Ser Tyr
370 375 380

Ser Glu Glu Val Cys Arg Cys Val Pro Ser Tyr Trp Lys Arg Pro Gln
385 390 395 400

Met Ser

<210> 42

<211> 170

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

10 <223> PIGF-2

<400> 42

Met Pro Val Met Arg Leu Phe Pro Cys Phe Leu Gln Leu Leu Ala Gly
1 5 10 15

Leu Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly
20 25 30

Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu
50 55 60

Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu
65 70 75 80

Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asp Leu His Cys Val Pro
85 90 95

Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly
100 105 110

Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys
115 120 125

Glu Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Arg Arg Pro
130 135 140

Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Asn Gln Arg Pro Thr Asp Cys
145 150 155 160

His Leu Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg Arg
165 170

<210> 43

<211> 221

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

10 <223> PIGF-3

<400> 43

Met Pro Val Met Arg Leu Phe Pro Cys Phe Leu Gln Leu Leu Ala Gly
1 5 10 15

Leu Ala Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly
20 25 30

Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly
35 40 45

Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu
50 55 60

Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu
65 70 75 80

Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro
85 90 95

Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly
100 105 110

Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys
115 120 125

Glu Cys Arg His Ser Pro Gly Arg Gln Ser Pro Asp Met Pro Gly Asp
130 135 140

Phe Arg Ala Asp Ala Pro Ser Phe Leu Pro Pro Arg Arg Ser Leu Pro
145 150 155 160

Met Leu Phe Arg Met Glu Trp Gly Cys Ala Leu Thr Gly Ser Gln Ser
165 170 175

Ala Val Trp Pro Ser Ser Pro Val Pro Glu Glu Ile Pro Arg Met His
180 185 190

Pro Gly Arg Asn Gly Lys Lys Gln Gln Arg Lys Pro Leu Arg Glu Lys
195 200 205

Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg Arg
210 215 220

<210> 44
<211> 188
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221>
<223> VEGF-B167

<400> 44

Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu
 1 5 10 15

Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
 20 25 30

Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
 35 40 45

Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
 50 55 60

Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
 65 70 75 80

Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
 85 90 95

Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
 100 105 110

Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
 115 120 125

Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Ser Pro Arg Pro Leu Cys Pro Arg
 130 135 140

Cys Thr Gln His His Gln Arg Pro Asp Pro Arg Thr Cys Arg Arg Arg
 145 150 155 160

Cys Arg Arg Arg Ser Phe Leu Arg Cys Gln Gly Arg Gly Leu Glu Leu
 165 170 175

Asn Pro Asp Thr Cys Arg Cys Arg Lys Leu Arg Arg
 180 185

5 <210> 45
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221>
 <223> VEGF-B186

<400> 45

Met Ser Pro Leu Leu Arg Arg Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu Gln Leu
1 . 5 10 15

Ala Pro Ala Gln Ala Pro Val Ser Gln Pro Asp Ala Pro Gly His Gln
20 25 30

Arg Lys Val Val Ser Trp Ile Asp Val Tyr Thr Arg Ala Thr Cys Gln
35 40 45

Pro Arg Glu Val Val Val Pro Leu Thr Val Glu Leu Met Gly Thr Val
50 55 60

Ala Lys Gln Leu Val Pro Ser Cys Val Thr Val Gln Arg Cys Gly Gly
65 70 75 80

Cys Cys Pro Asp Asp Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Gly Gln His Gln
85 90 95

Val Arg Met Gln Ile Leu Met Ile Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Leu Gly
100 105 110

Glu Met Ser Leu Glu Glu His Ser Gln Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys
115 120 125

Lys Asp Ser Ala Val Lys Pro Asp Arg Ala Ala Thr Pro His His Arg
130 135 140

Pro Gln Pro Arg Ser Val Pro Gly Trp Asp Ser Ala Pro Gly Ala Pro
145 150 155 160

Ser Pro Ala Asp Ile Thr His Pro Thr Pro Ala Pro Gly Pro Ser Ala
165 170 175

His Ala Ala Pro Ser Thr Thr Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Ala Ala
180 185 190

Ala Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser Ser Val Ala Lys Gly Gly Ala
195 200 205

<210> 46

<211> 71

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

10 <223> Propéptido del extremo N de VEGF-C

<400> 46

Phe Glu Ser Gly Leu Asp Leu Ser Asp Ala Glu Pro Asp Ala Gly Glu
1 5 10 15

Ala Thr Ala Tyr Ala Ser Lys Asp Leu Glu Glu Gln Leu Arg Ser Val
20 25 30

Ser Ser Val Asp Glu Leu Met Thr Val Leu Tyr Pro Glu Tyr Trp Lys
35 40 45

Met Tyr Lys Cys Gln Leu Arg Lys Gly Gly Trp Gln His Asn Arg Glu
50 55 60

Gln Ala Asn Leu Asn Ser Arg
65 70

<210> 47

<211> 192

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

10 <223> Propéptido del extremo C de VEGF-C

<400> 47

Ser Leu Pro Ala Thr Leu Pro Gln Cys Gln Ala Ala Asn Lys Thr Cys
1 5 10 15

Pro Thr Asn Tyr Met Trp Asn Asn His Ile Cys Arg Cys Leu Ala Gln
20 25 30

Glu Asp Phe Met Phe Ser Ser Asp Ala Gly Asp Asp Ser Thr Asp Gly
35 40 45

Phe His Asp Ile Cys Gly Pro Asn Lys Glu Leu Asp Glu Glu Thr Cys
50 55 60

Gln Cys Val Cys Arg Ala Gly Leu Arg Pro Ala Ser Cys Gly Pro His
65 70 75 80

Lys Glu Leu Asp Arg Asn Ser Cys Gln Cys Val Cys Lys Asn Lys Leu
85 90 95

Phe Pro Ser Gln Cys Gly Ala Asn Arg Glu Phe Asp Glu Asn Thr Cys
100 105 110

Gln Cys Val Cys Lys Arg Thr Cys Pro Arg Asn Gln Pro Leu Asn Pro
115 120 125

Gly Lys Cys Ala Cys Glu Cys Thr Glu Ser Pro Gln Lys Cys Leu Leu
130 135 140

Lys Gly Lys Lys Phe His His Gln Thr Cys Ser Cys Tyr Arg Arg Pro
145 150 155 160

Cys Thr Asn Arg Gln Lys Ala Cys Glu Pro Gly Phe Ser Tyr Ser Glu
165 170 175

Glu Val Cys Arg Cys Val Pro Ser Tyr Trp Lys Arg Pro Gln Met Ser
180 185 190

<210> 48

<211> 71

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

10 <223> Propéptido del extremo N de VEGF-D

<400> 48

Ser Ser Asn Glu His Gly Pro Val Lys Arg Ser Ser Gln Ser Thr Leu
1 5 10 15

Glu Arg Ser Glu Gln Gln Ile Arg Ala Ala Ser Ser Leu Glu Glu Leu
20 25 30

Leu Arg Ile Thr His Ser Glu Asp Trp Lys Leu Trp Arg Cys Arg Leu
35 40 45

Arg Leu Lys Ser Phe Thr Ser Met Asp Ser Arg Ser Ala Ser His Arg
50 55 60

Ser Thr Arg Phe Ala Ala Thr
65 70

<210> 49

<211> 153

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

10 <223> Propéptido del extremo C de VEGF-C

<400> 49

Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln Ile Pro Glu Glu Asp Arg Cys Ser His
1 5 10 15

Ser Lys Lys Leu Cys Pro Ile Asp Met Leu Trp Asp Ser Asn Lys Cys
20 25 30

Lys Cys Val Leu Gln Glu Glu Asn Pro Leu Ala Gly Thr Glu Asp His
35 40 45

Ser His Leu Gln Glu Pro Ala Leu Cys Gly Pro His Met Met Phe Asp
50 55 60

Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val Cys Lys Thr Pro Cys Pro Lys Asp Leu
65 70 75 80

Ile Gln His Pro Lys Asn Cys Ser Cys Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu
85 90 95

Glu Thr Cys Cys Gln Lys His Lys Leu Phe His Pro Asp Thr Cys Ser
 100 105 110

Cys Glu Asp Arg Cys Pro Phe His Thr Arg Pro Cys Ala Ser Gly Lys
 115 120 125

Thr Ala Cys Ala Lys His Cys Arg Phe Pro Lys Glu Lys Arg Ala Ala
 130 135 140

Gln Gly Pro His Ser Arg Lys Asn Pro
 145 150

<210> 50

<211> 258

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Leu Ser Thr Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg
 1 5 10 15

Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser
 20 25 30

Pro Pro Ser Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val
 35 40 45

Leu Ala Leu Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala
 50 55 60

Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr
 65 70 75 80

Arg Val Leu Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys
 85 90 95

Gln Ser Thr His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg
 100 105 110

Glu Ala Val Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu
 115 120 125

Leu Arg Leu Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys
 130 135 140

Tyr Ser Asn Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro
 145 150 155 160

Ser Asp Ser Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg
165 170 175

Gln Trp Leu Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala
180 185 190

His Cys Ser Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn
195 200 205

Gly Phe Thr Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met
210 215 220

Asn Arg Pro Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln
225 230 235 240

His Leu Gln Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys
245 250 255

Phe Ser

<210> 51
<211> 459
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221>
10 <223> VEGF109

<400> 51
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gacgcggccc aggatcctgg gcagaatcat cacgaagtgg tgaaattcat ggatgtctat 120
cagcgcagct actgccatcc gatcgagaca ctgggtggaca tcttccagga ataccctgat 180
gagatcgagt acatcttcaa gccatcctgc gtgccccctga tgagatgtgg gggttgctgc 240
aatgacgaag ggctggagtg cgttcccacc gaggagtcca acatcaccat gcagattatg 300
agaattaaac ctcaccaagg gcagcacatc ggagagatga gctttctcca gcataacaaa 360
tgtgaatgta gaccaaagaa agatttggtc ttccaacaaa aactcatctc agaagaggat 420
ctgaatagcg ccgtcgacca tcatcatcat catcattga 459

15 <210> 52
<211> 152
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <220>
<221>
<223> VEGF109

<400> 52

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Asp Pro Gly Gln Asn His His Glu
20 25 30

Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile
35 40 45

Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr
50 55 60

Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys
65 70 75 80

Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr
85 90 95

Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu
100 105 110

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

Leu Val Phe Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala
130 135 140

Val Asp His His His His His His
145 150

<210> 53

<211> 137

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

10 <223> Dominio CUB de PDGF-C

<400> 53

Glu Ser Asn Leu Ser Ser Lys Phe Gln Phe Ser Ser Asn Lys Glu Gln
1 5 10 15

Asn Gly Val Gln Asp Pro Gln His Glu Arg Ile Ile Thr Val Ser Thr
20 25 30

Asn Gly Ser Ile His Ser Pro Arg Phe Pro His Thr Tyr Pro Arg Asn
35 40 45

Thr Val Leu Val Trp Arg Leu Val Ala Val Glu Glu Asn Val Trp Ile
50 55 60

Gln Leu Thr Phe Asp Glu Arg Phe Gly Leu Glu Asp Pro Glu Asp Asp
65 70 75 80

Ile Cys Lys Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu Glu Pro Ser Asp Gly Thr
85 90 95

Ile Leu Gly Arg Trp Cys Gly Ser Gly Thr Val Pro Gly Lys Gln Ile
100 105 110

Ser Lys Gly Asn Gln Ile Arg Ile Arg Phe Val Ser Asp Glu Tyr Phe
115 120 125

Pro Ser Glu Pro Gly Phe Cys Ile His
130 135

<210> 54

<211> 819

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

10 <223> Dominio CUB de PDGF-D

<400> 54

atgcaccggc tcattcttgt ctacactcta atctgcgcaa acttttgag ctgtcgggac	60
acttttgcaa ccccgagag cgcattccatc aaagctttgc gcaacgcaa cctcaggcga	120
gatgagagca atcacctcac agacttgtag cgaagagatg agaccatcca ggtgaaagga	180
aacggctacg tgcagagtcc tagattcccc aacagctacc ccaggaacct gctcctgaca	240
tggcggttc actctcagga gaatacacgg atacagctag tgtttgacaa tcagtttgga	300
ttagaggaag cagaaaatga tatctgtagg tatgattttg tggaagttga agatatatcc	360
gaaaccagta ccattattag aggacgatgg tgtggacaca aggaagttcc tccaaggata	420
aaatcaagaa cgaaccaaat taaaatcaca ttcaagtccg atgactactt tgtggctaaa	480
cctggattca agatttatta ttctttgctg gaagatttcc aaccgcagc agcttcagag	540
accaactggg aatctgtcac aagctctatt tcaggggtat cctataactc tccatcagta	600
acggatccca ctctgattgc ggatgctctg gacaaaaaaaa ttgcagaatt tgatacagtg	660
gaagatctgc tcaagtactt caatccagag tcatggcaag aagatcttga gaatatgtat	720
ctggacaccc ctcggtatcg aggcaggcca taccatgacc ggaagtcaaa agttgacctg	780
gataggctca atgatgatgc caagcggtac agtgatcct	819

<210> 55
 <211> 273
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221>
 10 <223> Dominio CUB de PDGF-D

<400> 55

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

Val Ser Tyr Asn Ser Pro Ser Val Thr Asp Pro Thr Leu Ile Ala Asp
195 200 205

Ala Leu Asp Lys Lys Ile Ala Glu Phe Asp Thr Val Glu Asp Leu Leu
210 215 220

Lys Tyr Phe Asn Pro Glu Ser Trp Gln Glu Asp Leu Glu Asn Met Tyr
225 230 235 240

Leu Asp Thr Pro Arg Tyr Arg Gly Arg Ser Tyr His Asp Arg Lys Ser
245 250 255

Lys Val Asp Leu Asp Arg Leu Asn Asp Asp Ala Lys Arg Tyr Ser Asp
260 265 270

Pro

<210> 56
<211> 1209
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221>
10 <223> CUB271VEGF109

<400> 56

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacgcggccc aaggatcaac cccgcagagc gcatccatca aagctttgcg caacgccaac      120
ctcaggcgag atgagagcaa tcacctcaca gacttgtagc gaagagatga gaccatccag      180
gtgaaaggaa acgggtacgt gcagagtcct agattccoga acagctaccc caggaacctg      240
ctcctgacat ggcggcttca ctctcaggag aatacacgga tacagctagt gtttgacaat      300
cagtttggat tagaggaagc agaaaatgat atctgtaggt atgattttgt ggaagttgaa      360
gatatatccg aaaccagtac cattattaga ggacgatggt gtggacacaa ggaagttcct      420
ccaaggataa aatcaagaac gaaccaaatt aaaatcacat tcaagtccga tgactacttt      480
gtggctaaac ctggattcaa gatttattat tctttgctgg aagatttcca acccgagca      540
gcttcagaga ccaactggga atctgtcaca agctctatct caggggtatc ctataactct      600
ccatcagtaa cggatcccac tctgattgcy gatgctctgg acaaaaaaat tgcagaatct      660
gatacagtgg aagatctgct caagtacttc aatccagagt catggcaaga agatcttgag      720
aatatgtatc tggacacccc tcggtatcga ggcaggtcac accatgaccg gaagtcaaaa      780
gttgacctgg ataggctcaa tgatgatgcc aagcggtaca gtgatcctgg gcagaatcat      840

cacgaagtgg tgaaattcat ggatgtctat cagcgcagct actgccatcc gatcgagaca      900
ctggtggaca tcttcaggga ataccctgat gagatcgagt acatcttcaa gccatcctgc      960
gtgccccctga tgagatgtgg gggttgctgc aatgacgaag ggctggagtg cgttcccacc     1020
gaggagtcca acatcaccat gcagattatg agaattaaac ctcaccaagg gcagcacatc     1080
ggagagatga gctttctcca gcataacaaa tgtgaatgta gaccaaagaa agatttggtc     1140
ttcgaacaaa aactcatctc agaagaggat ctgaatagcg ccgtcgacca tcatcatcat     1200
catcattga                                     1209

```

<210> 57

<211> 402

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

10 <223> CUB271VEGF109

<400> 57

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

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

<212> ADN
<213> Homo sapiens

5 <220>
<221>
<223> CUB254VEGF109

<400> 58
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gacgcggccc aaggatcaac cccgcagagc gcatccatca aagctttgcy caacgcacaac 120
ctcaggcgag atgagagcaa tcacctcaca gacttgtacc gaagagatga gaccatccag 180
gtgaaaggaa acggctacgt gcagagtcct agattcccga acagctaccc caggaaacctg 240
ctcctgacat ggcggttca ctctcaggag aatacacgga tacagctagt gtttgacaat 300
cagtttggat tagaggaagc agaaaatgat atctgtaggt atgattttgt ggaagttgaa 360
gatatatccg aaaccagtac cattattaga ggacgatggg gtggacacaa ggaagttcct 420
ccaaggataa aatcaagaac gaaccaaatt aaaatcacat tcaagtccga tgactacttt 480
gtggctaaac ctggattcaa gatttattat tctttgctgg aagatttcca accgcgagca 540
gcttcagaga ccaactggga atctgtcaca agctctatct caggggtatc ctataactct 600
ccatcagtaa cggatccac tctgattgcy gatgctctgg acaaaaaaat tgcagaattt 660
gatacagtgg aagatctgct caagtacttc aatccagagt catggcaaga agatcttgag 720
aatatgtatc tggacacccc tcggtatcga ggcagggtcat accatgaccg gaatgatcct 780
gggcagaatc atcacgaagt ggtgaaattc atggatgtct atcagcgcag ctactgccat 840
ccgatcgaga cactgggtgga catcttccag gaataacctg atgagatcga gtacatcttc 900
aagccatcct gcgtgccct gatgagatgt gggggttgct gcaatgacga agggctggag 960
tgcgttccca ccgaggagtc caacatcacc atgcagatta tgagaattaa acctcaccaa 1020
gggcagcaca tcggagagat gagctttctc cagcataaca aatgtgaatg tagaccaaag 1080
aaagatttgg tcttcgaaca aaaactcatc tcagaagagg atctgaatag cgccgtcgac 1140
catcatcatc atcatcattg a 1161

10 <210> 59
<211> 386
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <220>
<221>
<223> CUB254VEGF109

20 <400> 59

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

Asn Met Tyr Leu Asp Thr Pro Arg Tyr Arg Gly Arg Ser Tyr His Asp
245 250 255

Arg Asn Asp Pro Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp
260 265 270

Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile
275 280 285

Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys
290 295 300

Val	Pro	Leu	Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Asn	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu
305					310					315					320

Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile
325 330 335

Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His
340 345 350

Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu Gln Lys
355 360 365

Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His
370 375 380

His His
385

<210> 60

<211> 1167

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

$\langle 220 \rangle$

$\langle 221 \rangle$

10 <223> CUB256VEGF109

<400> 60

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggg      60
gacgcggccc aaggatcaac cccgcagagc gcatccatca aagctttgcg caacgccaac      120
ctcaggcgag atgagagcaa tcacctcaca gacttgtagc gaagagatga gaccatccag      180
gtgaaaggaa acggctacgt gcagagtcct agattccccga acagctaccc caggaacctg      240
ctcctgacat ggcgggttca ctctcaggag aatacacgga tacagctagt gtttgacaat      300
cagtttggat tagaggaagc agaaaatgat atctgtaggt atgattttgt ggaagttgaa      360

gatatatccg aaaccagtac cattattaga ggacgatggg gtggacacaa ggaagttcct      420
ccaaggataa aatcaagaac gaaccaaatt aaaatcacat tcaagtccga tgactacttt      480
gtggctaaac ctggattcaa gatttattat tctttgctgg aagatttcca acccgagca      540
gcttcagaga ccaactggga atctgtcaca agctctatct caggggtatc ctataactct      600
ccatcagtaa cggatccac tctgattgcg gatgctctgg acaaaaaaat tgcagaattt      660
gatacagtgg aagatctgct caagtacttc aatccagagt catggcaaga agatcttgag      720
aatatgtatc tggacacccc tcggtatcga ggcaggtcac accatgaccg gaagtcaaat      780
gatcctgggc agaatcatca cgaagtgggt aaattcatgg atgtctatca gcgcagctac      840
tgccatccga tcgagacact ggtggacatc ttccaggaat accctgatga gatcgagtac      900
atcttcaagc catcctgcgt gccctgatg agatgtgggg gttgctgcaa tgacgaaggg      960
ctggagtgcg ttcccaccga ggagtccaac atcaccatgc agattatgag aattaaacct      1020
caccaagggc agcacatcgg agagatgagc tttctccagc ataacaaatg tgaatgtaga      1080
ccaaagaaag atttggctct cgaacaaaaa ctcatctcag aagaggatct gaatagcgcc      1140
gtcgaccatc atcatcatca tcattga                                          1167

```

<210> 61

<211> 388

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221>

10 <223> CUB256VEGF109

<400> 61

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

Val Phe Asp Asn Gln Phe Gly Leu Glu Glu Ala Glu Asn Asp Ile Cys
 100 105 110
 Arg Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu Asp Ile Ser Glu Thr Ser Thr Ile
 115 120 125
 Ile Arg Gly Arg Trp Cys Gly His Lys Glu Val Pro Pro Arg Ile Lys
 130 135 140
 Ser Arg Thr Asn Gln Ile Lys Ile Thr Phe Lys Ser Asp Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 Val Ala Lys Pro Gly Phe Lys Ile Tyr Tyr Ser Leu Leu Glu Asp Phe
 165 170 175
 Gln Pro Ala Ala Ala Ser Glu Thr Asn Trp Glu Ser Val Thr Ser Ser
 180 185 190
 Ile Ser Gly Val Ser Tyr Asn Ser Pro Ser Val Thr Asp Pro Thr Leu
 195 200 205
 Ile Ala Asp Ala Leu Asp Lys Lys Ile Ala Glu Phe Asp Thr Val Glu
 210 215 220
 Asp Leu Leu Lys Tyr Phe Asn Pro Glu Ser Trp Gln Glu Asp Leu Glu
 225 230 235 240
 Asn Met Tyr Leu Asp Thr Pro Arg Tyr Arg Gly Arg Ser Tyr His Asp
 245 250 255
 Arg Lys Ser Asn Asp Pro Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe
 260 265 270
 Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val
 275 280 285
 Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro
 290 295 300
 Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly
 305 310 315 320
 Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met
 325 330 335
 Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu
 340 345 350

Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Leu Val Phe Glu
355 360 365

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His
370 375 380

His His His His
385

<210> 62
<211> 515
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221>
10 <223> CUB+V5+His

<400> 62

```

ggtaccccg caccatgcac cggctcatct ttgtctacac tctaattctgc gcaaactttt      60
gcagctgtcg ggacacttct gcaaccccg agagcgcatc catcaaagct ttgcgcaacg      120
ccaacctcag gcgagatgag agcaatcacc tcacagactt gtaccgaaga gatgagacca      180
tccaggtgaa aggaaacggc tacgtgcaga gtcctagatt cccgaacagc taccacagga      240
acctgctcct gacatggcgg cttcactctc aggagaatac acggatacag ctagtgtttg      300
acaatcagtt tggattagag gaagcagaaa atgatattctg taggtatgat tttgtggaag      360
ttgaagatat atccgaaacc agtaccatta ttagaggacg atggtgtgga cacaaggaag      420
ttcctccaag gataaaatca agaacgaacc aaattaaaat cacattcaag tccgatgact      480
actttgtggc taaacctgga ttcaagattt attat                                     515

```

15 <210> 63
<211> 196
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <220>
<221>
<223> CUB+V5+His

25 <400> 63

Met His Arg Leu Ile Phe Val Tyr Thr Leu Ile Cys Ala Asn Phe Cys
1 5 10 15

Ser Cys Arg Asp Thr Ser Ala Thr Pro Gln Ser Ala Ser Ile Lys Ala
20 25 30

Leu Arg Asn Ala Asn Leu Arg Arg Asp Glu Ser Asn His Leu Thr Asp
35 40 45

Leu Tyr Arg Arg Asp Glu Thr Ile Gln Val Lys Gly Asn Gly Tyr Val
50 55 60

Gln Ser Pro Arg Phe Pro Asn Ser Tyr Pro Arg Asn Leu Leu Leu Thr
65 70 75 80

Trp Arg Leu His Ser Gln Glu Asn Thr Arg Ile Gln Leu Val Phe Asp
85 90 95

Asn Gln Phe Gly Leu Glu Glu Ala Glu Asn Asp Ile Cys Arg Tyr Asp
100 105 110

Phe Val Glu Val Glu Asp Ile Ser Glu Thr Ser Thr Ile Ile Arg Gly
115 120 125

Arg Trp Cys Gly His Lys Glu Val Pro Pro Arg Ile Lys Ser Arg Thr
130 135 140

Asn Gln Ile Lys Ile Thr Phe Lys Ser Asp Asp Tyr Phe Val Ala Lys
145 150 155 160

Pro Gly Phe Lys Ile Tyr Tyr Ser Arg Gly Pro Phe Glu Gly Lys Pro
165 170 175

Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His
180 185 190

His His His His
195

<210> 64
<211> 33
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético

10 <400> 64
gcggatccgg gccagaatca tcacgaagtg gtg 33

<210> 65
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 65
 gcggatccct aatctttctt tggctacat tcacat 36
 10

REIVINDICACIONES

1. Una construcción que comprende:

un dominio de unión a RTK, al menos un dominio flanqueante y al menos un enlace que conecta el dominio de unión a RTK con el al menos un dominio flanqueante;

- 5 en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

10 secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-A de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-B de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-C de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-D de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-E de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PIGF de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PDGF-A de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PDGF-B de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PDGF-C de mamífero; y secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PDGF-D de mamífero;

- 15 en la que la construcción y el dominio de unión a RTK se unen al dominio extracelular de al menos un receptor tirosina-cinasa seleccionado del grupo que consiste en: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-alfa y PDGFR-beta; y

20 en la que el al menos un dominio flanqueante comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en un propéptido del extremo amino de VEGF-C de mamífero; un propéptido del extremo carboxi de VEGF-C de mamífero; un propéptido del extremo amino de VEGF-D de mamífero; un propéptido del extremo carboxi de VEGF-D de mamífero; un péptido LAP TGF-β1 de mamífero; y fragmentos de los mismos que son eficaces para unir proteínas de la matriz extracelular o proteínas de neuropilina;

25 con la condición de que cuando el dominio de unión a RTK sea idéntico al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-C, el al menos un dominio flanqueante no sea idéntico al menos el 90% a un propéptido de VEGF-C; y cuando el dominio de unión a RTK sea idéntico al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-D, el al menos un dominio flanqueante no sea idéntico al menos el 90% a un pro-péptido de VEGF-D.

30 2. Una construcción según la reivindicación 1, en la que al menos un dominio flanqueante comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: un amino-pro-péptido de VEGF-C de mamífero; un carboxi-pro-péptido de VEGF-C de mamífero; un amino-pro-péptido de VEGF-D de mamífero; y un carboxi-pro-péptido de VEGF-D de mamífero.

3. Una construcción según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende además un dominio de unión a heparina conectado a la construcción por un enlace.

35 4. Una construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende además un dominio CUB conectado a la construcción por un enlace.

5. Una construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que cada uno del al menos un enlace comprende un enlace peptídico.

6. Una construcción según la reivindicación 5, en la que la construcción comprende además un péptido señal.

40 7. La construcción de la reivindicación 5 ó 6, en la que la construcción comprende además una marca de péptido.

8. Una construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en la que la construcción comprende al menos dos dominios flanqueantes.

9. Una construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en la que la construcción satisface la fórmula:

Fn-L-RTK-L-Fc

45 en la que Fn comprende un dominio flanqueante que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: un amino-pro-péptido de VEGF-C de mamífero y un amino-pro-péptido de VEGF-D de mamífero;

50 en la que Fc comprende un dominio flanqueante que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada de un carboxi-pro-péptido de VEGF-C de mamífero y un carboxi-pro-péptido de VEGF-D de mamífero;

en la que RTK comprende el dominio de unión a RTK; y

en la que L comprende el enlace entre el dominio flanqueante y el dominio de unión a RTK.

10. Una construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en la que el al menos un dominio flanqueante comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

la secuencia de amino-pro-péptidos de VEGF-C de SEQ ID NO: 46; la secuencia de carboxi-pro-péptidos de VEGF-C de SEQ ID NO: 47; la secuencia de amino-pro-péptidos de VEGF-D de SEQ ID NO: 48; y la secuencia de carboxi-pro-péptidos de VEGF-D de SEQ ID NO: 49.

11. Una construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 5-10,

en la que el polipéptido quimérico se une a VEGFR-1 o VEGFR-2;

en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

(a) aminoácidos 27 a 147 de la secuencia de aminoácidos de VEGF121 de SEQ ID NO: 4;
 (b) aminoácidos 27 a 171 de la secuencia de aminoácidos de VEGF145 de SEQ ID NO: 5;
 (c) aminoácidos 27 a 191 de la secuencia de aminoácidos de VEGF165 de SEQ ID NO: 6;
 (d) aminoácidos 27 a 215 de la secuencia de aminoácidos de VEGF189 de SEQ ID NO: 7;
 (e) aminoácidos 27-232 de la secuencia de aminoácidos de VEGF206 de SEQ ID NO: 3; y
 (f) fragmentos de (a) - (e) que se unen a VEGFR-1 o VEGFR-2.

12. Una construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 5-10,

en la que el polipéptido quimérico se une a VEGFR-1 o VEGFR-2;

en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a los aminoácidos 27 a 127 de la secuencia de aminoácidos de VEGF109 de SEQ ID NO: 52.

13. Una construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 27.

14. Una construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 5-10,

en la que el polipéptido quimérico se une a VEGFR-1 o VEGFR-2; y

en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

(a) aminoácidos 22 a 188 de la secuencia de aminoácidos de VEGF-B167 de SEQ ID NO: 44;
 (b) aminoácidos 22 a 207 de la secuencia de aminoácidos de VEGF-B186 de SEQ ID NO: 45;
 (c) aminoácidos 19 a 149 de la secuencia de aminoácidos de PIGF-1 de SEQ ID NO: 9;
 (d) aminoácidos 19 a 170 de la secuencia de aminoácidos de PIGF-2 de SEQ ID NO: 42;
 (e) aminoácidos 19 a 221 de la secuencia de aminoácidos de PIGF-3 de SEQ ID NO: 43; y
 (f) fragmentos de (a) - (e) que se unen a VEGFR-1 o VEGFR-2.

15. Una construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 5-10,

en la que el polipéptido quimérico se une a PDGFR-alfa o PDGFR-beta; y

en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

(a) aminoácidos 87 a 211 de la secuencia de aminoácidos de PDGF-A de SEQ ID NO: 17;
 (b) aminoácidos 82 a 190 de la secuencia de aminoácidos de PDGF-B de SEQ ID NO: 19;
 (c) aminoácidos 230 a 345 de la secuencia de aminoácidos de PDGF-C de SEQ ID NO: 21;
 (d) aminoácidos 255 a 370 de la secuencia de aminoácidos de PDGF-D de SEQ ID NO: 24; y
 (e) fragmentos de (a) - (d) que se unen a PDGFR-alfa o PDGFR-beta.

16. Una construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 5-10,

en la que el polipéptido quimérico se une a VEGFR-3 o VEGFR-2; y

en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) aminoácidos 103 a 227 de la secuencia de aminoácidos de VEGF-C de SEQ ID NO: 13;
- (b) aminoácidos 93 a 201 de la secuencia de aminoácidos de VEGF-D de SEQ ID NO: 15; y
- (c) fragmentos de (a) - (b) que se unen a VEGFR-3 o VEGFR-2.

- 5 17. Una construcción según la reivindicación 15 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) la secuencia de aminoácidos de la construcción CDD de SEQ ID NO 37;
 - (b) la secuencia de aminoácidos de la construcción CDC de SEQ ID NO: 39; y,
 - (c) la secuencia de aminoácidos de la construcción DDC de SEQ ID NO: 41.
- 10 18. Una construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en la que dicha construcción comprende además una secuencia de aminoácidos del dominio CUB unida por un enlace.
19. Una construcción que comprende:
- un dominio de unión a RTK, un dominio CUB y al menos un enlace que conecta el dominio de unión a RTK con el dominio CUB;
- 15 en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-A de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-B de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-C de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-D de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de VEGF-E de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PIGF de mamífero; secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PDGF-A de mamífero; y secuencias de aminoácidos del dominio de unión a RTK de PDGF-B de mamífero;
- 20 en la que el dominio CUB comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos del dominio CUB de PDGF-C y secuencias de aminoácidos del dominio CUB de PDGF; y
- 25 en la que la construcción y el dominio de unión a RTK se unen al dominio extracelular de al menos un receptor tirosina-cinasa seleccionado del grupo que consiste en: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR-alfa y PDGFR-beta.
- 30 20. La construcción según la reivindicación 19, en la que el dominio CUB está conectado al extremo N del dominio de unión a RTK.
21. La construcción según la reivindicación 19, en la que el dominio CUB está conectado al extremo C del dominio de unión a RTK.
22. La construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 19-21, en la que el dominio CUB comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 53.
- 35 23. La construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 19-21, en la que el dominio CUB comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 55.
24. La construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 19-23, en la que el dominio de unión a RTK comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 90% a los aminoácidos 27 a 127 de la secuencia de aminoácidos de VEGF109 de SEQ ID NO: 52.
- 40 25. La construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 19-24 que comprende además un dominio de unión a heparina conectado a la construcción por un enlace.
26. Una construcción según una cualquiera de las reivindicaciones 19-25, en la que cada uno de los enlaces comprende un enlace peptídico, por lo que la construcción comprende un polipéptido quimérico.
- 45 27. La construcción según la reivindicación 26, en la que el polipéptido quimérico comprende además un péptido señal.
28. La construcción de la reivindicación 27, en la que el polipéptido quimérico comprende además una marca de péptido.
29. La construcción según la reivindicación 24, en la que la construcción comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos 90% a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 57, 59 y 61.
- 50 30. La construcción según la reivindicación 19-29, en la que el dominio CUB está unido al factor de crecimiento

mediante una secuencia de reconocimiento reconocida específicamente por una enzima proteolítica de forma que la enzima proteolítica, si está presente, se escinde en la secuencia de reconocimiento para eliminar el dominio CUB y producir un factor de crecimiento activado.

31. Un dímero que comprende dos polipéptidos quiméricos de una cualquiera de las reivindicaciones 5-15 y 26-30.
- 5 32. El dímero de la reivindicación 31, que es un homodímero.
33. El dímero de la reivindicación 32, que es un heterodímero.
34. Una composición que comprende la construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1-33 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 35. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1-33, en el que la construcción comprende un polipéptido quimérico.
36. Un polinucleótido según la reivindicación 35, en el que el polinucleótido comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal fusionado en marco con el polipéptido.
37. Un polinucleótido según la reivindicación 35 ó 36 que comprende además una secuencia promotora que promueve la expresión del polinucleótido en una célula de mamífero.
- 15 38. Un polinucleótido según la reivindicación 37, en el que la secuencia promotora comprende un promotor específico de la piel.
39. Un polinucleótido según la reivindicación 38, en el que el promotor se selecciona del grupo que consiste en K14, K5, K6, K16 y promotor del colágeno alfa 1(I).
- 20 40. Un polinucleótido según la reivindicación 36, en el que el promotor es un promotor específico de células endoteliales.
41. Un vector que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 35-40.
42. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 35-40 ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión.
- 25 43. Un vector de expresión de la reivindicación 42, en el que la secuencia de control de la expresión comprende un promotor específico de células endoteliales.
44. Un vector de una cualquiera de las reivindicaciones 41-43 seleccionado del grupo que consiste en vectores adenovíricos deficientes en la replicación, vectores víricos adenoasociados y vectores de lentivirus.
45. Una composición que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 35-40 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 46. Una composición que comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 41-44 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
47. Una célula huésped transformada o transfectada con el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 35-40.
48. Una célula huésped transformada o transfectada con el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 41-44.
- 35 49. Una célula huésped según la reivindicación 48 que expresa el polipéptido codificado por el polinucleótido.
50. Una célula huésped según una cualquiera de las reivindicaciones 47-49 que comprende una célula endotelial o célula precursora endotelial de mamífero.
51. Una composición que comprende un miembro seleccionado del grupo que consiste en: (a) la construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1-30; (b) un polinucleótido que codifica (a); (c) un vector de expresión que contiene (b) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y (d) una célula transformada o transfectada con (b) o (c) y que expresa el polipéptido de (a) para uso en un procedimiento de modulación del crecimiento de células endoteliales de mamífero o células precursoras endoteliales de mamífero.
- 40 52. Una composición de la reivindicación 51, en la que el sujeto mamífero es un ser humano.
53. Una composición que comprende un miembro seleccionado del grupo que consiste en:
 - 45 (a) una construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1-30;
 - (b) un polinucleótido que codifica (a);

- (c) un vector de expresión que contiene (b) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y
- (d) una célula transformada o transfectada con (b) o (c) y que expresa el polipéptido de (a);

5 en la que la composición se administra en una cantidad eficaz para modular angiogénesis para uso en un procedimiento de modulación de la angiogénesis en un sujeto mamífero.

54. Una composición que comprende un miembro seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) una construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1-30;
- (b) un polinucleótido que codifica (a);
- 10 (c) un vector de expresión que contiene (b) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y
- (d) una célula transformada o transfectada con (b) o (c) y que expresa el polipéptido de (a);

en la que la composición se administra en una cantidad eficaz para modular angiogénesis para uso en un procedimiento de modulación de la linfangiogénesis en un sujeto mamífero

55. Un agente de cicatrización seleccionado del grupo que consiste en:

- 15 (a) una construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1-30;
- (b) un polinucleótido que codifica (a);
- (c) un vector de expresión que contiene (b) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y
- 20 (d) una célula transformada o transfectada con (b) o (c) y que expresa el polipéptido de (a) para uso en un procedimiento de mejora de la cicatrización de un injerto de piel o colgajo de piel al tejido subyacente de un sujeto mamífero.

56. Un dispositivo médico para mejorar la circulación, cicatrización de heridas o circulación sanguínea, recubierto o impregnado con una composición que comprende un agente angiogénico seleccionado del grupo que consiste en:

- 25 (a) una construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1-30;
- (b) un polinucleótido que codifica (a);
- (c) un vector de expresión que contiene (b) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y
- (d) una célula transformada o transfectada con (b) o (c) y que expresa el polipéptido de (a).

30 57. Un parche que comprende un material de almohadilla que tiene una superficie superior y una superficie inferior, un adhesivo sobre la superficie inferior y una composición terapéutica, en el que la composición comprende un agente de cicatrización seleccionado del grupo que consiste en

- (a) una construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1-30;
- (b) un polinucleótido que codifica (a);
- 35 (c) un vector de expresión que contiene (b) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y
- (d) una célula transformada o transfectada con (b) o (c) y que expresa el polipéptido de (a).

58. Un hilo de sutura quirúrgica recubierto o impregnado con una composición, en el que la composición comprende un agente de cicatrización seleccionado del grupo que consiste en:

- 40 (a) una construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 1-30;
- (b) un polinucleótido que codifica (a);
- (c) un vector de expresión que contiene (b) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y
- (d) una célula transformada o transfectada con (b) o (c) y que expresa el polipéptido de (a).

45 59. Un agente seleccionado del grupo que consiste en: (a) la construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 19-30; (b) el dímero de una cualquiera de las reivindicaciones 31-33; (c) un polinucleótido que codifica (a); (b) un vector de expresión que contiene (c) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y (e) una célula transformada o transfectada con (c) o (d) y que expresa el polipéptido de (a) para uso en un procedimiento para antagonizar en una célula al menos un receptor seleccionado del grupo que consiste en VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- α y PDGFR- β .

50 60. Un agente seleccionado del grupo que consiste en: (a) la construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 19-30; (b) el dímero de una cualquiera de las reivindicaciones 31-33; (c) un polinucleótido que codifica (a); (b) un vector de expresión que contiene (c) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y (e) una célula transformada o transfectada con (c) o (d) y que expresa el polipéptido de (a) para uso en un procedimiento para bloquear la unión de PDGF-D a PDGFR- α , pero no a PDGFR- β , en una célula cuando están presentes tanto

PDGFR- α como PDGFR- β .

- 5 61. Un agente seleccionado del grupo que consiste en: (a) la construcción de una cualquiera de las reivindicaciones 19-30; (b) el dímero de una cualquiera de las reivindicaciones 31-33; (c) un polinucleótido que codifica (a); (b) un vector de expresión que contiene (c) ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión; y (e) una célula transformada o transfectada con (c) o (d) y que expresa el polipéptido de (a) para uso en un procedimiento para modular actividades de un receptor de una célula cuyo receptor se une específicamente, a y es activado por, un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en PDGF-A, PDGF-B, el dominio de homología con VEGF de PDGF-C, VEGF, VEGF-B, VEGF-C y PIGF, proveyendo la célula de una enzima proteolítica, por medio de lo cual se activa el factor de crecimiento.

10



FIG. 1A



FIG. 1B



FIG. 1C



FIG. 1D



FIG. 1E



FIG. 1F



FIG. 1G

AdVEGF-CAC

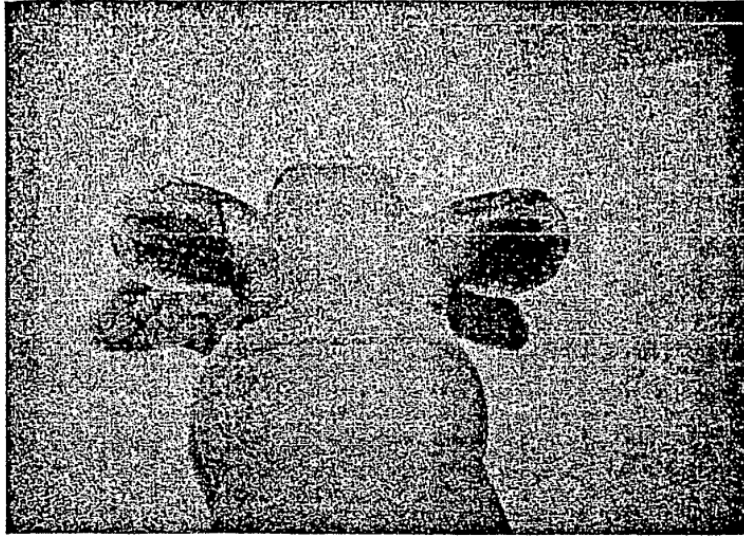


FIG. 2A

AdVEGF-A165

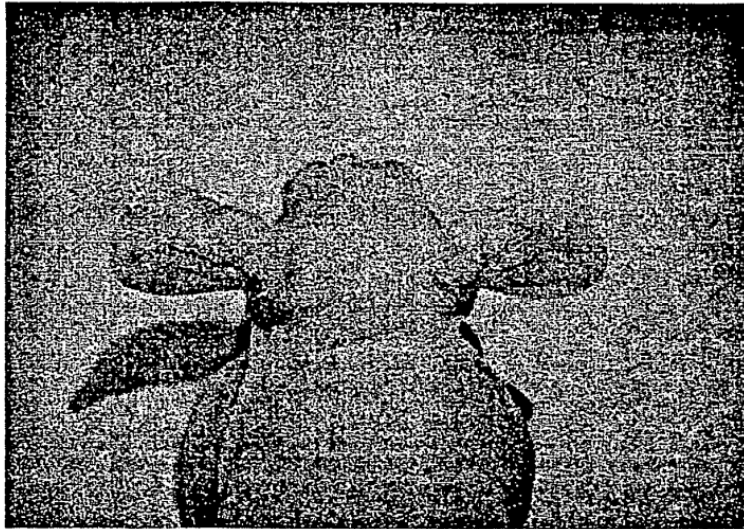


FIG 2B

AdLacZ

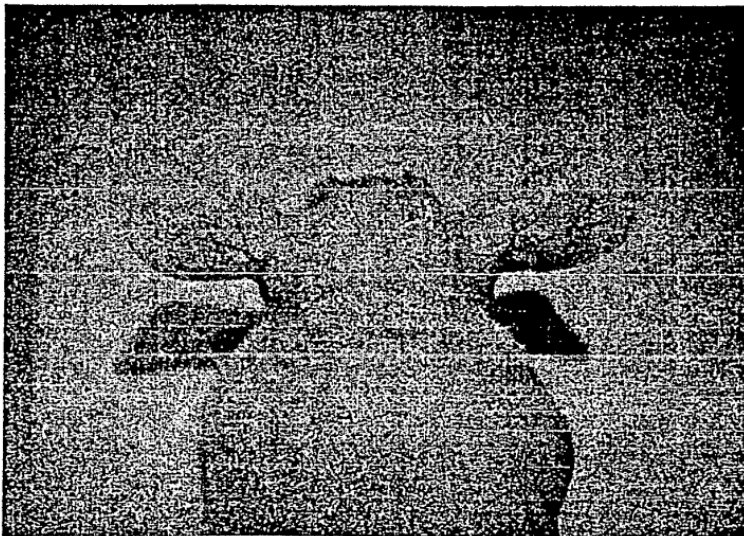


FIG. 2C