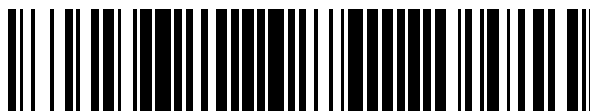


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 107**

51 Int. Cl.:
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/18 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
C07K 14/49 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09162873 .5**
96 Fecha de presentación: **21.08.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **2107109**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.10.2009**

54 Título: **Factor recombinante de crecimiento de las células endoteliales vasculares-D (VEGF-D)**

30 Prioridad:
23.08.1996 AU PO182596 23.08.1996 US 23751 P
11.11.1996 AU PO355496 14.11.1996 US 31097 P
05.02.1997 AU PO495497 10.02.1997 US 38814 P
19.06.1997 AU PO743597 01.07.1997 US 51426 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.11.2012

73 Titular/es:
VEGENICS PTY LTD (100.0%)
Level 1 10 Wallace Avenue
Toorak, VIC 3142, AU

72 Inventor/es:
ACHEN, MARC G.;
WILKS, ANDREW F.;
STACKER, STEVEN A. y
ALITALO, KARI

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 390 107 T3

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

DESCRIPCIÓN

Factor recombinante de crecimiento de las células endoteliales vasculares-D (VEGF-D)

Esta invención se refiere a polipéptidos VEGF-D maduros, a DNA que codifica dichos polipéptidos y a composiciones farmacéuticas y diagnósticas y métodos que utilizan o se derivan de los polipéptidos.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La angiogénesis es un proceso fundamental requerido para el crecimiento y desarrollo normales de los tejidos, e implica la proliferación de capilares nuevos a partir de vasos sanguíneos preexistentes. La angiogénesis no sólo está implicada en el desarrollo embrionario y el crecimiento, reparación y regeneración normales de los tejidos, sino que está implicada también en el ciclo reproductor femenino, el establecimiento y mantenimiento del embarazo, y en la reparación de heridas y fracturas. Además de la angiogénesis que tiene lugar en el individuo normal, están implicados sucesos angiogénicos en cierto número de procesos patológicos, particularmente el crecimiento y la metástasis de los tumores, y otras condiciones en las cuales la proliferación de vasos sanguíneos, especialmente del sistema microvascular, está incrementada, tales como retinopatía diabética, psoriasis y artropatías. La inhibición de la angiogénesis es útil en la prevención o el alivio de estos procesos patológicos.

Por otra parte, la promoción de la angiogénesis es deseable en situaciones en las cuales la vascularización debe establecerse o extenderse, por ejemplo después de trasplante de tejidos u órganos, o para estimular el establecimiento de la circulación colateral en el infarto tisular o la estenosis arterial, tal como en la enfermedad cardíaca coronaria y la tromboangitis obliterante.

Debido al papel crucial de la angiogénesis en tantos procesos patológicos, los factores implicados en el control de la angiogénesis han sido investigados intensamente. Se ha demostrado que cierto número de factores de crecimiento están involucrados en la regulación de la angiogénesis; éstos incluyen factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor α del crecimiento transformante (TGF α), y factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF). Véase por ejemplo, Folkman *et al*, "Angiogenesis", J. Biol. Chem., 1992, 267, 10931-10934 para una revisión.

Se ha sugerido que una familia particular de factores de crecimiento endotelial específicos de células y sus receptores correspondientes es fundamentalmente responsable de la estimulación del crecimiento y la diferenciación de las células endoteliales, y de ciertas funciones de las células diferenciadas. Estos factores son miembros de la familia PDGF, y parecen actuar por la vía de tirosina-quinasa receptoras endoteliales (RTKs). Hasta ahora, se han identificado cuatro subtipos de factor de crecimiento endotelial vascular. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), conocido actualmente como VEGF-A, ha sido aislado de varias fuentes. VEGF-A exhibe actividad mitógena altamente específica contra las células endoteliales y puede estimular la secuencia total de sucesos que conducen a la angiogénesis. Adicionalmente, el mismo presenta actividad quimioattractiva frente a los monocitos, puede inducir el activador del plasminógeno y el inhibidor del activador del plasminógeno en las células endoteliales, y puede influir también en la permeabilidad vascular. Debido a la última actividad, se hace referencia a veces al mismo como factor de permeabilidad vascular (VTF). El aislamiento y las propiedades de VEGF han sido revisados; véase Ferrara *et al*, Ferrara *et al*, "The Vascular Endothelial Growth Factor Family of Polypeptides", J. Cellular Biochem., 1991 47 211-218 y Connolly, "Vascular Permeability Factor: A Unique Regulator of Blood Vessel Function", J. Cellular Biochem., 1991 47 219-223.

En fecha más reciente, se han identificado tres miembros adicionales de la familia VEGF. Éstos se designan VEGF-B, descrito en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US96/02957 (WO 96/26736) por Ludwig Institute for Cancer Research y la Universidad de Helsinki, VEGF-C, descrito en Joukov *et al*, The EMBO Journal, 1996 15 290-298, y VEGF2, descrito en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US94/05291 (WO 95/24473) por Human Genome Sciences, Inc. VEGF-B tiene propiedades angiogénicas y de otros tipos estrechamente similares a las de VEGF, pero está distribuido y expresado en los tejidos de modo distinto que VEGF. En particular, VEGF-B se expresa muy intensamente en el corazón, y sólo débilmente en el pulmón, en tanto que sucede lo contrario en el caso de VEGF. Esto sugiere que VEGF y VEGF-B, a pesar del hecho de que se coexpresan en muchos tejidos, pueden tener diferencias funcionales.

VEGF-B se aisló utilizando una técnica de cribado con trampa de interacción co-híbrida de levadura, cribado para proteínas celulares que podrían interaccionar con la proteína tipo I de fijación de ácido retinoico celular (CRABP-I). Su aislamiento y sus características se describen en detalle en PCT/US 96/02597 y en Olofsson *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1996, 93, 2576-2581.

VEGF-C se aisló de medios acondicionados de la línea de células de adenocarcinoma de próstata PC-3 (CRL1435) por cribado respecto a la capacidad del medio para producir la fosforilación de la tirosina de la tirosina-quinasa del receptor específico de las células endoteliales Flt, utilizando células transfectadas para expresar Flt4. VEGF-C se purificó utilizando cromatografía de afinidad con Flt4 recombinante, y se clonó a partir de una biblioteca de cDNA de PC-3. Su aislamiento y características se describen en detalle en Joukov *et al*, The EMBO Journal, 1996, 15, 290-298.

VEGF2 se aisló de una línea de células de cáncer de mama humano altamente tumorigena, independiente de estrógenos. Si bien se afirma que esta molécula tiene aproximadamente 22% de homología a PDGF y 30% de homología a VEGF, el método de aislamiento del gen que codifica VEGF2 no está claro, y no se ha descrito caracterización alguna de la actividad biológica.

5 Los factores de crecimiento endotelial vascular parecen actuar por fijación a tirosina-quinastas receptoras de la familia de los receptores de PDGF. Han sido identificadas 5 tirosina-quinastas receptoras específicas de las células endoteliales, a saber Flt-1 (VEGFR-1), KDR/Flk-1 (VEGFR-2), Flt4 (VEGFR-3), Tie y Tek/Tie-2. Todas éstas tienen la actividad intrínseca de la tirosina-quinasa que es necesaria para la transducción de señales. El papel esencial, específico en la vasculogénesis y angiogénesis de Flt-1, Flk-1, Tie y Tek/Tie-2 ha sido demostrado por mutaciones direccionadas que desactivan estos receptores en embriones de ratón. VEGFR-1 y VEGFR-2 fijan VEGF con afinidad alta, y VEGFR-1 fija también VEGF-B y el factor de crecimiento de la placenta (PlGF). Se ha demostrado que VEGF-C es el ligando para Flt4 (VEGFR-3), y activa también VEGFR-2 (Joukov *et al*, 1996). Un ligando para Tek/Tie-2 ha sido descrito por Regeneron Pharmaceuticals, Inc.; sin embargo, el ligando para Tie no ha sido identificado todavía.

15 El receptor Flt-4 se expresa en los endotelios venoso y linfático del feto, y predominantemente en los endotelios linfáticos del adulto (Kaipainen *et al*, *Cancer Res*, 1994 54 6571-6577; *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1995 92, 3566-3570). Se ha sugerido que VEGF-C puede tener una función primaria en el endotelio linfático y una función secundaria en la regulación de la angiogénesis y la permeabilidad que es compartida con VEGF (Joukov, *et al*, 1996).

20 Los autores de la presente invención han aislado ahora cDNA humano que codifica una nueva proteína de la familia de los factores de crecimiento endotelial vascular. La nueva proteína, designada VEGF-D, tiene semejanzas estructurales con otros miembros de esta familia.

SUMARIO DE LA INVENCION

25 La invención proporciona en general un polipéptido aislado que tiene la capacidad de estimular la proliferación de células endoteliales en un mamífero, en donde dicho polipéptido está constituido por la secuencia de un VEGF-D maduro que está contenida en el fragmento comprendido entre los residuos de aminoácidos 92 y 205 de SEQ ID NO: 5 de VEGF-D, secuencias de DNA aisladas que codifican el polipéptido (con la condición de que el polipéptido codificado no sea VEGF-D de longitud total (SEQ ID NO: 5)), un anticuerpo específicamente reactivo con el polipéptido, y composiciones útiles para aplicaciones diagnósticas y/o terapéuticas. Se describe también una molécula de ácido nucleico aislada y purificada que codifica un nuevo polipéptido, designado VEGF-D, que es estructuralmente homólogo a VEGF, VEGF-B y VEGF-C. La molécula de ácido nucleico puede ser un cDNA que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7. Se describen también moléculas de DNA de secuencia tal que se hibridan en condiciones severas con el DNA de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7. Preferiblemente, la molécula de DNA capaz de hibridarse en condiciones severas codifica la porción de VEGF-D desde el residuo de aminoácido 93 al residuo de aminoácido 35 201, enlazado operativamente de modo opcional a una secuencia de DNA que codifica el péptido FLAGTM.

El cDNA puede comprender la secuencia expuesta en SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6 o SEQ ID NO. 7.

Se describe en esta memoria un polipéptido que posee la secuencia característica de aminoácidos

Pro-Xaa-Cys-Val-Xaa-Xaa-Xaa-Arg-Cys-Xaa-Gly-Cys-Cys (SEQ ID NO. 2),

40 teniendo dicho polipéptido la capacidad de estimular la proliferación de células endoteliales, y comprendiendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos que corresponde sustancialmente a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 3, o un fragmento o análogo de la misma que tiene la capacidad de estimular una o más de proliferación, diferenciación, migración o supervivencia de células endoteliales. Se hace referencia aquí a estas capacidades como "actividades biológicas de VEGF-D" y pueden ser testadas fácilmente por métodos conocidos en la técnica. Preferiblemente, el polipéptido de la invención tiene la capacidad para estimular proliferación de células endoteliales, con inclusión, pero sin carácter limitante, de la proliferación de las células endoteliales vasculares y/o células endoteliales linfáticas.

Se describen también polipéptidos que tienen la secuencia indicada en SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 8 o SEQ ID NO. 9.

50 Un fragmento preferido del polipéptido de la invención es la porción de VEGF-D desde el residuo de aminoácido 93 al residuo de aminoácido 201, enlazada opcionalmente al péptido FLAGTM. En el caso en que el fragmento está enlazado a FLAGTM, el fragmento es VEGFD Δ N Δ C, como se define en esta memoria.

55 Se describen también en esta memoria polipéptidos que comprenden sustituciones conservadoras, inserciones o deleciones, pero que retienen todavía la actividad biológica de VEGF-D. La persona experta en la técnica será perfectamente conocedora de métodos que pueden utilizarse fácilmente para generar tales polipéptidos, por ejemplo el uso de mutagénesis orientada, o escisión enzimática y ligación específicas. La persona

experta conocerá también que compuestos peptidomiméticos o compuestos en los cuales uno o más residuos de aminoácidos están reemplazados por un aminoácido no existente naturalmente o un análogo de aminoácido pueden retener los aspectos requeridos de la actividad biológica de VEGF-D. Tales compuestos pueden producirse y testarse fácilmente por métodos conocidos en la técnica.

5 Adicionalmente, se describen también formas variantes del polipéptido VEGF-D que resultan de corte y empalme (remodelación) alternativos, como se sabe que existen en el caso de VEGF, y variantes alélicas existentes naturalmente de la secuencia de ácido nucleico codificante de VEGF-D. Las variantes alélicas son bien conocidas en la técnica, y representan formas alternativas o una secuencia de ácido nucleico que comprenden sustitución, 10 deleción o adición de uno o más nucleótidos, pero que no conducen a alteración funcional sustancial alguna del polipéptido codificado.

 Como se utiliza en esta memoria, "VEGF-D" se refiere colectivamente a los polipéptidos de SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 8 y SEQ ID NO. 9 y fragmentos o análogos de los mismos que tienen la actividad biológica de VEGF-D como se define en esta memoria.

15 Tales formas variantes de VEGF-D pueden prepararse por direccionamiento de regiones no esenciales del polipéptido VEGF-D para modificación. Estas regiones no esenciales se espera que caigan fuera de las regiones fuertemente conservadas indicadas en las figuras de esta memoria, especialmente en la Figura 2 y la Figura 10. En particular, los factores de crecimiento de la familia PDGF, con inclusión de VEGF, son dímeros, y VEGF-B, VEGF-C, PIGF, PDFG-A y PDGF-B exhiben una conservación completa de 8 residuos cisteína en los dominios N-terminales, es decir, los dominios semejantes a PDGF (Olofsson *et al*, 1996; Joukov *et al*, 1996). Estas cisteínas se cree que 20 están implicadas en la formación de enlaces disulfuro intra- e inter-moleculares. Adicionalmente, existen otros residuos cisteína altamente, pero no totalmente, conservados en los dominios C-terminales. Los bucles 1, 2 y 3 de cada subunidad, que están formados por enlaces disulfuro intra-moleculares, están implicados en la fijación a los receptores para la familia PDGF/VEGF de factores de crecimiento (Andersson *et al*: Growth Factors, 1995, 12, 159-164). Como se muestra en esta memoria, las cisteínas conservadas en los miembros previamente conocidos de la familia VEGF están conservadas también en VEGF-D. 25

 La persona experta en la técnica es por tanto perfectamente sabedora de que estos residuos cisteína deberían preservarse en cualquier forma variante propuesta, y que los sitios activos presentes en los bucles 1, 2 y 3 deberían estar preservados también. En cambio, puede esperarse que otras regiones de la molécula tengan menor importancia para la función biológica, y por consiguiente representen dianas adecuadas para modificación. Los polipéptidos modificados pueden testarse fácilmente en cuanto a su capacidad para exhibir la actividad biológica de VEGF-D por procedimientos de ensayo de actividad rutinarios tales como tests de proliferación celular. 30

 Se contempla que algunos polipéptidos VEGF-D modificados tendrán la capacidad de fijarse a células endoteliales, es decir a receptores VEGF-D, pero serán incapaces de estimular la proliferación, diferenciación, migración o supervivencia de las células endoteliales. Estos polipéptidos modificados se espera que sean capaces 35 de actuar como inhibidores competitivos o no competitivos de VEGF-D, y sean útiles en situaciones en las que es deseable la prevención o reducción de la acción de VEGF-D. A dichas variantes de VEGF-D fijadoras de receptores pero no mitógenas, no inductoras de diferenciación, no inductoras de migración o no promotoras de supervivencia de VEGF-D se hace referencia en esta memoria como "variantes de fijación de receptores pero inactivas en otros aspectos".

40 De acuerdo con un tercer aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico purificado y aislado que codifica un polipéptido o fragmento de polipéptido de la invención (con la condición de que el polipéptido codificado no sea VEGF-D de longitud total (SEQ ID NO: 5)). El ácido nucleico puede ser DNA, DNA genómico, cDNA o RNA, y puede ser monocatenario o bicatenario. El ácido nucleico puede aislarse de una fuente celular o tisular, o de origen recombinante o sintético. Debido a la degeneración del código genético, la persona experta en la técnica apreciará 45 que son posibles muchas secuencias codificantes de este tipo, en donde cada secuencia codifica la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 8 o SEQ ID NO. 9, un fragmento activo o análogo de las mismas, o una variante de fijación de receptores pero inactiva o parcialmente inactiva de las mismas en otros aspectos.

50 Un cuarto aspecto de la invención proporciona vectores que comprenden el cDNA de la invención o un ácido nucleico de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, y células hospedadoras transformadas o transfectadas con ácidos nucleicos o vectores de la invención. Estas células son particularmente adecuadas para expresión del polipéptido de la invención, e incluyen células de insecto tales como células Sf9, que pueden obtenerse de la American Type Culture Collection (ATCC SRL-171), transformadas con un vector de baculovirus, y la línea de células de riñón embrionario humano 293EBNA transfectada por un plásmido de expresión adecuado. 55 Los vectores preferidos de la invención son vectores de expresión en los cuales un ácido nucleico de acuerdo con la invención está conectado operativamente a uno o más promotores apropiados y/u otras secuencias de control, tales que las células hospedadoras apropiadas transformadas o transfectadas con los vectores son capaces de expresar el polipéptido de la invención. Otros vectores preferidos son los adecuados para transfección de células de mamífero, o para terapia génica, tales como vectores de adenovirus o retrovirus, o liposomas. Una diversidad de 60 vectores de este tipo se conocen en la técnica.

La invención proporciona también un método de construcción de un vector capaz de expresar un polipéptido codificado por un ácido nucleico de acuerdo con la invención, que comprende los pasos de conectar operativamente el ácido nucleico a uno o más promotores apropiados y/u otras secuencias de control como se ha descrito arriba.

5 La invención proporciona adicionalmente un método de construcción de un polipéptido de acuerdo con la invención, que comprende los pasos de expresar un ácido nucleico o vector de la invención en una célula hospedadora, y aislar el polipéptido de la célula hospedadora o del medio de crecimiento de la célula hospedadora. En una realización preferida de este aspecto de la invención el vector de expresión comprende adicionalmente una secuencia que codifica un marcador de afinidad, tal como FLAGTM o hexahistidina, a fin de facilitar la purificación del polipéptido por cromatografía de afinidad.

10 En un aspecto adicional más, la invención proporciona un anticuerpo específicamente reactivo con un polipéptido de la invención. Tales anticuerpos son útiles como inhibidores o agonistas de VEGF-D y como agentes de diagnóstico para detección y cuantificación de VEGF-D. Pueden utilizarse anticuerpos policlonales o monoclonales. Pueden generarse anticuerpos monoclonales y policlonales contra los polipéptidos de la invención utilizando métodos estándar en la técnica. Para algunos propósitos, por ejemplo en los casos en que debe utilizarse un anticuerpo monoclonal para inhibir los efectos de VEGF-D en una situación clínica, puede ser deseable utilizar anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos. Métodos para la producción de éstos, con inclusión de métodos de DNA recombinante, son asimismo bien conocidos en la técnica.

Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede marcarse convenientemente.

20 Los polipéptidos o anticuerpos de acuerdo con la invención pueden marcarse con un marcador detectable, y utilizarse para propósitos diagnósticos. Análogamente, el polipéptido de la invención así marcado puede utilizarse para identificar su receptor correspondiente *in situ*. El polipéptido o anticuerpo puede acoplarse covalentemente o no covalentemente a un agente adecuado supermagnético, paramagnético, electrónicamente denso, ecogénico o radiactivo para producción de imágenes. Para uso en ensayos diagnósticos, pueden utilizarse marcadores radiactivos o no radiactivos, incluyendo los últimos marcadores enzimáticos o marcadores del sistema biotina/avidina.

25 Aplicaciones clínicas de la invención incluyen aplicaciones diagnósticas, aceleración de la angiogénesis en la curación de las heridas, trasplante de tejidos u órganos, o para establecimiento de circulación colateral en el infarto tisular o estenosis arterial, tal como estenosis de arterias coronarias, e inhibición de la angiogénesis en el tratamiento del cáncer o de la retinopatía diabética. La cuantificación de VEGF-D en especímenes de biopsias de cáncer puede ser útil como indicador del riesgo metastásico futuro.

30 Dado que VEGF-D se expresa en alta proporción en el pulmón, y aumenta también la permeabilidad vascular, el mismo es relevante para una diversidad de condiciones pulmonares. Podrían utilizarse ensayos de VEGF-D en la diagnosis de diversos trastornos del pulmón. Podría utilizarse también VEGF-D en el tratamiento de trastornos pulmonares para mejorar la circulación sanguínea en el pulmón y/o el intercambio de gases entre los pulmones y el torrente sanguíneo. Análogamente, podría utilizarse VEGF-D para mejorar la circulación sanguínea en el corazón y la permeabilidad al O₂ gaseoso en casos de insuficiencia cardíaca. De modo análogo, podría utilizarse VEGF-D para mejorar el flujo sanguíneo y el intercambio de gases en la enfermedad obstructiva crónica de las vías aéreas.

40 Inversamente, los antagonistas (v.g. anticuerpos y/o inhibidores) de VEGF-D podrían utilizarse para el tratamiento en condiciones tales como la insuficiencia cardíaca congestiva, que implican acumulaciones de fluido en, por ejemplo, el pulmón, como resultado aumentos en la permeabilidad vascular, por ejercer un efecto de compensación de la permeabilidad vascular a fin de contrarrestar la acumulación de fluido.

45 VEGF-D se expresa también en el intestino delgado y el colon, y podrían utilizarse administraciones de VEGF-D para tratar los síndromes de malabsorción en el tracto intestinal como resultado de sus actividades de aumento de la circulación sanguínea y aumento de la permeabilidad vascular.

50 Se describe en esta memoria un método de estimulación de la angiogénesis y/o neovascularización en un mamífero que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento, que comprende el paso de administrar al mamífero una dosis eficaz de VEGF-D, o un fragmento o análogo del mismo que tiene la capacidad de estimular la proliferación de células endoteliales.

VEGF-D puede administrarse junto con, o en asociación con, uno o más de VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, PIGF, PDGF, FGF y/o heparina.

55 Inversamente, se describe también un método de inhibición de la angiogénesis y/o neovascularización en un mamífero que se encuentra en necesidad de un tratamiento estético, que comprende el paso de administrar al mamífero una cantidad eficaz de un antagonista de VEGF-D. El antagonista puede ser cualquier agente que inhiba la acción de VEGF-D, sea por prevención de la fijación de VEGF-D a su receptor correspondiente o la célula diana, o por inhibición de la activación del transductor de la señal desde el receptor a su sitio de acción celular. Antagonistas

adecuados incluyen, pero sin carácter limitante, anticuerpos dirigidos contra VEGF-D; inhibidores competitivos o no competitivos de la fijación de VEGF-D al receptor de VEGF-D, tales como las variantes de VEGF-D de fijación de receptores pero no mitógenas a que se ha hecho referencia arriba; y secuencias de nucleótidos antisentido complementarias a al menos una parte de la secuencia de DNA que codifica VEGF-D.

5 Un método de detección de VEGF-D en una muestra biológica comprende el paso de poner en contacto la muestra con un reactivo capaz de fijarse a VEGF-D, y detectar la fijación. Preferiblemente, el reactivo capaz de fijarse a VEGF-D es un anticuerpo dirigido contra VEGF-D, más preferiblemente un anticuerpo monoclonal. La fijación y/o la extensión de la fijación pueden ser detectadas por medio de un marcador detectable; marcadores adecuados se han expuesto anteriormente.

10 En el caso en que debe utilizarse VEGF-D o un antagonista para propósitos terapéuticos, la dosis y ruta de aplicación dependerán de la afección a tratar, y estarán a discreción del médico o veterinario encargado del tratamiento. Rutas adecuadas incluyen inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, aplicación tópica, implantes, etc. La aplicación tópica de VEGF-D puede utilizarse de manera análoga a VEGF.

15 Se describen también medios de diagnóstico/pronóstico típicamente en forma de kits de test. Por ejemplo, un kit de test diagnóstico/pronóstico comprende un anticuerpo para VEGF-D y medios para la detección, y puede comprender también medios para evaluación de la fijación entre el anticuerpo y VEGF-D. El anticuerpo o el VEGF-D se marca con un marcador detectable, y el anticuerpo o el VEGF-D se fija al sustrato, de tal modo que puede establecerse la interacción VEGF-D-anticuerpo por determinación de la cantidad de marcador unida al sustrato después de la fijación entre el anticuerpo y el VEGF-D. Los medios diagnóstico/pronóstico pueden proporcionarse como un kit ELISA convencional.

20 Alternativamente, los medios diagnóstico/pronóstico pueden comprender medios de reacción en cadena de polimerasa para establecer la estructura de la secuencia genómica de un gen VEGF-D de un individuo sometido a test y comparar esta estructura de secuencia con la descrita en esta solicitud a fin de detectar cualesquiera anomalías, con vistas a establecer si cualquier aberración en la expresión de VEGF-D está relacionada con una condición de enfermedad dada.

25 Un método de detección de aberraciones en la estructura del gen VEGF-D en un individuo sometido a test que pueden estar asociadas con una condición de enfermedad en dicho individuo sometido a test comprende proporcionar una muestra de DNA de dicho individuo sometido a test; poner en contacto la muestra de DNA con un juego de iniciadores específicos para DNA de VEGF-D enlazados operativamente a una polimerasa y amplificar selectivamente el DNA de VEGF-D de la muestra por reacción en cadena de polimerasa, y comparar la secuencia de nucleótidos del DNA de VEGF-D amplificado de la muestra con las secuencias de nucleótidos expuestas en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4. Un kit de test comprende un par de iniciadores específicos para DNA de VEGF enlazados operativamente a una polimerasa, donde dicha polimerasa es capaz de amplificar selectivamente el DNA de VEGF-D a partir de una muestra de DNA.

30 Otro aspecto de la invención concierne al uso de un polipéptido o un anticuerpo de acuerdo con la invención en la provisión de una composición farmacéutica que comprende o bien el polipéptido VEGF-D de la invención que promueve la proliferación de células endoteliales o un anticuerpo para el mismo. Composiciones que comprenden polipéptido VEGF-D de acuerdo con la invención pueden comprender opcionalmente además uno o más de VEGF, VEGF-B y VEGF-C, y/o heparina.

35 Un dímero de proteína comprende el polipéptido VEGF-D, particularmente un dímero enlazado por disulfuro. Los dímeros de proteína incluyen tanto homodímeros del polipéptido VEGF-D como heterodímeros de VEGF-D y VEGF, VEGF-B, VEGF-C, PIGF o PDGF.

Un método para aislamiento de VEGF-D comprende el paso de exponer una célula que expresa VEGF-D a heparina a fin de facilitar la liberación de VEGF-D de la célula, y purificar el VEGF-D así liberado.

40 Se describe en esta memoria un vector que comprende una secuencia de nucleótidos antisentido que es complementaria a al menos una parte de una secuencia de DNA que codifica VEGF-D o un fragmento o análogo del mismo que promueve la proliferación de células endoteliales. Un vector de este tipo que comprende una secuencia antisentido puede utilizarse para inhibir, o al menos mitigar, la expresión de VEGF-D. El uso de un vector de este tipo para inhibir la expresión de VEGF-D se ve favorecido en casos en que la expresión de VEGF-D está asociada con una enfermedad, por ejemplo donde determinados tumores producen VEGF-D a fin de proporcionar angiogénesis. La transformación de tales células tumorales con un vector que contiene una secuencia de nucleótidos antisentido podría suprimir o retardar la angiogénesis, e inhibir o retardar así el crecimiento del tumor.

45 Polinucleótidos tales como los arriba descritos, fragmentos de dichos polinucleótidos, y variantes de tales polinucleótidos con semejanza suficiente a la cadena no codificante de dichos polinucleótidos para hibridarse a la misma en condiciones severas son útiles todos ellos para identificar, purificar, y aislar polinucleótidos que incluyen otras formas de VEGF-D de mamífero no humanas. Condiciones de hibridación severas ilustrativas son como sigue: hibridación a 42°C en 5X SSC, NaPO₄ 20 mM, pH 6,8, 50% formamida; y lavado a 42°C en 0,2X SSC. Los expertos en la técnica comprenderán que es deseable variar estas condiciones empíricamente basándose en la longitud y el

contenido de bases nucleotídicas GC de las secuencias a hibridar, y que existen fórmulas para determinar dicha variación. Véase por ejemplo Sambrook *et al*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Second Edition, Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory (1989).

5 Se comprenderá claramente que los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención pueden prepararse por medios sintéticos o por medios recombinantes, o pueden purificarse a partir de fuentes naturales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra una comparación entre las secuencias de VEGF-D humano y VEGF₁₆₅ humana (Figura 1a), VEGF-B humana (Figura 1b), VEGF-C humana (Figura 1c) y PIGF (Figura 1d). El recuadro indica residuos que coinciden exactamente con los de VEGF-D humano.

10 La Figura 2 muestra alineaciones de secuencia entre las secuencias de VEGF-D humano, VEGF₁₆₅ humana, VEGF-B humana, VEGF-C humana y PIGF humana. Los recuadros indican residuos que coinciden exactamente con los de la secuencia VEGF-D; y

15 La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de VEGF-D humano (SEQ ID NO: 3), como se predice a partir de la secuencia de cDNA (SEQ ID NO: 1). Los recuadros indican sitios potenciales para glicosilación unida a N.

La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos de una segunda secuencia de cDNA que codifica VEGF-D humano (SEQ ID NO 4), aislada por hibridación a partir de una biblioteca de cDNA de pulmón comercial humana; este cDNA contiene la región codificante entera para VEGF-D humano.

20 La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos para VEGF-D humano (SEQ ID NO 5) deducida de la secuencia del cDNA de la Figura 4.

La Figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos de cDNA codificante de VEGF-D1 de ratón (SEQ ID NO 6), aislada por cribado de hibridación para una biblioteca de cDNA de pulmón de ratón disponible comercialmente.

La Figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos de cDNA codificante de VEGF-2 de ratón (SEQ ID NO 7), aislada de la misma biblioteca que en la Figura 6.

25 La Figura 8 muestra las secuencias de aminoácidos deducidas para VEGF-D1 (SEQ ID NO 8) y VEGF-D2 (SEQ ID NO 9) de ratón.

La Figura 9 muestra una comparación entre las secuencias de aminoácidos deducidas de VEGF-D1 de ratón, VEGF-D2 de ratón y VEGF-D humano.

30 La Figura 10 muestra alineaciones de secuencias entre las secuencias de aminoácidos de VEGF-D humano, VEGF₁₆₅ humana, VEGF-B humana, VEGF-C humana y PIGF humana, y

la Figura 11 muestra los resultados de un bioensayo en el cual se testó el medio acondicionado de células COS que expresan VEGF-A o VEGF-D respecto a capacidad para fijarse al dominio extracelular de un receptor quimérico expresado en células Ba/F3.

35 La Figura 12 muestra los resultados del análisis por inmunoprecipitación y transferencia Western de péptidos VEGF-D.

(A) Se transfectaron pEFBOSVEGFDFullFLAG y pCDNA-1VEGF-A en células COS y se marcaron biosintéticamente con ³⁵S-cisteína/metionina durante 4 horas. Los sobrenadantes de estos cultivos se sometieron a inmunoprecipitación con gel M2 o con un antisuero dirigido a VEGF-A acoplado a la proteína A. Las cuentas lavadas se eluyeron con un volumen igual de tampón de muestra 2 x SDS-PAGE y se hirvieron. Las muestras se resolvieron luego por SDS-PAGE al 12%. Las pistas marcadas con un asterisco (*) indican donde se redujeron las muestras con ditiotreitil y se alquilaron con yodoacetamida. Se indican los marcadores de peso molecular. fA y fB indican las especies de 43 kD y 25 kD inmunoprecipitadas por el gel M2 a partir de las células COS que expresaban pEFBOSVEGFDFullFLAG.

40

(B) Análisis por transferencia Western de VEGFDΔNΔC. Se combinó una parte alícuota del material eluido de la columna de afinidad M2 (fracción #3, VEGFDΔNΔC) con 2 x tampón de muestra SDS-PAGE y se resolvió en un gel de SDS-PAGE al 15%. Las proteínas se transfirieron luego a membrana de nitrocelulosa y se sondaron con anticuerpo monoclonal M2 o con un anticuerpo de control coincidente en isotipo (Neg). Se revelaron las transferencias utilizando un anticuerpo secundario anti-ratón-HRP de cabra y quimioluminiscencia (ECL, Amersham). El VEGFDΔNΔC monómero se designa por la punta de flecha, al igual que la forma dímera supuesta de este péptido (VEGFDΔNΔC"). Se indican los marcadores de peso molecular.

45

50

La Figura 13 muestra los resultados del análisis de VEGFDΔNΔC utilizando el bioensayo VEGFR2. La VEGFDΔNΔC recombinante, y el material purificado por cromatografía de afinidad de M2, se evaluaron durante el

bioensayo VEGFR2. Células del bioensayo (10^4), lavadas para eliminar IL-3, se incubaron con partes alícuotas de medio acondicionado a partir de células COS transfectadas con VEGF-D, fracción #1 de la columna de afinidad (volumen vacío) o fracción #3 de la columna de afinidad (que contenía VEGFD Δ N Δ C). Todas las muestras se testaron a una concentración inicial de 20% (es decir 1/5) seguida por diluciones al doble. Las células se dejaron

5 incubar durante 48 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con 10% de CO₂. La proliferación celular se cuantificó por la adición de 1 μ Ci de ³H-timidina y recuento de la cantidad incorporada a lo largo de un periodo de 4 horas.

La Figura 14 muestra la estimulación de la fosforilación de la tirosina del receptor VEGFR3 (Flt4) en células NIH3T3 por el sobrenadante de cultivo de células HF infectadas con un vector recombinante de baculovirus transformado con VEGF-D.

10

La Figura 15 muestra la estimulación de la fosforilación de la tirosina del receptor VEGFR2 (KDR) en células PAE por el sobrenadante de cultivo preparado como en la Figura 14.

La Figura 16 muestra el efecto mitógeno de VEGFD Δ N Δ C en células endoteliales de aorta de bovino (BAEs). Se trataron BAEs con la fracción #3 que contenía VEGFD Δ N Δ C y, como control positivo, VEGF-A purificado como se describe en el texto. El resultado obtenido utilizando medio sin factor de crecimiento añadido se designa "Control de Medio".

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se describirá a continuación en detalle con referencia a las Figuras, y a los ejemplos no limitantes siguientes. Algunos de los ejemplos son comparativos en la medida en que los mismos no corresponden a la invención tal como se reivindica.

20

Ejemplo 1 (comparativo)

Se ha especulado que no se encontrarán más miembros de la familia VEGF debido a que no existen receptores huérfanos conocidos en la familia VEGFR. Adicionalmente, los inventores no conocen con certeza sugestión alguna en la técnica anterior de que puedan existir otros miembros de una familia de este tipo.

Se llevó a cabo incidentalmente una investigación por ordenador de bases de datos de ácido nucleico para otro proyecto, utilizando como materias de investigación las secuencias de aminoácidos de VEGF, VEGF-B, VEGF-C y PIGF. Se identificaron varias secuencias de cDNA por esta investigación. Una de estas secuencias, Acceso a GenBank No. H24828, codificaba un polipéptido que era similar en estructura a la región C-terminal de VEGF-C enriquecida en cisteína. Esta secuencia se obtuvo de la base de datos de marcadores de secuencia expresados (dbEST), y para los propósitos de esta memoria descriptiva se designa XPT. El cDNA de XPT se había aislado de una biblioteca de cDNA humana designada "Soares Breast 3NbHBst", que se construyó utilizando mRNA de un tejido mamario de hembra humana adulta. Hasta donde puede comprobarse este era tejido mamario normal. La secuenciación del DNA de XPT se realizó de acuerdo con el Análisis Molecular Integrado del Consorcio de Expresión del Genoma (IMAGE Consortium), que solicita bibliotecas de cDNA de laboratorios de todo el mundo, dispone los clones de cDNA, y proporciona los mismos a otras organizaciones para secuenciación.

25

30

35

La secuencia XPT que se muestra en la base de datos tenía una longitud de 419 nucleótidos, y codificaba una secuencia de aminoácidos similar a los 100 aminoácidos C-terminales de VEGF-C, es decir aproximadamente los residuos 250 a 350, utilizando el sistema de numeración de Joukov *et al* (1996). Se encuentran análogamente regiones ricas en cisteína en otras proteínas, que carecen totalmente de relación en función con la familia VEGF, por ejemplo la proteína secretada semejante a seda sp185 sintetizada en las glándulas salivares del jején *Chironomus tentans*. Esta proteína es codificada por el gen BR3, localizado en un anillo de Balbiani, un "puff" de cromosomas específico de tejido encontrado en los cromosomas politénicos de la glándula salivar del jején (Dignam y Case: Gene, 1990, 88, 133-140; Paulsson *et al*, J. Mol. Biol., 1990 211, 331-349). Se afirma en Joukov *et al* (1996) que el resto estructural semejante a sp185 en VEGF-C puede plegarse en un dominio independiente, que se cree se encuentra al menos parcialmente escindido después de la biosíntesis, y que existe al menos un resto cisteína del tipo sp185 en la región C-terminal de VEGF.

40

45

La Figura 3 de Joukov *et al* muestra que los dos tercios finales de la región C-terminal rica en cisteína de VEGF-C no están alineados con VEGF o PIGF y de hecho podrían considerarse como una extensión C-terminal de VEGF-C que no está presente en VEGF o PIGF. La secuencia codificada por XPT es similar a esta extensión. Dado que el cDNA de XPT estaba truncado en su extremo 5', no era posible deducir o predecir cualquier secuencia de aminoácidos para regiones N-terminales respecto al dominio rico en cisteína. Así, la porción de VEGF-C que es similar a la secuencia derivada de XPT no se extiende a las regiones de VEGF-C que están conservadas entre otros miembros de la familia VEGF.

50

Como se ha descrito arriba, no era posible predecir si la región N-terminal de polipéptido codificado por un ácido nucleico de XPT de longitud total (en lo que se diferencia del cDNA truncado de XPT consignado en dbEST) podría mostrar cualquier homología adicional con cualquier miembro de la familia VEGF, en particular VEGF-C, que tiene 250 aminoácidos N-terminales adicionales. Por ejemplo, la proteína existente naturalmente codificada por un

55

ácido nucleico de XPT de longitud total podría haber sido el homólogo humano de la proteína de la glándula salivar del jején. Alternativamente, el tipo de resto rico en cisteína codificado por el cDNA de XPT truncado podría estar distribuido ampliamente entre las proteínas, al igual que muchos dominios estructurales. Por ejemplo, agrupaciones de residuos cisteína pueden estar implicadas en la fijación de metales, formación de enlaces disulfuro intramoleculares para promover el plegado exacto de las proteínas, o la formación de enlaces disulfuro intermoleculares para ensamblaje de subunidades de proteínas en complejos (Dignam y Chase, 1990). Con objeto de determinar si el cDNA truncado de XPT se derivaba de secuencias codificantes de una molécula afín a VEGF, fue necesario aislar un cDNA de longitud mucho mayor.

Ejemplo 2 Clonación de cDNA Codificante de VEGF-D

Una muestra del cDNA de XPT consignada en dbEST se obtuvo de la American Type Culture Collection, que es un suministrador registrado de clones de cDNA obtenidos por el IMAGE Consortium. La identidad del cDNA de XPT se confirmó por secuenciación de nucleótidos, utilizando el método de terminación de cadenas didesoxi (Sanger *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 5463-5467).

El cDNA de XPT se utilizó como sonda de hibridación para cribar una biblioteca de cDNA de mama humana, que se obtuvo comercialmente de Clontech. Se aisló un clon positivo, y este clon se secuenció luego en ambas cadenas. Se recopiló la secuencia de nucleótidos, y se identificó un marco de lectura abierto. La secuencia de ácido nucleico se expone en SEQ ID NO. 1. El polipéptido codificado por esta secuencia se designó VEGF-D, y su secuencia deducida de aminoácidos, designada SEQ ID NO. 3, se presenta en la Figura 3. En la Figura 3, los sitios supuestos de glicosilación enlazados a N, con la secuencia de consenso N-X-S/T, en la cual X es cualquier aminoácido, se indican por los recuadros.

Ejemplo 3 Características de VEGF-D (comparativo)

La secuencia de aminoácidos de VEGF-D se comparó con las de VEGF-A₁₆₅, VEGF-B, VEGF-C y PIGF humanas. Estas comparaciones se exponen en las Figuras 1a a d respectivamente. Se calculó el grado de homología de secuencia se calculó, y si las lagunas en la secuencia introducidas para los propósitos de alineación no se consideran en el cálculo, VEGF-D tiene identidad de 31% con VEGF, identidad de 48% con respecto a VEGF-C, identidad de 28% con respecto a VEGF-B e identidad de 32% con respecto a PIGF. Así pues, la proteína más estrechamente afín identificada era VEGF-C.

Búsquedas por ordenador de las bases de datos de ácido nucleico GenBank, EMBL y SwissProt no revelaron ninguna secuencia de proteína idéntica a VEGF-D. Como era de esperar por la alineación de secuencias a que se ha hecho referencia anteriormente, la proteína más estrechamente afín encontrada en esta base de datos era VEGF-C. Se realizaron también búsquedas de dbEST, pero no revelaron secuencia alguna que abarcara la región codificante completa de VEGF-D. La secuencia de VEGF-D no está relacionada con la del ligando 1 de Tie-2 como se describe en WO 96/11269.

Es importante tener en cuenta que las únicas homologías detectadas se encontraban al nivel de la secuencia de aminoácidos. Por tanto, no habría sido posible aislar el cDNA o gDNA codificante de VEGF-D por métodos tales como hibridación a baja severidad con una secuencia de ácido nucleico codificante de otro miembro de la familia VEGF.

VEGF-D parece ser el más estrechamente relacionado con los VEGF-C de todos los miembros de la familia VEGF. Dado que la secuencia de aminoácidos de VEGF-D incluye el resto semejante a sp185 rico en cisteína que se encuentra en VEGF-C, el polipéptido de la invención puede jugar un papel funcional importante en los endotelios linfáticos. Si bien no se pretende quedar ligados por mecanismo propuesto alguno, se cree que VEGF-C y VEGF-D pueden constituir una matriz de tipo seda sobre la cual pueden crecer las células endoteliales. Los vasos linfáticos no tienen membrana basal alguna, por lo que la matriz de tipo seda puede formar un material base semejante a una membrana. Esto puede ser importante en la promoción del crecimiento celular y/o en la diferenciación celular, y puede ser relevante para el cáncer, especialmente las metástasis, la terapia con fármacos, la prognosis del cáncer, etc.

Ejemplo 4 Características Biológicas de VEGF-D

La secuencia de cDNA de VEGF-D se utilizó para predecir la secuencia de aminoácidos deducida de VEGF-D, las características bioquímicas del polipéptido codificado, con inclusión de los números de aminoácidos fuertemente básicos, fuertemente ácidos, hidrófobos y polares, el peso molecular, el punto isoeléctrico, la carga a pH 7, y el análisis de la composición de la proteína total. Este análisis se realizó utilizando el programa de análisis de proteínas Protean, Version 1.20 (DATASTAR). Estos resultados se resumen a continuación en las Tablas 1 y 2. La Tabla 1 muestra también el uso de codones.

Tabla 1

Secuencia de DNA Traducida del cóntigo x de VEGF-D (1,978) Con el Código Genético Estándar

ES 2 390 107 T3

Peso molecular 37056, 60 Daltons

425 aminoácidos

46 aminoácidos básicos fuertes (+)(K, R)

41 aminoácidos ácidos fuertes (-)(D, E)

5 79 aminoácidos hidrófobos (A, I, L, F, W, V)

108 aminoácidos polares (N, C, Q, S, T, Y)

Punto Isoeléctrico 7,792

Carga a pH 7,0 6,371

El número total de bases traducidas es 978

10 %A = 28,73 [281]

%G = 23,11 [226]

%T = 23,21 [227]

%C = 24,95 [244]

% Ambiguo = 0,00 [0]

15 %A+T = 51,94 [508]

% C+G = 48,06 [470]

Temp. de fusión Davis, Botstein, Roth, °C 84,09

Temp. Wallace, °C

3384,00

20

Tabla 1 (cont.)

Uso de codones:				
ccg ()	0 # ugc Cys (C)	14 # cuc Leu (L)	6 # ucg Ser (S)	
uaa ()	0 # ugu Cys (C)	16 # cug Leu (L)	4 # ucu Ser (S)	
uag ()	0 # --- Cys (C)	30 # cuu Leu (L)	2 # --- Ser (S)	3
--- ()	0 # caa Gln (Q)	1 # uua Leu (L)	1 # uga Ter (.)	
gca Ala (A)	5 # cag Gln (Q)	11 # uug Leu (L)	5 # --- Ter (.)	
gcc Ala (A)	4 # --- Gln (Q)	12 # --- Leu (L)	23 # aca Thr (T)	
gcg Ala (A)	1 # gaa Glu (E)	16 # aaa Lys (K)	13 # acc Thr (T)	
gcu Ala (A)	5 # gag Glu (E)	12 # aag Lys (K)	10 # acg Thr (T)	
--- Ala (A)	15 # --- Glu (E)	28 # --- Lys (K)	23 # acu Thr (T)	
aga Arg (R)	7 # gga Gly (G)	1 # aug Met (M)	6 # --- Thr (T)	2
agg Arg (R)	5 # ggc Gly (G)	2 # --- Met (M)	6 # ugg Trp (W)	
cga Arg (R)	5 # ggg Gly (G)	3 # uuc Phe (F)	4 # --- Trp (W)	
cgc Arg (R)	4 # ggu Gly (G)	2 # uuu Phe (F)	8 # uac Tyr (Y)	
cgg Arg (R)	1 # --- Gly (G)	8 # --- Phe (F)	12 # uau Tyr (Y)	
cgu Arg (R)	1 # cac His (H)	7 # cca Pro (P)	9 # --- Tyr (Y)	
--- Arg (R)	23 # cau His (H)	7 # ccc Pro (P)	6 # gua Val (V)	
aac Asn (N)	5 # --- His (H)	14 # ccu Pro (P)	8 # guc Val (V)	
aau Asn (N)	4 # aua Ile (I)	2 # --- Pro (P)	23 # gug Val (V)	
--- Asn (N)	9 # auc Ile (I)	6 # agc Ser (S)	6 # guu Val (V)	
gac Asp (D)	8 # auu Ile (I)	5 # agu Ser (S)	8 # --- Val (V)	1
gau Asp (D)	5 # --- Ile (I)	13 # uca Ser (S)	5 # nnn ??? (X)	
gaa Asp (D)	5 # --- Ile (I)	13 # uca Ser (S)	5 # nnn ??? (X)	
--- Asp (D)	13 # cua Leu (L)	5 # ucc Ser (S)	7 # TOTAL	32

Cóntigo 2:

Longitud del cóntigo:	2379 bases
Longitud media/secuencia:	354 bases
Longitud total de la secuencia:	4969 bases

Tabla 2

Clase Estructural Predicha de la Proteína Total: Modificación de Deléage & Roux de Nishikawa & Ooi 1987

Análisis	Proteína Total
Peso molecular	37056,60 p.m.
Longitud	325
1 microgramo =	26,986 pMoles
Coefficiente de Extinción	30.200 ± 5%
Molar	
1 A(280) =	1,23 mg/ml
Punto Isoeléctrico	7,79
Carga a pH 7	6,37

Tabla 2 (cont.)

Análisis de Composición de la Proteína Total

Aminoácido(s)	Recuento numérico	% en Peso	% por Frecuencia
Cargados (RKHYCDE)	134	46.30	41.23
Ácidos (DS)	41	13.79	12.62
Básicos (KR)	46	17.65	14.15
Polares (NCQSTY)	108	30.08	33.23
Hidrófobos (AILFWV)	79	23.86	24.31
A Ala	15	2.88	4.62
C Cys	30	8.35	9.23
D Asp	13	4.04	4.00
E Glu	28	9.75	8.62
F Phe	12	4.77	3.69
G Gly	8	1.23	2.46
H His	14	5.18	4.31
I Ile	13	3.97	4.00
K Lys	23	7.96	7.08
L Leu	23	7.03	7.08
M Met	6	2.12	1.85
N Asn	9	2.77	2.77
P Pro	23	6.08	7.08
Q Gln	12	4.15	3.69
R Arg	23	9.69	7.08
S Ser	33	7.76	10.15
T Thr	21	5.73	6.46
V Val	12	3.21	3.69
W Trp	4	2.01	1.23
Y Tyr	3	1.32	0.92
B Amx	0	0.00	0.00
Z Glx	0	0.00	0.00
X Xxx	0	0.00	0.00
. Ter	0	0.00	0.00

5 Este análisis predice un peso molecular para el monómero de VEGF-D no procesado de 37 kilodaltons (kD), comparado con los valores determinados experimentalmente (para

los péptidos totalmente procesados) de 20 a 27 kD para monómeros de VEGF-A, 21 kD para el monómero de VEGF-B y 23 kD para el monómero de VEGF-C.

Ejemplo 5

10 El aislamiento original de un cDNA para VEGF-D, descrito en el Ejemplo 2 implicaba el cribado de hibridación de una biblioteca de cDNA de mama humano. Dado que se aisló de este modo únicamente un solo clon de cDNA para VEGF-D, no fue posible confirmar la estructura del cDNA por comparación con otros cDNAs de VEGF-D aislados independientemente. El trabajo descrito en este ejemplo, que implicaba aislamiento de clones de cDNA de VEGF-D humano adicionales, se llevó a cabo con objeto de confirmar la estructura del cDNA de VEGF-D humano. Adicionalmente, se aislaron clones de cDNA de VEGF-D de ratón.

Dos bibliotecas de cDNA que se habían obtenido comercialmente de Stratagene, una para pulmón humano y una para pulmón de ratón (números de catálogo 937210 y 936307, respectivamente), se utilizaron para cribado de hibridación con una sonda de cDNA de VEGF-D. La sonda, que abarcaba desde los nucleótidos 1817 a 2495 de CDNA para VEGF-D humano descrito en el Ejemplo 2, se generó por reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando un plásmido que contenía el cDNA de VEGF-D como molde y los dos oligonucleótidos siguientes:

5' -GGGCTGCTTCTAGTTTGGAG (SEQ ID NO. 10), y
5' -CACTCGCAACGATCTTCGTC (SEQ ID NO. 11).

Aproximadamente dos millones de bacteriófagos recombinantes se cribaron con esta sonda de cada una de las dos bibliotecas de cDNA. Se aislaron subsiguientemente nueve clones de cDNA humanos y seis de ratón para VEGF-D.

Dos de los nueve clones humanos de cDNA para VEGF-D se secuenciaron completamente utilizando el método de terminación de cadenas dideoxi (Sanger *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 5463-5467). Los dos cDNAs contenían la región codificante entera para VEGF-D humano, y eran idénticos excepto que uno de los clones era cinco nucleótidos más largo que el otro en el término 5'. La secuencia de nucleótidos del cDNA más corto se muestra en la Figura 4, y se designa como SEQ ID NO. 4. La secuencia de aminoácidos para VEGF-D humano (hVEGF-D) deducida de este cDNA tenía una longitud de 354 residuos, y se muestra en la Figura 5; ésta se designa como SEQ ID NO. 5. Se determinaron también las secuencias de las regiones 5' de cinco de los otros clones de cDNA de VEGF-D humanos. Para cada clon, la secuencia que se caracterizó contenía más de 100 nucleótidos de DNA inmediatamente aguas abajo del sitio de comienzo de la traducción de la región codificante. En todos los casos, las secuencias de estas regiones eran idénticas a regiones correspondientes del cDNA de VEGF-D humano que se muestra en la Figura 4.

Los seis clones de cDNA de ratón para VEGF-D se secuenciaron completamente. Sólo dos de los clones contenían una región codificante entera para VEGF-D; los otros clones estaban truncados. Las secuencias de nucleótidos de los dos clones con la región codificante entera son diferentes, y codifican secuencias de aminoácidos de tamaños diferentes. La secuencia de aminoácidos más larga se designa como mVEGF-D1, y la secuencia más corta se designa mVEGF-D2. Las secuencias de nucleótidos de los cDNAs que codifican un mVEGF-1 y mVEGF-2 se muestran en las Figuras 6 y 7 respectivamente. Las secuencias de aminoácidos deducidas para mVEGF-D1 y mVEGF-2 se muestran en la Figura 8. Estas secuencias se designan respectivamente SEQ ID Nos. 6, 7, 8 y 9. Las diferencias entre las secuencias de aminoácidos son:

i) una inserción de cinco aminoácidos (DFSFE) después del residuo 30 en mVEGF-D1 en comparación con mVEGF-D2;

ii) divergencia completa de los extremos C-terminales después del residuo 317 en mVEGF-D1 y el residuo 312 en VEGF-D2, que da como resultado que mVEGF-D1 sea considerablemente más larga.

Tres de los cuatro cDNAs truncados para VEGF-D de ratón codificaban la región C-terminal, pero no los 50 aminoácidos N-terminales. Estos tres cDNAs codificaban un extremo C-terminal para VEGF-D que es idéntico al correspondiente a mVEGF-D2. El otro cDNA truncado codificaba únicamente la mitad N-terminal de VEGF-D. La secuencia de aminoácidos deducida de este cDNA contenía los cinco aminoácidos DFSFE inmediatamente después del residuo 30 encontrado en mVEGF-D1, pero no en mVEGF-D2.

Como se ha descrito arriba, la secuencia total del clon de cDNA de VEGF-D humano considerado en este ejemplo ha sido validada por comparación con la correspondiente a un segundo clon humano. Adicionalmente, se encontró que la secuencia del extremo 5' de la región codificante era idéntica en otros cinco clones de cDNA de VEGF-D humanos. En contraste, la secuencia consignada en el Ejemplo 2 contenía la mayor parte de la región codificante para VEGF-D, pero era incorrecta cerca del extremo 5' de esta región. Esto era debido probablemente a que el cDNA de VEGF-D estaba truncado cerca del extremo 5' de la región codificante y en dicho punto se había ligado con otro cDNA no identificado, y por consiguiente los primeros 30 codones de la secuencia codificante verdadera para VEGF-D habían sido delecionados y reemplazados con un residuo metionina. Este residuo metionina se definió como el aminoácido N-terminal de la secuencia de VEGF-D presentada en el Ejemplo 2.

Las regiones N-terminales de las secuencias de aminoácidos deducidas de VEGF-D1 y VEGF-D2 de ratón son muy similares a la deducida para VEGF-D humano (véase la Figura 9). Esto indica también que la secuencia de aminoácidos correcta deducida para VEGF-D humano es la consignada en este ejemplo. Los 25 aminoácidos N-terminales de VEGF-D humano forman una región extremadamente hidrófoba, lo cual es consistente con la idea de que parte de esta región puede ser una secuencia señal para la secreción de proteínas. La Figura 10 muestra la alineación de la secuencia de VEGF-D humano con las secuencias de otros miembros de la familia VEGF de factores de crecimiento, a saber VEGF₁₆₅ humana (hVEGF₁₆₅), VEGF-B humana (hVEGF-B), VEGF-C humana (hVEGF-C) y Factor de Crecimiento Placentario humano (hPIGF). Cuando las lagunas en las alineaciones se ignoran para los propósitos de cálculo, se encuentra que VEGF-D humano tiene una identidad de 31% en la secuencia de aminoácidos con VEGF₁₆₅ humano, 28% de identidad con VEGF-B humano, 48% de identidad con

VEGF-C y 32% de identidad con PlGF humano. Claramente, VEGF-C es el miembro de esta familia que está más estrechamente relacionado con VEGF-D.

Las diferencias en secuencia para VEGF-D1 y VEGF-D2 de ratón se originan muy probablemente por remodelación diferencial de mRNA. Los 41 residuos de aminoácidos C-terminales de VEGF-D1 están deletados en VEGF-D2, y están reemplazados con 9 residuos que no están relacionados estrechamente con la secuencia de VEGF-D1. Por consiguiente, 4 residuos de cisteína presentes cerca del término C de VEGF-D1 están deletados en VEGF-D2. Este cambio puede alterar las estructuras terciaria o cuaternaria de la proteína, o puede afectar a la localización de la proteína en la célula o el entorno extracelular. El extremo C-terminal de VEGF-D humano se asemeja al de la VEGF-D1 de ratón, no a la VEGF-D2 de ratón. La pequeña inserción de 5 aminoácidos después del residuo 30 en VEGF-D1 de ratón, que no está presente en VEGF-D2 de ratón o en VEGF-D humano, puede influir en el procesamiento proteolítico de la proteína.

VEGF-D está altamente conservada entre ratón y hombre. 85% de los residuos de aminoácidos de VEGF-D humano son idénticos en VEGF-D1 de ratón. Es probable que esto refleje la conservación de la función de las proteínas. Funciones supuestas para VEGF-D han sido propuestas en esta memoria. Aunque no se han encontrado formas alternativas de cDNA de VEGF-D humano, es posible que la variación de DNA de remodelación que da lugar a numerosas formas de mRNA para VEGF-D de ratón pueda ocurrir también en los tejidos humanos.

Ejemplo 6 Expresión de VEGF-D en células COS

Un fragmento del cDNA humano para VEGF-D, que abarca desde el nucleótido 1 al 1520 de la secuencia que se muestra en la Figura 4 y que contiene la región codificante entera, se insertó en el vector de expresión de mamífero pCDNA1-amp. Se utilizó el vector para transfectar transitoriamente células COS por el método DEAE-Dextrano como se ha descrito previamente (Arufo y Seed, 1987) y los medios de cultivo de células acondicionados resultantes, recogidos después de 7 días de incubación, se concentraron utilizando concentradores Amicon (Centricon 10, con un punto de corte por peso molecular de 10.000) de acuerdo con el fabricante. Los plásmidos utilizados para las transfecciones eran el constructo de expresión para VEGF-D humano y, como control positivo, un constructo fabricado por inserción de cDNA de VEGF-A de ratón en pCDNA1-amp. Los medios acondicionados se testaron en dos bioensayos diferentes, como se describe más adelante, y los resultados demuestran que las células COS expresaban y secretaban de hecho VEGF-D biológicamente activa.

Ejemplo 7 Bioensayo para Capacidad de VEGF-D para Fijación al Receptor-2 de VEGF

Como se muestra en el Ejemplo 5, VEGF-D está estrechamente relacionada en estructura primaria con otros miembros de la familia VEGF. La mayoría de los miembros de esta familia de proteínas son mitógenos y/o quimiotácticos para las células endoteliales (Keck *et al*, 1989; Leung *et al*, 1989; Joukov *et al*, 1996; Olofsson *et al*, 1996). Además, VEGF-A (conocido previamente como VEGF), el primer miembro de la familia VEGF que se describe en la bibliografía, es un inductor potente de la permeabilidad vascular (Keck *et al*, 1989). Dado que la estructura de las proteínas es un determinante importante de la función de las mismas, parece probable que VEGF-D pudiera ser mitógeno también para las células endoteliales o inducir permeabilidad vascular. Por esta razón, se testó VEGF-D humano en un bioensayo para la determinación de su capacidad para fijarse al receptor-2 de VEGF (VEGFR2; conocido también como Flk-1), un receptor específico de las células endoteliales que, cuando es activado por VEGF-A, se cree que da lugar a una señal mitógena (Strawn *et al*, 1996).

Un bioensayo para la detección de factores de crecimiento que se fijan a VEGFR2 ha sido desarrollado en la línea de células Ba/F3 dependiente de factores, y se describe en la Solicitud de Patente previa de los mismos inventores, No. PCT/US95/16755. Estas células crecen en presencia de interleuquina-3 (IL-3); sin embargo, la eliminación de este factor da como resultado la muerte celular en el transcurso de 48 horas. Si se transfecta a las células Ba/F3 otro receptor capaz de suministrar un estímulo de crecimiento, las células pueden ser rescatadas por el factor de crecimiento específico que activa dicho receptor cuando se cultivan las células en medio de carece de IL-3. En el caso específico de tirosina-quinazas de tipo receptor (v.g. VEGFR2), pueden utilizarse receptores quiméricos que contienen el dominio extracelular de la tirosina-quinasa receptora y los dominios transmembranal y citoplásmico del receptor eritropoyetina (EpoR). En este caso, la estimulación con el ligando (v.g. VEGF), que se fija al dominio extracelular del receptor quimérico, da como resultado una señalización por el dominio citoplásmico de EpoR y el rescate subsiguiente de la línea de células en medio de crecimiento que carece de IL-3. La construcción del receptor quimérico utilizado en este estudio, constituido por el dominio extracelular de VEGFR2 de ratón y los dominios transmembranal y citoplásmico de EpoR, y el bioensayo propiamente dicho se describen más adelante.

Construcción del Plásmido

i) Construcción de un plásmido para generación de receptores quiméricos VEGFR2

Para obtener un constructo plasmídico con el cual pudiera ligarse fácilmente DNA codificante del dominio extracelular de VEGFR2 de ratón con DNA codificante de otros dominios proteínicos, se utilizó mutagénesis orientada a fin de generar un sitio de la enzima de restricción BglII en la posición del cDNA de VEGFR2 de ratón que codificaba la unión del dominio extracelular y el dominio transmembranal. El clon de longitud total del cDNA de VEGFR2 de ratón descrito por Oelrichs *et al* (1993) se subclonó en el vector de expresión de mamífero pCDNA1-

amp, utilizando el sitio de la enzima de restricción BstXI. Se generó DNA monocatenario UTP+ utilizando el origen de replicación M13, y se utilizó éste como molde para generar cDNA de VEGFR2 de ratón que contenía el sitio BglII en la posición deseada. El plásmido que contenía el cDNA de VEGFR2 alterado se designó pVEGFR2Bgl. Los fragmentos de DNA que codifican los dominios transmembranal y citoplásmico de cualquier receptor pueden insertarse en el sitio BglII de pVEGFR2bgl a fin de generar vectores VEGFR2 quiméricos.

ii) Construcción del receptor quimérico VEGFR2/EpoR

El cDNA de EpoR de ratón se subclonó en el vector de expresión pCDNA1-amp, y se generó DNA monocatenario como molde para mutagénesis. Se insertó un sitio de la enzima de restricción BglII en el cDNA de EpoR en la posición codificante de la unión de los dominios transmembranal y extracelular de EpoR para permitir la ligación directa de este fragmento de DNA con el cDNA modificado codificante del dominio extracelular de VEGFR2 en pVEGFR2Bgl. Adicionalmente, se eliminó un sitio BglII en el dominio citoplásmico de EpoR por una sustitución silenciosa de un solo nucleótido. El fragmento de DNA que codificaba los dominios transmembranal y citoplásmico de EpoR se utilizó luego para reemplazar la porción de pVEGFR2Bgl codificante de los dominios transmembranal y citoplásmico de VEGFR2. De este modo se generó un solo marco de lectura que codificaba el receptor quimérico constituido por el dominio extracelular de VEGFR2 y los dominios transmembranal y citoplásmico de EpoR.

El fragmento de DNA que codificaba el receptor quimérico se subclonó en el vector de expresión pBOS, y se cotransfectó en la línea de células Ba/F3 con el plásmido pgk-neo en una relación de 1:20. Las células que expresaban la proteína VEGFR2-EpoR se seleccionaron por análisis mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal para el dominio extracelular de VEGFR2 (MAb 4H3). Este anticuerpo monoclonal se describe en la Solicitud de Patente Australiana No. PM 3794 presentada el 10 de febrero de 1994. Se seleccionaron líneas de células que expresaban niveles mayores de VEGFR2-EpoR por cultivo de las células en 5 µg/ml de MAb 4H3 o 25 ng/ml de VEGF recombinante. Se utilizó para el bioensayo una línea de células que expresaba niveles elevados de VEGFR2-EpoR, designada Ba/F3-NYK-EpoR.

El Bioensayo

Las células Ba/F3-NYK-EpoR arriba descritas se lavaron tres veces en PBS para eliminar totalmente IL-3 y se resuspendieron a una concentración de 1000 células por 13,5 µl de medio de cultivo y se dosificaron partes alícuotas de 13,5 µl por pocillo de una placa Terasaki de 60 pocillos. Se diluyeron luego medios acondicionados de células COS transfectadas en el medio de cultivo de las células. Como línea de células de control insensible se utilizaron células que expresaban un receptor quimérico constituido por el dominio extracelular Tie2 del receptor de células endoteliales y los dominios transmembranal y citoplásmico de EpoR. Las células se incubaron por espacio de 48-96 horas, durante cuyo tiempo las células incubadas exclusivamente en el medio de cultivo de células habían muerto y se registró la supervivencia/proliferación relativa observada en los otros pocillos (es decir en presencia de medio acondicionado de células COS) por recuento de las células viables presentes por pocillo.

El medio acondicionado de células COS que se había transfectado transitoriamente con plásmidos de expresión se concentró 30 veces y se utilizó en el bioensayo de VEGFR2. El medio concentrado acondicionado de células COS transfectadas con pCDNA1-amp se utilizó como control negativo.

Los resultados se muestran en la Figura 11, representándose el porcentaje de medio acondicionado de células COS concentrado 30 veces en el medio de incubación (vol/vol) en función del número de células viables en el pocillo después de 48 horas de incubación. Claramente, el medio acondicionado que contenía VEGF-A o VEGF-D era capaz de promover la supervivencia celular en este ensayo, lo que indicaba que ambas proteínas pueden fijarse a VEGFR2 y activarlo.

Ejemplo 8 Ensayo de Permeabilidad Vascular (comparativo)

VEGF-D humano, preparada como en el Ejemplo 6 y concentrada 30 veces, se testó en el ensayo de permeabilidad vascular de Miles (Miles y Miles, 1952) realizado en cobayos anestesiados (albino/blanco, 300-400 g). El medio concentrado acondicionado para células COS transfectadas con pCDNA1-amp se utilizó de nuevo como control negativo. Se anestesiaron cobayos con hidrato de cloral (3,6 g/100 ml; 0,1 ml por 10 g de peso corporal). Los lomos de los animales se afeitaron luego cuidadosamente con maquinillas de esquila. Se suministró a los animales una inyección intracardiaca del colorante Azul Evans (0,5% en MT PBS, 0,5 ml) utilizando una aguja 23G, y se inyectaron luego por vía intradérmica con 100-150 µl de medio concentrado acondicionado con células COS. Después de 15-20 min, se sacrificaron los animales y se extirpó la capa de la piel del lomo para dejar al descubierto los vasos sanguíneos subyacentes. Para la cuantificación, el área de cada inyección se extirpó y se calentó a 45°C en 2-5 ml de formamida. Los sobrenadantes resultantes, que contenían el colorante extravasado, se examinaron luego espectrofotométricamente a 620 nm.

Para el animal 1, la absorbancia a 620 nm procedente de la inyección de medio concentrado 30 veces acondicionado con VEGF-A era 0,178, la correspondiente al medio concentrado 30 veces acondicionado de VEGF-D era 0,114, y la correspondiente al medio concentrado 30 veces de células transfectadas con pCDNA1-amp era 0,004. Para el animal 2, los medios concentrados 30 veces se diluyeron 4 veces en medio de cultivo de células antes de la inyección intradérmica. La absorbancia a 620 nm para el medio acondicionado con VEGF-A era 0,141, la

correspondiente a la muestra acondicionada con VEGF-D era 0,116 y la correspondiente a una muestra coincidente respecto al contenido de suero como control negativo era 0,017. La extravasación incrementada de colorante observada para los animales, tanto en presencia de VEGF-A como de VEGF-D demostró que ambas proteínas inducían fuertemente la permeabilidad vascular.

- 5 Los datos aquí expuestos indican que VEGF-D es una proteína secretada que, al igual que VEGF-A, se fija a y activa VEGFR2 y puede inducir permeabilidad vascular.

Ejemplo 9 Bioactividades de los Polipéptidos VEGF-D Internos

10 La secuencia de aminoácidos deducida para VEGF-D incluye una región central que es similar en secuencia a todos los restantes miembros de la familia VEGF (aproximadamente los residuos 101 a 196 de la secuencia de aminoácidos de VEGF-D humano como se muestra en la alineación de la Figura 10). Por esta razón, se pensó que la porción bioactiva de VEGF-D podría residir en la región conservada. Con objeto de testar esta hipótesis, se estudió la biosíntesis de VEGF-D, y la región conservada de VEGF-D humano se expresó en células de mamífero, se purificó y se testó en bioensayos como se describe más adelante.

Construcción de plásmidos

15 Un fragmento de DNA que codificaba la porción de VEGF-D humano desde el residuo 93 al 201, es decir, con las regiones N- y C-terminales eliminadas, se amplificó por reacción en cadena de polimerasa con DNA-polimerasa *Pfu*, utilizando como molde un plásmido que comprendía cDNA de VEGF-D humano de longitud total. El fragmento de DNA amplificado, cuya secuencia se confirmó por secuenciación de nucleótidos se insertó luego en el vector de expresión pEFBOSSFLAG para originar un plásmido designado pEFBOSVEGFD Δ N Δ C. El vector pEFBOSSFLAG contiene DNA codificante de la secuencia señal para secreción de proteína por el gen de interleuquina-3 (IL-3) y el octapéptido FLAGTM. El octapéptido FLAGTM puede ser reconocido por anticuerpos disponibles comercialmente tales como el anticuerpo monoclonal M2 (IBI/Kodak). El fragmento PCR de VEGF-D se insertó en el vector de tal manera que la secuencia señal de IL-3 se encontraba inmediatamente aguas arriba de la secuencia FLAGTM, que se encontraba a su vez inmediatamente aguas arriba de la secuencia VEGF-D. Las tres secuencias citadas se encontraban en el mismo marco de lectura, por lo que la traducción de mRNA resultante de la transfección de pEFBOSVEGFD Δ N Δ C en células de mamífero podría dar lugar a una proteína que tuviera la secuencia señal de IL-3 en su término N, seguido por el octapéptido FLAGTM y la secuencia VEGF-D. La escisión de la secuencia señal y la secreción subsiguiente de la proteína por la célula podría dar lugar a un polipéptido de VEGF-D que está marcado con el octapéptido FLAGTM adyacente al término N. Esta proteína se designó VEGFD Δ N Δ C.

20

25

30

Adicionalmente, se construyó un segundo plásmido, designado pEFBOSVEGFD Δ fullFLAG, en el cual la secuencia codificante de longitud total de VEGF-D humano estaba insertada en pEFBOSIFLAG de tal modo que la secuencia para el octapéptido FLAGTM se encontraba inmediatamente aguas arriba de, y en el mismo marco de lectura que la secuencia codificante de VEGF-D. El plásmido pEFBOSIFLAG carece de la secuencia señal de IL-3, por lo que la secreción de la proteína de fusión VEGF-D/FLAG estaba dirigida por la secuencia señal de VEGF-D. Se diseñó pEFBOSVEGFD Δ fullFLAG para dirigir la expresión en células de mamífero de VEGF-D de longitud total que estaba marcada en el terminal C con el octapéptido FLAGTM. Esta proteína se designa VEGFD Δ fullFLAG, y es útil para el estudio de la biosíntesis de VEGF-D.

35

Análisis del Procesamiento de VEGF-D Posterior a la Traducción

40 Para examinar si el polipéptido VEGF-D se procesa para dar una proteína madura y totalmente activa, se transfectó transitoriamente pEFBOSVEGFD Δ fullFLAG en células COS (Aruffo y Seed, 1987). La expresión en células COS seguida por marcación biosintética con ³⁵S-metionina/cisteína e inmunoprecipitación con gel M2 ha demostrado la presencia de especies de aproximadamente 43 kd (fA) y 25 kd (fB) (Figura 12A). Estas bandas son consistentes con la idea de que VEGF-D se escinde para dar un fragmento C-terminal (marcado con FLAGTM) y un péptido interno (que corresponde aproximadamente a la proteína VEGFD Δ N Δ C). La reducción de los inmunoprecipitados (M2*) proporciona cierta reducción de la banda fA, lo que indica el potencial para enlaces disulfuro entre los dos fragmentos.

45

Expresión y Purificación del Polipéptido Interno VEGF-D

50 Se utilizó el plásmido pEFBOSVEGFD Δ N Δ C para transfectar transitoriamente células COS por el método DEAE-Dextrano como se ha descrito previamente (Aruffo y Seed, 1987). El medio de cultivo de células acondicionado resultante (aproximadamente 150 ml), recogido después de 7 días de incubación, se sometió a cromatografía de afinidad utilizando una resina a la cual se había acoplado el anticuerpo monoclonal M2. Resumidamente, el medio se hizo pasar por lotes a través de una columna de anticuerpo M2 de 1 ml durante aproximadamente 4 horas a 4°C. La columna se lavó luego concienzudamente con Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM antes de la elución con el péptido FLAGTM libre a 25 μ g/ml en el mismo tampón. El material resultante se utilizó para los bioensayos descritos más adelante.

55

Con objeto de detectar el VEGFD Δ N Δ C purificado, las fracciones eluidas de la columna de afinidad M2 se sometieron a análisis por transferencia Western. Partes alícuotas de las fracciones de la columna se combinaron con tampón de muestra 2 x SDS-PAGE, se hirvieron y se cargaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 15%. Las fracciones resueltas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y los sitios de fijación inespecíficos se bloquearon por incubación en Tris-NaCl/Tween 20 (TST) y polvo de leche desnatada al 10% (BLOTTO). Las membranas se incubaron luego con el anticuerpo monoclonal M2 o el anticuerpo de control a 3 μ g/ml durante 2 h a la temperatura ambiente, seguido por lavado concienzudo en TST. Las membranas se incubaron luego con un antisuero secundario anti-ratón de cabra conjugado a HRP durante 1 hora a la temperatura ambiente, seguido por lavado en tampón TST. La detección de las especies de proteínas se realizó utilizando un reactivo quimioluminiscente (ECL, Amersham) (Figura 12B).

En condiciones no reductoras, se detectó una especie de peso molecular aproximadamente 23 kD (VEGFD Δ N Δ C) por el anticuerpo M2. Esto es consistente con el peso molecular predicho para este fragmento interno (12.800) más glicosilación unida a N; VEGFD Δ N Δ C contiene dos sitios de glicosilación potenciales enlazados a N. Se detectó también una especie de aproximadamente 40 kD, y puede representar un dímero no covalente de la proteína de 23 kD (VEGFD Δ N Δ C).

Bioensayos

El bioensayo para la capacidad de los polipéptidos de fijarse al receptor-2 de VEGF se describe en detalle en el Ejemplo 7. Partes alícuotas de las fracciones eluidas de la columna de afinidad M2, que contenían la proteína VEGFD Δ N Δ C, se diluyeron en medio y se testaron en el bioensayo de VEGFR2 como se ha descrito previamente. La fracción #3 de la columna de afinidad, que se demostró contenía la proteína VEGFD Δ N Δ C purificada (Figura 12B), demostró una aptitud clara para inducir proliferación de la línea de células del bioensayo a una dilución de 1/100 de la fracción purificada (Figura 13). En comparación, el volumen vacío de la columna de afinidad (fracción #1) no exhibía actividad alguna, mientras que el medio acondicionado original VEGFD Δ N Δ C exhibía solamente una actividad débil.

El ensayo de permeabilidad vascular (Miles y Miles, 1952) se describe resumidamente en el Ejemplo 8. Partes alícuotas de VEGFD Δ N Δ C purificado, y muestras del volumen vacío de la columna de afinidad M2 (control negativo) se combinaron con medio y se inyectaron intradérmicamente en la piel de cobayos. Las regiones de la piel en los sitios de inyección se extirparon, y se eluyó el colorante extravasado. La absorbancia del colorante extravasado a 620 nm originado por la inyección de VEGFD Δ N Δ C purificado era $0,131 \pm 0,09$. En comparación, el valor para la absorbancia originada por la inyección de una muestra del volumen vacío era $0,092 \pm 0,020$. Por consiguiente, VEGFD Δ N Δ C inducía permeabilidad vascular, si bien el efecto era sólo marginal.

Debido a su capacidad para fijarse a VEGFR2 y su menor inducción de la permeabilidad vascular comparada con VEGF-D de longitud total, puede decirse que VEGF-D Δ N Δ C reduce relativamente la inducción de la permeabilidad vascular por VEGF-D a causa de inhibición competitiva. En este sentido, puede pensarse que el fragmento VEGF-D Δ N Δ C es un antagonista para VEGF-D en lo que respecta a la inducción de permeabilidad vascular.

Sumario

Dos factores han conducido a los autores de la invención a explorar fragmentos internos de VEGF-D en cuanto a actividad intensificada. En primer lugar, es la región central de VEGF-D la que exhibe homología de aminoácidos con todos los restantes miembros de la familia VEGF. En segundo lugar, el procesamiento proteolítico que da lugar a polipéptidos bioactivos internos ocurre para otros factores de crecimiento tales como PDGF-BB. Adicionalmente, la actividad observada con la proteína VEGF-D de longitud total en células COS era menor que para el medio acondicionado correspondiente de células COS transfectadas con VEGF-A.

Se predijo que la secuencia madura de VEGF-D podría derivarse de un fragmento contenido dentro de los residuos 92-205, con escisión en FAA[^]TFY e IIRR[^]SIQI.

El análisis por inmunoprecipitación de VEGF-D Δ full/FLAG expresada en células COS producía especies consistentes con la escisión proteolítica interna del polipéptido VEGF-D en estos sitios. Por esta razón, se produjo una forma truncada de VEGF-D, con las regiones terminales N y C eliminadas (VEGFD Δ N Δ C) y se expresó en células COS. Esta proteína se identificó y se purificó utilizando el anticuerpo M2. La proteína VEGFD Δ N Δ C era detectada también por el anticuerpo A2, que reconoce un péptido dentro del fragmento 92-205 de VEGF-D (no representado). Se evaluó VEGFD Δ N Δ C por el bioensayo VEGFR2 y el ensayo de permeabilidad vascular de Miles, y se demostró que se fija al receptor VEGFR2 y activa el mismo en un bioensayo diseñado para detectar la reticulación del dominio extracelular de VEGFR2. La inducción de permeabilidad vascular por este polipéptido en un ensayo Miles era en el mejor de los casos marginal, en contraste con el efecto de VEGF-A.

Ejemplo 10 VEGF-D se Fija a VEGFR-3 y lo Activa

El cDNA de VEGF-D humano se clonó en vectores lanzadera de baculovirus para la producción de VEGF-D recombinante. Además de los vectores lanzadera de baculovirus, que contenían el cDNA de VEGF-D sin modificar

(al que se hace referencia como "VEGF-D de longitud total"), se ensamblaron dos vectores lanzadera de baculovirus, en los cuales el cDNA de VEGF-D se modificó de las maneras siguientes.

En un constructo (al que se hace referencia como "VEGF-D-H₆ de longitud total") se añadió un marcador histidina C-terminal. En el otro constructo, se eliminaron los polipéptidos N- y C-terminales supuestos, se fusionó el péptido señal melitina en marco con el término N, y se añadió un marcador histidina al término C del dominio de homología de VEGF restante (al que se hace referencia como "ΔNΔC-MELsp-VEGF-D-H₆").

Para cada uno de los tres constructos, se amplificaron clones de baculovirus de dos o tres transfecciones independientes. El sobrenadante de células High Five (HF) se recogió 48 horas después de la infección con stocks de título de virus alto. El sobrenadante se ajustó a pH 7 con NaOH y se diluyó con un volumen de D-MEM (0,2% FCS).

Se testaron las muestras respecto a su aptitud para estimular la fosforilación de la tirosina de VEGFR-3 (receptor Flt4) en las células NIH3T3, como ha sido descrito por Joukov *et al*, 1996. El sobrenadante de las células no infectadas y el sobrenadante de las células infectadas con la variante corta de remodelación de VEGF-C, que no estimula la fosforilación de la tirosina de VEGFR-3, se utilizaron como control negativo. Como control positivo se utilizó VEGF-C modificada del mismo modo que ΔNΔC-melSP-VEGF-D-H₅. Los resultados se muestran en la Figura 14.

La aparición de bandas nuevas a 125 y 195 kD indica fosforilación, y por consiguiente activación del receptor.

Ejemplo 11 VEGF-D se Fija a VEGFR-2 y la Activa

Se clonó cDNA de VEGF-D humano modificado y sin modificar en vectores lanzadera de baculovirus para la producción de VEGF-D recombinante como se describe en el Ejemplo 10.

Para cada uno de los tres constructos de VEGF-D, VEGF-D-H₆ de longitud total, y ΔNΔC-melSP-VEGF-D-H₆, se amplificaron clones de baculovirus de dos o tres transfecciones independientes. El sobrenadante de las células High Five (HF) se recogió 48 horas después de la infección con stocks de alto título de virus. El sobrenadante se ajustó a pH 7 con NaOH y se diluyó con un volumen de D-MEM (0,2% FCS).

Los sobrenadantes acondicionados con las proteínas marcadas con histidina se testaron respecto a su aptitud para estimular la fosforilación de la tirosina del receptor KDR de acuerdo con Joukov *et al* (1996). KDR es el homólogo humano de flk1 (VEGFR-2).

El sobrenadante de las células no infectadas y el sobrenadante de las células infectadas con el mutante 156S de VEGF-C, que no estimula KDR, se utilizaron como controles negativos. Como controles positivos se utilizaron VEGF₁₆₅ y VEGF-C modificados del mismo modo que ΔNΔC-melSP-VEGF-D-H₆. Los resultados se muestran en la Figura 15.

La aparición de una nueva banda a aproximadamente 210 kD indica fosforilación, y por consiguiente activación, del receptor.

Ejemplo 12 Análisis de la Expresión del Gen VEGF-D

Con objeto de caracterizar el patrón de expresión del gen VEGF-D en los embriones humano y de ratón, se utilizaron cDNAs de VEGF-D como sondas de hibridación para análisis por transferencia Northern de RNA humano poliadenilado y para análisis de hibridación *in situ* con embriones de ratón.

Expresión del gen en el Adulto Humano

Un fragmento de 1,1 kb del cDNA de VEGF-D humano representado en la Figura 4 (SEQ ID NO. 4) que abarcaba desde el sitio *EcoRV* al término 3' (nucleótidos 911 a 2029) se marcó con [α-³²P]dATP utilizando el sistema de marcación de DNA Megaprime (Amersham) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó esta sonda para cribar transferencias Northern de tejidos múltiples humanos (Clontech) por hibridación, asimismo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estas transferencias contenían RNA poliadenilado obtenido de tejidos de humanos adultos que estaban aparentemente exentos de enfermedad. La autorradiografía con las transferencias marcadas reveló que el mRNA de VEGF-D era muy abundante en corazón, pulmón y músculo esquelético. El mRNA de VEGF-D exhibía una abundancia intermedia en bazo, ovario, intestino delgado y colon, y su abundancia era escasa en riñón, páncreas, timo, próstata y testículos. No se detectó mRNA alguno de VEGF-D en el RNA de cerebro, placenta, hígado o leucocitos de sangre periférica. En la mayoría de los tejidos en los que se detectó mRNA de VEGF-D, el tamaño del transcrito era 2,3 kb. La única excepción era el músculo esquelético, donde se detectaron dos transcritos de VEGF-D de 2,3 kb y 2,8 kb. En el músculo esquelético, el transcrito de 2,3 kb era más abundante que el transcrito de 2,8 kb.

Expresión del gen en embriones de ratón

Con objeto de generar una sonda de RNA antisentido para mRNA de VEGF-D de ratón, se insertó el cDNA de VEGF-D2 de ratón representado en la Figura 7 (SEQ ID NO. 7) en el vector de transcripción pBluescriptIIKS+ (Stratagene). El plásmido resultante se digirió completamente con la endonucleasa de restricción *FokI* y se utilizó luego como molde para una reacción de transcripción *in vitro* con RNA-polimerasa T3. Esta reacción de transcripción dio lugar a una sonda de RNA antisentido para mRNA de VEGF-D cuya secuencia era complementaria a la región del cDNA de VEGF-D2 (Figura 7) desde el término 3' hasta el sitio de escisión por *FokI* más próximo al término 3' (nucleótidos 1135 a 700). Esta sonda de RNA antisentido se hibridó en condiciones de alta severidad con secciones de tejidos incrustadas en parafina generadas a partir de embriones de ratón en el día post-coital 15,5. La hibridación y el lavado se realizaron esencialmente como se ha descrito con anterioridad (Achen *et al*, 1995).

Después de lavado y secado, se expusieron los portaobjetos a película de autorradiografía durante 6 días.

El revelado de la película de autorradiografía demostró que el mRNA de VEGF-D está localizado en el pulmón en desarrollo de los embriones del día 15,5 post-coital. La señal para mRNA de VEGF-D en el pulmón era fuerte y muy específica. Las hibridaciones de control con sonda de sentido no producían ruido de fondo detectable alguno en pulmón o ningún otro tejido.

Sumario

El gen VEGF-D se expresa extensamente en el humano adulto, pero por supuesto no se expresa de manera ubicua. La expresión más fuerte se detectó en corazón, pulmón y músculo esquelético. En los embriones de ratón, el día 15,5 post-coital, se detectaba una expresión fuerte y específica del gen VEGF-D en el pulmón. Estos datos sugieren que VEGF-D puede jugar un papel en el desarrollo del pulmón, y que la expresión del gen VEGF-D en el pulmón persiste en el adulto, al menos en los humanos. La expresión del gen en otros tejidos en el humano adulto sugiere que VEGF-D puede desempeñar otras funciones en otros tejidos adultos.

Ejemplo 13 VEGF-D es Mitógeno para las Células Endoteliales

Algunos miembros de la familia VEGF de proteínas, a saber VEGF-A (Leung *et al*, 1989) y VEGF-B (Olofsson *et al*, 1996), son mitógenos para las células endoteliales. Con objeto de testar la capacidad mitógena de VEGFD Δ N Δ C para las células endoteliales, se expresó y purificó esta proteína por cromatografía de afinidad como se describe en el Ejemplo 9. La fracción #3, eluida de la columna de afinidad M2, que contenía VEGFD Δ N Δ C, se diluyó en relación 1 a 10 en medio de cultivo de células que contenía 5% de suero y se aplicó a células endoteliales de aorta de bovino (BAEs) que se habían propagado en medio que contenía 10% de suero. Las BAEs se habían sembrado en cápsulas de 24 pocillos a una densidad de 10.000 células por pocillo el día antes de la adición de VEGFD Δ N Δ C, y tres días después de la adición de este polipéptido se disociaron las células con tripsina y se contaron. Se incluyó en el experimento VEGF-A purificado como control positivo. Los resultados se muestran en la Figura 16. La adición de la fracción #3 al medio de cultivo de células condujo a un aumento de 2,4 veces en el número de BAEs después de tres días de incubación, resultado que era comparable al obtenido con VEGF-A. Claramente, VEGFD Δ N Δ C es mitógeno para las células endoteliales.

Ejemplo 14 Localización del Gen VEGF-D en los Cromosomas Humanos

Con objeto de generar sondas de hibridación para localización del gen VEGF-D en los cromosomas humanos, se aisló un clon de DNA genómico humano para VEGF-D a partir de una biblioteca de DNA genómico humano (Clontech). La biblioteca genómica se cribó por hibridación con el cDNA de VEGF-D humano que se muestra en la Figura 4, utilizando métodos estándar (Sambrook *et al*, 1989). Se demostró que uno de los clones así aislados contenía parte del gen VEGF-D por hibridación a numerosos oligonucleótidos que se derivaban en secuencia del cDNA de VEGF-D humano. Una región del clon genómico, de aproximadamente 13 kb de tamaño, se purificó en gel de agarosa, se marcó por traslación de la mella con biotina-14-dATP y se hibridó *in situ* a una concentración final de 20 ng/ μ l hasta metafases de dos varones humanos normales. Se modificó el método de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) respecto al descrito previamente (Callen *et al*, 1990) en el sentido de que los cromosomas se tificaron antes del análisis con yoduro de propidio (como contratinción) y DAPI (para identificación de los cromosomas). Las imágenes de las operaciones de metafase se capturaron con una cámara CCD refrigerada, utilizando el sistema de recogida y mejora de imágenes CytoVision Ultra (Applied Imaging Int. Ltd.). Las señales FISH y el patrón de bandas DAPI se combinaron para análisis.

Se examinaron 15 metafases del primer varón normal respecto a señal fluorescente. Diez de las metafases exhibían señal en una cromátida (tres células) o ambas cromátidas (siete células) del cromosoma X en la banda p22.1. Se observaron un total de 9 puntos de ruido de fondo inespecíficos en estas 15 metafases. Se obtuvo un resultado similar por la hibridación de la sonda a 15 metafases del segundo varón normal, en las que se observó la señal en Xp22.1 en una sola cromátida en 7 células y en ambas cromátidas en 4 células. En conclusión, el gen VEGF-D humano está localizado en el cromosoma X en la banda p22.1.

Ejemplo 15 Localización del gen VEGF-D Murino en los Cromosomas del Ratón (comparativo)

La localización cromosómica en el ratón del gen VEGF-D se determinó por análisis de retrocruzamiento interespecífico utilizando progeñe generada por apareamiento de hembras (C57BL/6J x *Mus spretus*)F1 y machos CB7BL/67 como se ha descrito previamente (Copeland y Jenkins, 1991). Este panel de mapeado de retrocruzamiento interespecífico ha sido tipificado para más de 2400 loci que están bien distribuidos entre todos los autosomas así como en el cromosoma X (Copeland y Jenkins, 1991). Se digirieron los DNAs de C57BL/6J y *M. spretus* con varias enzimas y se analizaron por hibridación de transferencia Southern respecto a polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción informativos (RFLPs) utilizando una sonda de cDNA de VEGF-D de ratón de 1,3 kb esencialmente como se ha descrito (Jenkins *et al*, 1982). Se detectaron fragmentos de 7,1, 6,3, 4,7, 2,5 y 2,2 kb en DNA de C57BL/6J digerido con *TaqI* y se detectaron fragmentos principales de 7,1, 3,7, 2,7 y 2,2 kb en DNA de *M. spretus* digerido con *TaqI*. La presencia o ausencia de los fragmentos 3,7 y 2,7 específicos de *M. spretus* *TaqI*, que se cosegregaban, se siguió en los ratones generados por retrocruzamiento. Los resultados del mapeado indicaban que el gen VEGF-D está localizado en la región distal del cromosoma X del ratón enlazado a *Bik*, *DxPasi* y *Ptmb4*. Aunque se analizaron 89 ratones para todos los marcadores, se tipificaron hasta 133 ratones para algunos pares de marcadores. Cada locus se analizó en combinaciones por pares respecto a frecuencias de recombinación utilizando los datos adicionales. Las relaciones del número total de ratones que exhibían cromosomas recombinantes al número total de ratones analizados para cada par de loci y el orden más probable de los genes son: centrómero – *Btk* - 14/121 - *DxPasi* - 3/99 – VEGF-D - 5/133 – *Ptmb4*. Las frecuencias de recombinación [expresadas con distancias genéticas en centiMorgans (cM) ± el error estándar], calculadas utilizando Map Manager (versión 2.6.5), son – *Btk* – 11,6 ± 2,9 – *DxpasI* – 3,0 ± 1,7 – VEGF-D – 3,8 ± 1,7 – *Ptmb4*. Una descripción de las sondas y RFLPs para los loci enlazados al gen VEGF-D, con inclusión de *Btk*, *DxPasi* y *Ptmb4*, ha sido comunicada previamente (Hacfliger *et al*, 1992; Holloway *et al*, 1997).

Los autores de la invención han comparado el presente mapa interespecífico del cromosoma X con un mapa compuesto de enlaces de ratón que consigna la localización en el mapa de muchas mutaciones no clonadas (proporcionado por Mouse Genome Database, una base de datos computerizada mantenida en la Jackson Library, Bar Harbor, ME). El gen VEGF-D mapeaba en una región del mapa compuesto que carece de mutaciones de ratón con un fenotipo que podría esperarse para una alteración en el caso del locus de un mitógeno de células endoteliales. La región distal del cromosoma X del ratón comparte una región de homología con la rama corta de los cromosomas X humanos (Mouse Genome Database). La ubicación del gen VEGF-D en este intervalo en el ratón sugiere que el homólogo humano mapeará a Xp22. Esto es consistente con el análisis FISH de los inventores, que ha localizado el gen humano en Xp22.1.

Numerosos estados de enfermedad son causados por mutaciones en genes desconocidos que se han mapeado a Xp22.1 y las posiciones que rodean inmediatamente esta región en el humano. Estos estados de enfermedad incluyen el síndrome de Kallmann, albinismo ocular (tipo Nettleship-Falls), albinismo ocular y sordera sensorineural, síndrome de Partington, displasia espondiloepifisaria (tardía), retinitis pigmentosa 15, disgenesia gonadal (tipo hembra XY), síndrome catarático-dental de Nance-Horan, retinosquiasis, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, producción de células F, hipomagnesemia, queratosis folicular espinulosa decalvans, síndrome de Coffin-Lowry, dermoides corneales, hipofosfatemia, agammaglobulinemia, síndrome de Aicardi, hipofosfatemia hereditaria II, retardo mental (no dismórfico), síndrome G de Opitz, trastorno pigmentario (reticulado), inversión sexual sensible a la dosificación, hipoplasia suprarrenal, retinitis pigmentosa-6, sordera 4 (sensorineural congénita) y síndrome de Wilson-Turner. Las posiciones de los genes implicados en estos estados de enfermedad se documentan en el mapa de genes OMIM, que ha sido publicado por Dr. Victor McKusick y colaboradores en la Universidad Johns Hopkins (EE.UU.).

BIOENSAYOS PARA DETERMINAR LA FUNCIÓN DE VEGF-D

Otros ensayos se conducen para evaluar si VEGF-D tiene actividades similares a VEGF en relación con la función de las células endoteliales, la angiogénesis y la curación de las heridas. Pueden realizarse también ensayos adicionales, dependiendo de los resultados de los estudios de distribución de la fijación de receptores.

I. Ensayos de Función de las Células Endotelialesa) *Proliferación de células endoteliales*

Se realizan ensayos de crecimiento de células endoteliales por métodos por métodos bien conocidos en la técnica, *v.g.*, los de Ferrara & Henzel (1989), Gospodarowicz *et al* (1989), y/o Claffey *et al*, Biochim. Biophys. Acta, 1995 1246 1-9.

b) *Ensayo de adhesión celular*

Se testa el efecto de VEGF-D sobre la adhesión de granulocitos polimorfonucleares a células endoteliales.

c) *Quimiotaxis*

Se utiliza el ensayo estándar de quimiotaxis de la cámara de Boyden para testar el efecto de VEGF-D sobre la quimiotaxis.

d) *Ensayo del activador del plasminógeno*

Se testan células endoteliales en cuanto al efecto de VEGF-D sobre el activador del plasminógeno y la producción de inhibidores del activador del plasminógeno, utilizando el método de Pepper *et al* (1991).

e) *Ensayo de Migración de las Células Endoteliales*

5 Se ensaya la capacidad de VEGF-D para estimular las células endoteliales a migrar y formar tubos como se describe en Montesano *et al* (1986). Alternativamente, puede utilizarse el ensayo del gel tridimensional de colágeno descrito por Joukov *et al* (1996) o una membrana gelatinizada en una cámara de Boyden modificada (Glaser *et al* 1980).

II. Ensayo de Angiogénesis

10 La aptitud de VEGF-D para inducir una respuesta angiogénica en la membrana corioalantoica del pollo se testa como se describe en Leung *et al* (1989). Alternativamente, puede utilizarse el ensayo de la córnea de la rata, de Rastinejad *et al* (1989); este es un método aceptado para ensayo de la angiogénesis *in vivo*, y los resultados son transferibles fácilmente a otros sistemas *in vivo*.

III. Curación de las Heridas

15 La capacidad de VEGF-D para estimular la curación de las heridas se testa en el modelo más importante clínicamente disponible, como se describe en Schilling *et al* (1959) y como ha sido utilizado por Hunt *et al* (1967).

IV. El Sistema Hemopoyético

20 Se conocen en la técnica una diversidad de ensayos *in vitro* e *in vivo* que utilizan poblaciones específicas de células del sistema hemopoyético, y se reseñan a continuación. En especial, son particularmente convenientes una diversidad de ensayos *in vitro* de células madre murinas que utilizan células purificadas en clasificadores de células activados por fluorescencia:

a) *Células Madre Repobladoras*

25 Éstas son células capaces de repoblar la médula ósea de ratones irradiados letalmente, y tienen el fenotipo Lin⁻, Rh^{h1}, Ly-6A/E⁺, c-kit⁺. Se testa VEGF-D en estas células sea solas, o por co-incubación con otros factores, seguido por medida de la proliferación celular por incorporación de ³H-timidina.

b) *Células Madre de Etapa Tardía*

30 Estas son células que tienen comparativamente poca capacidad de repoblación de la médula ósea, pero pueden generar D13 CFU-S. Estas células tienen el fenotipo Lin⁻, Rh^{h1}, Ly-6A/E⁺, c-kit⁺. Se incuba VEGF-D con estas células durante cierto periodo de tiempo, se inyecta en receptores irradiados letalmente, y se cuenta el número de colonias D13 en el bazo.

c) *Células Enriquecidas en Progenitor*

35 Estas son células que responden *in vitro* a factores de crecimiento simples y tienen el fenotipo Lin⁻, Rh^{h1}, Ly-6A/E⁺, c-kit⁺. Este ensayo indicará si VEGF-D puede actuar directamente sobre células progenitoras hemopoyéticas. VEGF-D se incuba con estas células en cultivos de agar, y se cuenta el número de colonias presentes después de 7-14 días.

V. Aterosclerosis

40 Las células musculares lisas juegan un papel crucial en el desarrollo o la iniciación de la aterosclerosis, requiriendo un cambio de su fenotipo desde un estado contráctil a un estado sintético. Macrófagos, células endoteliales, linfocitos T y plaquetas juegan todos ellos un papel en el desarrollo de las placas ateroscleróticas por influir en el crecimiento y las modulaciones fenotípicas de la célula muscular lisa. Un ensayo *in vitro* que utiliza una cámara Rose modificada en el cual se siembran diferentes tipos de células en cubreobjetos enfrentados mide la tasa de proliferación y las modulaciones fenotípicas de las células musculares lisas en un entorno multicelular, y se utiliza para evaluar el efecto de VEGF-D sobre las células musculares lisas.

VI. Metástasis

45 La capacidad de VEGF-D para inhibir las metástasis se ensaya utilizando el modelo del carcinoma de pulmón de Lewis, utilizando por ejemplo el método de Cao *et al* (1995).

VII. VEGF-D en Otros Tipos de Células

Los efectos de VEGF-D sobre la proliferación, diferenciación y función de otros tipos de células, tales como las células hepáticas, el músculo y otras células cardíacas, células endocrinas y osteoblastos pueden ensayarse

fácilmente por métodos conocidos en la técnica, tales como la absorción de ^3H -timidina por cultivos *in vitro*. La expresión de VEGF-D en estos y otros tejidos puede medirse por técnicas tales como transferencia Northern e hibridación o por hibridación *in situ*.

VIII. Construcción de Variantes y Análogos de VEGF-D

5 VEGF-D es un miembro de la familia PDGF de factores de crecimiento que exhibe un alto grado de homología con los otros miembros de la familia PDGF. VEGF-D contiene ocho residuos cisteína conservados que son característicos de esta familia de factores de crecimiento. Estos residuos cisteína conservados forman enlaces disulfuro intercatenarios que producen la estructura de nudos de la cisteína, y enlaces disulfuro intracatenarios que forman los dímeros de proteína que son característicos de los miembros de la familia de factores de crecimiento PDGF. VEGF-D interaccionará con los receptores de factores de crecimiento de la proteína tirosina-quinasa.

10 En contraste con las proteínas en que se conoce poco o nada acerca de la estructura proteínica y los sitios activos necesarios para la fijación de receptores y la actividad consiguiente, el diseño de mutantes activos de VEGF-D se ve facilitado notablemente por el hecho de que se sabe mucho acerca de los sitios activos y aminoácidos importantes de los miembros de la familia de factores de crecimiento PDGF.

15 Artículos publicados que dilucidan las relaciones estructura/actividad de miembros de la familia de factores de crecimiento PDGF incluyen, para PDGF: Oestman *et al*, J. Biol. Chem., 1991 266 10073-10077; Andersson *et al*, J. Biol. Chem., 1992 267 11260-1266; Oefner *et al*, EMBO J., 1992 11 3921-3926; Flemming *et al*, Molecular and Cell Biol., 1993 13 4066-4076 y Andersson *et al*, Growth Factors, 1995 12 159-164; y para VEGF: Kim *et al*, Growth Factors, 1992 7 53-64; Pötgens *et al*, J. Biol. Chem., 1994 269 32879-32885 y Claffey *et al*, Biochem. Biophys. Acta, 1995 1246 1-9. Partiendo de estas publicaciones es evidente que, debido a los ocho restos cisteína conservados, los miembros de la familia de factores de crecimiento PDGF exhiben una estructura plegada anudada y dimerización características, que dan como resultado la formación de tres regiones de bucle expuestas en cada extremo de la molécula dimerizada, en las cuales puede esperarse que estén localizados los sitios activos de fijación de los receptores.

25 Basándose en esta información, una persona experta en las técnicas de la biotecnología puede diseñar mutantes de VEGF-D con una probabilidad muy alta de retención de la actividad de VEGF-D por la conservación de los ocho residuos cisteína responsables de la configuración plegada anudada y de la dimerización, así como por la conservación, o realización únicamente de sustituciones conservadoras de aminoácidos en las secuencias probables de los receptores en la región del bucle 1, bucle 2 y bucle 3 de la estructura de la proteína.

30 La formación de mutaciones deseadas en sitios específicamente direccionados en una estructura de proteína está considerada como una técnica estándar en el arsenal del químico especialista en proteínas (<biblio>). Ejemplos de dicha mutagénesis orientada con VEGF pueden encontrarse en Pötgens *et al*, J. Biol. Chem., 1994 269 32879-32885 y Claffey *et al*, Biochim. Biophys. Acta, 1995 1246 1-9. De hecho, la mutagénesis orientada es tan común que están disponibles comercialmente kits para facilitar tales procedimientos (v.g., Promega 1994-1995 Catalog., páginas 142-145).

35 La actividad de proliferación de las células endoteliales de los mutantes de VEGF-D puede confirmarse fácilmente por procedimientos de cribado bien establecidos. Por ejemplo, puede utilizarse un procedimiento análogo al ensayo mitótico de las células endoteliales descrito por Claffey *et al*, (Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1246, 1-9). Análogamente, pueden testarse los efectos de VEGF-D sobre la proliferación de otros tipos de células, sobre la diferenciación celular y sobre las metástasis humanas, utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica.

40

REFERENCIAS

Achen, M.G., Clauss, M., Schnürch, H. and Risau, W.
Differentiation, 1995 59 15-24

5

Andersson, M., Östman, A., Bäckström, G., Hellman, U., George-
Nascimento, C., Westermark, B. and Heldin, C-H.
J. Biol. Chem., 1992 267 11260-1266

Anderson, M, Östman, A., Kreysing, J., Bäckström, G.
van de Poll, M. and Heldin, C-H.
Growth Factors, 1995 12 159-164

Aruffo, A. and Seed, B.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1987 84 8573-8577

Callen, D.F., Baker, E., Eyre, H.J., Chermos, J.E., Bell, J.A.
and Sutherland, G.R.
Ann. Genet., 1990 33 219-221

Claffey, K.P., Senger, D.R., Spiegelman, B.M.
Biochem. Biophys. Acta, 1995 1246 1-9

Cao, Y. Chen, C., Weatherbee, J.A., Tsang, M. and Folkman, J.
J. Exp. Med., 1995 182 2069-2077

Copeland, N.G. and Jenkins N.A.
Trends Genet., 1991 7 113-118

Ferrara, N. & Henzel, W.J.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1989 161 851-858

Flemming, S.V., Andersson, M., Westermark, B., Heldin, C-H. and
Östman, A.
Molecular and Cell Biol., 1993 13 4066-4076

Glaser, B.M. and D'Amore, P.A.
Nature, 1980 288 483-484

- Gospodarowicz, D., Abraham, J.A., Schilling, J.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989 86 7311-7315
- Haefliger, J-A., Bruzzone, R., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J.,
Copeland, N.G. and Paul D.L.
1992 J. Biol. Chem., 1992 267 2057-2064
- Holloway, A.J., Della N.G., Fletcher, C.F., Largaespada, D.A.,
Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Bowtell D.D.L.
Genomics, 1997 41 160-168
- Hunt et al
Am. J. Surgery, 1967 114 302-307
- Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Taylor, B.A. and Lee, B.K.
J. Virol. 1982 43 26-36
- Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen,
I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N. and Alitalo, K.
EMBO Journal, 1996 15 290-298
- Kim, K.J., Li, B., Houck, K. Winner, J. and Ferrara, N.
Growth Factors, 1992 7 53-64
- Kunkel, T.A., Roberts, J.D. and Zakour, R.A.
Methods in Enzymol., 1987 154 367-382
- Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W-J., Goeddel, D.V. and
Ferrara, N.
Science, 1989 246 1306-1309
- Miles, A.A. and Miles, E.M.
J. Physiol. (London), 1952 118 228-257
- Montesano, R., Vassalli, J.D., Baird, A., Guillemin, R. and
Orci, L.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986 83 7297-7301

Oefner, C., D'Arcy, A., Winkler, F.K., Eggimann, B. and Hosang, M.

EMBO Journal, 1992 11 3921-3926

Oelrichs, R.B., Reid, H.H., Bernard, O., Ziemiecki, A. and Wilks, A.F.

Oncogene, 1993 8 11-18

Oestman, A., Andersson, M., Hellman, U. and Heldin, C-H.

J. Biol. Chem., 1991 266 10073-10077

Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R.F., Alitalo, K. and Eriksson, U.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1996 93 2576-2581

Pepper, M.S., Ferrara, N. Orci, L. and Montesano. R.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1991 181 902-906

Pötgens, A.J., Lubsen, N.H., van Altena, M.C., Vermeulen, R., Bakker, A., Schoenmakers, J.G.G., Ruitter, D.J. and de Waal, R.M.W.

J. Biol. Chem., 1994 269 32879-32885

Rastinejad, F., Plverini, P.J. and Bouck, N.P.

Cell, 1989 56 345-355

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.

Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Schilling et al

Surgery, 1959 46 702-710

Strawn, L.M., McMahon, G., App, H., Schreck, R., Kuchler, W.R., Longhi, M.P., Hui, T.H., Tang, C., Levitzki, A., Gazit, A., Chen, I., Keri, G., Orfi, L., Risau, W., Flamme, I., Ullrich, A., Hirth, K.P. and Shawver, L.K.

Cancer Res., 1996 56 3540-3545

REALIZACIONES ADICIONALES

Las siguientes realizaciones se describen pero no se reivindican como parte de la invención.

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde sustancialmente a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 8 o SEQ ID NO. 9, teniendo dicho polipéptido la capacidad de estimular la permeabilidad vascular o la proliferación de células endoteliales, o un fragmento o análogo del mismo que tiene la capacidad de estimular al menos una actividad biológica seleccionada del grupo
 - 10 constituido por angiogénesis, permeabilidad vascular, proliferación, diferenciación, migración o supervivencia de células endoteliales, o que tiene la capacidad de fijarse a las células endoteliales pero es incapaz de estimular al menos una de dichas actividades biológicas.
- 15 2. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la realización 1, en donde dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos: Pro-Xaa-Cys-Val-Xaa-Xaa-Xaa-Arg-Cys-Xaa-Gly-Cys-Cys (SEQ ID NO. 2).
- 20 3. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la realización 1, en donde dichas células endoteliales se seleccionan del grupo constituido por células endoteliales vasculares y células endoteliales linfáticas.
4. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la realización 1, que es un DNA genómico.
5. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la realización 1, que es un cDNA.
- 25 6. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la realización 5, que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, o una secuencia de DNA que se hibrida con una de las secuencias anteriores en condiciones severas.
- 30 7. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la realización 6, que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO.4.
8. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 7, que codifica un polipéptido que tiene la capacidad de estimular la permeabilidad vascular o la proliferación de células endoteliales.
- 35 9. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la realización 1, que codifica un polipéptido que comprende los residuos de aminoácidos desde 64 hasta 172 de SEQ ID NO: 3 o los residuos de aminoácidos desde 93 hasta 201 de SEQ ID NO: 5.
- 40 10. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la realización 9, en donde dicho polipéptido comprende adicionalmente una secuencia peptídica de marcador de afinidad.
- 45 11. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 7, que codifica un polipéptido que tiene la capacidad de fijarse a células endoteliales pero es incapaz de estimular la proliferación de células endoteliales.
12. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la realización 11, en donde dichas células endoteliales se seleccionan del grupo constituido por células endoteliales vasculares y células endoteliales linfáticas.
- 50 13. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la realización 1, en donde dicha molécula de ácido nucleico es una molécula de DNA humano.
14. Un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 13.
- 55 15. Una célula hospedadora transformada o transformada con un vector de acuerdo con la realización 14.
- 60 16. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde sustancialmente a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 8 o SEQ ID NO. 9, teniendo dicho polipéptido la capacidad de estimular la permeabilidad vascular o la proliferación de células endoteliales, o un fragmento o análogo del mismo que tiene la capacidad de estimular al menos una actividad biológica de células endoteliales seleccionada del grupo constituido por proliferación celular, diferenciación celular, migración celular, supervivencia celular y permeabilidad vascular, o que tiene la capacidad de fijarse a las células endoteliales pero es incapaz de estimular al menos una de dichas actividades biológicas.

17. Un polipéptido de acuerdo con la realización 16, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos: Pro-Xaa-Cys-Val-Xaa-Xaa-Xaa-Arg-Cys-Xaa-Gly-Cys-Cys (SEQ ID NO. 2).
- 5 18. Un polipéptido de acuerdo con la realización 16, en donde dichas células endoteliales se seleccionan del grupo constituido por células endoteliales vasculares y células endoteliales linfáticas.
19. Un polipéptido de acuerdo con la realización 16, que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde sustancialmente a SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5.
- 10 20. Un polipéptido de acuerdo con la realización 19, que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde sustancialmente a SEQ ID NO: 5.
21. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 16 a 20, que tiene la capacidad de estimular la proliferación de células endoteliales.
- 15 22. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 16 a 20, que tiene la capacidad de inducir la diferenciación de células endoteliales.
23. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 16 a 20, que tiene la capacidad de inducir la permeabilidad vascular.
- 20 24. Un polipéptido de acuerdo con la realización 16, que comprende los residuos de aminoácidos desde 64 hasta 172 de SEQ ID NO: 3 o desde 93 hasta 201 de SEQ ID NO: 5.
- 25 25. Un polipéptido de acuerdo con la realización 24, que comprende adicionalmente una secuencia peptídica de marcador de afinidad.
26. Un polipéptido de acuerdo con la realización 16 o 17, que tiene la capacidad de fijarse a células endoteliales pero es incapaz de estimular la proliferación de células endoteliales.
- 30 27. Un polipéptido de acuerdo con la realización 26, en donde dichas células endoteliales se seleccionan del grupo constituido por células endoteliales vasculares y células endoteliales linfáticas.
28. Un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 16 a 20, en donde dicho polipéptido es una proteína humana.
- 35 29. Un anticuerpo específicamente reactivo con un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 16 a 28.
- 40 30. Un anticuerpo de acuerdo con la realización 29, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
31. Un anticuerpo de acuerdo con la realización 29, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
32. Un anticuerpo de acuerdo con la realización 29, en donde dicho anticuerpo está marcado con un marcador detectable.
- 45 33. Un método de construcción de un polipéptido de acuerdo con la realización 16, comprendiendo dicho método los pasos de: cultivar una célula hospedadora transformada o transfectada con un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido conectada operativamente a una secuencia promotora de manera tal que la secuencia de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido se exprese; y aislar dicho polipéptido de dicha célula hospedadora o de un medio de crecimiento en el que dicha célula hospedadora se cultive.
- 50 34. Un método de aislamiento de VEGF-D que comprende el paso de exponer una célula que exprese VEGF-D a heparina para facilitar la liberación de VEGF-D de la célula, y purificar el VEGF-D liberado de este modo.
- 55 35. Un método de construcción de un vector capaz de expresar un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, comprendiendo dicho método insertar dicha molécula de ácido nucleico en un vector en una posición en la que dicha molécula de ácido nucleico esté conectada operativamente con al menos un promotor.
- 60 36. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos antisentido, siendo dicha secuencia de nucleótidos antisentido complementaria a al menos una parte de una secuencia de DNA genómico de VEGF-D o una secuencia de RNA de VEGF-D o una secuencia de cDNA que codifica VEGF-D o un fragmento o análogo del mismo que

promueve al menos una bioactividad seleccionada entre permeabilidad vascular, proliferación de células endoteliales y diferenciación de células endoteliales, en donde dicho vector puede utilizarse para inhibir dicha bioactividad.

5 37. Un método de estimulación de la proliferación de células endoteliales que comprende poner en contacto células endoteliales con una cantidad estimuladora de la proliferación de células endoteliales eficaz de un polipéptido de acuerdo con la realización 16.

10 38. Un método de acuerdo con la realización 37, en donde dichas células endoteliales se seleccionan del grupo constituido por células endoteliales vasculares y células endoteliales linfáticas.

15 39. Un método de estimulación de al menos una bioactividad seleccionada entre proliferación de células endoteliales, diferenciación de células endoteliales y permeabilidad vascular, *in vivo* en un mamífero, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad estimuladora de la bioactividad eficaz de un polipéptido de acuerdo con la realización 16, que tiene la capacidad de estimular dicha bioactividad.

40 40. Un método de acuerdo con la realización 39, en donde dicho polipéptido comprende los residuos de aminoácidos desde 64 hasta 172 de SEQ ID NO: 3 o los residuos de aminoácidos desde 93 hasta 201 de SEQ ID NO: 5.

20 41. Un método de acuerdo con la realización 39, en donde se estimula la proliferación de células endoteliales de vasos linfáticos.

25 42. Un método de estimulación de al menos una bioactividad seleccionada entre angiogénesis y neovascularización en un mamífero, comprendiendo dicho método el paso de administrar a dicho mamífero una cantidad estimuladora de la angiogénesis o neovascularización eficaz de un polipéptido de acuerdo con la realización 16, teniendo dicho polipéptido la capacidad de estimular la proliferación de células endoteliales.

30 43. Un método de acuerdo con la realización 42, en donde dicho polipéptido comprende los residuos de aminoácidos desde 64 hasta 172 de SEQ ID NO: 3 o los residuos de aminoácidos desde 93 hasta 201 de SEQ ID NO: 5.

35 44. Un método de acuerdo con la realización 43, en donde dicho polipéptido comprende adicionalmente una secuencia peptídica de marcador de afinidad.

40 45. Un método de acuerdo con la realización 32, que comprende adicionalmente administrar conjuntamente al menos una sustancia seleccionada del grupo constituido por VEGF, VEGF-B, VEGF-C, PIGF, PDGF, FGF y heparina.

45 46. Un método de inhibición de una bioactividad seleccionada entre angiogénesis y neovascularización en un mamífero, comprendiendo dicho método el paso de administrar a dicho mamífero una cantidad inhibitoria de la angiogénesis o la neovascularización eficaz de un antagonista de VEGF-D.

50 47. Un método de acuerdo con la realización 46, en donde dicho antagonista de VEGF-D comprende un anticuerpo específico para VEGF-D.

55 48. Un método de acuerdo con la realización 46, en donde dicho antagonista de VEGF-D comprende un polipéptido que se fija a células endoteliales pero que es incapaz de estimular al menos una actividad biológica seleccionada entre proliferación de células endoteliales, diferenciación de células endoteliales y permeabilidad vascular.

60 49. Un método de acuerdo con la realización 48, en donde dichas células endoteliales se seleccionan del grupo constituido por células endoteliales vasculares y células endoteliales linfáticas.

65 50. Un método de inhibición de la expresión de VEGF-D en un mamífero que comprende el paso de transformar células diana que expresan VEGF-D con un vector de acuerdo con la realización 36.

70 51. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 16 a 24 y un portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

75 52. Una composición farmacéutica de acuerdo con la realización 51, que comprende adicionalmente al menos una sustancia seleccionada del grupo constituido por VEGF, VEGF-B, VEGF-C, PIGF, PDGF y heparina.

53. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 29 a 32 y un portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 5 54. Una composición farmacéutica de acuerdo con la realización 53, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
55. Un dímero de proteína que comprende un primer polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 16 a 24 y un segundo polipéptido.
- 10 56. Un dímero de proteína de acuerdo con la realización 55, en donde dicho dímero de proteína es un homodímero en el que el segundo polipéptido es idéntico al primer polipéptido.
57. Un dímero de proteína de acuerdo con la realización 55, en donde dicho dímero de proteína es un heterodímero en el que el segundo polipéptido se selecciona entre VEGF, VEGF-B, VEGF-C, PIGF y PDGF.
- 15 58. Un método de detección de VEGF-D en una muestra biológica, que comprende el paso de poner en contacto la muestra con un reactivo capaz de fijarse a VEGF-D, y detectar la fijación de dicho reactivo.
- 20 59. Un método de acuerdo con la realización 58, en donde dicho reactivo comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 29 a 32.
60. Un método de modulación de la permeabilidad vascular en un mamífero, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad moduladora de la permeabilidad vascular eficaz de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 16 a 24, o un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 29 a 32.
- 25 61. Un método de acuerdo con la realización 60, que comprende administrar a dicho mamífero un polipéptido de acuerdo con la realización 16, el cual tiene la capacidad de estimular la proliferación de células endoteliales.
- 30 62. Un método de acuerdo con la realización 60, que comprende administrar a dicho mamífero un polipéptido de acuerdo con la realización 16, el cual tiene la capacidad de fijarse a células endoteliales pero que es incapaz de estimular la proliferación de células endoteliales.
63. Un método de activación del receptor-2 de VEGF, que comprende el paso de exponer las células que contienen dicho receptor a una dosis activadora del receptor eficaz de VEGF-D.
- 35 64. Un método de activación del receptor-3 de VEGF, que comprende el paso de exponer las células que contienen dicho receptor a una dosis activadora del receptor eficaz de VEGF-D.
- 40 65. Un método de acuerdo con la realización 63 o 64, en donde dicho método se lleva a cabo *in vivo*.
66. Un método de acuerdo con la realización 63 o 64, en donde dicho método se lleva a cabo *in vitro*.
- 45 67. Un kit de test diagnóstico o pronóstico que comprende un reactivo de fijación específico para VEGF-D y medios para detectar la fijación de dicho reactivo.
68. Un kit de test de acuerdo con la realización 67, en donde dicho reactivo de fijación específico comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 29 a 32.
- 50 69. Un kit de test diagnóstico o pronóstico que comprende un par de iniciadores específicos para DNA de VEGF-D enlazados operativamente a una polimerasa, con lo que dicha polimerasa puede amplificar selectivamente el DNA de VEGF-D a partir de una muestra de DNA.
- 55 70. Un método de detección de aberraciones en la estructura del gen VEGF-D en un individuo sometido a test que comprende los pasos de: proporcionar una muestra de DNA de dicho individuo sometido a test; poner en contacto dicha muestra con un juego de iniciadores específicos para DNA de VEGF-D enlazados operativamente a una polimerasa y amplificar selectivamente el DNA de VEGF-D de dicha muestra por reacción en cadena de polimerasa; y comparar la secuencia de nucleótidos del DNA de VEGF-D amplificado de dicha muestra con una secuencia de nucleótidos como las expuestas en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4.
- 60 71. Un antagonista de VEGF-D que tiene la capacidad de inhibir al menos una actividad biológica inducida por VEGF-D seleccionada entre permeabilidad vascular, proliferación de células endoteliales y diferenciación de células

endoteliales, fijándose dicho antagonista a VEGF-D o a un receptor de VEGF-D pero teniendo una menor capacidad que VEGF-D para estimular dicha actividad biológica.

5 72. Un antagonista de VEGF-D de acuerdo con la realización 71, en donde dicho antagonista comprende un anticuerpo que se fija selectivamente a VEGF-D.

73. Un antagonista de VEGF-D de acuerdo con la realización 72, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

10 74. Un antagonista de VEGF-D de acuerdo con la realización 71, en donde dicho antagonista comprende un fragmento o análogo del polipéptido VEGF-D que se fija a un receptor de VEGF-D, pero tiene una menor capacidad para estimular dicha actividad biológica.

15 75. Un método para mejorar la circulación sanguínea y/o el intercambio de gases en el pulmón de un mamífero, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de VEGF-D que mejore la circulación sanguínea y/o el intercambio de gases.

20 76. Un método para tratar la acumulación de fluido en el corazón y/o el pulmón debida a aumentos de la permeabilidad vascular en un mamífero, comprendiendo dicho método administrar a dicho mamífero una cantidad reductora de la permeabilidad vascular eficaz de un antagonista de VEGF-D.

25 77. Un método para tratar un síndrome de malabsorción intestinal en un paciente que sufra dicho síndrome, comprendiendo dicho método administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de VEGF-D que aumente la permeabilidad vascular y/o la circulación sanguínea intestinal.

78. Un anticuerpo de acuerdo con la realización 29, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

79. Un anticuerpo de acuerdo con la realización 29, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: LUGWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: FACTOR DE CRECIMIENTO

5 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 11

(iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

(A) DESTINATARIO: Evenson, McKeown, Edwards & Lenahan, P.L.L.C.

(B) CALLE: 1200 G Street, NW, Suite 700

(C) CIUDAD: Washington

10 (D) ESTADO: DC

(E) PAÍS: Estados Unidos de América

(F) CÓDIGO POSTAL: 20005

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible

15 (B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD:

20 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:

(C) CLASIFICACIÓN:

(viii) INFORMACIÓN DE PROCURADOR/AGENTE:

(A) NOMBRE: EVANS, Joseph D.

(C) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: 1064/42983PCT

25 (iv) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:

(A) TELÉFONO (202) 628-8800

(B) TELEFAX: (202) 628-8844

(C) TELEX: N/A

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO 1:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2846 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CLASE DE CADENA: Simple

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(F) TIPO DE TEJIDO: Mama humana

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

5

GGAAATTCAGT	GAAGTAAGAA	AGACAAAGTG	TTCATTGGAG	ATTTTTFAGTA	AGGGGCCAAC	60
AGAGCTGCTA	AAGTCATGCT	TCACTTAACG	ATGGGGATAT	GTPCGGAGAA	ATGCATTGTT	120
AGGTGATTTT	GTCGTGTGTC	AAGCATCTTA	GAGTACACTT	AGACAAACCT	AGCTGGTATA	180
ACCTAGGTGT	GTAAGTAGGAT	ATATGGTATA	GCCTATTGTT	CCTAGGCTAC	AAACCCATAC	240
AGCATGTTCC	TGTACTGAAT	ACTGAGGCAA	CTGCAACACC	GTGGTGAGTA	TTTGTGTATC	300
TAAACATACC	TAAACATAGA	AAAGATACAG	TAAAAATATG	GCATTATAGT	CTTATGGGAC	360

TACTGTCATA	CATACAGTCC	ATATATTGTT	GACTGTGTAA	TGTTGACCTG	AATGTCATTA	420
TGTGGCAGGC	ACATGACTGT	GTCGCTAACC	TTGCACAAG	ATTACTGTAG	GATTACATGA	480
GATAGTTGTA	AATAATGGT	GGGGTACTGG	GCACCTAGTA	GGTATGCATA	CATGTTCCACC	540
ATCATTATGG	TTGTTTTAAA	TCACCTAACC	CAGGCCCTGC	ACATAGTAAG	ACATCAACAA	600
ATTGTAGCTG	CTACTATTTT	GCGCATCTAA	TCTTAATATC	ATTTATTTTG	TAGTCCTTGG	660
ATGTTCCCTC	CTTTATGACT	TCTTTTTTTT	TTGTTGTCTT	TCCTTTAGCC	CTCCATCCTC	720
TACAGCTCAG	CATCAGAACA	CTCTCTTTTT	AGACTCCGAT	ATGGGGTCTT	CCAAGAAAGT	780
TACTCTCTCA	GTGCTCAGCC	GGGAGCAGTC	GGAAGGGGTT	GGAGCGAGGG	TCCGGAGAAG	840
CATTGGCAGA	CCCCAGTTAA	AAAATCTGGA	TCCGTTTTTA	CTGTTTGATG	AATTTAAAGG	900
AGGTAGACCA	GGAGGATTTT	CTGATCATCC	ACATCGAGGT	TTGAAACAG	TATCCTACCT	960
CCTGGAAGGG	GGCAGCATGG	CCCATGAAGA	CTTCTGTGGA	CACACTGGTA	AAATGAACCC	1020
AGGAGATTTG	CAGTGGATGA	CTGCGGGCCG	GGGCATTCTG	CACGCTGAGA	TGCCTTGCTC	1080
AGAGGAGCCA	GCCCATGGCC	TACAACCTGT	GGTTAATTTG	AGGAGCTCAG	AGAAGATGGT	1140
GGAGCCTCAG	TACCAGGAAC	TGAAAAGTGA	AGAAATCCCT	AAACCCAGTA	AGGATGGTGT	1200
GACAGTTGCT	GTCATTTCTG	GAGAAGCCCT	GGGAATAAAG	TCCAAGGTTT	ACACTCGCAC	1260
ACCAACCTTA	TATTTGGACT	TCAAATTGGA	CCCAGGAGCC	AAACATTCCC	AACCTATCCC	1320
TAAAGGGTGG	ACAAGCTTCA	TTTACACGAT	ATCTGGAGAT	GTGTATATTG	CCCTCTCTAT	1380
ATCCCAGCAC	AGBTATGCCC	AGGGCAGGGT	GCCTTTCAGC	TTACAGAACA	TTCAGTGAGG	1440
GAAGAGAATA	TGAACACCAG	TCATGACACA	TCTGTGCAC	AGATGAAAGT	CCAGGCACCA	1500
TTATGTGTTT	TGATACCTCG	CTAAGACGTT	GGCAACCTCC	ATACTGATAA	AGGGATGGAG	1560
CTACAGTGGG	CTCCAAGGGG	AGCAGGAATC	TGCCTATCTC	CTGGGAGAAG	GAAATGGGAAG	1620
GAGGGCCCGA	TGATGCACAA	CAAAAAATAG	AACCTCATCA	CACAGCAGTG	CTTGGAGAAG	1680
GTGACAGTGT	CCAAGTGGAG	AACAAGGATC	CCAAGAGAAG	CCACTTTGTC	TTAATTGCTG	1740
GGGAGCCATT	AAGAGAACCA	GTTATCCAAC	ATGCGATCAT	CTCAGTCCAC	ATTGGAACGA	1800
TCTGAACAGC	AGATCAGGGC	TGCTTCTAGT	TTGGAGGAAC	TACTTCGAAT	TACTCACTCT	1860
GAGGACTGGA	AGCTGTGGAG	ATGCAGGCTG	AGGCTCAAAA	GTTTTACCAG	TATGGACTCT	1920
CGCTCAGCAT	CCCATCGGTC	CACTAGGTTT	GCGGCAACTT	TCTATGACAT	TGAAACACTA	1980
AAAGTTATAG	ATGAAGAATG	GCAAAGAACT	CAGTGCAGCC	CTAGAGAAAC	GTGCGTGGAG	2040
GTGGCCAGTG	AGCTGGGGAA	GAGTACCAAC	ACATTCTTCA	AGCCCCCTTG	TGTGAACGTG	2100
TTCCGATGTG	GTGGCTGTTG	CAATGAAGAG	AGCCTTATCT	GTATGAACAC	CAGCACCTCG	2160
TACATTTCCA	AACAGCTCTT	TGAGATATCA	GTGCCTTTGA	CATCAGTACC	TGAATTAGTG	2220
CCTGTTAAAG	TTGCCAATCA	TACAGGTTGT	AAGTGCTTGC	CAACAGCCCC	CCGCCATCCA	2280
TACTCAATTA	TCAGAAGATC	CATCCAGATC	CCTGAAGAAG	ATCGCTGTTT	CCATTCCAAG	2340
AAACTCTGTC	CTATTGACAT	GCTATGGGAT	AGCAACAAAT	GTAATGTGT	TTTGCAGGAG	2400

GAAAATCCAC TCGCTGGAAC AGAAGACCAC TCTCATCTCC AGGAACCAGC TCTCTGTGGG	2460
CCACACATGA TGTTTGACGA AGATCGTTGC GAGTGTGTCT GTAAAACACC ATGTCCCAA	2520
GATCTAATCC AGCACCCCAA AACTGTCAGT TGCTTTGAGT GCAAAGAAAG TCTGGAGACC	2580
TGCTGCCAGA AGCACAAGCT ATTTACCCCA GACACCTGCA GCTGTGAGGA CAGATGCCCC	2640
TTTCATACCA GACCATGTGC AAGTGGCAAA ACAGCATGTG CAAAGCATTG CCGCTTTCCA	2700
AAGGAGAAAA GGGCTGCCCA GGGGCCCCAC AGCCGAAAGA ATCCTTGATT CAGCGTTCCA	2760
AGTTCCCCAT CCCTGTGATT TTTAACAGCA TGCTGCTTTG CCAAGTTGCT GTCACTGTTT	2820
TTTTCCCAGG TGTTAAAAA AAAAAA	2846

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 13 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (C) CLASE DE CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Péptido

10 (iii) HIPOTÉTICA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

Pro Xaa Cys Val Xaa Xaa Xaa Arg Cys Xaa Gly Cys Cys
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 3:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 325 aminoácidos
- (B) TIPO: Aminoácido
- (C) CLASE DE CADENA: Simple
- 20 (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(F) TIPO DE TEJIDO: Mama humana

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

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

 Gln Cys Ser Pro Arg Glu Thr Cys Val Glu Val Ala Ser Glu Leu Gly
 85 90 95
 Lys Ser Thr Asn Thr Phe Phe Lys Pro Pro Cys Val Asn Val Phe Arg
 100 105 110
 Cys Gly Gly Cys Cys Asn Glu Glu Ser Leu Ile Cys Met Asn Thr Ser
 115 120 125
 Thr Ser Tyr Ile Ser Lys Gln Leu Phe Glu Ile Ser Val Pro Leu Thr
 130 135 140
 Ser Val Pro Glu Leu Val Pro Val Lys Val Ala Asn His Thr Gly Cys
 145 150 155 160
 Lys Cys Leu Pro Thr Ala Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg
 165 170 175
 Ser Ile Gln Ile Pro Glu Glu Asp Arg Cys Ser His Ser Lys Lys Leu
 180 185 190
 Cys Pro Ile Asp Met Leu Trp Asp Ser Asn Lys Cys Lys Cys Val Leu
 195 200 205
 Gln Glu Glu Asn Pro Leu Ala Gly Thr Glu Asp His Ser His Leu Gln
 210 215 220
 Glu Pro Ala Leu Cys Gly Pro His Met Met Phe Asp Glu Asp Arg Cys
 225 230 235 240
 Glu Cys Val Cys Lys Thr Pro Cys Pro Lys Asp Leu Ile Gln His Pro
 245 250 255
 Lys Asn Cys Ser Cys Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Thr Cys Cys
 260 265 270
 Gln Lys His Lys Leu Phe His Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu Asp Arg
 275 280 285
 Cys Pro Phe His Thr Arg Pro Cys Ala Ser Gly Lys Thr Ala Cys Ala
 290 295 300
 Lys His Cys Arg Phe Pro Lys Glu Lys Arg Ala Ala Gln Gly Pro His
 305 310 315 320
 Ser Arg Lys Asn Pro
 325

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2029 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CLASE DE CADENA: Simple

5 (D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(F) TIPO DE TEJIDO: Pulmón humano

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

GTTGGGTTCC AGCTTTCTGT AGCTGTAAGC ATTGGTGGCC ACACCACCTC CTTACAAAGC

60

AACTAGAACC TGCGGCATAC ATTGGAGAGA TTTTTTTAAT TTTCTGGACA TGAAGTAAAT 120
 TTAGAGTGCT TTCTAATFTC AGGTAGAAGA CATGTCCACC TTCTGATTAT TTTTGGAGAA 180
 CATTTTGATT TTTTTCATCT CTCTCTCCCC ACCCCTAAGA TTGTGC AAAA AAAGCGTACC 240
 TTGCCTAATT GAAATAATTT CATTGGATTT TGATCAGAAC TGATTATTTG GTTTTCTGTG 300
 TGAAGTTTTG AGGTTTCAA CTTTCCTTCT GGAGAATGCC TTTTGAAACA ATTTTCTCTA 360
 GCTGCCTGAT GTCAACTGCT TAGTAATCAG TGGATATTGA AATATTCAAA ATGTACAGAG 420
 AGTGGGTAGT GGTGAATGTT TTCATGATGT TGTACGTCCA GCTGGTGCAG GGCTCCAGTA 480
 ATGAACATGG ACCAGTGAAG CGATCATCTC AGTCCACATT GGAACGATCT GAACAGCAGA 540
 TCAGGGCTGC TTCTAGTTTG GAGGAACTAC TTCGAATTAC TCACTCTGAG GACTGGAAGC 600
 TGTGGAGATG CAGGCTGAGG CTCAAAAGTT TTACCAGTAT GGACTCTCGC TCAGCATCCC 660
 ATCGGTCCAC TAGGTTTGGC GCAACTTTCT ATGACATTGA AACACTAAAA GTTATAGATG 720
 AAGAATGGCA AAGAACTCAG TGCAGCCCTA GAGAAACGTG CGTGGAGGTG GCCAGTGAGC 780
 TGGGGAAGAG TACCAACACA TTCTTCAAGC CCCCTTGTGT GAACGTGTTT CGATGTGTTG 840
 GCTGTTGCAA TGAAGAGAGC CTTATCTGTA TGAACACCAG CACCTCGTAC ATTTCCAAAC 900
 AGCTCTTTGA GATATCAGTG CCTTTGACAT CAGTACCTGA ATTAGTGCCT GTTAAAGTTG 960
 CCAATCATA AGGTTGTAAG TGCTTGCCAA CAGCCCCCG CCATCCATAC TCAATTATCA 1020
 GAAGATCCAT CCAGATCCCT GAAGAAGATC GCTGTTCCCA TTCCAAGAAA CTCTGTCTTA 1080
 TTGACATGCT ATGGGATAGC AACAAATGTA AATGTGTTTT GCAGGAGGAA AATCCACTTG 1140
 CTGGAACAGA AGACCACTCT CATCTCCAGG AACCAGCTCT CTGTGGGCCA CACATGATGT 1200
 TTGACGAAGA TCGTTGCGAG TGTGTCTGTA AAACACCATG TCCCAAAGAT CTAATCCAGC 1260
 ACCCCAAAA CTGCAGTTGC TTTGAGTGCA AAGAAAGTCT GGAGACCTGC TGCCAGAAGC 1320
 ACAAGCTATT TCACCCAGAC ACCTGCAGCT GTGAGGACAG ATGCCCTTT CATAACAGAC 1380
 CATGTGCAAG TGGCAAAACA GCATGTGCAA AGCATTGCCG CTTTCCAAAG GAGAAAAGGG 1440
 CTGCCAGGG GCCCCACAGC CGAAAGAATC CTTGATTGAG CGTTCCAAGT TCCCATCCC 1500
 TGTCATTTTT AACAGCATGC TGCTTTGCCA AGTTGCTGTC ACTGTTTTTT TCCCAGGTGT 1560
 TAAAAA AAAA ATCCATTTTA CACAGCACA CAGTGAATCC AGACCAACCT TCCATTCACA 1620
 CCAGCTAAGG AGTCCCTGGT TCATTSATGG ATGTCTTCTA GCTGCAGATG CCTCTGCGCA 1680
 CCAAGGAATG GAGAGGAGGG GACCCATGTA ATCCTTTTGT TTAGTTTTGT TTTTGTTTTT 1740
 TGGTGAATGA GAAAGGTGTG CTGGTCATGG AATGGCAGGT GTCATATGAC TGATTACTCA 1800
 GAGCAGATGA GGAAAACGTG AGTCTCTGAG TCCTTTGCTA ATCGCAACTC TTGTGAATTA 1860
 TTCTGATTCT TTTTATGCA GAATTTGATT CGTATGATCA GTACTGACTT TCTGATTACT 1920
 GTCCAGCTTA TAGTCTTCCA GTTTAATGAA CTACCATCTG ATGTTTCATA TTTAAGTGTA 1980
 TTTAAAGAAA ATAAACACCA TTATTCAAGC CAAAAA AAAA 2029

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 354 aminoácidos

(B) TIPO: Aminoácido

5 (C) CLASE DE CADENA: Simple

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

10 (F) TIPO DE TEJIDO: Pulmón humano

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

```

Met Tyr Arg Glu Trp Val Val Val Asn Val Phe Met Met Leu Tyr Val
1      5      10
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

5

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1325 pares de bases
- (B) TIPO: Ácido nucleico
- (C) CLASE DE CADENA: Simple
- (D) TOPOLOGÍA: Lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

20

(F) TIPO DE TEJIDO: Pulmón de ratón

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

```

GGAGAATGCC TTTTGCAACA CTTTTCAGTA GCTGCCTGGA AACAACTGCT TAGTCATCGG      60
TAGACATTTA AAATATTCAA AATGTATGGA GAATGGGGAA TGGGGAATAT CCTCATGATG      120
TTCCATGTGT ACTTGGTGCA GGGCTTCAGG AGCGAACATG GACCAGTGAA GGATTTTTTCT      180
TTTGAGCGAT CATCCCGGTC CATGTTGGAA CGATCTGAAC AACAGATCCG AGCAGCTTCT      240
AGTTTGGAGG AGTTGCTGCA AATCGCGCAC TCTGAGGACT GGAAGCTGTG GCGATGCCGG      300
TTGAAGCTCA AAAGTCTTGC CAGTATGGAC TCACGCTCAG CATCCCATCG CTCCACCAGA      360
TTTGCGGCAA CTTTCTATGA CACTGAAACA CTAAAAGTTA TAGATGAAGA ATGGCAGAGG      420
ACCCAATGCA GCCCTAGAGA GACATGCGTA GAAGTCGCCA GTGAGCTGGG GAAGACAACC      480
AACACATTCT TCAAGCCCCC CTGTGTAAT GTCTTCCGGT GTGGAGGCTG CTGCAACGAA      540
GAGGGTGTGA TGTGTATGAA CACAAGCACC TCCTACATCT CCAAACAGCT CTTTGAGATA      600
TCAGTGCCTC TGACATCAGT GCCCGAGTTA GTGCTGTGTA AAATTGCCAA CCATACGGGT      660
TGTAAGTGCT TGCCCACGGG CCCCCGCCAT CCTTACTCAA TTATCAGAAG ATCCATTGAG      720
ACCCCAGAAG AAGATGAATG TCCTCATTCC AAGAAACTCT GTCCTATTGA CATGCTGTGG      780
GATAACRCCA AATGTAATG TGTTTTGCAA GACGAGACTC CACTGCCTGG GACAGAAGAC      840
CACTCTTACC TCCAGGAACC CACTCTCTGT GGACCGCACA TGACGTTTGA TGAAGATCGC      900
TGTGAGTGCG TCTGTAAGC ACCATGTCCG GGAGATCTCA TTCAGCACCC GGAAAAGTGC      960
    
```

ES 2 390 107 T3

AGTTGCTTTG AGTGCAAAGA AAGTCTGGAG AGCTGCTGCC AAAAGCACAA GATTTTTCAC 1020
CCAGACACCT GCAGCTGTGA GGACAGATGT CCTTTTCACA CCAGAACATG TGCAAGTAGA 1080
AAGCCAGCCT GTGGAAAGCA CTGGCGCTTT CCAAAGGAGA CAAGGGCCCA GGGACTCTAC 1140
AGCCAGGAGA ACCCTTGATT CAACTTCCTT TCAAGTCCCC CCATCTCTGT CATTTTAAAC 1200
5 AGCTCACTGC TTTGTCAAGT TGCTGTCACT GTTGCCCACT ACCCCTTGAA CATGTGCAAA 1260
CACAGACACA CACACACACA CACACACAGA GCAACTAGAA TTATGTTTTC TAGGTGCTGC 1320
CTAAG 1325

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 7:

- 10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1135 pares de bases
 - (B) TIPO: Ácido nucleico
 - (C) CLASE DE CADENA: Simple
 - (D) TOPOLOGÍA: Lineal
- 15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (F) TIPO DE TEJIDO: Pulmón de ratón
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

AAACTTTGCT TCTGGAGAAT GCCTTTTGCA ACACTTTTCA GTAGCTGCCT GGAAACAAC	60
GCTTAGTCAT CGSTAGACAT TTAAAATATT CAAAATGTAT GGAGAATGGG GAATGGGGAA	120
TATCCTCATG ATGTTCCATG TGTACTTGGT GCAGGGCTTC AGGAGCGAAC ATGGACCAGT	180
GAAGCGATCA TCCCGGTCCA TGTGGAAACG ATCTGAACAA CAGATCCGAG CAGCTTCTAG	240
TTTGGAGGAG TTGCTGCAAA TCGCGCACTC TGAGGACTGG AAGCTGTGGC GATGCCGGTT	300
GAAGCTCAAA AGTCTTGCCA GTATGGACTC ACGCTCAGCA TCCCATCGCT CCACCAGATT	360
TGCGGCAACT TTCTATGACA CTGAAACACT AAAAGTTATA GATGAAGAAT GGCAGAGGAC	420
CCAATGCAGC CCTAGAGAGA CATGCCGTAGA AGTCGCCAGT GAGCTGGGGA AGACAACCAA	480
CACATTCTTC AAGCCCCCCT GTGTAAATGT CTTCCGGTGT GGAGGCTGCT GCAACGAAGA	540
GGGTGTGATG TGTATGAACA CAAGCACCTC CTACATCTCC AACAGCTCT TTGAGATATC	600
AGTGCCTCTG ACATCAGTGC CCGAGTTAGT GCCTGTTAAA ATTGCCAACC ATACGGGTTG	660
TAAGTGCTTG CCCACGGGCC CCCGCCATCC TTACTIONAATT ATCAGAAGAT CCATTCAGAC	720
CCCAGAAGAA GATGAATGTC CTCATTCCAA GAAACTCTGT CCTATTGACA TGCTGTGGGA	780
TAACACCAAA TGTAATGTG TTTTGCAAGA CGAGACTCCA CTGCCTGGGA CAGAAGACCA	840
CTCTTACCTC CAGGAACCCA CTCTCTGTGG ACCGCACATG ACGTTTGATG AAGATCGCTG	900
TGAGTGCGTC TGTAAGCAC CATGTCCGGG AGATCTCATT CAGCACCCGG AAAACTGCAG	960
TTGCTTTGAG TGCAAAGAAA GTCTGGAGAG CTGCTGCCAA AAGCACAAGA TTTTTCACCC	1020
AGACACCTGC AGGTCAATGG TCTTTTCGCT TTCCCTTAA CTTGGTTTAC TGATGACATT	1080
TAAAGGACAT ACTAATCTGA TCTGTTCAAG CTCTTTTCTC TCAGAGTCCA AGCAC	1135

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 358 aminoácidos

(B) TIPO: Aminoácido

5 (C) CLASE DE CADENA: Simple

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(F) TIPO DE TEJIDO: Pulmón de ratón

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

Met Tyr Gly Glu Trp Gly Met Gly Asn Ile Leu Met Met Phe His Val
 1 5 10 15
 Tyr Leu Val Gln Gly Phe Arg Ser Glu His Gly Pro Val Lys Asp Phe
 20 25 30
 Ser Phe Glu Arg Ser Ser Arg Ser Met Leu Glu Arg Ser Glu Gln Gln
 35 40 45
 Ile Arg Ala Ala Ser Ser Leu Glu Glu Leu Leu Gln Ile Ala His Ser
 50 55 60
 Glu Asp Trp Lys Leu Trp Arg Cys Arg Leu Lys Leu Lys Ser Leu Ala
 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 Thr 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 Thr 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 Gly Val Met 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 Ile Ala Asn His Thr
 180 185 190
 Gly Cys Lys Cys Leu Pro Thr Gly Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile
 195 200 205
 Arg Arg Ser Ile Gln Thr Pro Glu Glu Asp Glu Cys Pro His Ser Lys
 210 215 220
 Lys Leu Cys Pro Ile Asp Met Leu Trp Asp Asn Thr Lys Cys Lys Cys
 225 230 235 240
 Val Leu Gln Asp Glu Thr Pro Leu Pro Gly Thr Glu Asp His Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Gln Glu Pro Thr Leu Cys Gly Pro His Met Thr Phe Asp Glu Asp
 260 265 270

```

Arg Cys Glu Cys Val Cys Lys Ala Pro Cys Pro Gly Asp Leu Ile Gln
      275                               280                       285

His Pro Glu Asn Cys Ser Cys Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Ser
      290                               295                       300

Cys Cys Gln Lys His Lys Ile Phe His Pro Asp Thr Cys Ser Cys Glu
305                               310                       315                       320

Asp Arg Cys Pro Phe His Thr Arg Thr Cys Ala Ser Arg Lys Pro Ala
      325                               330                       335

Cys Gly Lys His Trp Arg Phe Pro Lys Glu Thr Arg Ala Gln Gly Leu
      340                               345                       350

Tyr Ser Gln Glu Asn Pro
      355
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 321 aminoácidos

(B) TIPO: Aminoácido

5

(C) CLASE DE CADENA: Simple

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Proteína

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(F) TIPO DE TEJIDO: Pulmón de ratón

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

Met Tyr Gly Glu Trp Gly Met Gly Asn Ile Leu Met Met Phe His Val
 1 5 10 15
 Tyr Leu Val Gln Gly Phe Arg Ser Glu His Gly Pro Val Lys Arg Ser
 20 25 30
 Ser Arg Ser Met Leu Glu Arg Ser Glu Gln Gln Ile Arg Ala Ala Ser
 35 40 45
 Ser Leu Glu Glu Leu Leu Gln Ile Ala His Ser Glu Asp Trp Lys Leu
 50 55 60
 Trp Arg Cys Arg Leu Lys Leu Lys Ser Leu Ala Ser Met Asp Ser Arg
 65 70 75 80
 Ser Ala Ser His Arg Ser Thr Arg Phe Ala Ala Thr Phe Tyr Asp Thr
 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 Thr 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 Gly Val Met 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 Ile Ala Asn His Thr Gly Cys Lys Cys Leu
 180 185 190
 Pro Thr Gly Pro Arg His Pro Tyr Ser Ile Ile Arg Arg Ser Ile Gln
 195 200 205
 Thr Pro Glu Glu Asp Glu Cys Pro His Ser Lys Lys Leu Cys Pro Ile
 210 215 220
 Asp Met Leu Trp Asp Asn Thr Lys Cys Lys Cys Val Leu Gln Asp Glu
 225 230 235 240
 Thr Pro Leu Pro Gly Thr Glu Asp His Ser Tyr Leu Gln Glu Pro Thr
 245 250 255
 Leu Cys Gly Pro His Met Thr Phe Asp Glu Asp Arg Cys Glu Cys Val
 260 265 270
 Cys Lys Ala Pro Cys Pro Gly Asp Leu Ile Gln His Pro Glu Asn Cys
 275 280 285
 Ser Cys Phe Glu Cys Lys Glu Ser Leu Glu Ser Cys Cys Gln Lys His
 290 295 300
 Lys Ile Phe His Pro Asp Thr Cys Arg Ser Met Val Phe Ser Leu Ser
 305 310 315 320
 Pro

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CLASE DE CADENA: Simple

5

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(F) TIPO DE TEJIDO:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

10

GGGCTGCTTC TAGTTTGGAG 20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

15

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) CLASE DE CADENA: Simple

(D) TOPOLOGÍA: Lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(vi) FUENTE ORIGINAL:

20

(F) TIPO DE TEJIDO:

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

CACTCGCAAC GATCTTCGTC 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado que tiene la capacidad de estimular la proliferación de células endoteliales en un mamífero, en donde dicho polipéptido está constituido por la secuencia de un VEGF-D maduro que está contenida en el fragmento comprendido entre los residuos de aminoácidos 92 y 205 de SEQ ID NO: 5 de VEGF-D.
2. Un polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, que está constituido por los residuos de aminoácidos desde 92 hasta 205 de SEQ ID NO: 5.
- 10 3. Un polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, que está constituido por los residuos de aminoácidos desde 93 hasta 201 de SEQ ID NO: 5.
4. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, con la condición de que el polipéptido codificado no sea VEGF-D de longitud total (SEQ ID NO: 5).
- 15 5. Una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 4, que es un DNA genómico.
6. Una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 4, que es un cDNA.
- 20 7. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
- 25 8. Un vector de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el ácido nucleico es un cDNA que codifica el polipéptido de la reivindicación 3 y está conectado operativamente a un DNA que codifica la secuencia señal para secreción de proteína por el gen de interleuquina-3 (IL-3).
9. Una célula hospedadora transformada o transfectada con un vector de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8.
- 30 10. Un anticuerpo específicamente reactivo con un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 35 11. Un método de construcción de un vector capaz de expresar un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo dicho método insertar el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6 en un vector en una posición en la que dicha molécula de ácido nucleico esté conectada operativamente con al menos un promotor y/u otras secuencias de control.
- 40 12. Un polipéptido aislado que tiene la capacidad de estimular la proliferación de células endoteliales en un mamífero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para utilizar en la estimulación de la angiogénesis y/o la neovascularización en un mamífero.
- 45 13. Un polipéptido para utilizar de acuerdo con la reivindicación 12, para su uso en la aceleración de la angiogénesis en la curación de las heridas, trasplante de tejidos u órganos; o para el establecimiento de la circulación colateral en infartos tisulares o estenosis arterial.
14. Un polipéptido para utilizar de acuerdo con la reivindicación 12, en donde las células endoteliales son células endoteliales de vasos linfáticos.
15. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 10.

1	M R S S O S T L E R S E Q I R A A S S L E E L L R I T H S	VEGF-D
2	M S P L L R R L - - - - - L L A A L L Q L A P A	h VEGF-B
31	E D W K L W R C R L R L K S F T S M D S R S A S H R S T R E	VEGF-D
20	Q A - - - - - P V S Q P D A P G H Q R K V V S W	h VEGF-B
61	A A T F Y D I E T L K V I D E E W O R T O C S P R E T C V E	VEGF-D
39	I D V Y - - - - - T R A T C Q P R E V V V P	h VEGF-B
91	V A S E L G K S T N T F F K P P C V N V F R C G G C C N E E	VEGF-D
56	L T V E L M G T V A K Q L V P S C V T V Q R C G G C C P D D	h VEGF-B
121	S L I C M N T S T S Y I S K Q L F E I S V P L T S V P E L V	VEGF-D
86	G L E C V P T G O H Q V R M O I L M I R Y P S S Q L G E M -	h VEGF-B
151	P V K V A N H T G C K C L P T A P R H P Y S I I R R S I O I	VEGF-D
115	- - S L E E H S Q C E C R P K - - - - - K K D S A V	h VEGF-B
181	P E E D R C S H S K K L C P I D M L W D S N K C K C V L O E	VEGF-D
134	K P D S - - - - P R P L C P - - - - - R C T Q H H	h VEGF-B
211	E N P L A G T E D H S H L O E P A L C G P H M M F D E D R C	VEGF-D
150	Q R P - - - - - D P R T C	h VEGF-B
241	E C V C K T P C P K D L I O R P K N C S C F E C K E S L E T	VEGF-D
158	R C R C R R - - - R S F L R - - - - -	h VEGF-B
271	C C O K H K L - F H P D T C S C E D R C P F H T R P C A S G	VEGF-D
169	- C O G R G L E L N F D T C R C - - - - -	h VEGF-B
300	K T A C A K H C R F P K E K R A A O G P H S R K N P	VEGF-D
184	- - - - - R K L R R	h VEGF-B

FIG. 1b

1	<u>M</u> R <u>S</u> S <u>O</u> - - - - - <u>S</u> T <u>L</u> E <u>R</u> S <u>E</u> <u>O</u> <u>O</u> <u>T</u> R <u>A</u> A <u>S</u> S <u>L</u>	VEGF-D
1	<u>M</u> P <u>V</u> <u>M</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> A - - - - -	hPlGF
22	<u>E</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>W</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>R</u>	VEGF-D
19	- - - <u>L</u> P <u>A</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>A</u> <u>L</u> - - - - -	hPlGF
52	<u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>Y</u> <u>D</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>O</u> <u>R</u> <u>T</u> <u>O</u>	VEGF-D
30	<u>S</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>S</u> - - - - - <u>E</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>P</u> - <u>F</u> <u>O</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>Y</u>	hPlGF
82	<u>C</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>P</u>	VEGF-D
52	<u>C</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>Y</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>M</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>L</u>	hPlGF
112	<u>R</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>N</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>C</u> <u>M</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>V</u>	VEGF-D
82	<u>R</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>S</u>	hPlGF
142	<u>P</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>N</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>Y</u>	VEGF-D
112	- - <u>G</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>P</u> - - - - -	hPlGF
172	<u>S</u> <u>I</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>O</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>W</u> <u>D</u> <u>S</u>	VEGF-D
133	- - <u>L</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>M</u> <u>K</u> - <u>P</u> <u>E</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>R</u> - - - - -	hPlGF
202	<u>N</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>O</u> <u>E</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>H</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>I</u> <u>O</u> <u>E</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>P</u>	VEGF-D
144	- - - - -	hPlGF
232	<u>R</u> <u>M</u> <u>M</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>O</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>C</u>	VEGF-D
144	- - - - -	hPlGF
262	<u>F</u> <u>E</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>O</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>H</u> <u>P</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>P</u> <u>F</u>	VEGF-D
144	- - - - -	hPlGF
292	<u>H</u> <u>T</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>P</u> - -	VEGF-D
144	- - - - - <u>P</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>G</u> - - - - - <u>K</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>K</u> <u>O</u> <u>R</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>D</u>	hPlGF
320	- - - - - <u>H</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>P</u>	VEGF-D
160	<u>C</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>R</u>	hPlGF

FIG. 1d

FIG. 2

```

1  H R S S O S T L P R S F Q O I R A A S S I F F L L R I T H S VEGF-D
1  M T - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - V L Y P VEGF-C
1  M S - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - P I I - - - - - h VEGF-B
1  M - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - N F L L S h VEGF 165
1  M P - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - V M R L F P C hPIGF

31  E D W K L H R C R L R L K S F - - - - - T S M D S R S A VEGF-D
7  F Y H K M Y K C Q L R K G G W O R - N R E Q A N L N I S R T - VEGF-C
5  - - - - - L R R L L L A A L L O L A P A Q A P V S Q P D A h VEGF-B
7  - - - - - W V H R S L A L L L L - Y L E H A K H S Q A A P M A E C C b VEGF 165
10  - - F L Q L L A C L L A L P A V P P O O W A - - - - - L S A G N hPIGF

54  S R E S T R F A A T F Y D I E T L K V I D F E W O R T Q C S VEGF-D
35  - E E T I K P A A A R H Y N T E I L L K S I D N E H R K I T Q C H VEGF-C
29  P G H - - - - - L R R L L L A A L L O L A P A Q A P V S Q P D A h VEGF-B
34  C Q N - - - - - B R E V V V K F M D V - Y Q R S Y C R h VEGF 165
34  G S S - - - - - T V E V V P F Q E V - H G R S Y C R hPIGF

84  P R E T C V F V A S E I G K S T N T F F K P P C V N V F R C VEGF-D
64  P R E V C I D V C K E F I G V A T N T F F K P P C V S V Y R C VEGF-C
49  P R E V V V P L T V E I H G T V A K Q L V P S C V T V Q R C h VEGF-B
54  P I E T L V D I F O E Y P D E I E T Y I F R P S C V P L M R C h VEGF 165
54  A L E R L V D V V S E Y P S E V E R M E S P S C V S L L R C hPIGF

114  C C C C N F E S L Y C H M T S T S Y I S K O L F E I S V P L VEGF-D
94  C C C C N S E C L Q C H M T S T S Y L L S R T I F E I T V P L VEGF-C
79  G C C C P D D G L E C V P T C O H O V R M D I L M I R - - - b VEGF-B
84  G C C C N D E C L E C V P T E E S N I T H Q I M R I K F - - - h VEGF 165
84  T G C C C G D E N L E C V P V E T A N V T H Q L L K Y R S - - - hPIGF

144  T S Y P F L V P V K V A N H T G C K C I P T A P - - - R H P V VEGF-D
124  S Q G R K E Y T I S F A N H T S C R C M S K L D V Y R Q V H VEGF-C
106  Y P S S Q T G E M S L E E R S Q C E C - - - - - h VEGF-B
112  H Q G O B I G E M S P L O H N K C E C - - - - - h VEGF 165
112  G D R R S Y V E L T F S Q H V R C E C - - - - - hPIGF

172  S I I R R S I O T P F E D R C S H S K K I C P I D M I W D S VEGF-D
154  S I I R R S I P - A T L P O L C O A A N R T I C P T N Y M H N N VEGF-C
125  - - - - - R P R K K D S A V K P D S P R F L C P - - - - - h VEGF-B
131  - - - - - R P K K D R - A R O E N P - - - - - L C G - - - - - h VEGF 165
131  - - - - - R P L R E K - H X - - - - - - - - - - - - - - - hPIGF

202  H K C K C Y I O E F H P I A G T E D - - - - - VEGF-D
183  H I C R C L A O E D F M F S S D A G D D S T D G F H D I C G VEGF-C
144  - - - - - R C T O H E O R - - - - - P - - - - - - - - - - - - - - - h VEGF-B
145  - - - - - P C S E R R K H L F V O - - - - - - - - - - - - - - - h VEGF 165
139  - - - - - P E R R R P - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - hPIGF

220  - H S H L O E - - - - - VEGF-D
213  P N K E L I D E T C O C V C R A G L R P A S C C P H K E L D VEGF-C
153  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D h VEGF-B
157  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D h VEGF 165
145  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - hPIGF

226  - - - - - P A I C G P H M H P D E D R C E C VEGF-D
243  R N S C Q C V C K N K L F P S O L G A N R E F D E N T C Q C VEGF-C
154  F R T C R C R C R R S F - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - h VEGF-B
158  P Q T C K C S C K N T D - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - h VEGF 165
145  - - - - - K G R C - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - hPIGF

243  V C K T E C P F D L I O H P K M C S C P E C K E S I E T C C VEGF-D
273  V C K R T C P R N O P L N D G K C A L C - E C T E S P O K C L VEGF-C
167  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - L R C Q h VEGF-B
170  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - S R C K h VEGF 165
149  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - K R R R hPIGF

273  Q K H K L F H P D T C S C F D R - C P F H T R P C A S G R T VEGF-D
302  L R G R K F R H Q T C S C Y R R P C T N R O K A C E P L G F S VEGF-C
171  G R G L E L N P D T C R C - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - h VEGF-B
174  A R Q L E L N E R T C R C - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - h VEGF 165
153  E R Q R P T D C E L C G D - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - hPIGF

302  A C A K H C R F P F K R A A O G P R S R E N P VEGF-D
332  Y S E E V C R C V P S Y H - - - - - K R L R O M S VEGF-C
184  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - R K L R R h VEGF-B
187  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D K P R R h VEGF 165
166  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - A V P R R hPIGF
    
```

FIG. 3

10 20 30 40
MRSSQSTLERSEQQIRAASSLEELLRITHSEDWKLWRCRL

50 60 70 80
RLKSFTSMDSRSASHRSTRFAATFYDIETLKVIDEEWQRT

90 100 110 120
QCSPRETCVEVASELGKSTNTFFKPPCVNVFRCGGCCNEE

130 140 150 160
SLICMNTSISYISKQLFEISVPLTSVPELVPVKVANHTGC

170 180 190 200
KCLPTAPRHPYSIIRRSIQIPEEDRCSHKKLCPI DMLWD

210 220 230 240
SNKCKCVLQEEENPLAGTEDHSHLQEPALCGPHMMFDEDRC

250 260 270 280
ECVCKTPCPKDLIQHPKNCSCFECKESLETCCQKHKL FHP

290 300 310 320
DTCSCEDRCPFHTRPCASGKTACAKHCRFPKEKRAAQGPH

SRKNP

FIG. 4

GTTGGGTTCAGCTTTCTGTAGCTGTAAGCATTGGTGGCCACACCACCTCCTTACAA
 AGCAACTAGAACCTGCGGCATACATTGGAGAGATTTTTTTAATTTCTGGACATGAA
 GTAAATTTAGAGTGCTTTCTAATTTTCAGGTAGAAGACATGTCCACCTTCTGATTATT
 TTTGGAGAACATTTTGATTTTTTTCATCTCTCTCCCCACCCCTAAGATTGTGCAA
 AAAAGCGTACCTTGCCCTAATTGAAATAATTTTCATGGATTTTGATCAGAAGTATT
 ATTTGGTTTTCTGTGTGAAGTTTTGAGTTTTCAAACCTTCTCTGGAGAATGCCTT
 TTGAAACAATTTTCTCTAGCTGCCTGATGTCAACTGCTTAGTAATCAGTGGATATTG
 AATATTCAAATGTACAGAGAGTGGGTAGTGGTGAATGTTTTTCATGATGTTGTACG
 TCCAGCTGGTGCAGGGCTCCAGTAATGAACATGGACCAGTGAAGCGATCATCTCAGT
 CCACATTGGAACGATCTGAACAGCAGATCAGGGCTGCTTCTAGTTTGGAGGAACTAC
 TTCGAATTACTCACTCTGAGGACTGGAAGCTGTGGAGATGCAGGCTGAGGCTCAAAA
 GTTTTACCAGTATGGACTCTCGCTCAGCATCCCATCGGTCCACTAGGTTGCGGGCAA
 CTTTCTATGACATTGAAACACTAAAAGTTATAGATGAAGAATGGCAAAGAAGTCACT
 GCAGCCCTAGAGAAAAGTGGCTGGAGGTGGCCAGTGAAGTGGGGAAGAGTACCAACA
 CATTCTTCAAGCCCCCTTGTGTGAACGTGTTCCGATGTGGTGGCTGTTGCAATGAAG
 AGAGCCTTATCTGTATGAACACCAGCACCTCGTACATTTCCAAACAGCTCTTTGAGA
 TATCAGTGCCTTTGACATCAGTACCTGAATTAGTGCCTGTTAAAGTTGCCAATCATA
 CAGGTTGTAAGTGCTTGCCAAACAGCCCCCGCCATCCATACTCAATTATCAGAAGAT
 CCATCCAGATCCCTGAAGAAGATCGCTGTTCCCATTTCCAAGAAACTGTCTATTTG
 ACATGCTATGGGATAGCAACAAATGTAATGTGTTTTGCAAGGAGGAAAATCCACTTG
 CTGGAACAGAAGACCCTCTCATCTCCAGGAACCAGCTCTCTGTGGGCCACACATGA
 TGTGTTGACGAAGATCGTTGCGAGTGTGTCTGTAAAACACCATGTCCCAAAGATCTAA
 TCCAGCACCCCAAAAAGTGCAGTTGCTTTGAGTGCAAAAGAAAGTCTGGAGACCTGCT
 GCCAGAAGCACAAAGCTATTTTACCAGACACCTGCAGCTGTGAGGACAGATGCCCT
 TTCATACCAGACCATGTGCAAGTGGCAAAACAGCATGTGCAAAGCATTGCCGCTTTC
 CAAAGGAGAAAAGGGCTGCCAGGGGCCCCACAGCCGAAAGAATCCTTGATTCAGCG
 TTCCAAGTTCCCATCCCTGTCAATTTTAAACAGCATGCTGCTTTGCCAAGTTGCTGT
 CACTGTTTTTTTTCCAGGTGTTAAAAAAAATCCATTTTACACAGCACCACAGTGA
 ATCCAGACCAACCTTCCATTCACACCAGCTAAGGAGTCCCTGGTTCATTGATGGATG
 TCTTCTAGCTGCAGATGCCTCTGCGCACCAAGGAATGGAGAGGAGGGGACCCATGTA
 ATCCTTTTGTGTTAGTTTTGTTTTGTTTTTGGTGAATGAGAAAGGTGTGCTGGTCA
 TGGAATGGCAGGTGTATATGACTGATTACTCAGAGCAGATGAGGAAAACGTGATGTC
 TCTGAGTCCCTTGCTAATCGCAACTCTGTGAATFATTCTGATCTTTTTTATGCAG
 AATTTGATTCGTATGATCAGTACTGACTTTCTGATTACTGTCCAGCTTATAGTCTTC
 CAGTTAATGAACTACCATCTGATGTTTCATATTTAAGTGTATTTAAAGAAAATAAA
 CACCATTATCAAGCCAAAAAATAAAAAA

MYREWVVNVFMMLYVQLVQGSSNEHGPVKRSSQSTLERSEQQIRAASSLEELLRIT
HSEDWKLWRCRLRLKSFTSMDSRASASHRSTRFAATFYDIETLKVIDEEWQRTQCS
ETCVEVASELGKSTNTFFKPPCVNVFRCGGCCNEESLICMNTSTSYISKQLFEISVP
LTSVPPELVKVANHTGCKCLPTAPRHYPYSIIRRSIQIPEEDRCSHKKLCPIDMLW
DSNKCKCVLQEEENPLAGTEDHSHLQEPALCGPHMDFEDRCECVCKTPCPKDLIQHP
KNCSCFECKESLETCCQKHKLPHPDTCSCEDRCPFHTRPCASGKTACAKHCRFPKEK
RAAQGPHSRKNP

FIG. 5

FIG. 6

GGAGAATGCCTTTTGCAACACTTTTCAGTAGCTGCCTGGAAACAACCTGCTTAGTCAT
CGGTAGACATTTAAAATATTCAAATGTATGGAGAATGGGGAATGGGGAATATCCTC
ATGATGTTCCATGTGTACTTGGTGCAGGGCTTCAGGAGCGAACATGGACCAGTGAAG
GATTTTCTTTTGAGCGATCATCCCGGTCCATGTTGGAACGATCTGAACAACAGATC
CGAGCAGCTTCTAGTTGGAGGAGTTGCTGCAAATCGCGCACTCTGAGGACTGGAAG
CTGTGGCGATGCCGGTTGAAGCTCAAAGCTTGGCCAGTATGGACTCACGCTCAGCA
TCCCATCGCTCCACCAGATTTGCGGCAACTTCTATGACACTGAAACACTAAAAGTT
ATAGATGAAGAATGGCAGAGGACCCAATGCAGCCCTAGAGAGACATGEGTAGAAGTC
GCCAGTGAGCTGGGGAAGACAACCAACACATTCTTCAAGCCCCCTGTGTAATGTC
TTCCGGTGTGGAGGCTGCTGCAACGAAGAGGGTGTGATGTGTATGAACACAAGCACC
TCCTACATCTCCAAACAGCTCTTTGAGATATCAGTGCCTCTGACATCAGTGCCCGAG
TTAGTGCCCTGTTAAAATTGCCAACCATACGGGTTGTAAGTGCTTGCCACGGGCCCC
CGCCATCCTTACTCAATTATCAGAAGATCCATTCAGACCCCAGAAGAAGATGAATGT
CCTCATTTCCAAGAACTCTGTCTATTGACATGCTGTGGGATAACACCAAATGTAAA
TGTGTTTTGCAAGACGAGACTCCACTGCCTGGGACAGAAGACCACTCTTACCTCCAG
GAACCCACTCTCTGTGGACCGCACATGACGTTTGATGAAGATCGCTGTGAGTGCCTC
TGTAAGCACCATGTCCGGGAGATCTCATTGACACCCGGAAAACCTGCAGTTGCTTT
GAGTGCAAAGAAAGTCTGGAGAGCTGCTGCCAAAAGCACAAAGATTTTTACCCAGAC
ACCTGCAGCTGTGAGGACAGATGTCCTTTTCACACCAGAACATGTGCAAGTAGAAAG
CCAGCCTGTGGAAAGCACTGGCGCTTTCCAAAGGAGACAAGGGCCCAGGGACTCTAC
AGCCAGGAGAACCCTTGATTCAACTTCCTTTCAAGTCCCCCATCTCTGTCAATTTTA
AACAGCTCACTGCTTTGTCAAGTTGCTGTCACTGTTGCCCACTACCCCTTGAACATG
TGCAAACACAGACACACACACACACACACAGAGCAACTAGAATTATGTTTTCT
AGGTGCTGCCTAAG

FIG. 7

AACTTTGCTTCTGGAGAATGCCTTTTGCAACACTTTTCAGTAGCTGCCTGGAAACA
 ACTGCTTAGTCATCGGTAGACATTTAAAATATTCAAATGTATGGAGAATGGGGAAT
 GGGGAATATCCTCATGATGTTCCATGTGTACTTGGTGCAGGGCTTCAGGAGCGAACA
 TGGACCAGTGAAGCGATCATCCCGGTCCATGTTGGAACGATCTGAACAACAGATCCG
 AGGAGCTTCTAGTTTGGAGGAGTTGCTGCAAATCGCGCACTCTGAGGACTGGAAGCT
 GTGGCGATGCCGGTTGAAGCTCAAAGTCTTGCCAGTATGGACTCACGCTCAGCATC
 CGATCGCTCCACCAGATTTGCGGCAACTTCTATGACACTGAAACACTAAAAGTTAT
 AGATGAAGAATGGCAGAGGACCCAATGCAGCCCTAGAGAGACATGCGTAGAAGTCGC
 CAGTGAGCTGGGGAAGACAACCAACACATTCCTCAAGCCCCCTGTGTAAATGTCTT
 CCGGTGTGGAGGCTGCTGCAACGAAGAGGGTGTGATGTGTATGAACACAAGCACCTC
 CTACATCTCCAAACAGCTCTTTGAGATATCAGTGCCTCTGACATCAGTGCCCGAGTT
 AGTGCCTGTAAAATTGCCAACCATACGGTTGTAAGTGCTTGCCACGGGCCCCCG
 CCATCCTTACTCAATTATCAGAAGATCCATTCAGACCCAGAGAAGATGAATGTCC
 TCATTCCAAGAACTCTGTCCATTGACATGCTGTGGGATAACACCAAATGTAAATG
 TGTTTTGCAAGACGAGACTCCACTGCCTGGGACAGAAGACCACTCTTACCTCCAGGA
 ACCCACTCTCTGTGGACCGCACATGACGTTTGATGAAGATCGCTGTGAGTGCCTCTG
 TAAAGCACCATGTCCGGGAGATCTCATTGAGCACC CGAAAACCTGCAGTTGCTTTGA
 GTGCAAAGAAAGTCTGGAGAGCTGCTGCCAAAAGCACAAGATTTTTCACCCAGACAC
 CTGCAGGTCAATGGTCTTTTCGCTTTCCCTTAACTTGTTTACTGATGACATTTAA
 AGGACATACTAATCTGATCTGTTCAGGCTCTTTCTCTCAGAGTCCAAGCAC

1	M Y G E W G M G N I L M M F H V Y L V O G F R S E H G P V K D F S F E R S S R S	mVEGF-D1
1	M Y G E W G M G N I L M M F H V Y L V O G F R S E H G P V K R S S R S	mVEGF-D2
41	M L E R S E Q Q I R A A S S L E E L L Q I A H S E D W K L W R C R L K L K S L A	mVEGF-D1
36	M L E R S E Q Q I R A A S S L E E L L Q I A H S E D W K L W R C R L K L K S L A	mVEGF-D2
81	S M D S R S A S H R S T R F A A T F Y D T E T L K V I D E E W O R T Q C S P R E	mVEGF-D1
76	S M D S R S A S H R S T R F A A T F Y D T E T L K V I D E E W O R T Q C S P R E	mVEGF-D2
121	T C V E V A S E L G K T T N T F F K P P C V N V F R C G G C C N E E G V H C M N	mVEGF-D1
116	T C V E V A S E L G K T T N T F F K P P C V N V F R C G G C C N E E G V H C M N	mVEGF-D2
161	T S T S Y I S K Q L F F I S V P L T S V P E L V P V X I A N H T G C K C L P T G	mVEGF-D1
156	T S T S Y I S K O L F F I S V P L T S V P E L V P V X I A N H T G C K C L P T G	mVEGF-D2
201	P R H P Y S I I R R S I Q T P E E D E C P H S K K L C P I D M L W D N T K C K C	mVEGF-D1
196	P R H P Y S I I R R S I Q T P E E D E C P H S K K L C P I D M L W D N T K C K C	mVEGF-D2
241	V L Q D E T P L P G T E D H S Y L Q E P T L C G P H M T F D E D R C E C V C K A	mVEGF-D1
236	V L Q D E T P L P G T E D H S Y L Q E P T L C G P H M T F D E D R C E C V C K A	mVEGF-D2
281	P C P G D L I O H P E N C S C F E C K E S L E S C C O K H K I F H P D T C R S N	mVEGF-D1
276	P C P G D L I O H P E N C S C F E C K E S L E S C C O K H K I F H P D T C R S N	mVEGF-D2
321	D R C P F H T R T C A S R K P A C G K H R E P K S T R A O Q L V S O E N P	mVEGF-D1
316 V P S L . S D	mVEGF-D2

FIG. 8

1	M Y R E W V V V N V F M L L Y V O L V Q G S S N E R G P V K R S S O S	hVEGF-D
1	M Y G E W G M G N I L M M P H V Y V L V Q G F R S E H G P V X R S S R S	mVEGF-D1
1	M Y G E W G M G N I L M M P H V Y V L V Q G F R S E H G P V X R S S R S	mVEGF-D2
36	T L E R S E Q Q I R A A S S L E E L L I A H S E D W K L W R C R L R L K K S F T		hVEGF-D
41	H L E R S E Q Q I R A A S S L E E L L I A H S E D W K L W R C R L R L K K S L A		mVEGF-D1
36	H L E R S E Q Q I R A A S S L E E L L I A H S E D W K L W R C R L R L K K S L A		mVEGF-D2
76	S M D S R S A S H R S T R F A A T F Y D I E T L K K V I D E E W Q R T Q C S P R E		hVEGF-D
81	S M D S R S A S H R S T R F A A T F Y D I E T L K K V I D E E W Q R T Q C S P R E		mVEGF-D1
76	S M D S R S A S H R S T R F A A T F Y D I E T L K K V I D E E W Q R T Q C S P R E		mVEGF-D2
116	T C V E V A S E L G K S T N T F F K P P C V N V F R C G G C C N E E S B L I C M N		hVEGF-D
121	T C V E V A S E L G K S T N T F F K P P C V N V F R C G G C C N E E S B L I C M N		mVEGF-D1
116	T C V E V A S E L G K S T N T F F K P P C V N V F R C G G C C N E E S B L I C M N		mVEGF-D2
156	T S T S Y I S K Q L F F E I S V P L T S V P E L V P V K V A N H T G C C R K L P T A		hVEGF-D
161	T S T S Y I S K Q L F F E I S V P L T S V P E L V P V K V A N H T G C C R K L P T G		mVEGF-D1
156	T S T S Y I S K Q L F F E I S V P L T S V P E L V P V K V A N H T G C C R K L P T G		mVEGF-D2
196	P R H P Y S I I R R S I O L P E E D R C S H S K K L C C P I D M L W D S N K C K C		hVEGF-D
201	P R H P Y S I I R R S I O L P E E D R C S H S K K L C C P I D M L W D S N K C K C		mVEGF-D1
196	P R H P Y S I I R R S I O L P E E D R C S H S K K L C C P I D M L W D S N K C K C		mVEGF-D2
236	V L Q E N P L A G T E D H S H L Q E P A L C G P R M M F D E D R C E C V C K T		hVEGF-D
241	V L Q D E T P L P G T E D H S Y L Q E P T L C G P R M M T F D E D R C E C V C K A		mVEGF-D1
236	V L Q D E T P L P G T E D H S Y L Q E P T L C G P R M M T F D E D R C E C V C K A		mVEGF-D2
276	P C P K D L I Q H P K N C S C F E C K E S L E S C C Q K K K L F H P D T C S C E		hVEGF-D
281	P C P G D L I Q H P E N C S C F E C K E S L E S C C Q K K K I F H P D T C S C E		mVEGF-D1
276	P C P G D L I Q H P E N C S C F E C K E S L E S C C Q K K K I F H P D T C S C E		mVEGF-D2
316	D R C P F H T R P C A S G K T A C A X H C R F P P K E K R A A Q G P H S R K N P P		hVEGF-D
321	D R C P F H T R P C A S R R K P A C G K H M R F P K E T R A . . . O G L Y S Q E N P P		mVEGF-D1
316	D R C P F H T R P C A S R R K P A C G K H M R F P K E T R A . . . V F S L - S E		mVEGF-D2

FIG. 9

```

1  MYREWVVVNVFHM . . . . . LYVOLLVGGSSNEHGPR . . . . . hVEGF-D
1  MHLLEGFFSVACSSL . . . . . LAAAALLPGLPREAPAAAAAFESG hVEGF-C
1  MNFL . . . . . LSWVHWSLA LLLYLHHAHAKWSQAAAPMA . . . . . hVEGF 165
1  MSPL . . . . . LRRLLAAALLLQ LAPAQAPVSO . . . . . hVEGF-B
1  MPVMRLFFPCFLQL . . . . . LAGLALPFAVPPQOWALS . . . . . hPIGF

31  . . . . . RSSOSTLENSEOOYRAASSLEELLRYTR hVEGF-D
36  LDLSDAEPDAGEATAYASKDLLEELQLRVSLSVDLEIMTVLYP hVEGF-C
31  . . . . . EGGGONHHEVV . . . . . hVEGF 165
26  . . . . . PDAPGHQRVV . . . . . hVEGF-B
31  . . . . . ACNGSSSEVEVV . . . . . hPIGF

60  EDWKLWRRCRLR . . . . . LKSF TSMDSRSASHRSTRFAATFY hVEGF-D
60  EYWKMYKQLR KGGWQHNR EQANLNRTEETIRFAAAYN hVEGF-C
42  . . . . . hVEGF 165
37  . . . . . hVEGF-B
42  . . . . . hPIGF

96  LETLKVIDEFEWORTQCSFKETCVEVASLGLKBTNTFFKLP hVEGF-D
116  TETLKLSDNEWRKTKCMPREVLICIDVIGKELFGVATNTFFKLP hVEGF-C
42  . . . . . KFMDVYORSYCHPTEVLDIFQHYPDEIEYIFKHS hVEGF 165
37  . . . . . SWIDVYTRATCCQPREVVVPLTVEIKGTVAKQLVHS hVEGF-B
42  . . . . . PFOEVRGCRSYCRALBRLLVDVVEEY PSEVEHMTSLB hPIGF

136  CUNVFRCGCCCNESLICYMNTSTSYISKOLFEISVPLTSV hVEGF-D
156  CVSYVYRCGGCCCNSEGLLOCMNTSTSYLSKTLFEITVPLSQG hVEGF-C
77  CVPLMRCGGCCCNDEGLELCVPTESNITMCIIRIKP . . . . . HOC hVEGF 165
77  CVTVORRCGGCCCFDGLLECVPTGQHQVIRMQILMIR . . . . . YPS hVEGF-B
72  CVSLLRCTGCCGDLNLEHCVVPEH ANVTMQLLKR . . . . . GDR hPIGF

176  PELVPEVKVANRATGCKCLPTAB . . . . . RHPEYSYIRR . . . . . SIOIPB hVEGF-D
196  PKPVITISFANHTS CRGM SKLDVYRQVHSTIRR . . . . . SLPATL hVEGF-C
115  QHIGEMSFLOHMKCECRPKKD . . . . . RA . . . . . RQENFC hVEGF 165
109  SDIGEMSLZEHHSQCCECRPKKK . . . . . DS . . . . . AVKPDSLR hVEGF-B
115  PSYVELTFSQVRECECRFLRE . . . . . KM . . . . . KPERRR hPIGF

212  EDRCSRSKKLCPIDMLWDSNKKCKVLOEENPLAGTEDHS hVEGF-D
234  PQCOAANKTCTPTNYMWNHHCRLCLALOEDFMFSSDAGDSS hVEGF-C
144  GPCSERR . . . . . hVEGF 165
140  PLCPFRCTQ . . . . . hVEGF-B
144  P . . . . . hPIGF

252  LOE . . . . . hVEGF-D
273  TDGFHDICGPNKELDEETCQCVCRAGLNFPASC GFHKELDR hVEGF-C
152  . . . . . hVEGF 165
148  . . . . . hVEGF-B
145  . . . . . hPIGF

255  . . . . . PALCGEHHMFDEDRCECVCKRTCPKDL hVEGF-D
313  NSCCVCENKLFPSQCGANREPDENTCQCVCCKRTCPRNQP hVEGF-C
152  . . . . . HLFV hVEGF 165
148  . . . . . HHQR hVEGF-B
145  . . . . . hPIGF

283  OHFKNCSCECKESL . . . . . ETCCORHKLHPDTCSEEDRCPP hVEGF-D
353  LNFGRKCACTEESP . . . . . QKCLLKGKREHHTCSG . . . . . Y hVEGF-C
156  QDPQTCCKC . . . . . BCKNTD . . . . . SRC KAOLELNERTCRC . . . . . D hVEGF 165
152  PDPRTRCR . . . . . RCRRRSFLRCOGRGLELNFDTCLR . . . . . R hVEGF-B
145  . . . . . VGRG . . . . . KRREREQRPTDCHLCGD . . . . . A hPIGF

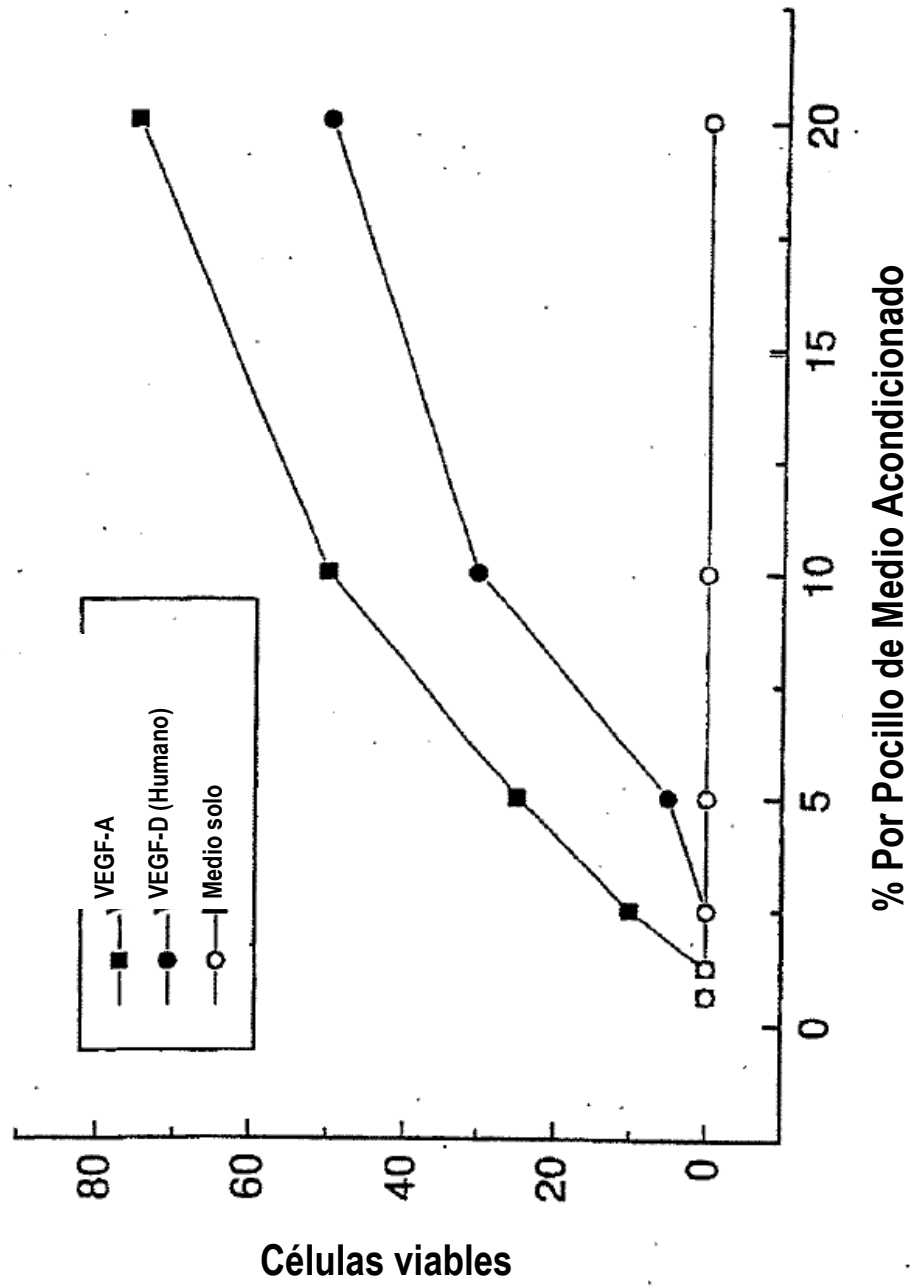
322  TRPCASGKTACAKHCRFPKE . . . . . KRAAOGPHSRK hVEGF-D
385  RIRPC TNRQKACGEPGFSYSE . . . . . VVCRVPSYWKR PQMS hVEGF-C
186  K . . . . . PRR hVEGF 165
185  K . . . . . LRR hVEGF-B
167  V . . . . . PRR hPIGF

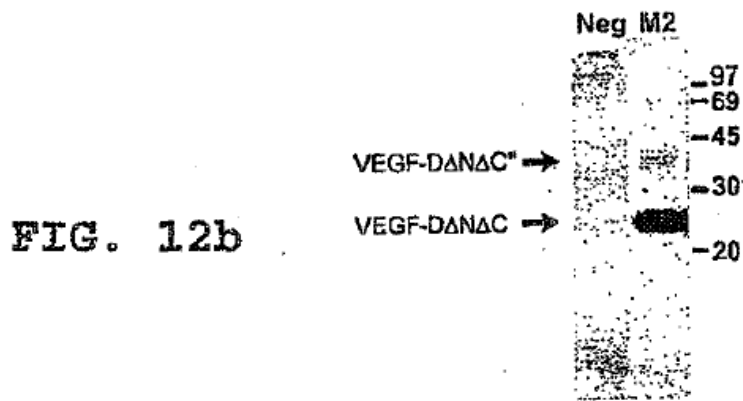
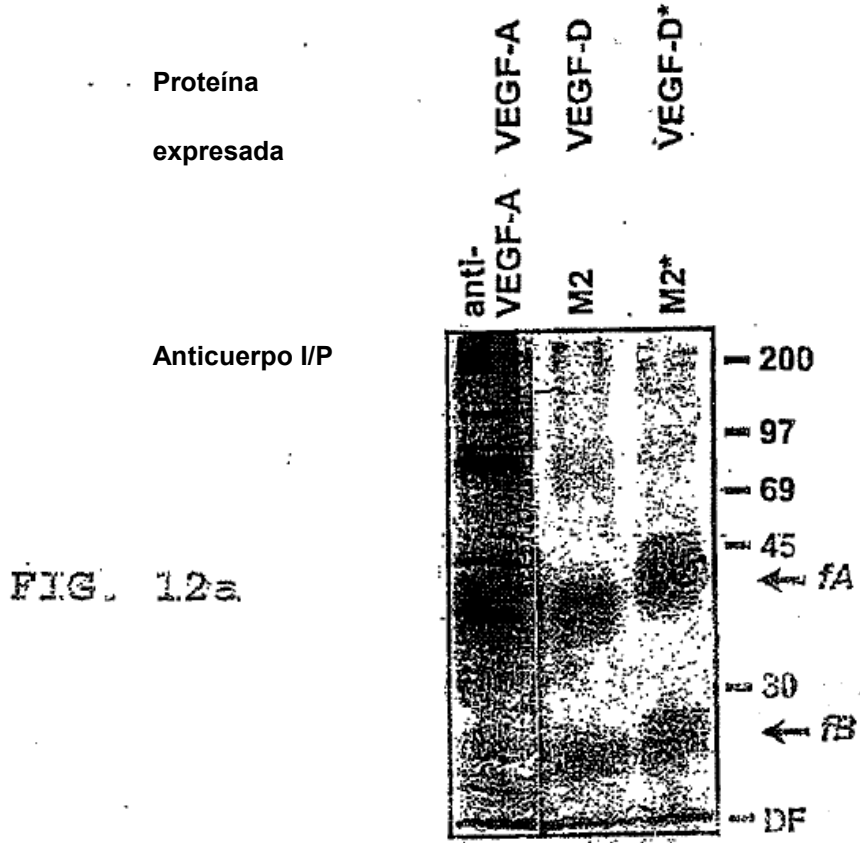
353  NP . . . . . hVEGF-D
419  . . . . . hVEGF-C
191  . . . . . hVEGF 165
188  . . . . . hVEGF-B
170  . . . . . hPIGF

```

FIG. 10

FIG. 11 Bioensayo de VEGFR2. Testado de medio acondicionado de células COS que contiene VEGF-A, VEGF-D (Humano)





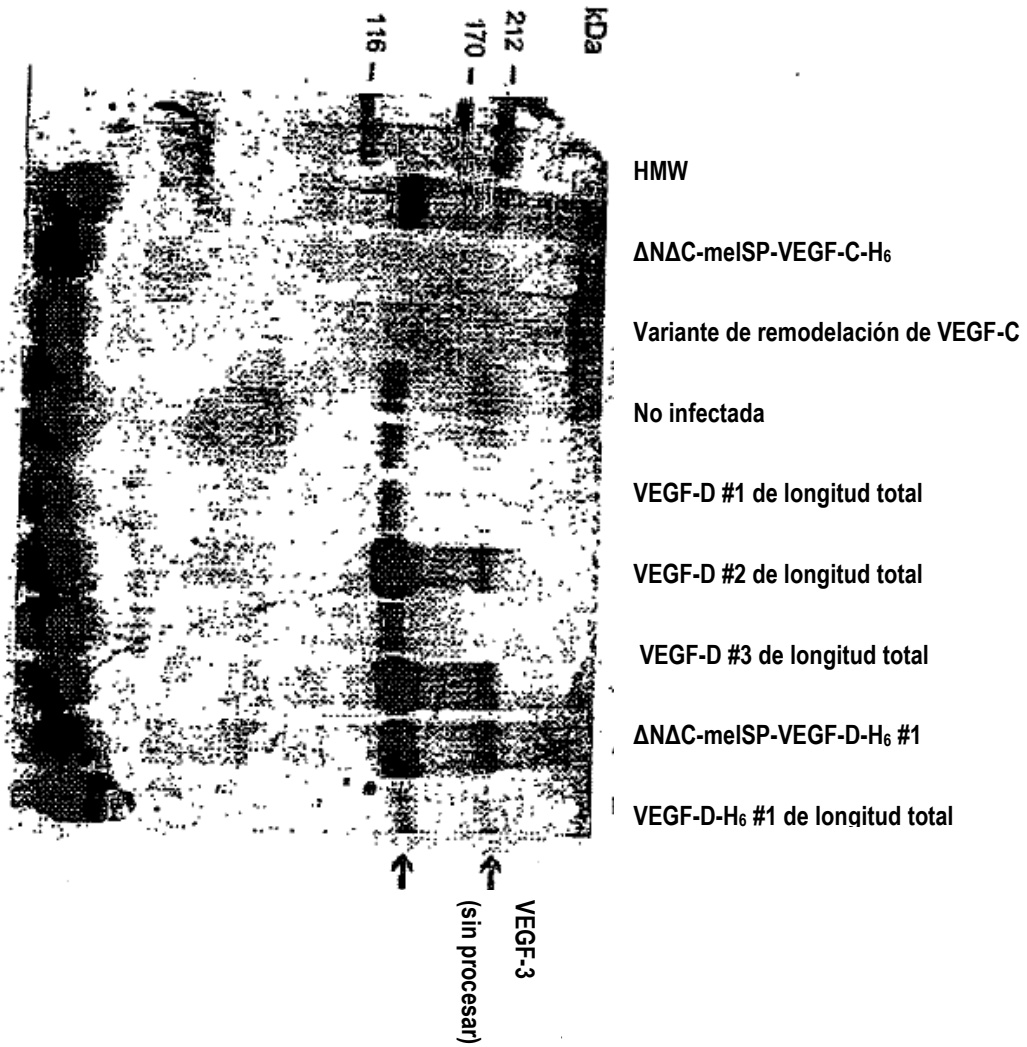


FIG. 14

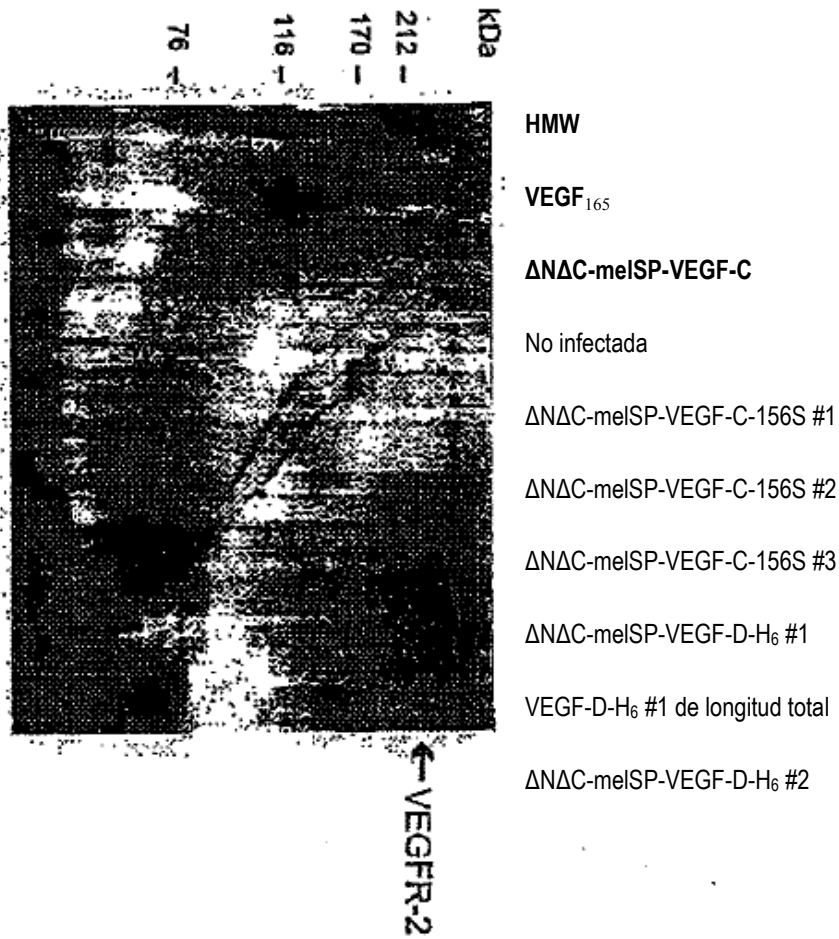


FIG. 15

FIG. 16

