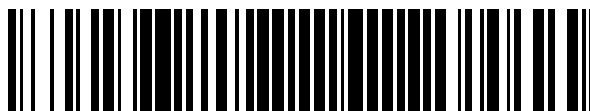


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 487**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2013 PCT/US2013/038506**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13163606**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2013 E 13720737 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2841087**

54 Título: **Antagonistas de factor de crecimiento endotelial vascular y métodos para su uso**

30 Prioridad:

27.04.2012 US 201261639230 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.01.2018

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (100.0%)
6011 Executive Boulevard, Suite 325
Bethesda, MD 20892-7660, US**

72 Inventor/es:

**BOTTARO, DONALD P. y
CECCHI, FABIOLA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 648 487 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

Antagonistas de factor de crecimiento endotelial vascular y métodos para su uso

Antecedentes

- 5 El factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) es un regulador esencial de la angiogénesis durante la embriogénesis y en la edad adulta y media la angiogénesis patológica en muchas enfermedades, incluyendo el cáncer. La señalización de VEGF-A se produce a través de los receptores de tirosina quinasa VEGFR1 y VEGFR2; el gen VEGFA codifica múltiples isoformas de VEGF-A, que se unen todas ellas a VEGFR1 y VEGFR2, pero difieren en su capacidad de unión a heparan sulfato de proteoglicanos (HSP) también presente en las células diana. La unión de HSP desempeña un papel crítico en la señalización de VEGF-A; los ratones sometidos a ingeniería genética para expresar solamente una isoforma de unión no a HSP presentan defectos en la ramificación de la microvasculatura y frecuentemente se mueren poco después de nacer.
- 10
- 15 El factor del crecimiento endotelial vascular es un miembro de la familia PDGF que se caracteriza por la presencia de ocho restos de cisteína conservados y una estructura de nudos de cisteína. Los seres humanos expresan alternamente isoformas empalmadas de 121,145, 165, 183, 189 y 206 aminoácidos de longitud. VEGFR165 parece ser la isoforma más potente y abundante, seguida de VEGFR121 y VEGFR189. Otras formas distintas a VEGFR121 contienen regiones básicas y no difusibles libremente de unión a heparina.
- 20 VEGFR165 humano comparte 88 % de la identidad de la secuencia de aminoácidos con las regiones correspondientes VEGF en ratones y ratas, el 96 % con las de cerdos, el 95 % con las de especies caninas y el 93 % con las de especies felinas, equinas y bovinas, respectivamente. VEGF se une a los receptores de tirosina quinasa de transmembrana de tipo I VEGFR1 (también denominado Flt1) y VEGFR2 (Flk1/ KDR) o células endoteliales. Aunque la afinidad de VEGF es la máxima para la unión a VEGFR1, VEGFR2 parece ser el principal mediador de la actividad angiogénica de VEGF.
- 25
- Dentro del dominio carboxilo terminal de la isoforma VEGFR165, según se ha notificado, los aminoácidos R123, R124 y R159 son críticos para la unión a HSP. Sin embargo, ha de advertirse que aunque el reemplazamiento de estos aminoácidos por alanina causa una menor unión de VEGFR165 a VEGFR1, no afecta a la unión de VEGFR165 a VEGFR2. Cabe destacar que, en un ensayo *in vitro* con el que se evalúa la actividad angiogénica, los mutantes de sustitución alanina de VEGFR165 presentaron la misma capacidad de potenciación de la angiogénesis que VEGFR165 nativo. Los mutantes sustituidos con alanina también presentaron una menor afinidad para heparina, heparan sulfato de proteoglicanos y para el co-receptor VEGFR2, NRP2. Se ha identificado VEGFR2 como un receptor de señalización clave mediador de los efectos proliferativos y migratorios de VEGF. Se observó que los mutantes alanina poseían una actividad angiogénica igual de potente que VEGFR165 nativo (ratón), lo que indica que el dominio carboxilo terminal de VEGFR165 no está directamente relacionado con la unión de VEGFR2.
- 30
- 35 El papel crítico de la señalización de VEGF en muchos cánceres humanos, en particular como impulsor del crecimiento de tumor y metástasis, por ejemplo, ha hecho que VEGF y sus receptores sean importantes dianas de fármacos contra el cáncer. El bloqueo de la señalización de VEGF se ha conseguido con el uso de antagonistas de sitio de unión VEGFR ATP y anticuerpos de neutralización de VEGF; ambos enfoques tienen sus pros y sus contras también. Los anticuerpos neutralizantes son altamente selectivos para la diana pretendida, p.ej., VEGF, y tienen un escaso efecto, si lo tienen, fuera de la diana. Los antagonistas de unión ATP, en cambio, suelen ser más económicos que los anticuerpos en lo que respecta a su fabricación, pero son menos selectivos para la diana pretendida y, frecuentemente, presentan toxicidades fuera de la diana asociadas a su uso. Los antagonistas biológicos derivados del ligando de proteína nativo, p.ej., VEGF, pueden ser más rentables de producir que las moléculas de anticuerpo más grandes, pero poseen un nivel comparable de selectividad de diana. Sería deseable un antagonista de receptor ya que un antagonista de receptor se uniría al receptor y es probable que ejerciera una acción inhibitoria incluso aunque la activación del receptor sea independiente de la unión de VEGF. Bevacizumab (Avastina) es el producto terapéutico contra el cáncer antagonista de VEGF biológico principal aprobado hasta el momento por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (USFDA). Bevacizumab resulta caro de producir ya que requiere la expresión en mamíferos para su fabricación, el sistema de expresión recombinante más caro utilizado para la producción de proteínas. Aflibercept, una proteína de fusión VEGFR tiene la aprobación de la USFDA para el tratamiento de cáncer colorrectal y degeneración macular húmeda. Entre los antagonistas de VEGF existentes, Aflibercept tiene un espectro diana único, si bien también se fabrica utilizando un sistema de expresión en célula de mamífero. Sería deseable fabricar dicho antagonista en un sistema menos caro, por ejemplo, a través de *P. pastoris*.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60 El documento WO2006/119035 describe el dominio pro-inflamatorio de la molécula de proteína VEGF utilizando mutantes de proteína VEGF 164 en los que se inactiva el dominio de unión a heparina a través de mutagénesis dirigida a sitio de exploración de alanina. La divulgación proporciona variantes de VEGF que tienen un dominio de unión a heparina modificado. Las variantes de VEGF tienen una modificación de la función de unión a heparina en comparación con VEGF nativo, al mismo tiempo que se mantenía la función de unión a receptor.
- 65

Krilleke et al (J. Biol. Chem. (2007) 282 (38): 28045-28056) describe una cartografía molecular y la caracterización funcional del dominio de unión a heparina de VEGF164.

5 El documento WO2007/044534 describe proteínas VEGF modificadas que inhiben la activación o proliferación mediada por VEGF de células endoteliales. Se pueden utilizar los análogos para inhibir la activación mediada por VEGF de células endoteliales en enfermedades asociadas con la angiogénesis como cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades oculares y trastornos cutáneos.

10 Sumario

La invención se define en las reivindicaciones.

15 La presente invención se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad caracterizada por una angiogénesis patológica. Dicho método incluye la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido de factor de crecimiento de célula endotelial vascular (VEGF) que comprende una variante del dominio de unión a heparina C-terminal y un dominio de unión a receptor de tirosina quinasa nativo. En una realización, el polipéptido comprende una variante del dominio de heparina C-terminal. Dicha variante de polipéptido tiene una o más alteraciones de aminoácido desde el polipéptido VEGF nativo diseñadas para ocupar el receptor y/o repeler y/o reducir la afinidad de unión a heparina, en lugar de unirse a heparina y/o proteoglicanos que contienen heparan sulfato con alta afinidad, como lo hace el VEGF nativo. En una realización, la afinidad de la variante de polipéptido, tanto para VEGFR-1 (FLT-1) como para VEGFR-2 (KDR/FLK-1) se mantiene sustancialmente en comparación con dicho VEGF nativo.

20 En otra realización, la variante de polipéptido antagoniza la activación de señal KDR. En una realización, el polipéptido VEGF nativo puede ser uno de los siguientes: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO: 4.

30 La presente invención incluye variantes de polipéptidos VEGF. Una variante de polipéptido de factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF) incluye polipéptidos que comprenden una variante del dominio de unión a heparina C-terminal y un dominio de unión a receptor de tirosina quinasa nativo, en el que dicha variante de polipéptido tiene una o más alteraciones de aminoácido de un polipéptido de VEGF nativo, en la que dicha variante de polipéptido se une a heparina a una menor afinidad en comparación con dicho VEGF nativo, y/o repele la heparina y, en la que se mantiene sustancialmente la afinidad de la variante de polipéptido tanto para VEGFR-1 (FLT-1) como VEGFR-2 (KDR/FLK-1) en comparación con dicho VEGF nativo y en la que dicha variante de polipéptido antagoniza la activación de señal KDR. En una realización, el polipéptido comprende una variante del dominio de heparina C-terminal.

40 Una variante del polipéptido de la invención puede ser cualquiera de los siguientes: un polipéptido que incluye la SEQ ID NO: 25 en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 25 es un aminoácido ácido, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 123, 124 y 159 de la SEQ ID NO: 26 es un aminoácido ácido, o un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 27 en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 13, 14 y 49 de la SEQ ID NO: 27 es un aminoácido ácido; o un polipéptido que tiene al menos 95 % de identidad con cualquiera de los polipéptidos anteriores y que tienen la capacidad de antagonizar la activación de señal KDR. En una realización, el aminoácido ácido es E. En otra realización, la variante de polipéptido puede ser cualquiera de los siguientes: un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 25 en la que el aminoácido en las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 25 es un aminoácido ácido, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido en las posiciones 123, 124 y 159 de la SEQ ID NO: 26 es un aminoácido ácido, o un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 27 en la que el aminoácido en las posiciones 13, 14 y 49 de la SEQ ID NO: 27 es un aminoácido ácido; o un polipéptido que tiene al menos un 95 % identidad con cualquiera de los polipéptidos anteriores y que tiene la calidad de antagonizar la activación de señal KDR. En una realización, el aminoácido ácido es E.

50 En otra realización, la variante de polipéptido de la invención puede ser cualquiera de los siguientes: un polipéptido que incluye las SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 24; y un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad con un polipéptido anterior y que tiene la capacidad de antagonizar la activación de la señal KDR.

60 La enfermedad caracterizada por una angiogénesis patológica puede ser cáncer o una enfermedad ocular. La enfermedad ocular puede ser degeneración macular o retinopatía diabética. El cáncer puede ser cáncer metastásico. A lo largo de la memoria descriptiva de la patente se contemplan y se describen también otras enfermedades caracterizadas por una angiogénesis patológica

65 En otra realización, la presente invención incluye un método para crear un polipéptido capaz de inhibir la angiogénesis que comprende las etapas de proporcionar un VEGF nativo que comprende una variante del dominio de unión a heparina C-terminal y un dominio de unión a receptor de tirosina quinasa nativo y la modificación de dicho

VEGF nativo para formar un variante del polipéptido VEGF. La variante de polipéptido VEGF incluye (1) SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27 en la que Xaa es un aminoácido ácido; y (2) un polipéptido que tiene al menos 95 % de identidad con un polipéptido de (1) y que tiene la capacidad de antagonizar la activación de señal KDR. En una realización el polipéptido comprende una variante del dominio de heparina C-terminal.

La presente invención incluye también polinucleótidos. En una realización, los polinucleótidos de la presente invención incluyen un polinucleótido que codifica una variante de polipéptido de factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF) que comprende un dominio de unión a heparina C-terminal, en la que dicha variante de polipéptido tiene una o más alteraciones de aminoácido desde un polipéptido VEGF nativo, en la que dicha variante de polipéptido se une a heparina con una menor afinidad que dicho VEGF nativo, y/o repele heparina, y en la que se mantiene sustancialmente la afinidad de la variante de polipéptido tanto para VEGFR-1 (FLT-1) como VEGFR-2 (KDR/FLK-1) en comparación con dicho VEGF nativo y en la que dicha variante de polipéptido antagoniza la activación de señal KDR.

En una realización, el polinucleótido puede incluir los siguientes polinucleótidos: un polinucleótido que codifica al menos uno de los siguientes polipéptidos: SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27; y un polinucleótido que tiene al menos 95 % de identidad con uno de los polipéptidos anteriores y que codifica un polipéptido que tiene la capacidad de antagonizar la activación de señal KDR. En otra realización, el polinucleótido puede ser cualquiera de los siguientes: a polinucleótido que comprende SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 21, , SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33; y un polinucleótido que tiene al menos 95 % de identidad con cualquiera de los polinucleótidos anteriores y que codifica un polipéptido que tiene la capacidad de antagonizar la activación de señal KDR. Otras realizaciones incluyen aquellos en los que se reemplaza la secuencia codificante encontrada en SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 33 (pares de base 938-1513 en cada SEQ ID) con pares de base 1016-1513 de cualquiera de estas SEQ ID que corresponde a la isoforma VEGF madura o pares de base 1346-1513 de cualquiera de estas SEQ ID que corresponde al dominio de unión a heparina. Se contemplan asimismo realizaciones que tienen al menos 95 % de identidad de secuencia con estos polinucleótidos.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A-1C. Conservación de restos de unión HS primaria en dominio de unión HS VEGF165

Figura 1A. Secuencias de aminoácido, en código de una sola letra, de precursores de proteína VEGF 165 de especies de vertebrados y registros de acceso del GenBank indicados a la derecha. Se creó el alineamiento múltiple utilizando la herramienta BLAST MULTIALIGN (Altschul et al., 1990). Adviértase que todos los registros de secuencia del GenBank de los precursores de VEGF-A incluyen la secuencia de péptido de señal como restos 1-26, indicados en la caja. La escisión proteolítica separa el péptido de señal de las proteínas VEGF-A maduras, produciendo un término amino indicado por la flecha. Los nombres de varias isoformas VEGF-A como VEGF165, VEGF189, etc., se derivan del número de restos de aminoácidos en la proteína madura, tras la escisión del péptido de señal. Por tanto, el precursor VEGF 165 contiene 191 restos, pero la proteína VEGF 165 madura contiene restos de precursor 27-191, o 165. El esquema de numeración del GenBank no suele utilizarse en la bibliografía de VEGF, sino que se suele hacer referencia al resto 27 del precursor sobre todo como el resto 1. La secuencia de dominio de unión a heparina (HBD) se indica en la caja. Las posiciones destacadas en el HBD indican sitios de unión HS primarios tal como se ha determinado anteriormente (Krilleke et al., 2007).

Figura 1B. Diagrama esquemático del Grupo 1 de isoformas de proteína VEGF 165 madura, que contienen una región de unión a receptor de tirosina quinasa (RTK) VEGF amino terminal y un dominio de unión a heparina carboxi terminal (HBD). La numeración de los restos de aminoácido en las proteínas VEGF 165 maduras del Grupo 1 se muestra encima del esquema; la secuencia de aminoácidos y los restos de unión HS críticos en el HBD se identifican debajo, numeradas en relación con su posición en el HBD solamente. Para el grupo de las isoformas VEGFA representadas en esta Figura, la identificación de los restos de unión HS críticos como R13, R14 y R49 del HBD proporciona un medio uniforme y sin ambigüedad de identificación de todas las isoformas de unión a heparina VEGF-A, independiente de la longitud de proteína total o la posición HBD.

Figura 1C. La Figura 1C presenta una alineación entre los dominios de unión a heparina de un segundo grupo, Grupo 2, que contiene dominios de unión a heparina con inserciones. Tal como se puede observar de ambos alineamientos y los esquemas, las inserciones HBD en el Grupo 2 cambian la numeración de los restos de unión HS críticos (13, 14, 49 en el Grupo 1) a 31, 32, 67 en el Grupo 2a; 37, 38, 73 en el Grupo 2b; y 54, 55, 90 en el Grupo 2c.

Figura 2. Estructura de dominio de unión HS VEGF 165. Modelos que representan la estructura tridimensional de alta resolución del dominio de unión HS de VEGF 16 determinados previamente por espectrometría de RMN (Fairbrother et al., 1998; Zhou et al., 1998) (Códigos del Banco de Datos de Proteínas 2HGF y 1KMX). Se crearon los modelos utilizando PyMOL (el sistema de gráficos moleculares PyMOL Molecular versión 1.3,

Schrödinger, LLC); el modelo de plegamiento de la cadena principal del péptido (paneles superior y central) presenta restos amino terminales, restos carboxilo terminales y las posiciones (panel superior) y cadenas laterales (panel central) de restos de unión HS primarios. La numeración de los restos de unión HS críticos está en el contexto del HBD solamente, tal como se detalla en la Figura 1B. El modelo de rellenado de espacio (panel inferior) presenta la distribución de la carga superficial positiva de restos de unión a HS primaria.

Figura 3. Ensayo de proteína VEGF-A humano. Curva patrón para el inmunoensayo en dos sitios electroquimioluminiscente para VEGF-A: intensidad de señal (IS) frente a la concentración de proteína de VEGF.

Figura 4. La proteína VEGF 165 3S retiene la masa normal, inmunorreactividad y unión a KDR pero no la actividad de señalización.

A. contenido de proteína VEGF 165 medio (ng/mg de total de proteína celular +/- DT; n = 3) en medio acondicionado 24 h (barras claras) o extractos detergentes de bajo volumen (barras grises) preparados de células 293/KDR transfectadas con plásmidos que codifican vector vacío (vacío), VEGF165 de tipo silvestre (WT), o VEGF165 3S (3S).

B. Proteína VEGF165 3S (3S; izquierda) en medios acondicionados 24 h preparados de células 293/KDR transfectadas con VEGF165 3S visualizadas tras SDS-PAGE e inmunotransferencia. Se cargaron tres cantidades (ng) de VEGF165 WT purificado a la derecha como referencia (flecha).

C. Unión de saturación de proteína de fusión IgG con el ectodominio de KDR con VEGF165 WT (cuadrados) o proteínas VEGF165 3S (círculos) *in vitro*. Los valores son la media de KDR unido (ng/ml) +/- DT (n = 3).

D. Nivel fosfo-KDR medio (intensidad de señal +/- DT; n = 3) en células 293/KDR establemente transfectadas con plásmidos que codifican vector vacío (vacío; barra en blanco), VEGF165 WT (WT; barra gris claro), VEGF165 3S (3S; barra gris oscuro), o células de vector vacío tratadas con proteína VEGF165 WT purificada (2,5 nM) durante 20 minutos (+VEGF; barra negra).

E. Velocidad de crecimiento (media del número de células +/- DT, n = 3) de células 293/KDR cultivadas establemente transfectadas con plásmidos que codifican vector vacío (círculos), VEGF165 WT (cuadrados), o VEGF165 3S (triángulos).

F. Formación de colonia en agar blando con células 293/KDR establemente transfectadas con vector vacío (izquierda), plásmido de expresión VEGF 3S (centro), o plásmido de expresión VEGF WT (derecha).

Figura 5. Antagonismo competitivo de activación de VEGFR y crecimiento de célula independiente del anclaje accionado por VEGFR y génesis de tumor por proteína VEGF165 3S.

A. Contenido en proteína VEGF en medios acondicionados con células 293/KDR transfectadas con plásmido VEGF165 3S (izquierda) o plásmido vacío (derecha), antes ("ninguna") o después de la inmunosupresión (IS) utilizando anti-VEGF-A (" -VEGF") o un anticuerpo de control no relacionado ("simulado"), expresado como la media de ng/ml de total de proteína +/- DT (n = 3).

B. Niveles de fosfo-KDR (% máximo, +/- DT, n = 3) células 293/KDR privadas de suero tratadas con proteína VEGF165 WT (10 ng/ml) en presencia de medio acondicionado concentrado de transfectantes 293/KDR VEGF 3S que han sido inmunosuprimidos utilizando un anticuerpo de control no específico (triángulos) o anti-VEGF (círculos). El eje de las x indica la concentración de la proteína VEGF165 3S (ng/ml) en el medio acondicionado antes de la inmunosupresión.

C. Formación de colonia en agar blando con células 293/KDR sin tratar establemente transfectadas con un plásmido de expresión para VEGF165 WT (panel superior izquierda), células tratadas con las concentraciones indicadas del inhibidor VEGFR pazopanib (paneles centro superior y derecha), o células tratadas con medio acondicionado que contienen las concentraciones indicadas de proteína VEGF165 3S (paneles inferiores).

D. Volumen de tumor medio (mm³ +/- DT) en ratones (n = 5/grupo) en los que se han implantado células 293/KDR (3 x 10⁶ células por animal) que expresan establemente VEGF165 3S (triángulos invertidos), VEGF165 WT (cuadrados) o vector vacío (círculos), medidos en los momentos indicados tras la implantación. Se implantó a otros grupos una mezcla de células de vector vacío y transfectantes VEGF165 WT a 1,5 x 10⁶ células cada uno (triángulos) o una mezcla de VEGF165 WT y transfectantes VEGF165 3S a 1,5 x 10⁶ células cada uno (rombos).

Figura 6. Alineamientos de nucleótido de trece HBD de secuencias alfa VEGF humano. Los 6 más abundantes en la naturaleza son Grupo 1. Los 7 transcritos más raros contienen HBD con inserciones y se denominan Grupo 2.

Figura 7. VEGF165 3S y WT forman ambos dímeros de proteína unida a disulfuro de la masa molecular anticipada.

Figura 8. VEGF165 3S no se oligomeriza con heparan sulfato.

Figura 9A-C. El antagonismo de VEGF165 3S sigue el patrón de la interacción de unión VEGFA/VEGFR.

Figura 10A-B. El antagonismo de VEGF165 3S es independiente de interacción de NRP1.

Descripción detallada

En la presente invención, sus autores han descubierto que cuando se interrumpió la unión HSP a los restos R123, R124 y R159 de VEGF 165 utilizando sustituciones de carga opuesta combinada, de forma inesperada y sorprendente el polipéptido resultante fue un antagonista competitivo de la señalización de VEGF y la angiogénesis. Los resultados obtenidos por los autores de la invención indican que la ocupación del receptor combinada con la repulsión de HSP sobre la base de la carga del complejo ligando/receptor constituye una estrategia general eficaz para antagonizar la señal de VEGF.

Los autores de la invención generaron un ADNc para codificar sustituciones de carga opuesta en tres restos de unión HS críticos en VEGF 165 humano, las posiciones R123E/R124E/R159E en proteína VEGF165 madura, numerados desde el sitio de la escisión de péptido de señal (designado VEGF165 3S; Figura 1A y B). Para mayor facilidad en la identificación de estos restos en el contexto de otras isoformas VEGF-A que también contienen el dominio de unión a heparina (HBD; la secuencia HBD es idéntica en cuanto algunas isoformas VEGF-A, pero el HBD para otras isoformas tiene inserciones/delecciones; véase la lista de secuencias de isoforma VEGF-A expuesta a lo largo de la memoria descriptiva, que se presentan en la Figura 1B, 1C y Figura 6). En el grupo de HBD denominado Grupo 1, se puede hacer referencia a las posiciones de estos restos en relación con el dominio de unión a heparina solamente como R13E, R14E y R49E, tal como se representa en la Figura 1B. Se representan en la estructura de RMN tridimensional del dominio de unión a heparina VEGF 165 en la Figura 2. La Figura 1C muestra que existen también HBD que tienen inserciones/delecciones en el HBD que cambian la numeración relativa de las posiciones de estos restos en el dominio HBD, tal como se representa en dicha figura y en la Figura 6. Los plásmidos de expresión que codifican el vector solamente VEGF165 WT o VEGF165 3S fueron transfectados establemente en células hEK293 obtenidas por ingeniería genética previamente para expresar $2,5 \times 10^6$ VEGFR2 por célula (293/KDR; Backer et al., 2005). Los autores de la invención han anticipado que la expresión de VEGF165 WT en estas células podría tener como resultado una activación autocrina de KDR y la transformación celular. Los autores de la invención esperaban que VEGF165 3S careciera de capacidad de activación KDR y por tanto que no tuvieran ningún efecto sobre el fenotipo. Se midió la producción de proteína VEGF ectópica mediante transfectantes utilizando inmunoensayo en dos sitios con un límite de detección de 37,5 attomoles 25 μ l (1,5 mP) VEGF (Figura 3). Entre los cultivos de masa seleccionada del marcador, los transfectantes WT produjeron $\sim 1,0$ ng/ml/24h de proteína VEGF165 en medio acondicionado, los transfectantes 3S produjeron $\sim 2,5$ ng/ml/24h y la proteína VEGF no fue detectable en el medio de control de vector vacío (Figura 4A, barras blancas). El contenido en VEGF en extractos detergentes de bajo volumen de las mismas células fue proporcionalmente mayor, según lo esperado (Figura 4A, barras grises). La masa molecular y el reconocimiento de anticuerpos de proteína VEGF165 3S en medios acondicionados fue indistinguible de WT (Figura 4B). La unión de saturación de VEGF165 3S a KDR *in vitro* (Figura 4C, cuadrados; KD ~ 19 pM) también fue equivalente a la unión de VEGF165 WT (Figura 4C, círculos; KD ~ 23 pM) y conforme a los valores de afinidad de unión de estado constante publicados (Ferrara, 2004).

Por tanto, los autores de la invención han descubierto que si bien VEGF165 3S se une a KDR, al igual que la proteína VEGF165 WT, el mutante no indujo la actividad quinasa de KDR y antagonizó la unión y señalización de VEGF165 WT *in vitro* e *in vivo*. Estos resultados demuestran el papel crucial de HS en la activación de receptor y demuestran que la interrupción dirigida de los sitios de unión HS críticos constituye una estrategia de desarrollo antagonista viable para VEGF. Este trabajo demuestra que dicha repulsión sobre la base de la carga de HSP desde el complejo ligando/receptor es una estrategia general eficaz para antagonizar la señal de VEGF.

Estos resultados resultan sorprendentes a la vista de los trabajos anteriores, en los que dichos restos en VEGF 165, mutados de arginina a alanina, habían tenido como resultado un mutante que retenía toda la actividad como agonista de la estimulación de angiogénesis.

Sin vincularse a teoría alguna, tal como lo entienden los autores de la invención, la activación de KDR mediante VEGF 165 y HS indica una base mecánica para el antagonismo de señalización a través de la interrupción dirigida de la unión HS-ligando. El sitio de unión de VEGF en KDR abarca los dominios de tipo IgG (D) 1-3: D2 contiene contactos primarios y D1 y D3 contribuyen a la especificidad y afinidad de unión global. Se ha observado que HS es necesario para la unión de alta afinidad de VEGF 165 a KDR expresado ectópicamente en células pgsA CHO HS negativas. De manera similar a Met y los receptores de factor de crecimiento de fibroblastos, KDR también interactúa directamente con HS, a través de al menos un sitio localizado entre D6 y D7. Los últimos estudios estructurales de las familias de receptores KIT, PDGF y VEGF destacan la importancia de los dominios de interacción receptor-receptor homotípico para estabilizar la dimerización de receptor y la transactivación de quinasas: los contactos directos entre los dominios D4 para KIT y los dominios D7 para KDR se producen gracias a los cambios conformacionales inducidos por ligandos en el ectodominio de receptor. En estos modelos, los eventos de unión secuenciales promueven y estabilizan progresivamente agregados HS-ligando-receptor capaces de señalización. Sin vincularse a teoría alguna, los autores de la invención lanzan la hipótesis de que VEGF165 se une primero a KDR D2; las interacciones más débiles VEGF165-D1 y -D3 se pueden estabilizar a través de la interacción HS-VEGF y entrecruzamiento HS-VEGF-KDR en D6/D7. VEGF-HS también puede inducir cambios conformacionales para permitir la aposición de los dominios KDR D7 y, a su vez, la interacción homotípica y transactivación de quinasa. Las observaciones subrayaron la importancia de las interacciones HS específicas para facilitar eventos tras la unión de ligando que se requieren para la activación de KDR y exponen su susceptibilidad a

la interrupción dirigida.

Los factores de crecimiento de unión a HS promueven el crecimiento de tumor, angiogénesis y metástasis en diversos cánceres humanos. Además de la estrategia que se describe en el presente documento, los miméticos HS de oligosacárido y los fragmentos de heparina modificada pueden actuar como antagonistas de unión de HS. Sin embargo, la complejidad de los glicosaminoglicanos (GAG) de HS supone un desafío para el desarrollo de agentes potentes y selectivos y las frecuentes alteraciones en la composición HS GAG en tumores puede hacer que dichos agentes sean menos competitivos para la unión a ligando. En cambio, las sustituciones contrarias a los restos de unión HS críticas en un ligando de proteína que sería sino de tipo silvestre son fáciles de introducir, no se ven afectadas por la composición HS GAG de tumor y son inherentemente una ruta selectiva. Estas características indican que el enfoque de los autores de la invención constituye una vía conveniente y práctica para el desarrollo de factores de crecimiento de unión a HS, en particular, VEGF 165.

En un aspecto, la presente invención proporciona nuevas variantes de VEGF. En particular, la invención se refiere a variantes del Factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A). VEGF-A es un regulador esencial de la angiogénesis normal durante la embriogénesis y la edad adulta y participa en la angiogénesis patológica en muchas enfermedades, entre las que se incluyen muchas formas prevalentes de cáncer. Tal como se conoce en la técnica, la señalización de VEGF-A se mide a través de los receptores de la superficie de la célula tirosina quinasa VEGFR1 (Flt-1) y VEGFR2 (Flk-1, KDR). El empalme diferencial de VEGF-A pre-ARNm tiene como resultado la expresión de múltiples isoformas VEGF-A, cuyas formas más abundantes en los seres humanos son VEGF121, VEGF 165 y VEGF 189. Todas las isoformas contienen los mismos sitios de unión para VEGFR1 y VEGFR2, pero difieren en su capacidad para unirse a heparan sulfato de proteoglicanos (HSP) que están presentes de forma ubicua en la matriz extracelular y en las superficies de la célula diana, debido a la presencia o ausencia de dos dominios de unión a heparina (HBD) básicos codificados por los exones 6 y 7. VEGF 121 carece de HBD y es libremente difusible en el espacio extracelular, mientras que VEGF 165 (SEQ ID NO: 3) y VEGF 189 presentan una unión a HSP de afinidad moderada y alta afinidad, respectivamente, lo que limita la movilidad de estas isoformas en compartimentos ricos en HSP. El péptido codificado por el exón 7 también contiene restos que permiten la unión de VEGF 165 a I co-receptor de VEGF, NRP1.

En una realización, la presente invención se refiere a variantes de VEGF 165. La SEQ ID NO: 2 presenta el precursor de la isoforma 1 del Factor de crecimiento endotelial vascular A de *Homo sapiens*. Esta forma es de 191 aminoácidos de longitud. Se escinde una secuencia de señal para formar la isoforma 2 del factor 1 de crecimiento endotelial vascular maduro *Homo sapiens* SEQ ID NO: 3. Se puede hacer referencia a la SEQ ID NO: 3 como "VEGF 165" y es de 165 aminoácidos de longitud. Se hace referencia también a VEGF 165, tanto en el presente documento como en otros, como VEGF 165 nativo, VEGF 165 maduro y similares. La SEQ ID NO: 4 es la región carboxilo terminal de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y corresponde a los restos 111-165 de SEQ ID NO: 3 y se define por un sitio de escisión de plasmina. Se puede hacer referencia conjuntamente a las SEQ ID NO: 2-4 como secuencias VEGF 165; se puede hacer referencia a ellas también como "secuencias de aminoácido VEGF nativas" o "VEGF nativas" o "polipéptido VEGF nativo". Es posible también hacer referencia a ellos como "secuencias de aminoácido de VEGF nativos" o "VEGF 165 nativos" o polipéptidos de VEGF 165 nativos".

Las variantes de VEGF descritas en el presente documento representan secuencias de VEGF 165 que han sido modificadas de acuerdo con la invención. Dichas variante comprenden al menos un polipéptido que tiene un dominio de unión a heparina modificado. Se puede hacer referencia a estos polipéptidos como variante de VEGF de los polipéptidos, variante de una secuencia de aminoácidos VEGF, variantes de VEGF 165, variantes de secuencias de aminoácido de VEGF 165, variante de polipéptidos de VEGF 165 y similares. Se puede hacer referencia asimismo a las variantes de VEGF descritas en el presente documento como "polipéptidos de la presente invención" o "variantes de VEGF de la presente invención", "secuencias de VEGF de la presente invención" y similares.

Una proteína de "secuencia nativa" comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína tal como se encuentra en la naturaleza, p.ej., en un ser humano. La proteína de secuencia nativa puede obtenerse por medios recombinantes u otros medios sintéticos o se pueden aislar desde una fuente nativa.

Los términos "aminoácido" y "aminoácidos" se refieren a L- α -aminoácidos de origen natural. Se pretende que esta definición incluya norleucina, ornitina y homocisteína. Los aminoácidos se identifican o bien por la designación de una sola letra o bien por la de tres letras, del siguiente modo: Asp (D) ácido aspártico, Thr (T) treonina, Ser (S) serina, Glu (E) ácido glutámico, Pro (P) prolina, Gly (G) glicina, Ala (A) alanina, Cys (C) cisteína, Val (V) valina, Met (M) metionina, Ile (I) isoleucina, Leu (L) leucina, Tyr (Y) tirosina, Phe (F) fenilalanina, His (H) histidina, Lys (K) lisina Arg (R) arginina, Trp (W) triptófano, Gln (Q) glutamina, Asn (N) asparagina.

La presente invención, se refiere en parte a variantes de VEGF que tienen una o más sustituciones en el dominio de unión a heparina de restos de aminoácido de carga negativa (p.ej. ácido) para el resto de aminoácido arginina en ciertas posiciones específicas en un polipéptido VEGF, tal como se describe en el presente documento. Los polipéptidos VEGF apropiados con los que se pueden crear variantes, se explican en el presente documento e incluyen isoformas de VEGF empalmadas alternativamente humanos de 121, 145, 165, 183, 189 y 206 aminoácidos de longitud y especies ortólogas de VEGF. En el presente documento se describen los restos arginina específicos para

su sustitución con un aminoácido ácido, para dar un polipéptido VEGF específico. Un aminoácido ácido se define en el presente documento como un resto de aminoácido que tiene una carga negativa a pH fisiológico. En una realización, un aminoácido ácido es ácido aspártico (Asp, D) o ácido glutámico (Glu, E). En una realización, un aminoácido ácido es ácido glutámico: la unión de heparan sulfato (HS) es una interacción sobre la base de la carga en la que las fracciones sulfato en HS se unen a restos básicos (R o K) en el dominio de unión VEGF HS. El cambio de los restos R o restos K básicos en restos D o restos E tiene el mismo impacto-repulsión de las fracciones sulfato de HS del complejo VEGF-VEGFR y antagonismo de señalización.

En una realización, el dominio de unión a heparina de una secuencia de VEGF nativa de la presente invención se modifica sustituyendo restos de aminoácido de carga negativa (p.ej., ácidos) con un resto de aminoácido arginina en ciertas posiciones en el polipéptido VEGF. La variante del polipéptido de VEGF de la invención incluye SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27. La SEQ ID NO: 25 es la misma que la SEQ ID NO: 2, a excepción de que una o más de las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 25 puede contener un resto de aminoácido ácido en lugar de la arginina en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 26 es la misma que la SEQ ID NO: 3, a excepción de que una o más de las posiciones 123, 124 y 159 de la SEQ ID NO: 26 pueden contener un aminoácido ácido en lugar de la arginina en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 3. La SEQ ID NO: 27 es la misma que la SEQ ID NO: 4, a excepción de que una o más de las posiciones positions 13, 14 y 49 de la SEQ ID NO: 27 puede contener un aminoácido ácido en lugar de la arginina en las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 4.

En otra realización, se modifica el dominio de unión a heparina sustituyendo restos de aminoácido con carga negativa (p.ej., ácidos) con un resto arginina en determinadas posiciones específicas de un polipéptido VEGF. La variante del polipéptido de VEGF de la invención incluye la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8. La SEQ ID NO: 6 es la misma que la SEQ ID NO: 2, a excepción de que las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 6 contienen un ácido glutámico en lugar de la arginina en las correspondientes posiciones de la SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 7 es la misma que la SEQ ID NO: 3, a excepción de que las posiciones 123, 124 y 159 de la SEQ ID NO: 7 contienen un ácido glutámico en lugar de la arginina en las correspondientes posiciones de la SEQ ID NO: 3. En el presente documento se hace referencia a la SEQ ID NO: 7 también como "3S VEGF 165." La SEQ ID NO: 8 es la misma que la SEQ ID NO: 4, a excepción de que en posiciones 13, 14 y 49 de la SEQ ID NO: 8 contienen un ácido glutámico en lugar de arginina en las correspondientes posiciones de la SEQ ID NO: 4.

Otra variante de polipéptido de VEGF de la invención incluye las SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12. La SEQ ID NO: 10 es la misma que la SEQ ID NO: 2, a excepción de que las posiciones 149 y 150 de la SEQ ID NO: 10 contienen un ácido glutámico en lugar de arginina en las correspondientes posiciones de la SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 11 es la misma que la SEQ ID NO: 3 a excepción de que las posiciones 123 y 124 de la SEQ ID NO: 11 contienen un ácido glutámico en lugar de la arginina en las correspondientes posiciones de la SEQ ID NO: 3. La SEQ ID NO: 12 es la misma que la SEQ ID NO: 4, a excepción de que las posiciones 13 y 14 de SEQ ID NO: 12 contienen un ácido glutámico en lugar de arginina en las correspondientes posiciones de la SEQ ID NO: 4.

Otra variante del polipéptido de VEGF de la invención incluye las SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16. La SEQ ID NO: 14 es la misma que la SEQ ID NO: 2, a excepción de que la posición 185 de la SEQ ID NO: 14 contiene un ácido glutámico en lugar de la arginina en la correspondiente posición de la SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 15 es la misma que la SEQ ID NO: 3 a excepción de que la posición 159 de la SEQ ID NO: 15 contiene un ácido glutámico en lugar de arginina en la correspondiente posición de la SEQ ID NO: 3. La SEQ ID NO: 16 es la misma que la SEQ ID NO: 4 a excepción de que la posición 49 de la SEQ ID NO: 16 contiene un ácido glutámico en lugar de arginina en la correspondiente posición de la SEQ ID NO: 4.

Otra variante del polipéptido de VEGF de la invención incluye las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20. La SEQ ID NO: 18 es la misma que la SEQ ID NO: 2, a excepción de que la posición 150 de la SEQ ID NO: 18 contiene un ácido glutámico en lugar de arginina en la correspondiente posición de la SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 19 es la misma que la SEQ ID NO: 3, a excepción de que la posición 124 de la SEQ ID NO: 19 contiene un ácido glutámico en lugar de la arginina en la correspondiente posición de la SEQ ID NO: 3. La SEQ ID NO: 20 es la misma que la SEQ ID NO: 4, a excepción de que en la posición 14 de la SEQ ID NO: 20 contiene a ácido glutámico en lugar de arginina en la correspondiente posición de la SEQ ID NO: 4.

Otra variante de polipéptido de VEGF de la invención incluye las SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24. La SEQ ID NO: 22 es la misma que la SEQ ID NO: 2, a excepción de que la posición 149 de la SEQ ID NO: 22 contiene un ácido glutámico en lugar de la arginina en la correspondiente posición de la SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 23 es la misma que la SEQ ID NO: 3, a excepción de que la posición 123 de la SEQ ID NO: 23 contiene un ácido glutámico en lugar de arginina en la correspondiente posición de la SEQ ID NO: 3. La SEQ ID NO: 24 es la misma que la SEQ ID NO: 4, a excepción de que en la posición 13 de la SEQ ID NO: 24 contiene un ácido glutámico en lugar de arginina en la correspondiente posición de la SEQ ID NO: 4.

En una realización, la variante del polipéptido de la variante del factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF) comprende una variante del dominio de unión a heparina C-terminal y un dominio de unión a receptor de tirosina quinasa nativo, en la que dicha variante de polipéptido tiene una o más alteraciones de aminoácido desde un

polipéptido VEGF nativo, en la que dicha variante de polipéptido se une a heparina con menor afinidad que dicho VEGF nativo y/o repele la heparina y en la que la afinidad de la variante de polipéptido tanto para VEGFR-1 (FLT-1) como para VEGFR-2 (KDR/FLK-1) se mantiene sustancialmente en comparación con dicha secuencia de aminoácido de VEGF nativo y en la que dicha variante de polipéptido antagoniza la activación de la señal de KDR. En una realización, el polipéptido comprende una variante del dominio de heparina C-terminal.

En una realización, un polipéptido VEGF nativo se refiere a uno o más de los polipéptidos que comprenden SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

En una realización, una variante de polipéptido VEGF comprende un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 25 en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 25 es un aminoácido ácido. Un aminoácido ácido se define en el presente documento como un resto de aminoácido que tiene una carga negativa a pH fisiológico. En una realización, un aminoácido ácido es ácido aspártico (Asp, D) o ácido glutámico (Glu, E). En otra realización, una variante de polipéptido VEGF comprende un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 123, 124 y 159 de la SEQ ID NO: 26 es un aminoácido ácido. En otra realización, una variante de polipéptido VEGF comprende un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 27 en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 13, 14 y 49 de la SEQ ID NO: 27 es un aminoácido ácido.

En otra realización, la presente invención incluye la variante de los polipéptidos y polinucleótidos VEGF189. La variante de polipéptidos y polinucleótidos VEGF189 son isoformas de empalme diferencial de VEGF165. La variante de los polipéptidos VEGF189 de la invención incluye VEGF189 que tienen cambios de aminoácido ácido en uno o más de los sitios equivalentes (conservados) como los descritos para VEGF165. En la forma madura de VEGF189, son R147, 148 y 183. VEGF 189 despliega una afinidad de unión a HSP moderada y alta, limitando la movilidad de estas isoformas en compartimentos ricos en HSP. La variante de los polipéptidos VEGF189 de la invención incluye los siguientes polipéptidos: precursor de VEGF 189 de 215 aminoácidos que tiene E en las posiciones 173, 174 y 209 (SEQ ID NO: 34), el precursor VEGF 189 de 215 aminoácidos que tiene E en las posiciones 173, 174 (SEQ ID NO: 35), el precursor de VEGF 189 de 215 aminoácidos que tiene E en la posición 209 (SEQ ID NO: 36), precursor de VEGF 189 de 215 aminoácidos que tienen E en la posición 174 (SEQ ID NO: 37) y precursor de VEGF 189 de 215 aminoácidos que tiene E en la posición 173 (SEQ ID NO: 38). En las SEQ ID NO: 34 a 38 las alternancias para obtener la variante VEGF189 se encuentran en una o más de AA 173, 174 y 209. La invención incluye las formas maduras de los aminoácidos antes mencionados de la SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37 y 38. La invención también incluye polinucleótidos que incluyen polinucleótidos que codifican cualquiera de las variantes de polipéptido VEGF189 de la invención.

Por tanto, la presente invención incluye polipéptidos en los que la variante de polipéptido incluye los siguientes: un polipéptido que comprende la forma madura de un polipéptido que incluye los siguientes: SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38; y un polipéptido que tiene al menos 95 % de identidad con un polipéptido antes descrito y que tiene la capacidad de antagonizar la activación de señal KDR.

Otra variante de los polipéptido VEGF de la presente invención incluye otras isoformas VEGF-A que comprenden un dominio C-terminal que contiene un dominio de unión a heparina que comprende las sustituciones de aminoácido de la presente invención. En el presente documento se describen dichos registros del GenBank que contienen isoformas de VEGF-A que contienen el dominio de unión a heparina que se pueden modificar de acuerdo con la presente invención, p.ej., que tienen un dominio C terminal que contiene un dominio de unión a heparina que comprende sustituciones de aminoácido. Éstas incluyen isoforma A o precursor del factor de crecimiento endotelial vascular (Homo sapiens) que tienen modificaciones en las posiciones equivalentes en la secuencia de aminoácidos como las otras variantes de secuencias que se reivindican en el presente documento. Tal como se explica en el presente documento, en la Figura 1B, las secuencias del Grupo 1 de las isoformas divulgadas en la Figura 1B tienen modificaciones en el HBD de las posiciones 13, 14 y 49 para un aminoácido ácido, en el que, en una realización, el aminoácido ácido es E. Las secuencias del Grupo 1 incluyen NP_001165097.1; NP_001165100.1; NP_001028992.1, NP_001020539, BAG70265.1, BAG70136.1. NP_001165100.1 GI: 284172471; el precursor isoforma 1 del factor de crecimiento endotelial vascular A (Homo sapiens) está representado en el presente documento por la SEQ ID NO: 47, con un dominio C terminal (HBD) de SEQ ID NO: 68. NP_001165097.1, GI: 284172465; es SEQ ID NO: 48, con un dominio C terminal (HBD) de SEQ ID NO: 4. El precursor k de la isoforma A del factor de crecimiento endotelial vascular (Homo Sapiens), una proteína aa 209, NP_001165096.1, GI: 284172463; está representado en el presente documento por la SEQ ID NO: 49, con un dominio C terminal (HBD) de SEQ ID NO: 64. El precursor j de la isoforma A del factor de crecimiento endotelial vascular (Homo sapiens), una proteína aa 215, NP_001165095.1, GI: 284172461 está representado en el presente documento por la SEQ ID NO: 50, con un dominio C terminal (HBD) de SEQ ID NO: 65. El precursor i de la isoforma A del factor de crecimiento endotelial vascular (Homo sapiens), una proteína aa 232, NP_001165094.101:284172459 está representado en el presente documento por la SEQ ID NO: 51, con un dominio C terminal (HBD) de la SEQ ID NO: 67. El precursor g de la isoforma A del factor de crecimiento endotelial vascular (Homo sapiens), una proteína aa 371, NP_001028928.101:76781487 está representado en el presente documento por la SEQ ID NO: 52, con un dominio C terminal (HBD) de la SEQ ID NO: 68. El precursor d de la isoforma A del factor de crecimiento endotelial vascular (Homo sapiens), una proteína aa 371, NP_001020539.2, GI:76781483; está representado en el presente documento

por la SEQ ID NO: 53, con un dominio C terminal (HBD) de SEQ ID NO:4. El precursor c de la isoforma A del factor de crecimiento endotelial vascular (Homo sapiens), una proteína aa 389, NP_001020538.2, gl: 76781482, está representado en el presente documento por la SEQ ID NO: 54, con un dominio C terminal (HBD) de SEQ ID NO: 64. b de la isoforma a del factor de crecimiento endotelial vascular (Homo sapiens) una proteína aa 395, NP_003367.4, GI: 76781481 está representado en el presente documento por la SEQ ID NO: 55, con un dominio C terminal (HBD) de la SEQ ID NO: 65. El precursor a de la isoforma A del factor de crecimiento endotelial vascular (Homo sapiens), una proteína aa 412, NP_001020537.2, GI:76781480, está representada en el presente documento por la SEQ ID NO: 56, con un dominio C terminal (HBD) de la SEQ ID NO: 67. VEGF165 de la isoforma del factor de crecimiento endotelial vascular (Homo sapiens), una proteína aa 191, BAG70265.1, GI: 197692603, está representado en el presente documento por la SEQ ID NO:57, con un dominio C terminal (HBD) de SEQ ID NO: 4. VEGF165 de la isoforma del factor de crecimiento endotelial vascular (Homo sapiens), una proteína aa 191, BAG70136.1GI:197692345, está representada en el presente documento por la SEQ ID NO:58, con un dominio C terminal (HBD) de SEQ ID NO: 4. El factor de permeabilidad vascular, una proteína aa 232 P15692.2, GI:17380528, está representado en el presente documento por la SEQ ID NO: 59, con un dominio C terminal (HBD) de la SEQ ID NO: 67. Véase la Figura 6, en la que se muestra una alineación de trece dominios de unión a heparina de secuencias alfa de VEGF humano (isoformas). Las seis isoformas más abundantes en la naturaleza se agrupan como el Grupo 1 (véase Figura 1B). La Figura 1C que presenta un alineamiento ente los dominios de unión a heparina de un segundo grupo, Grupo 2, que contiene dominios de unión a heparina con inserciones. Tal como se puede observar de ambos alineamientos y los esquemas, las inserciones en HBD en el grupo 2 cambian la numeración de restos de unión de HS críticos (13,14, 49 en el Grupo 1) a 31, 32, 67 en el Grupo 2a; 37, 38, 73 en el Grupo 2b; y 54, 55, 90 en el Grupo 2c.

Por tanto la variante de polipéptidos de la invención incluye polipéptidos que comprenden un polipéptido que incluye lo siguiente: SEQ ID NO: 4, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 13, 14 y 49 de la secuencia SEQ ID NO: 4 es un aminoácido ácido; SEQ ID NO: 64, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 31, 32 y 67 de la secuencia SEQ ID NO: 64 es un aminoácido ácido; SEQ ID NO: 65, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 37, 38 y 73 de la secuencia SEQ ID NO: 65 es un aminoácido ácido, SEQ ID NO: 67, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 54, 55 y 90 de la secuencia SEQ ID NO: 67 es un aminoácido ácido y la SEQ ID NO: 68, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 13, 14 y 49 de la secuencia SEQ ID NO: 68 es un aminoácido ácido; así como polipéptidos que tienen al menos 95 % de identidad con un polipéptido descrito y que tiene la capacidad de antagonizar la activación de señal KDR.

La variante de polipéptidos de la invención incluye asimismo un polipéptido que comprende un polipéptido que incluye lo siguiente: SEQ ID NO: 47, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 47 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 48, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO:48 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 49, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 167, 168 y 203 de la SEQ ID NO: 49 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 50, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 173, 174 y 209 de la SEQ ID NO: 50 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 51, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 190, 191 y 226 de la SEQ ID NO: 51 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 52, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 329, 330 y 365 de la SEQ ID NO:52 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO:53, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 329, 330 y 365 de la SEQ ID NO: 53 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 54, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 347, 348 y 383 de la SEQ ID NO: 54 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 55, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 353, 354 y 389 de la SEQ ID NO:55 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO:56, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 370, 371 y 406 de la SEQ ID NO: 56 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO:57, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 57 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 58, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 58 es un aminoácido ácido y la SEQ ID NO: 59, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 190, 191 y 226 de la SEQ ID NO: 59 es un aminoácido ácido; así como un polipéptidos que tiene al menos 95 % de identidad con un polipéptido descrito y que tiene la capacidad de antagonizar la activación de señal KDR.

La presente invención, a continuación, incluye también una variante del polipéptido del factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF) que comprende un dominio de unión a heparina C-terminal, en la que dicha variante de polipéptido tiene una o más alteraciones de aminoácido desde un polipéptido VEGF nativo, en la que la variante incluye un dominio de unión de heparan sulfato (HBD) en el que el HBD puede comprender también un HBD, tal como se describe en la Figura 1B o la Figura 1C o la Figura 6. Por ejemplo, el HBD puede contener un sitio de empalme tal como se muestra en la Figura 1C y la Figura 6 con secuencias adicionales empalmadas, ajustando así la posición de los restos variantes sobre la base de la numeración de la posición desde la posición 1 en el HBD, tal como se observa en la Figura 1C. Por ejemplo, el HBD puede comprender la secuencia tal como se muestra en las SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, y/o SEQ ID NO: 68, que tienen una inserción entre los restos 4 (E) y 6 (P) de entre los restos de aminoácidos 18-41 que reemplazan el resto 5(N) tal como se muestra en la Figura 6, en la que al menos un equivalente de las posiciones 13, 14 y 49 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 4 está sustituido por un aminoácido ácido, como E o D. Por ejemplo, para la SEQ ID NO: 64, las sustituciones pueden tener lugar en las posiciones 31, 32 y 67. Por ejemplo, para la SEQ ID NO: 65, las sustituciones pueden tener lugar en las posiciones 37, 38 y 73. Por ejemplo, para la SEQ ID NO: 67, las

sustituciones pueden tener lugar en las posiciones 54, 55 y 90. Para la SEQ ID NO: 68, Las posiciones variantes son las mismas, pero el término C tiene un extremo variante, tal como se muestra en la Figura 6. Específicamente, los insertos pueden incluir KKSVRGKGGKQKRKRKKS (SEQ ID NO: 60), véase el dominio C-terminal de longitud completa de SEQ ID NO: 64; KKSVRGKGGKQKRKRKKSRYKSWSV (SEQ ID NO: 61), véase el dominio C-terminal de longitud completa de la SEQ ID NO:65, KKSVRGKGGKQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCCCLMPWLSLPG (SEQ ID NO:62), véase el dominio C-terminal de longitud completa de la SEQ ID NO: 66 y KKSVRGKGGKQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCCCLMPWLSLPGPH (SEQ ID NO: 63), véase el dominio C-terminal de longitud completa de la SEQ ID NO: 67. El término C del HBD puede variar SLTRKD (SEQ ID NO: 69), véase el dominio C-terminal de longitud completa de la SEQ ID NO: 68.

Para mayor facilidad, estas secuencias se denominarán secuencias de Grupo 2 y el posicionamiento de los restos variantes puede ser en el resto 31, 31 y/o 67 del HBD para NP_001020538.2 (SEQ ID NO: 64) y NP_001165096.1 (SEQ ID NO: 64), en los restos 37, 38 y/o 73 del HBD para NP_001165095.1 (SEQ ID NO:65) y NP_003367.4 (SEQ ID NO: 65) y en los restos 54, 55 y 90 del HBD para NP_001020537.2 (SEQ ID NO: 67), p15692.2 (SEQ ID NO: 67), y NP_001165094.1 (SEQ ID NO: 67). Las variantes de VEGF de la presente invención presentan al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 86 %, al menos aproximadamente 87 %, al menos aproximadamente 88 %, al menos aproximadamente 89 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 %, de identidad de la secuencia de aminoácidos con un polipéptido de la presente invención y que tiene opcionalmente la capacidad de antagonizar la activación de señal KDR.

Realizaciones alternativas dentro del alcance de la invención incluyen aquellas en las que la variante de polipéptido del factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF) pueden incluir restos de aminoácido tal como se muestran en las Figuras 1A, 1B, 1C, y/o la Figura 6, entre otras y por tanto incluyen isoformas de VEGF que contienen una inserción del dominio de unión de heparina (HBD) en los aminoácidos 18-41 (véase Figura 1C y Figura 6), así como las isoformas de VEGF de origen natural que contienen cada uno de ellas las variantes del dominio de unión de heparina en las localizaciones señaladas (véase Figura 1B). La variante del polipéptido VEGF tiene, en el caso de las moléculas descritas en la Figura 1B, al menos una de las argininas en los aminoácidos 13, 14 y/o 49 sustituidas por un resto de aminoácido de carga negativa (p.ej., ácido), en algunas realizaciones ácido glutámico, o en el caso de las moléculas descritas en la Figura 1C, al menos una de las argininas en el aminoácido 31, 32 y/o 67; 37, 38 y/o 73; o 54, 55 y/o 90 sustituidas por un resto de aminoácido con carga negativa (p.ej., ácido) en algunas realizaciones ácido glutámico.

La presente invención incluye también métodos de tratamiento de una enfermedad caracterizada por angiogénesis patológica que comprende la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad farmacéuticamente eficaz de una variante de polipéptido de un factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF) que comprende una variante del dominio de unión a heparina C-terminal y un dominio de unión de receptor tirosina quinasa nativo, en la que dicha variante de polipéptido se une a heparina con una menor afinidad que el VEGF nativo, o repele la heparina. En una realización el polipéptido comprende una variante del dominio de heparina C-terminal.

Tal como se utiliza en el presente documento una "cantidad eficaz" o una "cantidad farmacéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para llevar a efecto los resultados clínicos beneficiosos o deseados. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. Para los fines de la presente invención, una cantidad eficaz de una variante de VEGF es una cantidad suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, invertir, ralentizar retrasar el avance de una patología. En una realización preferente de la invención, la "cantidad eficaz" se define como una cantidad capaz de reducir el crecimiento y/o remodelación de vasos sanguíneos colaterales.

Tal como se utiliza en el presente documento "tratamiento" o "tratar" consiste en un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de la presente invención, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, sin limitarse a ellos, alivio de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estabilización (es decir no empeoramiento) de la patología, retraso o ralentización del avance de la enfermedad, mejora o paliación de la patología y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. "Tratamiento" puede significar también prolongar la esperanza de vida en comparación con la esperanza de vida en ausencia de tratamiento. "Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como las medidas profilácticas o preventivas. Entre aquellos que necesitan tratamiento se incluyen tanto aquellos que presentan ya el trastorno como aquellos en los que se debe prevenir el trastorno. "Paliar" una enfermedad significa que se reducen y/o se ralentiza o se prolonga el curso de progresión del grado y/o las manifestaciones clínicas no deseadas de una patología, en comparación con una situación sin tratamiento.

En una realización, la afinidad de la variante de polipéptido tanto para VEGFR-1 (FLT-1) como para VEGFR-2 (KDR/FLK-1) se mantiene sustancialmente en comparación dicho VEGF nativo. En otra realización, la variante de polipéptido antagoniza la activación de señal KDR.

"Angiogénesis" se define como la promoción del crecimiento de nuevos vasos capilares de la sangre desde el endotelio existente. La contribución de la expresión de VEGF elevada y su ruta de señalización se ha asociado con angiogénesis patológica en prácticamente todos los carcinomas estudiados, así como enfermedades oftálmicas neovasculares, como degeneración macular relacionada con la edad y retinopatía. Los polipéptidos de la invención se pueden utilizar para tratar estos trastornos.

Una enfermedad caracterizada por angiogénesis patológica incluye cualquier enfermedad o proceso patológico que se caracteriza por un crecimiento no deseable de nuevos vasos sanguíneos en el organismo. Por lo tanto, se pueden usar los polipéptidos de la presente invención para tratar estados patológicos como crecimiento de tumor y enfermedades neoplásicas que implican una neurovascularización anormal. Por consiguiente, entre los ejemplos de trastornos caracterizados por angiogénesis patológicas que se pueden tratar mediante la presente invención se incluyen, sin limitarse a ellas, enfermedades neoplásicas, incluyendo sin limitarse a ellas, tumores sólidos y angiogénesis excesiva, que implica por ejemplo vascularización y/o inflamación, como aterosclerosis, artritis reumatoide (AR), glaucoma neovascular, retinopatía proliferativa, incluyendo retinopatía diabética proliferativa, degeneración macular, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración macular húmeda, hemangiomas, angiofibromas y psoriasis. Otros ejemplos no exhaustivos de enfermedades angiogénicas no neoplásicas son retinopatía del prematuro (fibroplasia retrolental), rechazo a injerto córneo, diabetes melitus dependiente de insulina, esclerosis múltiple, miastenia gravis, enfermedad de Crohn, nefritis autoinmune, cirrosis biliar primaria, pancreatitis aguda, rechazo de aloinjerto, inflamación alérgica, dermatitis de contacto y reacciones de hipersensibilidad retardada, enfermedad intestinal inflamatoria, choque séptico, osteoporosis, osteoartritis, defectos cognitivos inducidos por inflamación neuronal, síndrome de Osler-Weber, restenosis e infecciones fúngicas, parasitarias y víricas, incluyendo infecciones por citomegalovirus. Las afecciones y enfermedades en las que la angiogénesis persistente y descontrolada tiene un papel se engloban bajo el término enfermedades asociadas angiogénicas o dependientes angiogénicas.

Las enfermedades neoplásicas para su tratamiento incluyen cáncer y/o cáncer metastásico. Una lista parcial de cánceres para tratar con los polipéptidos de la presente invención incluyen tumores sólidos, como carcinomas, derivados de células epiteliales, incluyendo de mama, próstata, pulmón, páncreas y colon; sarcomas que se generan desde el tejido conectivo, tales como cáncer de huesos, linfoma y leucemias, que se generan desde células hematopoyéticas; tumores de células germinales como cáncer de testículo y cáncer ovárico y blastomas derivados de tejido precursor o embrionario. Dichos tumores incluyen tumores benignos o malignos (p.ej., de hígado, riñón, vejiga, mama, gástrico, ovárico, colorrectal, próstata, pancreático, pulmón, vulva, tiroides, carcinomas hepáticos; sarcomas; glioblastomas y diversos tumores de cabeza y de cuello); leucemias y malignidades linfoides; otros trastornos como por ejemplo neurológicos, gliales, de los astrocitos, del hipotálamo y otros trastornos glandulares, de macrófagos, epiteliales, estrómicos y blastocélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos.

La identificación de dicha enfermedad entra dentro de la capacidad y el conocimiento de las personas especializadas en la técnica. Por ejemplo, es adecuado administrar los anticuerpos de receptor de VEGF de la presente invención a individuos humanos que o bien padecen una enfermedad neoplásica o angiogénica clínicamente significativa o bien están en riesgo de desarrollar síntomas clínicamente significativos. Un profesional clínico especializado en la técnica podrá determinar fácilmente, por ejemplo, mediante el uso de pruebas clínicas, un examen físico y la historia médica/familiar, si el individuo es candidato de dicho tratamiento.

Las composiciones de la presente invención pueden ser útiles asimismo como agentes de formación de imágenes moleculares para VEGFR. Las composiciones de la presente invención se puede utilizar para unir la molécula diana (VEGFR, por ejemplo) y marcarla con una fracción que la hace visible para una modalidad de formación de imágenes en particular. Las marcas comúnmente utilizadas incluyen radionúclidos, moléculas fluorescentes e iones paramagnéticos, así como nanopartículas, liposomas y macroburbujas, todos ellos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los agentes de formación de imágenes moleculares que incluyen las composiciones de la presente invención pueden ser útiles en el diagnóstico y/o evaluación de una enfermedad caracterizada por angiogénesis patológica, tal como se describe en el presente documento.

La variante de polipéptidos de la presente invención útil en los métodos de la presente invención incluye los siguientes polipéptidos: un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 25 en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 149, 150, y 185 de la SEQ ID NO: 25 es un aminoácido ácido, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 123, 124 y 159 de la SEQ ID NO: 26 es un aminoácido ácido y un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 27 en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 13, 14 y 49 de la SEQ ID NO: 27 es un aminoácido ácido.

La variante de polipéptidos de la presente invención útil en los métodos de la presente invención incluye también: un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 25 en la que el aminoácido en las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 25 es un aminoácido ácido, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido en las posiciones 123, 124 y 159 de la SEQ ID NO: 26 es un aminoácido ácido y un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 27 en la que el aminoácido en las posiciones 13, 14 y 49 de la SEQ ID NO:27 es un aminoácido ácido.

La variante de polipéptidos de la presente invención útil en los métodos de la presente invención incluye también: un

polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 6, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 7, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 8, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 10, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 11, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 12, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 14, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 15, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 16, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 18, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 19, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 20, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 22, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 23 o un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 24.

Además de las alteraciones en las posiciones de aminoácido descritas en el presente documento, las variantes de VEGF de la presente invención pueden contener además otras alteraciones de aminoácido, incluyendo sustituciones y/o inserciones y/o deleciones en cualquier otra región de la molécula del VEGF incluyendo las regiones N- o C-terminal. Preferentemente, estas sustituciones serán sustituciones “conservadores” y no alteran la estructura o función de los polipéptidos resultantes basados en o bien los polipéptidos de VEGF 165 nativos de la presente invención o bien la variante de los polipéptidos de VEGF 165 de la presente invención. Las variantes VEGF de la presente invención presenta al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 86 %, al menos aproximadamente 87 %, al menos aproximadamente 88 %, al menos aproximadamente 89 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 %, identidad de la secuencia de aminoácidos con un polipéptido de la presente invención. Dichos polipéptidos incluyen la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24. Dichos polipéptidos incluyen también la variante de polipéptido de VEGF189 de la presente invención y la isoforma de la variante de polipéptidos VEGF que presenta al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 86 %, al menos aproximadamente 87 %, al menos aproximadamente 88 %, al menos aproximadamente 89 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 y/o SEQ ID NO: 69, y/o variantes de cada uno de las descritas en el presente documento.

Un ejemplo de variantes de VEGF de la presente invención que puede contener otras alteraciones de aminoácido incluyendo sustituciones y/o inserciones y/o deleciones en cualquier otra región de la molécula de VEGF, incluyendo la región N- y C- terminal, se puede observar en la Figura 1A. La Figura 1A, presenta ortólogos de VEGF 165 humano que corresponde a las SEQ ID NO: 39 a SEQ ID NO: 46. Las SEQ ID NO: 39 a SEQ ID NO: 46 son las secuencias de aminoácidos nativas de ortólogos de VEGF 165 humano. Estos ortólogos de VEGF165 humano también contienen el aminoácido básico crítico, restos arginina (Arg/R) que pueden estar sustituidos con un aminoácido ácido, por ejemplo ácido glutámico (Glu/E) para obtener las variantes de la presente invención. En particular, la Figura 1A presenta ortólogos de VEGF165 humano para *F. catus* (gato), en los que las sustituciones de un aminoácido ácido en la SEQ ID NO: 39 podría tener lugar en al menos uno entre R147, R148 y R183 de SEQ ID NO: 39 que corresponde a R121, R122 y R157 cuando se considera solamente la parte de la SEQ ID NO: 39 que refleja la secuencia de aminoácidos de la molécula VEGF madura; *C. familiaris* (perro), en la que los las sustituciones de un aminoácido ácido en la SEQ ID NO: 40 podría tener lugar en al menos uno entre R148, R149 y R184 de SEQ ID NO: 40 que corresponde a R122, R123 y R158 cuando se considera solamente la parte de la SEQ ID NO: 40 que refleja la secuencia de aminoácido de la molécula de VEGF madura; *B. Taurus* (bovino), en los que las sustituciones de un aminoácido ácido en la SEQ ID NO: 41 podría tener lugar en al menos uno entre R148, R149 y R184 de la SEQ ID NO: 41 que corresponde a R122, R123 y R158 cuando se considera solamente parte de la SEQ ID NO: 41 que refleja la secuencia del aminoácido de la molécula VEGF madura; *E. caballus* (caballo), *R. norvegicus* (rata), en los que las sustituciones de un aminoácido ácido en la SEQ ID NO: 42 o la SEQ ID NO: 43 pueden tener lugar en al menos uno entre R148, R149 y R184 de la SEQ ID NO: 42 o SEQ ID NO: 43 que corresponde a R122, R123 y R158 cuando se considera solamente la parte de la SEQ ID NO: 42 o la SEQ ID NO: 43 que refleja la secuencia del aminoácido de la molécula VEGF madura; *M. musculus* (ratón), en los que las sustituciones de un aminoácido ácido en la SEQ ID NO: 44 podría tener lugar en al menos uno entre R148, R149 y R184 de la SEQ ID NO: 44 que corresponde a R122, R123 y R158 cuando se considera solamente la parte de la SEQ ID NO: 44 que refleja la secuencia del aminoácido de la molécula de VEGF maduro; *G. gallus* (pollo), en los que las sustituciones de un aminoácido ácido en la SEQ ID NO: 45 podría tener lugar en al menos uno entre R150, R151 y R186 de la SEQ ID NO: 45 que corresponde a R124, R125 y R160 cuando se considera solamente parte de la SEQ ID NO: 45 que refleja la secuencia del aminoácido de la molécula de VEGF madura; y *X. laevis* (rana), en los que las sustituciones de un aminoácido ácido en la SEQ ID NO: 46 podría tener lugar en al menos uno entre K150,

R153 y R188 de la SEQ ID NO: 46 que corresponden a K124, R127 y R162 cuando se considera solamente parte de la SEQ ID NO: 46 que refleja la secuencia del aminoácido de la molécula de VEGF madura. Ejemplos de variantes 3S de estos ortólogos de VEGF podrían ser R121E/R122E/R157E (*F. Catus*), R122E/R123E/R159E (*C. familiaris*, *B. Taurus*, *E. caballus*, *R. Norvegicus*, *M. Musculus*, R124E/R125E/R160E (*G. gallus*) y K124E/R127E/R162E (*X. laevis*). Estos ortólogos tienen una alta identidad de secuencia con las variantes de VEGF humano de la presente invención y deberían considerarse como un ejemplo de las variantes de VEGF de la presente invención.

Las variantes de polipéptidos de la presente invención incluyen polipéptidos que presentan al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 86 %, al menos aproximadamente 87 %, al menos aproximadamente 88 %, al menos aproximadamente 89 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de la secuencia de aminoácidos con un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, y/o SEQ ID NO: 46" y/o variantes de cada una de las descritas en el presente documento.

"Porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos" en el presente documento se define como el porcentaje de los restos de aminoácido en una secuencia candidato que son idénticos a los restos del aminoácido en una secuencia seleccionada, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para los fines de la determinación del porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de diversas formas, conocidas entre las personas especializadas en la técnica, por ejemplo utilizando el software informático de dominio público como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Las personas especializadas en la técnica podrán determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento incluyendo los algoritmos necesarios para conseguir el máximo alineamiento en la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Para los fines del presente documento, sin embargo, los valores de los % de identidad de la secuencia de aminoácidos se obtienen tal como se describe a continuación con el uso del programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc. y está registrado con la documentación de usuario en la Oficina de Registro de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington D.C., 20559, No. TXU510087 y está públicamente disponible a través de Genentech, Inc., South San Francisco, Calif. El programa ALIGN-2 deberá compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están establecidos mediante el programa ALIGN-2 y no varían.

Para los fines del presente documento, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con, con respecto, frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que puede expresar alternativamente como secuencia de aminoácidos A que tiene o que comprende cierto % de identidad de la secuencia de aminoácidos con, con respecto, frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula del siguiente modo: 100 multiplicado por la fracción X/Y en la que X es un número de restos de aminoácidos marcados como apareamientos idénticos por el programa de alineamiento de secuencia ALIGN-2 en ese alineamiento de programa de A y B, y en el que Y es el número total de restos de aminoácido en B. Se podrá apreciar que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácido B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácidos de B a A.

En una realización, la presente invención incluye un polinucleótido que codifica una variante del polipéptido de la presente invención. En una realización, la presente invención incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 25 en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 25 es un aminoácido ácido. La presente invención incluye también un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 123, 124 y 159 de la SEQ ID NO: 26 es un aminoácido ácido. La presente invención incluye también un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 27 en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 13, 14 y 49 de la SEQ ID NO: 27 es un aminoácido ácido.

En otras realizaciones de la presente invención incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 6, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 7, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 8, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 11, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 12, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 14, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 15, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende SEQ ID NO: 16, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 18, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 19, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 20, un

polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 22, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 23 o un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 24.

- 5 En otra realización, el polinucleótido incluye un polinucleótido que comprende las SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 21. En otra realización, el polinucleótido incluye un polinucleótido que comprende las SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 33.

10 Los polinucleótidos que codifican las variantes de VEGF de la presente invención pueden contener otras alteraciones de nucleótidos, incluyendo sustituciones y/o inserciones y/o deleciones en cualquier otra región de la molécula de VEGF, incluyendo las regiones codificantes N- y C-terminales. Preferentemente, estas sustituciones serán sustituciones “conservadoras” y no alteran los restos de aminoácido de los polipéptidos resultantes. En algunas realizaciones, se puede alterar un resto de aminoácido, pero el cambio es un cambio por otro aminoácido que es similar al reemplazado y la estructura y/o función de los polipéptidos resultantes permanecerán sobre la base de los polipéptidos de VEGF 165 nativos de la presente invención o las variantes de polipéptidos de VEGF 165 de la presente invención. Los polinucleótidos de la presente invención que codifican las variantes de VEGF de la presente invención presentan al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 86 %, al menos aproximadamente 87 %, al menos aproximadamente 88 %, al menos aproximadamente 89 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con un polinucleótido que puede ser cualquiera de los siguientes: un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 6, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 7, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 8, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 10, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 11, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 12, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 14, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 15, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 16, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 18, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 19, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 20, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 22, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 23 o un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 14; en otra realización el polinucleótido incluye un polinucleótido que incluye las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 21; en otra realización, el polinucleótido incluye un polinucleótido que comprende las SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 33.

40 En otra realización, los polinucleótidos de la presente invención que codifica variantes VEGF189 de la presente invención presenta al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 86 %, al menos aproximadamente 87 %, al menos aproximadamente 88 %, al menos aproximadamente 89 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con un polinucleótido a polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 34, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 35, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 36, un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 37 o un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 38.

50 En otra realización, los polinucleótidos de la presente invención que codifica otras variantes de VEGF de la presente invención presenta al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 86 %, al menos aproximadamente 87 %, al menos aproximadamente 88 %, al menos aproximadamente 89 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende las SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 y/o SEQ ID NO: 69 y/o variantes de cada una de las descritas en el presente documento.

65 La práctica de la presente invención empleará a no ser que se indique de otra forma técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología,

que entran dentro de la especialización de la técnica. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía, como por ejemplo en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology" (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds.);

5 "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., eds., 1994); y "Current Protocols in Immunology" (J. E. Coligan et al., eds., 1991).

Las variantes de VEGF con más de una sustitución de aminoácidos se pueden generar de una entre varias formas. Si los aminoácidos están localizados muy próximos en la cadena de polipéptido, se pueden mutar simultáneamente utilizando un oligonucleótido que codifica todas las sustituciones de aminoácido deseadas. Sin embargo, si los aminoácidos están localizados a cierta distancia uno de otro (p.ej., separados por más de diez aminoácidos), es más difícil generar un solo oligonucleótido que codifica todos los cambios deseados. En su lugar, se puede utilizar uno de los dos métodos alternativos. En un primer método, se genera un oligonucleótido por separado para cada aminoácido que se va a sustituir. Los oligonucleótidos se hibridan entonces con el ADN matriz monocatenario simultáneamente y la segunda cadena de ADN que se sintetiza de la matriz codificará todas las sustituciones de aminoácido deseadas. El método alternativo implica dos o más rondas de mutagénesis para producir el mutante deseado.

10

15

Las variantes de la secuencia de aminoácido de los polipéptidos de la presente invención (a los que se hace referencia en el presente documento como polipéptido diana) se preparan introduciendo los cambios de nucleótido apropiados en el ADN que codifica el polipéptido diana o por síntesis *in vitro* del polipéptido diana deseado. Se puede realizar cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre y cuando la construcción final posea las características deseadas. Los cambios del aminoácido también pueden alterar procesos de post-traducción del polipéptido diana, como el cambio del número o la posición de los sitios de glicosilación, la alteración de cualquier característica de anclaje de membrana y/o la alteración de la localización intra-celular del polipéptido diana por inserción, delección o que afecte de otra forma a cualquier secuencia líder del polipéptido diana nativo.

20

25

Existen dos variables principales en la construcción de las variantes de la secuencia de aminoácidos: la localización del sitio de mutación y la naturaleza de la mutación. En general, la localización y la naturaleza de la mutación seleccionada dependerán del polipéptido diana característico que se va a modificar.

30

Las delecciones de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de VEGF de la presente invención por lo general no son las preferentes, ya que se cree que para esta actividad es deseable mantener la configuración general de un polipéptido. Se seleccionará cualquier delección para preservar la estructura.

35

Entre las inserciones de la secuencia de aminoácidos se incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que oscilan en su longitud desde un resto a polipéptidos que contienen un centenar o más restos, así como inserciones dentro de la secuencia de uno o múltiples restos de aminoácidos. Las inserciones dentro de la secuencia (es decir, las inserciones dentro de la secuencia de polipéptido diana) pueden oscilar generalmente entre aproximadamente 1 y 10 restos, más preferentemente, más preferentemente entre 1 y 5, siendo sobre todo preferente entre 1 y 3. Entre los ejemplos de inserciones terminales se incluyen el polipéptido diana con un resto metionilo N-terminal, un instrumento de la expresión directa del polipéptido diana en cultivo celular recombinante bacteriano y fusión de la secuencia de señal N-terminal heteróloga para el N-término de la molécula de polipéptido diana para facilitar la secreción del polipéptido diana maduro desde las células huésped recombinantes. Dichas secuencias de señal se obtendrán generalmente desde las especies de células huésped pretendidas y, por tanto, homólogas. Las secuencias adecuadas incluyen STII o lpp para *E. coli*, factor alfa para levadura y señales virales como herpes gD para células de mamífero. Otras variantes de inserción del polipéptido diana incluyen la fusión con el término N- o C- del polipéptido diana de polipéptidos inmunogénicos, p.ej., polipéptidos bacterianos como beta-lactamasa o enzima codificada por el locus *trp* de *E. coli*, o proteína de levadura y fusiones C-terminales con proteínas que tienen una larga semivida como regiones constantes de inmunoglobulina (u otras regiones de inmunoglobulina) albúmina o ferritina.

40

45

50

El ADN que codifica las variantes de la secuencia de aminoácidos de las variantes de VEGF de la presente invención se prepara a través de diversos métodos conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero sin limitarse a ellos, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o la preparación mediada por oligonucleótido de mutagénesis (o dirigida a sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete de una variante previamente preparada o una versión no variante del polipéptido diana. Estas técnicas pueden utilizar ácido nucleico de polipéptido (ADN o ARN) o ácido nucleico complementario del ácido nucleico de polipéptido diana.

55

60

La mutagénesis mediada por oligonucleótido es un método para preparar variantes por sustitución, delección e inserción del ADN de polipéptido diana. Esta técnica es muy conocida en la especialidad, tal como la describen Adelman et al., DNA, 2: 183 (1983). Brevemente, se altera el ADN del polipéptido diana por hibridación de un oligonucleótido que codifica la mutación deseada para una matriz de ADN, en la que la matriz es la forma

65

monocatenaria de un plásmido o bacteriófago que contiene la secuencia de ADN sin alterar o nativa del polipéptido diana. Tras la hibridación, se utiliza una ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena complementaria entera de la matriz que se incorpora así al cebador de oligonucleótido y codificará la alteración seleccionada en el ADN del polipéptido diana. Generalmente, se utilizan oligonucleótidos de al menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido óptimo tendrá de 12 a 15 nucleótidos que son completamente complementarios para la matriz en cada lado del nucleótido que codifica la mutación. Esto asegura que se hibriden los oligonucleótidos apropiadamente con la molécula matriz de ADN monocatenario. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente aplicando las técnicas conocidas en la especialidad, tales como las descritas por Crea et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos., 75: 5765 (1978)). La matriz de ADN monocatenario puede generarse también por desnaturalización del ADN del plásmido bicatenario (u otro) utilizando las técnicas convencionales.

Para la alteración de la secuencia de ADN nativa (para generar variantes de la secuencia de aminoácido, por ejemplo), se hibrida el oligonucleótido con la matriz monocatenaria en condiciones de hibridación adecuadas. A continuación, se añade una enzima de polimerización de ADN, normalmente, un fragmento Kenow de ADN polimerasa 1, para sintetizar la cadena complementaria de la matriz utilizando el oligonucleótido como cebador para la síntesis. Se forma así una molécula heterohíbrida, tal que una cadena de ADN codifica la forma mutada del polipéptido diana y la otra cadena (la matriz original) codifica la secuencia sin alterar nativa del polipéptido diana. A continuación, se transforma esta molécula heterohíbrida en una célula huésped adecuada, normalmente, una procarionta como *E. coli* JM101. Después de cultivar las células, se colocan en placas de agarosa y se rastrean utilizando el cebador de oligonucleótido radiomarcado con fosfato-32 para identificar colonias bacterianas que contienen el ADN mutado. A continuación, se extrae la región mutada y se coloca en un vector apropiado para la producción de proteína, generalmente, un vector de expresión del tipo empleado normalmente para la transformación de un huésped apropiado.

El método que se acaba de describir se puede modificar, de manera que se cree una molécula homohíbrida en la que ambas cadenas del plásmido contiene la(s) mutación(es). Las modificaciones son las siguientes: se hibrida el oligonucleótido monocatenario con la matriz monocatenaria tal como se ha descrito. Se combina una mezcla de tres desoxirribonucleótidos, desoxirriboadenosina (dATP), desoxirriboguanosina (dGTP) y desoxiribotimidina (dTTP) con una tio-desoxirribocitosina modificada denominada dCTP-(aS) (que se puede obtener de Amersham Corporation). Se añade esta mezcla al complejo de matriz-oligonucleótido. Tras la adición de ADN polimerasa a esta mezcla, se genera una cadena de ADN idéntica a la matriz, a excepción de las bases mutadas. Además, la nueva cadena de ADN contendrá dCTP-(aS) en lugar de dCTP, que sirve para protegerla de la digestión de endonucleasa de restricción.

Una vez mellada la cadena de la matriz del heterohíbrido bicatenario con una enzima de restricción apropiada, la cadena de la matriz puede digerirse con ExoIII nucleasa u otra nucleasa apropiada pasada la región que contiene el (los) sitio(s) que se van a mutar. Después, se detiene la reacción para dejar una molécula que es solamente parcialmente monocatenaria. A continuación, se forma un homohíbrido de ADN bicatenario completo utilizando ADN polimerasa en presencia de los cuatro desoxirribonucleótido trifosfatos, ATP y ADN ligasa. Esta molécula homohíbrida se puede transformar entonces en una célula huésped adecuada como *E. coli* JM101, tal como se ha descrito.

El ADN que codifica las variantes de polipéptido diana en los que se va a sustituir más de un aminoácido se pueden generar a través de una de una serie de formas. Si los aminoácidos están localizados muy próximos en la cadena de polipéptido, se pueden mutar simultáneamente utilizando un oligonucleótido que codifica todas las sustituciones de aminoácido deseadas. Sin embargo, si los aminoácidos están localizados a cierta distancia uno de otros (separados más de aproximadamente diez aminoácidos), es más difícil generar un solo nucleótido que codifique todos los cambios deseados. En su lugar, se puede emplear uno de dos métodos alternativos.

En el primer método, se genera un oligonucleótido por separado para cada aminoácido que se va a sustituir. A continuación, se hibridan los oligonucleótidos con el ADN matriz monocatenario simultáneamente y la segunda cadena del ADN que se sintetiza desde la matriz codificará todas las sustituciones de aminoácido deseadas.

El método alternativo implica dos o más rondas de mutagénesis para producir el mutante deseado. La primera ronda es como se ha descrito para los mutantes simples: se utiliza ADN de tipo silvestre para la matriz, se hibrida un oligonucleótido que codifica las primeras sustituciones de aminoácido deseadas con esta matriz y a continuación, se genera la molécula de ADN heterohíbrido. La segunda ronda de mutagénesis utiliza el ADN mutado producido en la primera ronda de mutagénesis como matriz. Por tanto, esta matriz contiene ya una o más mutaciones. El oligonucleótido que codifica la(s) sustitución(es) de aminoácido deseada(s) adicional(es) se hibrida después con esta matriz y la cadena resultante del ADN codifica ahora las mutaciones de la primera y segunda ronda de mutagénesis. Se puede utilizar el ADN resultante como matriz en una tercera ronda de mutagénesis, y así sucesivamente.

La mutagénesis por PCR también es adecuada para obtener variantes de aminoácido del polipéptido diana. Aunque la siguiente explicación se refiere a ADN, debe entenderse que la técnica también se puede aplicar con ARN. La técnica de PCR se refiere generalmente al siguiente procedimiento (véase Erlich, supra, el capítulo de R. Higuchi, p.

61-70): Cuando se utilizan pequeñas cantidades del ADN matriz como material de partida en una PCR, los cebadores que difieren ligeramente en la secuencia de la región correspondiente en un ADN matriz se puede utilizar para generar cantidades relativamente grandes de un fragmento de ADN específico que difiere de la secuencia matriz únicamente en las posiciones en las que los cebadores difieren de la matriz. Para introducir una mutación en un ADN de plásmido, se designa uno o más cebadores para solapar la posición de la mutación y contener la mutación; la secuencia del otro cebador debe ser idéntica a un tramo de la secuencia de la cadena opuesta del plásmido, pero esta secuencia puede estar localizada en cualquier parte del ADN del plásmido. Sin embargo, preferentemente, la secuencia del segundo cebador está localizada dentro de 200 nucleótidos de los del primero, de manera que se puede secuenciar fácilmente en el extremo toda la región amplificada del ADN unida a los cebadores. La amplificación por PCR con el uso de un par de cebadores como la que se acaba de describir tiene como resultado una población de fragmentos de ADN que difieren en la posición de la mutación especificada por el cebador y posiblemente en otras posiciones, ya que la copia de la matriz tiende al error en cierto modo.

Si la relación entre la matriz y el material producto es extremadamente baja, la inmensa mayoría de los fragmentos de ADN producto incorporan la(s) mutación(es) deseada(s). Este material producto se utiliza para reemplazar la región correspondiente en el plásmido que ha servido como matriz de PCR aplicando la tecnología de ADN normal. Se pueden introducir mutaciones en posiciones separadas simultáneamente utilizando un segundo cebador mutante o llevando a cabo una segunda PCR con diferentes cebadores mutantes y ligando los dos fragmentos de PCR resultante simultáneamente al fragmento de vector en una ligadura en tres (o más) partes.

En un ejemplo específico de mutagénesis por PCR, el ADN de plásmido matriz (1 ug) se lineariza por digestión con una endonucleasa de restricción que tiene un único sitio de reconocimiento en el ADN del plásmido fuera de la región que se va a amplificar. De este material, se añaden 100 ng a una mezcla de PCR que contiene tampón PCR, que contiene los cuatro desoxinucleótido trifosfatos y se incluye en los kits GENEAMP (obtenidos de Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn. y Emeryville, Calif.) y 25 pmoles de cada cebador de oligonucleótido, hasta un volumen final de 50 µl. Se superponen sobre la mezcla de reacción 35 µl de aceite mineral. Se desnaturaliza la reacción durante 5 minutos a 100 °C, se coloca brevemente sobre hielo y después se añade 1 µl de ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) (5 unidades/µl, adquirida de Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT y Emeryville, Calif.) por debajo de la capa de aceite mineral. A continuación, se inserta la mezcla de reacción en un termociclador de ADN (adquirido de Perkin-Elmer Cetus) programado del siguiente modo: 2 min, a 55 °C., a continuación 30 s a 72 °C., a continuación 19 ciclos del siguiente modo: 30 s a 94 °C., 30 s a 55 °C y 30 s a 72 °C. Al final del programa, se retira el vial de reacción del termociclador y se transfiere la fase acuosa a un nuevo vial, se extrae con fenol/cloroformo (50:50 vol.) y se hace precipitar el etanol y se recupera el ADN a través de procedimientos convencionales. Posteriormente, se somete este material a tratamientos apropiados por inserción en un vector.

Otro método para preparar variantes, la mutagénesis de casete, se basa en la técnica descrita por Wells et al. (Gene, 34: 315 (1985)). El material de partida es el plásmido (u otro vector) que comprende el ADN de polipéptido diana que se va a mutar. Se identifica el (los) codón(es) en el ADN del polipéptido diana que se va a mutar. Debe haber un único sitio de endonucleasa de restricción en cada lado del (los) sitio(s) de mutación identificados. Si no existen sitios de restricción, se pueden generar utilizando el método de mutagénesis mediado por oligonucleótido que se ha descrito para introducirlos en las localizaciones apropiadas en el ADN del polipéptido diana. Una vez introducidos los sitios de restricción en el plásmido, se corta el plásmido en estos sitios para linearizarlos. Se sintetiza un oligonucleótido bicatenario que codifica la secuencia del ADN entre los sitios de restricción pero que contiene la(s) mutación(es) sintetizadas aplicando los procedimientos convencionales. Se sintetizan las dos cadenas por separado y después se hibridan utilizando técnicas convencionales. Este oligonucleótido bicatenario se denomina casete. Dicho casete se diseña para que tenga extremos 3' y 5' compatibles con los extremos del plásmido linearizado, de manera que se puede ligar directamente al plásmido. Dicho plásmido contiene ahora la secuencia de ADN de polipéptido diana mutado.

En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede formar parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector.

Los polipéptidos de la presente invención se puede expresar no solamente directamente, sino también como fusión con un polipéptido heterólogo, preferentemente una secuencia de señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el término N del polipéptido o proteína madura. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede formar parte del ADN del polipéptido diana que se inserta en el vector. Se incluye dentro del alcance de la invención los polipéptidos diana en los que se ha suprimido y reemplazado con una secuencia de señal heteróloga cualquier secuencia de señal nativa. La secuencia de señal heteróloga seleccionada deberá ser aquella que pueda ser reconocida y procesada (es decir escindida por peptidasa de señal) por la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no reconocen y procesan la secuencia de señal del polipéptido diana nativo, se sustituye la secuencia de señal por una secuencia de señal procariota seleccionada por ejemplo del grupo que consiste en líderes fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o de enterotoxina II termoestable. Para la secreción de levadura, la secuencia de señal del polipéptido diana nativo puede sustituirse por líderes levadura invertasa, factor alfa o de fosfatasa ácida. En la expresión de células de mamífero, la secuencia de señal nativa es satisfactoria, si bien pueden ser adecuadas también otras secuencias de señal de mamífero.

Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Generalmente, en los vectores de clonación esta secuencia es aquella que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico huésped e incluye orígenes de replicación o secuencias autónomamente replicantes. Dichas secuencias son muy conocidas para una serie de bacterias, levaduras y virus. El origen de la replicación desde el plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen plásmido 2 μ es adecuado para levaduras y varios orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el origen del componente de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero (normalmente, se puede utilizar el origen SV40 solamente porque contiene el promotor temprano).

La mayoría de los vectores de expresión son vectores "lanzadera", es decir, son capaces de replicación en al menos una clase de organismos, pero se pueden transfectar en otro organismo para expresión. Por ejemplo, se clona un vector en *E. coli* y después se transfecta el mismo vector en células de levadura o de mamífero para expresión incluso aunque no sea capaz de replicarse independientemente del cromosoma de la célula huésped.

La presente invención se refiere asimismo a vectores que comprenden las moléculas de polinucleótido de la invención, así como células huésped transformadas con dichos vectores. Cualquiera de las moléculas de polinucleótido de la invención se puede unir a un vector, que incluye generalmente un marcador seleccionable y un origen de replicación, para la propagación en un huésped. Las células huésped se obtienen por ingeniería genética para expresar polipéptidos de la presente invención. Los vectores incluyen ADN que codifica cualquiera de los polipéptidos descritos a lo largo del presente documento, ligados operativamente a secuencias reguladoras de transcripción o traducción, como las derivadas de un gen de mamífero, microbio, virus o insecto. Entre los ejemplos de secuencias de reguladoras incluyen promotores, operadores o potenciadores de transcripción, sitios de unión ribosómicos de ARNm y secuencias apropiadas que controlan la transcripción y la traducción. Las secuencias de nucleótidos están ligadas operativamente cuando la secuencia reguladora está relacionada funcionalmente con el ADN que codifica la proteína diana. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos promotora está operativamente ligada al polinucleótido de la presente invención si la secuencia de nucleótido promotora dirige la transcripción del polinucleótido de la presente invención.

La selección de vectores adecuados para su uso para la clonación de las moléculas de polinucleótido de la presente invención dependerá de la célula huésped en la que se transforma el vector y, cuando sea aplicable, la célula huésped a partir de la cual se ha de expresar el polipéptido diana. Entre los ejemplos de vectores útiles en los métodos de la presente invención se incluyen, sin limitarse a ellos, plásmidos, bacteriófagos, cósmidos, retrovirus y cromosomas artificiales. Entre las células huésped adecuadas para la expresión de los polipéptidos de la invención se incluyen procariontes, levaduras y células eucariotas superiores.

El ADN puede amplificarse también por inserción en el genoma huésped. Esto se realiza fácilmente utilizando la especie *Bacillus* como huésped, por ejemplo, incluyendo en el vector una secuencia de ADN que es complementaria de la secuencia encontrada en el ADN genómico de *Bacillus*. La transfección de *Bacillus* con este vector tiene como resultado la recombinación homóloga con el genoma y la inserción del ADN del polipéptido diana. Sin embargo, la recuperación del ADN genómico que codifica el polipéptido diana es más complejo que la del vector replicado exógenamente ya que se requiere la digestión con enzima de restricción para escindir el ADN del polipéptido diana.

Los vectores de expresión y clonación deberán contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Dicho gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de las células huésped transformadas desarrolladas en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p.ej. ampicilina, neomicina metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles para medios complejos, p.ej., el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Según un ejemplo de un esquema de selección se utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo expresan una proteína que confiere resistencia a fármaco y por tanto sobreviven el régimen de selección. Entre los ejemplos de dicho uso de selección dominante se pueden mencionar los fármacos neomicina (Southern et al., J. Molec. Appl. Genet., 1: 327 (1982)), ácido micofenólico (Mulligan et al., Science, 209: 1422 (1980)) o higromicina (Sugden et al., Mol. Cell. Biol., 5: 410-413 (1985)). Los tres ejemplos dados emplean genes bacterianos bajo el control eucariota para transmitir resistencia al fármaco apropiado G418 o neomicina (geneticina), xgpt (ácido micofenólico), o higromicina, respectivamente. Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero está constituido por aquellos que permiten la identificación de células competentes para recoger el ácido nucleico del polipéptido diana, como dihidrofolato reductasa (DHFR) o timidina quinasa. Los transformantes de célula de mamífero se sustituyen bajo la presión de selección a la que solamente se adaptan los transformantes únicamente para sobrevivir en virtud de haber recogido el marcador. La presión de selección se impone cultivando los transformantes en condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio se cambia sucesivamente, en virtud de lo cual se llega a la amplificación tanto del gen de selección como el ADN que codifica el polipéptido diana. La amplificación es el proceso según el cual se reiteran los genes en mayor demanda para la producción de una proteína crítica para el

crecimiento en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Se sintetizan cantidades crecientes de polipéptido diana desde el ADN amplificado.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero por cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada con DHFR de tipo silvestre empleada es la línea de células de ovario de hámster chino (CHO) deficientes en actividad DHFR preparada y propagada tal como describen Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 77: 4216 (1980). Las células transformadas se exponen después a niveles crecientes de metotrexato. Esto lleva a la síntesis de múltiples copias del gen DHFR y, simultáneamente, múltiples copias de otros ADN que comprenden vectores de expresión, tales como el ADN que codifica el polipéptido diana. Esta técnica de amplificación se puede aplicar con otros huéspedes adecuados de otra forma, p.ej., ATCC No. CCL61 CHO-K1, independientemente de la presencia de DHFR endógeno si, por ejemplo, se emplea un gen DHFR mutante que es muy resistente a Mtx (EP 117.060). Alternativamente, se pueden seleccionar células huésped (en particular huéspedes de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican el polipéptido diana, proteína DHFR de tipo silvestre y otro marcador seleccionable como por ejemplo aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, como por ejemplo antibiótico aminoglicosídico, p.ej., kanamicina, neomicina o G418. Véase la patente estadounidense No. 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb et al., Nature, 282: 39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7: 141 (1979); o Tschemper et al., Gene, 10: 157 (1980)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics, 85: 12 (1977)). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona un entorno eficaz para detectar la transformación según el crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura con deficiencia en *Leu2* (ATCC 20,622 o 38,626) se complementan con plásmidos conocidos que llevan el gen *Leu2*.

Los vectores de expresión y clonación contienen normalmente un promotor que es reconocido por el organismo huésped y se liga operativamente al ácido nucleico del polipéptido diana. Los promotores son secuencias sin traducir localizadas en dirección 5' para el codón de inicio de un gen estructural (generalmente dentro de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción o traducción de una secuencia de ácido nucleico en particular, como por ejemplo la que codifica el polipéptido diana, al que se ligan operativamente. Dichos promotores entran dentro de dos clases normalmente, inducibles o constitutivos. Los promotores inducibles son promotores que inician niveles crecientes de transcripción desde ADN bajo su control como respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, p.ej., la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. En este momento, se conoce un gran número de promotores reconocidos por diversas posibles células huésped. Dichos promotores se ligan operativamente a ADN que codifica el polipéptido diana eliminando el promotor del ADN de origen mediante la digestión con enzima de restricción y la inserción de la secuencia promotora aislada en el vector. Es posible utilizar tanto la secuencia promotora del polipéptido diana nativo como muchos promotores heterólogos para la amplificación directa y/o expresión del ADN del polipéptido diana. Sin embargo, son preferentes los promotores heterólogos, ya que por lo general permiten mayor transcripción y más altos rendimientos del polipéptido diana expresados en comparación con el promotor de polipéptido diana nativo. Los promotores adecuados para su uso en huéspedes procariontes incluyen sistemas de promotor β -lactamasa y lactosa (Chang et al., Nature, 275: 615 (1978); y Goeddel et al., Nature, 281: 544 (1979)), fosfatasa alcalina, un sistema de promotor triptofano (*trp*) (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980) y EP 36.776) y promotores híbridos como el promotor *tac* (de Boer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 80: 21-25 (1983)). Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Sus secuencias de nucleótido han sido publicadas, lo que permite a las personas especializadas ligarlas operativamente al ADN que codifica el polipéptido diana (Siebenlist et al., Cell, 20: 269 (1980)) utilizando engarces y adaptadores para suministrar los sitios de restricción requeridos. Los promotores para su uso en los sistemas bacterianos también contienen generalmente una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) ligada operativamente al ADN que codifica el polipéptido diana.

Las secuencias de promoción adecuadas para su uso en los huéspedes de levadura incluyen promotores para 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255: 2073 (1980)) u otras enzimas glicolíticas (Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); y Holland, Biochemistry, 17: 4900 (1978)), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, tiosulfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa. Otros promotores de levadura que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada mediante las condiciones de crecimiento son las regiones de promotor para alcohol deshidrogenasa 2, isocianocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. En Hitzeman et al., EP 73.657A se describen además vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levaduras. Los potenciadores de levaduras también se utilizan ventajosamente como promotores de levadura.

Las secuencias promotoras son conocidas para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases en dirección 5' desde el sitio en el que se inicia la

transcripción. Otra secuencia encontrada 70 a 80 bases en dirección 5' desde el inicio de la transcripción de muchos genes es una región CXCAAT en la que X puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas es una secuencia AATAAA que puede ser una señal para la adición de la cola poli A del extremo 3' de la secuencia de codificación. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión de mamífero.

La transcripción del polipéptido diana desde vectores en células huésped de mamífero se controla mediante los promotores obtenidos de los genomas de virus como poliomavirus, virus de la viruela (patente británica UK 2.211.504 publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis-B y siendo preferentes sobre todo virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, p.ej., el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico y del promotor asociado normalmente con la secuencia de polipéptido diana, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

Los promotores tempranos y tardíos de virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción SV40 que contiene también el origen viral SV40 de replicación Fiers et al., *Nature*, 273:113 (1978); Mulligan y Berg, *Science*, 209: 1422-1427 (1980); Pavlakis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 78: 7398-7402 (1981). El promotor temprano inmediato de los citomegalovirus humanos se obtiene convenientemente como el fragmento de restricción HindIII E. Greenaway et al., *Gene*, 18: 355-360 (1982). En la patente estadounidense No. 4.419.446 se describe un sistema para la expresión de ADN en huéspedes de mamíferos utilizando el virus de papiloma bovino como vector. Una modificación de dicho sistema se describe en la patente estadounidense No. 4.60178. Véase también Gray et al., *Nature*, 295: 503-508 (1982) sobre la expresión de ADNc que codifica interferón inmune en células de mono; Reyes et al., *Nature*, 297: 598-601 (1982) sobre la expresión de ADNc de beta-interferón humano en células de ratón, bajo el control de un promotor de timidina quinasa de virus herpes simple, Canaani y Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 79: 5166-5170 (1982) sobre la expresión del gen interferón beta 2 humano en cultivo de células de ratón y conejo y Gorman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 79: 6777-6781 (1982) sobre la expresión de secuencias CAT bacterianas en células de riñón de mono CV-1, fibroblastos de embrión de pollo, células de ovario de hámster chino, células HeLa y células NIH-3T3 de ratón utilizando repeticiones largas terminales del virus de sarcoma de Rous como promotor.

La transcripción de ADN que codifica el polipéptido diana de la presente invención mediante eucariotas superiores suele incrementarse por inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, normalmente de aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Los potenciadores son relativamente independientes en orientación y posición, habiéndose encontrado en dirección 5' (Laimins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 993 (1981)) y 3' (Lusky et al., *Mol. Cell Bio.*, 3: 1108 (1983)) de la unidad de transcripción dentro de un intrón (Banerji et al., *Cell*, 33: 729 (1983)) así como dentro de la propia secuencia de codificación (Osborne et al., *Mol. Cell Bio.*, 4:1293 (1984)). Actualmente, se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Entre los ejemplos, se incluyen el potenciador SV40 en el último lado del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador polioma en el último lado del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature*, 297: 17-18 (1982) sobre los elementos de potenciación para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede empalmarse en el vector en la posición 5' o 3' para el ADN del polipéptido diana, pero está localizado preferentemente en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión utilizados en células huésped eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles comúnmente desde las regiones sin traducir 5' y, ocasionalmente 3' de ADN y ADNc virales y eucariotas. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción sin traducir del ARNm que codifica el polipéptido diana. Las regiones 3' sin traducir también incluyen sitios de terminación de la transcripción.

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes mencionados, la codificación deseada y las secuencias de control, emplean las técnicas de ligadura convencionales. Se escinden plásmidos aislados o fragmentos de ADN, adaptados y religados en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos.

Para el análisis para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos construidos, se utilizan las mezclas de ligadura para transformar la cepa 294 de *E. coli* K12 (ATCC 31,446) y transformantes logrados seleccionados por su resistencia a ampicilina o tetraciclina, cuando sea apropiado. Los plásmidos de los transformantes se preparan, se analizan por digestión de endonucleasa de restricción y/o se secuencian según el método de Messing et al., *Nucleic Acids Res.*, 9: 309 (1981) o a través del método de Maxam et al., *Methods in Enzymology*, 65: 499 (1980).

Son particularmente útiles en la práctica de la presente invención los vectores de expresión que proporcionan una expresión transitoria en células de mamífero de ADN que codifica el polipéptido diana. En general, la expresión transitoria implica el uso de un vector de expresión que es capaz de replicarse eficientemente en una célula

huésped, de manera que la célula huésped acumula muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetiza altos niveles de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión. Los sistemas de expresión transitorios que comprenden un vector de expresión adecuado y una célula huésped permiten la identificación positiva conveniente de los polipéptidos codificados por ADN clonados, así como el rápido rastreo de dichos polipéptidos en busca de propiedades biológicas y fisiológicas deseada. Por lo tanto, los sistemas de expresión transitorios son particularmente útiles en invención para fines de identificación de análogos y variantes del polipéptido diana que tienen una actividad de tipo polipéptido diana.

En Gething et al., Nature, 293: 620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281: 40-46 (1979); Levinson et al.; las patentes europeas EP 117.060; y EP 117.058 se describen otros métodos, vectores y células huésped adecuados para su adaptación para la síntesis del polipéptido diana en el cultivo de células de vertebrado recombinantes. Un plásmido útil en particular para la expresión del polipéptido diana en cultivo de células de mamífero es pRK5 (patente europea publicada No. 307.247) o pSV16B.

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de los vectores del presente documento son procariotas, levadura o eucariotas superiores, tal como se han descrito. Entre las procariotas adecuadas se incluyen eubacterias como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, como por ejemplo, *E. coli*, *Bacilli* como *B. subtilis*, especies pseudomonas como *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcescans*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferente es *E. coli* 294 (ATCC 31,446), aunque son adecuadas otras cepas como *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31,537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27,325). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de exhaustivos. Preferentemente, la célula huésped deberá secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Alternativamente, son adecuados métodos *in vitro* de clonación, p.ej., PCR u otras reacciones de la polimerasa de ácido nucleico.

Además de los procariotas, son huéspedes adecuados también microbios eucariotas como hongos o levaduras filamentosos para vectores que codifican el polipéptido diana. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero común, es la más utilizado entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores. No obstante, existen otros géneros, especies y cepas disponibles comúnmente y útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 (1981); patente europea EP 139.383 publicada el 2 de mayo de 1985), huéspedes *Kluyveromyces* (patente estadounidense. No. 4.943.529) como p.ej., *K. lactis* (Louvencourt et al., J. bacteriol., 737 (1983)), *K. fragilis*, *K. bulgaricus*, *K. thermotolerans* y *K. marxianus*, *yarrowia* (patente europea EP 402.226), *Pichia pastoris* (patente europea EP 183.070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28: 265-278 (1988)), *Candida*, *Trichoderma reesia* (patente europea EP 244.234), *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 76: 5259-5263 (1979)) y hongos filamentosos como p.ej., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (el documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero, 1991) y huéspedes de *Aspergillus* como *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biofis. Res. Commun., 112: 284-289 (1983); Tilburn et al., Gene, 26: 205-221 (1983); Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 81: 1470-1474 (1984)) y *A. Niger* (Kelly and Hynes, EMBO J. 4: 475-479 (1985)).

Las células huésped adecuadas para la expresión del polipéptido diana se derivan de organismos multicelulares. Dichas células huésped son capaces de actividades de glicosilación y de procesamientos complejos. En principio, se puede trabajar con cualquier cultivo de células eucariotas superiores, ya sea de cultivos de vertebrados o invertebrados. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas baculovirales y las variantes y las células huésped de insecto permisivas correspondientes de huéspedes como células huésped de *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *bombyx mori*. Véase, p.ej., Luckow et al., Bio/Technology 6: 47-55 (1988); Miller et al., in genetic Engineering, Setlow, J. K. et al., eds., Vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), pp. 277-279; y Maeda et al., Nature, 315: 592-594 (1985). Varias de estas cepas virales son de dominio público, p.ej., la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV y este tipo de virus se puede utilizar como el virus del presente documento de acuerdo con la presente invención, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. Se pueden utilizar como huéspedes cultivos de células de plantas de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco. Normalmente, las células vegetales se transfectan por incubación con ciertas cepas de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, que ha sido manipulada previamente para contener el ADN del polipéptido diana. Durante la incubación del cultivo de células de planta con *A. tumefaciens*, se transfiere el ADN que codifica el polipéptido diana al huésped de la célula de planta, para su transfección y para que en condiciones apropiadas exprese el ADN del polipéptido diana. Asimismo, están disponibles secuencias reguladoras y de señal compatibles con las células de planta, tales como el promotor de nopalina sintasa y las secuencias de señalización de poliadenilación. Depicker et al., J. Mol. Appl. Gen., 1: 561 (1982). Asimismo, los segmentos ADN aislados de la región en dirección 5' del gen T-DNA 780 son capaces de activar o incrementar los niveles de transcripción de genes expresables en la planta en un tejido vegetal que contiene ADN recombinante. Véase la patente europea EP 321.196 publicada el 21 de junio de 1989.

Sin embargo, se ha centrado el interés principalmente en células de vertebrados y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento de rutina en los últimos años (Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, editors (1973)). Entre los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles se incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformadas por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea células de riñón embrionarias humanas (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en

suspensión, Graham et al., J. Gen Virol., 36: 59 (1977)); células de riñón de hámster recién nacido (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980)); células de ratón Sertoli (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC cRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de ratas búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383: 44-68 (1982)); célula MRC 5; células FS4; línea celular de hepatoma humano (Hep G2). Las células huésped preferentes son células de riñón embrionarias humanas 293 y células de ovario de hámster chino.

Las células huésped se transfectan y, preferentemente, se transforman con los vectores de expresión o clonación que de la presente invención que se han descrito y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionando transformantes o amplificando los genes que codifican las secuencias deseadas.

La transfección se refiere a la recogida de un vector de expresión mediante una célula huésped ya se expresen o no las secuencias codificantes en realidad. Las personas especializadas en la técnica conocen numerosos métodos de transfección, por ejemplo Ca-PO.sub.4 y electroporación. Generalmente, se reconoce que se logra la transfección cuando tiene lugar cualquier indicio de operación de este vector dentro de la célula huésped.

Transformación significa introducir ADN en un organismo, de manera que ADN se puede replicar, o bien como un elemento extracromosómico o bien como un elemento integrante del cromosoma. Dependiendo de la célula huésped que se utilice, la transformación se realiza utilizando las técnicas apropiadas convencionales para dichas células. El tratamiento con calcio empleando cloruro cálcico que se describe en la sección 1.82 de Sambrook et al., supra, se suele emplear para células procariotas y otras células que contienen sustanciales barreras de pared celular. Suele emplearse la infección con *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de ciertas células de planta, tal como describe Shaw et al., gene, 23: 315 (1983) y el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para las células de mamífero sin paredes celulares, es preferente el método de precipitación con fosfato cálcico descrito en las secciones 16.30-16.37 de Sambrook et al., supra. Los aspectos generales de las transformaciones del sistema huéspedes de células de mamífero han sido descritos por Axel en la patente estadounidense No. 4.399.216 publicada el 16 de agosto 1983. Las transformaciones en las levaduras se llevan a cabo normalmente de acuerdo con el método de Van Solingen et al., J. Bact., 130: 946 (1977) e Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden utilizar otros métodos para introducir ADN en células, como por ejemplo inyección nuclear, electroporación o fusión de protoplasto.

Las células procariotas utilizadas para producir el polipéptido diana de la presente invención se cultivan en medios adecuados, como los descritos de forma general en Sambrook et al., supra.

Las células huésped de mamífero utilizadas para producir el polipéptido diana de la presente invención se pueden cultivar en diferentes medios. Los medios disponibles en el mercado como Ham's F10 (Sigma), Medio Mínimo Esencial ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle modificado con Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Asimismo, se puede utilizar cualquiera de los medios descritos en Ham and Wallace, Meth. Enz., 58: 44 (1979), Barnes y Sato, Anal. Biochem., 102: 255 (1980), las patentes estadounidenses Nos. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; o 4.560.655; los documentos WO 90/03430; WO 87/00195; la patente estadounidense No. Re. 30.985 como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede suplementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (como HEPES), nucleósidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como el fármaco GentamicinTM), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente a una concentración final del intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Se puede incluir también cualquier suplemento necesario, en las concentraciones apropiadas, conocido entre las personas especializadas en la técnica. Las condiciones de cultivo, como la temperatura, el pH y similares, son como las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y serán evidentes para las personas especializadas en la técnica.

Las células huésped a las que se hace referencia en la presente divulgación abarca células en cultivo *in vitro* así como células dentro del animal huésped.

Se prevé además que los polipéptidos diana de la presente invención se pueden producir por recombinación homóloga o con métodos de producción recombinante utilizando elementos de control introducida en células que ya contienen ADN que codifica el polipéptido diana en uso actualmente dentro del campo. Por ejemplo, se inserta un elemento promotor/potenciador potente, un supresor o un elemento modulador de la transcripción exógeno en el genoma de la célula huésped pretendida en proximidad y con una orientación suficiente como para influir en la transcripción de ADN que codifica el polipéptido diana deseado. El elemento de control no codifica el polipéptido diana de la presente invención, sino que el ADN está presente en el genoma de la célula huésped. A continuación, se realizan rastreos para determinar las células que fabrican el polipéptido diana de la presente invención, o los mayores o menores niveles de expresión, según se desee.

Se puede medir la amplificación génica y/o expresión en una muestra directamente, por ejemplo, por transferencia de Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980)), transferencia puntual (análisis ADN DNA), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, sobre la base de las secuencias que se proporcionan en el presente documento. Se pueden emplear diversas marcas, siendo los más comunes radioisótopos, en particular ³²P. No obstante, es posible emplear otras técnicas, como por ejemplo nucleótidos modificados con biotina para su introducción en un polinucleótido. La biotina sirve por tanto como sitio para la unión con avidina o anticuerpos, que pueden marcarse con una amplia gama de marcas, como radionúclidos, fluorescentes, enzimas y similares. Alternativamente, se pueden emplear anticuerpos que pueden reconocer híbridos específicos, incluyendo híbridos de ADN, híbridos de ARN e híbridos de ADN-ARN o híbridos de proteína de ADN. Los anticuerpos, a su vez, se pueden marcar y el ensayo se puede llevar a cabo cuando el híbrido se une a superficie, de manera que tras la formación del híbrido en la superficie, se puede detectar la presencia del anticuerpo unido al híbrido.

Alternativamente, se puede medir la expresión génica a través de métodos inmunológicos, como por ejemplo tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido y ensayo de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Con las técnicas de tinción inmunohistoquímica, se prepara una muestra celular, normalmente por deshidratación y fijación seguido de reacción con anticuerpos marcados específicos para el producto génico acoplado, en las que las marcas normalmente se pueden detectar visualmente, como por ejemplo marcas enzimáticas, marcas fluorescentes, marcas luminiscentes y similares. Una técnica de tinción particularmente sensible adecuada para su uso en la presente invención se describe en Hsu et al., Am. J. Clin. Path., 75: 734-738 (1980).

Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de los fluidos de la muestra pueden ser monoclonales o policlonales y se pueden preparar en cualquier mamífero. Convenientemente, se pueden preparar los anticuerpos contra un polipéptido diana nativo o contra un péptido sintético sobre la base de las secuencias de ADN proporcionadas en el presente documento tal como se describe más adelante en la Sección 4 más adelante.

Preferentemente, el polipéptido diana se recupera del medio de cultivo como un polipéptido secretado, si bien también se puede recuperar de lisados de la célula huésped cuando se expresa directamente sin una señal secretora.

Cuando se expresa el polipéptido diana en una célula recombinante distinta a una de origen humano, el polipéptido diana está complementemente desprovisto de proteínas o polipéptidos de origen humano. Sin embargo, es necesario purificar el polipéptido diana desde las proteínas o polipéptidos de la célula recombinante para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas en cuanto al polipéptido diana. En una primera etapa, se centrifuga el medio de cultivo o lisado para eliminar los residuos en partículas de las células. Se separan membrana y las fracciones de proteína soluble. El polipéptido diana se puede purificar después desde la fracción de la proteína soluble y de la fracción de la membrana del lisado de cultivo, dependiendo de si se une o no a la membrana el polipéptido de diana. Los procedimientos que se exponen a continuación son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC en fase inversa; cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio cationes, como DEAE; cromatofocalización; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio, filtración de gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; y columnas de Sepharosa proteína A para eliminar contaminantes como IgG.

Las variantes de polipéptido diana en las que se han suprimido, insertado o sustituido restos se recuperan de la misma manera teniendo en cuenta los cambios sustanciales en las propiedades ocasionados por la variación. Por ejemplo, la preparación de una fusión del polipéptido diana con otra proteína o polipéptido, p.ej., un antígeno viral o bacteriano, facilita la purificación; se puede utilizar una columna de inmunoafinidad que contiene anticuerpo para el antígeno (o que contiene antígeno, en el que el polipéptido diana es un anticuerpo) para absorber la fusión. Se pueden emplear columnas de inmunoafinidad como una columna de polipéptido anti-diana policlona de conejo para absorber la variante del polipéptido diana por unión con al menos un epítipo inmune restante. Un inhibidor de proteasa como fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF) puede ser útil para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes accidentales. Las personas especializadas en la técnica podrán apreciar que los métodos de purificación adecuados para el polipéptido diana nativo pueden requerir la modificación para tener en cuenta los cambios de carácter del polipéptido diana o sus variantes tras la expresión en cultivo de células recombinantes.

Las variantes VEGF de la presente invención se pueden administrar para tratamientos terapéuticos a un paciente que padece de un tumor o angiogénesis asociada a un estado patológico en una cantidad suficiente para prevenir, inhibir o reducir la progresión del tumor o el estado patológico. La progresión incluye, p.ej., el crecimiento, capacidad de invasiva, metástasis y/o recurrencia del tumor o el estado patológico. Una cantidad adecuada para llevarlo a cabo se define como la dosis terapéuticamente eficaz. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y el estado general del sistema inmune del propio paciente. Las pautas de dosificación pueden variar según la patología y el estado del paciente y normalmente oscilarán entre dosis de bolo única o infusión continua hasta múltiples administraciones al día (p.ej., cada 4-6 horas), o según la indicación del médico responsable y el estado del paciente. Debe señalarse, sin embargo, que la presente invención no se limita a ninguna

posología en particular.

En una realización de la invención, las variantes de VEGF de la presente invención se pueden administrar en combinación con otro u otros agentes antineoplásicos. Se puede utilizar cualquier agente antineoplásico adecuado, como por ejemplo un agente quimioterapéutico o radiación. Cuando el agente antineoplásico es radiación, la fuente de la radiación puede ser externa (terapia de radiación de haz externo - EBRT) o interna (braquiterapia - BT) al paciente tratado. La variante de polipéptido de VEGF de la presente invención se puede administrar junto con un agente antineoplásico que incluye un agente quimioterapéutico. Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil para el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes como tiotepa y ciclosfosfamida, sulfonatos de alquilo como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenefosramida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulltacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictiina; espongiastatina; mostazas de nitrógeno, como clorambucil, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nirnustina, ranimustina; anticuerpos como enedina antibióticos (p.ej. calicheamicina, especialmente calicheamicina, dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromoforo de neocarzinostatina y cromoforos antibióticos de cromoproteína Eenedina relacionados), aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogo de ácido fólico como denopterina, pteropterina, trimetexato; análogos de purina como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales como aminoglucetimidina, mitotane, trilostano; ácido fólico, reforzador como ácido frofínico; aceglatona; aldofosfamida glicosida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquone; elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucida; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazide; procarbazona; rizoquina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquone; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p.ej., paclitaxel y doxetaxel; clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etoposida (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposida; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables o derivados de cualquiera de los mencionados. También se incluyen en esta definición los agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores como anti-estrógenos, incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles de inhibición de aromataza, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y anti-andrógenos como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados de sales farmacéuticamente aceptables de los mencionados.

En una realización, la terapia de combinación pueden incluir combinaciones con variantes de VEGF de la presente invención y por ejemplo IFL (5-fluorouracilo, leucovorina y irinotecan), FOLFOX (5-fluorouracilo, leucovorina y oxaliplatino); XELOX (capecitabina y oxaliplatino), paclitaxel, docetaxel, (capecitabina, taxano y antraciclina), (carboplatino y paclitaxel), (cisplatino y gemcitabina), erlotinib, interferon-2 α , (carboplatino y paclitaxel), sunitinib, sorafenib, pazopanib, (vandefanib y paclitaxel), cetuximab, (quimioterapia a base de oxaliplatino- o irinotecano y panitumumab), capecitabina, (capecitabina o 5-fluorouracilo y cisplatino), gemcitabina, (gemcitabina y erlotinib), (docetaxel y prednisona), prednisona, pemetrexed, (5-fluorouracilo, leucovorina e irinotecano), (leucovorina y 5-fluorouracilo), lomustina, bevacizumab, aflibercept, sunitinib, sorafenib, PTK787, semaxanib, axitinib, vandetanib, cediranib.

La dosis del agente antineoplásico administrada depende de una serie de factores, entre los que se incluyen por ejemplo, el tipo de agente, el tipo y gravedad del tumor tratado y la ruta de administración del agente. Debe subyarse sin embargo que la presente invención no se limita a ninguna dosis en particular.

Asimismo, las variantes de VEGF de la presente invención se pueden administrar con anticuerpos que neutralizan otros receptores relacionados con el crecimiento de tumor o angiogénesis. Uno de dichos receptores es EGFR. En una realización de la presente invención, se utiliza una variante VEGF de la presente invención en combinación con

- un antagonista de EGFR. Un antagonista de EGFR puede ser un anticuerpo que se une a EGFR o un ligando de EGFR e inhibe la unión de EGFR a su ligando. Entre los ejemplos de antagonistas de EGFR que se unen a EGFR se incluyen sin limitación, moléculas biológicas como por ejemplo anticuerpos (y equivalentes funcionales de los mismos) específicos para EGFR y moléculas pequeñas, tales como inhibidores de quinasa sintéticos que actúan directamente en el dominio citoplásmico de EGFR. Otros ejemplos de los receptores del factor de crecimiento relacionados con la génesis de tumor son los receptores para el factor de crecimiento derivados de plaquetas (PDGFR), factor de crecimiento de tipo insulina (IGFR), factor de crecimiento nervioso (NGFR) y factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR).
- En una realización alternativa adicional, las variantes de VEGF de la presente invención se pueden administrar en combinación con uno o más adyuvantes adecuados, como por ejemplo citoquinas (IL-10 y IL-13, por ejemplo) u otros estimuladores inmunes. Véase, p.ej., Larrivee et al., supra. Debe apreciarse, sin embargo, que la administración de tan solo el anticuerpo anti-KDR es suficiente para prevenir, inhibir o reducir la progresión del tumor de una forma terapéuticamente eficaz.
- En una terapia de combinación, se administra una variante de VEGF de la presente invención antes, durante o después de comenzar la terapia con otro agente, así como cualquier combinación de los mismos, es decir, antes y durante, antes y después, durante y después o antes, durante y después de comenzar la terapia con el agente antineoplásico. Por ejemplo, una variante de VEGF de la presente invención se puede administrar durante entre 1 y 30 días, preferentemente entre 3 y 20 días, más preferentemente entre 5 y 12 días antes de comenzar la terapia de radiación.
- Debe señalarse que las variantes de VEGF de la presente invención se pueden administrar como conjugado que se une específicamente al receptor y suministra una carga letal tóxica tras la internalización de ligando-tóxica.
- La presente invención también incluye kits para inhibir el crecimiento de tumor y/o angiogénesis que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más de las variantes de VEGF de la presente invención. Los kits pueden contener además cualquier antagonista adecuado como, por ejemplo, otro receptor del factor de crecimiento relacionado con la génesis de tumor o angiogénesis (p.ej., EGFR, PDGFR, IGFR, NGFR, FGFR, etc., tal como se ha descrito anteriormente). Alternativamente, o además, los kits de la presente invención pueden comprender además un agente antineoplásico. En el presente documento, se han descrito ejemplos de agentes antineoplásicos adecuados en el contexto de la presente invención. Los kits de la presente invención pueden comprender además un adyuvante, cuyos ejemplos se ha descrito anteriormente.
- Debe entenderse que las variantes de VEGF de la presente invención, cuando se utilizan en un mamífero con fines de profilaxis o tratamiento, se administrarán en forma de una composición que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Entre los vehículos farmacéuticamente aceptables se incluyen por ejemplo uno más entre agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de ellas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares como agentes de humectación o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o la eficacia de las proteínas de unión. Tal como se conoce en la técnica, las composiciones de la inyección se pueden formular para proporcionar una liberación sostenida o retardada del ingrediente activo tras la administración al mamífero.
- Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender un polinucleótido que codifica una variante de VEGF del presente documento o, alternativamente, composiciones farmacéuticas que comprenden las propias variantes de VEGF.
- Las formas adecuadas dependen en parte del uso o la ruta de entrada, por ejemplo, oral, transdérmica, inhalación, o por inyección. Por ejemplo, los agentes o composiciones farmacológicas inyectados en la corriente sanguínea deberán ser solubles. Otros factores conocidos en la técnica incluyen consideraciones como la toxicidad y las formas que impiden que el agente o la composición ejerzan su efecto.
- Las composiciones que comprenden un variante de VEGF o un polinucleótido que codifica una variante de VEGF también pueden formularse como sales farmacéuticamente aceptables (p.ej., sales de adición de ácido) y/o complejos de los mismos. Las sales farmacéuticamente aceptables no son tóxicas a la concentración a la que se administran. Entre las sales farmacéuticamente aceptables se incluyen sales de adición de ácido, tales como las que contienen sulfato, clorhidrato, fosfato, sulfonato, sulfamato, sulfato, acetato, citrato, lactato, tartrato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, ptoluensulfonato, ciclohexilsulfonilo, ciclohexilsulfamato y quinato. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse a partir de ácidos como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido sulfónico, ácido sulfámico, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido ciclohexilsulfónico, ácido ciclohexilsulfámico y ácido quínico. Dichas sales se pueden preparar por ejemplo haciendo reaccionar las formas base y ácido libre del producto con uno o más equivalentes de la base o el ácido apropiados en un disolvente o medio en el que la sal es insoluble, o en un disolvente como agua, que se elimina después al vacío o por liofilización por intercambio de iones de una sal existente por otro ion en una resina de intercambio iónico

adecuada.

Se pueden emplear vehículos y excipientes para facilitar la administración del compuesto. Entre los ejemplos de vehículos y excipientes se incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares, como lactosa, glucosa o sacarosa u otros tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales, polietilen glicoles o disolventes fisiológicamente compatibles. Las composiciones o la composición farmacéutica se pueden administrar a través de diferentes rutas que incluyen, pero sin limitarse a ellas, intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intrapericardial, intracoronaria, subcutánea e intramuscular, oral, tópica o transmucosa.

La isotonicidad de las composiciones deseada se puede conseguir mediante el uso de cloruro sódico u otros agentes farmacéuticamente aceptables como dextrosa, ácido bórico, tartrato sódico, propilen glicol, polioles (como manitol y sorbitol) u otros solutos orgánicos o inorgánicos.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden una variante VEGF o un polinucleótido que codifica una variante de VEGF se pueden formular para diversos modos de administración, incluyendo administración sistémica y tópica o localizada. Las técnicas y las formulaciones de forma general, se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 1990. Véase también, Wang and Hanson "Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers", Journal of Parenteral Science and Technology, Technical Report No. 10, Supp. 42-2S (1988). El médico facultativo podrá determinar de la mejor forma un formato de administración adecuado es a través para cada paciente como individuo.

Para la administración sistémica, es preferente la inyección, p.ej., intramuscular, intravenosa, intra-arterial, intracoronaria, intrapericardial, intraperitoneal, subcutánea, intratecal o intracerebrovasclar. Para inyección, los compuestos de la invención se formulan en soluciones líquidas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles como solución de Hank o solución de Ringer. Alternativamente, los compuestos de la invención se formulan en uno o más excipientes (p.ej., propilen glicol) generalmente aceptados como seguros, según las normas USP. Por ejemplo, se pueden suspender en un aceite inerte, un aceite vegetal, adecuadamente, como aceite de sésamo, cacahuete, oliva u otro vehículo aceptable. Preferentemente, se suspenden en un vehículo acuoso, por ejemplo, en una solución de tampón isotónico a un pH de aproximadamente 5,6 a 7,4. Estas composiciones pueden esterilizarse a través de técnicas de esterilización convencionales o se pueden filtrar por esterilización. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximar las condiciones fisiológicas, como agentes de tamponado del pH. Entre los tampones útiles se incluyen por ejemplo, tampones de acetato sódico/ácido acético. Se puede utilizar una forma de liberación prolongada o "depot" de lenta liberación para suministrar cantidades terapéuticamente eficaces de la preparación en la corriente sanguínea durante muchas horas o días tras la inyección o administración transdérmica. Asimismo, los compuestos se pueden formular en forma sólida y volver a disolver o suspender inmediatamente antes de su uso. Se incluyen también las formas liofilizadas.

Alternativamente, los compuestos se pueden administrar por vía oral. Para la administración oral, se formulan los compuestos en formas farmacéuticas orales convencionales, tales como cápsulas, comprimidos y tónicos.

La administración sistémica también puede ser transmucosa o transdérmica. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación agentes de penetración apropiados para impregnar la barrera. Dichos agentes de penetración se conocen de forma general en la técnica e incluyen por ejemplo, para administración transmucosa, sales biliares y derivados de ácido fusídico. Asimismo, se pueden utilizar detergentes para facilitar la impregnación. La administración transmucosa puede ser por ejemplo a través de pulverizadores nasales o mediante el uso de supositorios.

Para la administración por inhalación, normalmente se utilizan composiciones en polvo seco para inhalación o composiciones de aerosol, en las que el tamaño de las partículas o las gotas se selecciona para asegurar el depósito del ingrediente activo en la parte deseada del tracto respiratorio, p.ej., garganta, tracto respiratorio superior o pulmones. Las composiciones para inhalación y los dispositivos para su administración son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo se conocen los dispositivos para la administración de medicaciones de aerosol por inspiración. Dicho dispositivo es un inhalador con dosificador que suministra la misma dosis de medicación al paciente cada vez que se acciona el dispositivo. Los inhaladores con dosificador incluyen normalmente un envase que contiene un depósito de medicación y un propelente a presión y una cámara dosificadora del volumen fijado. Se inserta el receptáculo en una carcasa o base que tiene una boquilla o una pieza nasal para administrar la medicación al paciente. El paciente utiliza el dispositivo presionando manualmente el envase hacia la carcasa para cerrar una válvula de relleno y capturar la dosificación de medicamento dentro de la cámara y abrir una válvula de liberación que suministra el volumen de medicación fijo captado en la cámara de dosificación a la atmósfera como un vapor de aerosol. Simultáneamente, el paciente inhala a través de la boquilla para aspirar el vapor hacia las vías respiratorias. A continuación, el paciente libera el envase para que se cierre la válvula de liberación y se abra la válvula de cargado para rellenar la cámara de dosificación para la siguiente administración de medicación. Véase por ejemplo, la patente estadounidense No. 4.896.832 y un producto distribuido por 3M Healthcare conocido como Aerosol Sheathed Actuator and Cap.

Para la administración tópica, se formulan los compuestos de la invención en pomadas, geles o cremas, tal como se conoce generalmente en la técnica. Si se desea, se pueden espesar las soluciones deseadas de las composiciones mencionadas con un agente espesante como metilcelulosa. Se pueden preparar en forma emulsionada, ya sea agua en aceite o aceite en agua. Se pueden emplear diversos agentes farmacéuticamente aceptables incluyendo por ejemplo polvo de acacia, un tensioactivo no iónico (como Tween) o un tensioactivo iónico (como, por ejemplo, sulfatos o sulfonatos de poliéter alcohol alcalinos, p.ej., Triton).

Las composiciones útiles en la invención se preparan mezclando los ingredientes siguiendo los procedimientos generalmente aceptados. Por ejemplo, se pueden mezclar los componentes seleccionados simplemente con una mezcladora u otro dispositivo normal para producir una mezcla concentrada que se puede ajustar después hasta una concentración y viscosidad final mediante la adición de agua o un agente espesante y, posiblemente, un tampón para controlar el pH y un soluto adicional para controlar tonicidad.

Las cantidades de los distintos componentes para su uso en los métodos de la invención para su administración se pueden determinar a través de procedimientos convencionales. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz oscila entre aproximadamente 100 mg/kg y 10-12 mg/kg dependiendo de la edad y la complejidad del paciente, así como la enfermedad o trastornos asociado con el paciente.

La presente invención proporciona también vehículos de administración adecuados para administrar un polinucleótido que codifica una variante de VEGF en las células (ya sea *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*). Generalmente, un polinucleótido que codifica una variante de VEGF estará ligado operativamente a un promotor y un polinucleótido heterólogo. Un polinucleótido que codifica una variante de VEGF puede estar contenido dentro de un vector de expresión o de clonación, empleando métodos conocidos dentro de la técnica, o dentro de un vector viral. Estos vectores (especialmente los vectores de expresión) pueden manipularse a su vez para adoptar cualquiera entre una serie de formas que, por ejemplo, pueden facilitar la administración y/o entrada en una célula diana. La administración de las construcciones de polinucleótido de la invención en células eucariotas, en particular células de mamífero, más en particular células tubulares distales del riñón, puede realizarse a través de cualquier método conocido en la técnica adecuado. La administración se puede llevar a cabo *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

La invención proporciona métodos y composiciones para transferir dichas construcciones de expresión a las células, especialmente *in vivo* para llevar a cabo los métodos de la presente invención. La invención tiene por objeto también proporcionar composiciones para el tratamiento (incluyendo prevención) de las afecciones antes mencionadas proporcionando la prevención o reparación de las lesiones vasculares subyacentes y/o las lesiones asociadas con tejidos no vasculares. Los vehículos de administración adecuados para su incorporación en el polinucleótido que codifica una variante de VEGF de la presente invención para su introducción en una célula huésped incluyen vehículos no virales y vectores virales. Verma and Somia (1997) Nature 389:239-242.

Dentro de la técnica se conoce una amplia variedad de vehículos no virales para la administración de un polinucleótido que codifica una variante de VEGF y quedan abarcados en la presente invención. Se puede administrar un polinucleótido que codifica una variante de VEGF a una célula como ADN desnudo (patente estadounidense No. 5.692.622; WO 97/40163). Alternativamente, se puede administrar un polinucleótido que codifica una variante de VEGF a una célula asociada de diversas formas con diversas sustancias (formas de administración), incluyendo, sin limitarse a ellas, lípidos catiónicos; polímeros biocompatibles, incluyendo polímeros naturales y polímeros sintéticos; lipoproteínas; polipéptidos; polisacáridos, lipopolisacáridos, envueltas virales artificiales; partículas metálicas y bacterias. Un vehículo de administración puede ser una micro-partícula. También se pueden utilizar mezclas o conjugados de estas distintas sustancias como vehículos de administración. Un polinucleótido que codifica una variante de VEGF se puede asociar de forma covalente o no covalente con estas distintas formas de administración. Los liposomas se pueden dirigir a un tipo de célula en particular, p.ej., una célula glomerular o epitelial.

Los vectores virales incluyen, sin limitarse a ellos, vectores virales de ADN como los basados en adenovirus, virus herpes simple, poxovirus como virus vacuna y parvovirus, incluyendo virus adeno-asociados; y vectores virales de ARN, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, los vectores retrovirales. Los vectores retrovirales incluyen virus de la leucemia murina y lentivirus como virus de inmunodeficiencia humana. Naldini et al. (1996) Science 272:263-267.

Los vehículos de administración no virales que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de VEGF se pueden introducir en células huésped y/o células diana a través de cualquier método conocido dentro de la técnica, como por ejemplo la técnica de transfección por co-precipitación con fosfato cálcico, electroporación; electropermeabilización; transfección mediada por liposoma; transfección balística; procesos biolísticos incluyendo bombardeo de micro-partículas, inyección por chorro o inyección con aguja y jeringuilla; o micro-inyección. Los especialistas que trabajan en este campo conocen numerosos métodos de transfección.

Es posible introducir los vehículos de administración viral por infección. Alternativamente, es posible incorporar vehículos virales en cualquiera de los vehículos de administración no viral que se han descrito para la administración en células. Por ejemplo, se pueden mezclar vectores virales con lípidos catiónicos (Hodgson and Solaiman (1996) Nature Biotechnol. 14:339-342); o liposomas laminares (Wilson et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:3471; y

Faller et al. (1984) J. Virol. 49:269). Para la administración *in vivo*, es posible introducir el (los) vehículo(s) de administración en un individuo a través de una serie de métodos conocidos dentro de la técnica.

5 La presente invención incluye un método para crear un polipéptido capaz de inhibir angiogénesis: (1) proporcionando un VEGF nativo que comprende un dominio de unión a heparina C-terminal y (2) modificando dicho VEGF nativo para formar una variante de VEGF de la invención.

Otros detalles de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de los siguientes ejemplos no exhaustivos

10 Ejemplos

Ejemplo 1

15 Las células 293/KDR fueron de SibTech y se mantuvieron según la descripción (Backer et al., 2005). Heparina y biotina heparina fueron de Sigma. Tetrámero HS purificado y oligómero de HS fueron de Neoparin.

20 Se generaron los siguientes clones siguiendo el sistema de clonación Gateway Entry (Invitrogen) (todos 3,8 kB): Secuencia de tipo silvestre Hs.VEGF165 (SEQ ID NO: 28); Hs.VEGF165 R149E (SEQ ID NO: 33); Hs.VEGF165 R150E (SEQ ID NO: 32); Hs.VEGF165 R185E (SEQ ID NO: 31); Hs.VEGF165 R149E/R150E (SEQ ID NO: 30); Hs.VEGF165 R149E/R150E/R185E (SEQ ID NO: 29); todos los plásmidos fueron cultivados en *E. coli* con espectinomomicina (100 ug/ml) para selección de plásmido.

25 Se generaron plásmidos para expresión de mamífero de VEGF 165 de tipo silvestre y formas mutantes (todas 6,1 kB) bajo el control de un promotor CMV/T7 a partir de clones Gateway Entry (Invitrogen). Todos ellos poseen resistencia ampicilina utilizados para propagación de plásmido (100 ug/ml), neomicina (G418) resistencia para selección de mamífero (500 - 800 ug/ml, dependiendo del tipo de célula diana), la secuencia de péptido de señal de VEGF165 nativo y resistencia G418. Se generaron los siguientes clones de VEGF para expresión en mamífero: secuencia de tipo silvestre Hs.VEGF165; secuencia de tipo silvestre Hs.VEGF165 (SEQ ID NO: 28); Hs.VEGF165 R149E (SEQ ID NO: 33); Hs.VEGF165 R150E (SEQ ID NO: 32); Hs.VEGF165 R185E (SEQ ID NO: 31); Hs.VEGF165 R149E/R150E (SEQ ID NO: 30); Hs.VEGF165 R149E/R150E/R185E (SEQ ID NO: 29).

35 Para los ensayos de proliferación, se sembraron líneas celulares derivadas de 293/KDR (5×10^4 células por pocillos) en placas de cultivo de 6 pocillos por cuadruplicado. Se midió el número de células por pocillo al cabo de 2, 3, 4 y 5 días de crecimiento separando las células con tripsina, recogiendo por centrifugación y haciendo el recuento de células suspendidas por triplicado en un contador de células automático Cellometer (Nexcelom bioscience, Lawrence, MA). Se utilizó la proteína de VEGF-A recombinante purificada como cuantificación patrón externo como masa de VEGF por masa total extraída de la proteína celular. De manera similar, se midió la autofosforilación de KDR en lisados celulares; se privaron de suero células de cultivo durante 48 h, en los que las células señaladas se estimularon durante 20 minutos con VEGF-A WT o 3S en solitario o en combinación a las concentraciones indicadas, a continuación, se extrajeron con tampón enfriado con hielo que contenía inhibidores de fosfato y proteasa detergentes no iónicos. Se aplicaron los extractos aclarados a las placas de ensayo y se procesaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45 El contenido de KDR y VEGF en los lisados celulares, los extractos de tejido y los medios acondicionado fue determinado utilizando los inmunoensayos de electroquimioluminiscencia en dos sitios desarrollados por Meso Escala Descubrimiento (Gaithersburg, MD) para su uso con el lector de placa Sector Imager 2400 de Meso Escala Descubrimiento (MSD)

50 Se midió de forma similar autofosforilación de KDR en lisados celulares o extractos de tejido de tumor, pero incluyó la detección paralela con anticuerpos anti-receptor y anticuerpos anti-fosfo-receptor específicos o 4G10 (Millipore). Se prepararon los lisados celulares tal como se ha descrito (Athauda et al., 2006). Se prepararon extractos de detergente no iónico de tejido de tumor utilizando el mismo tampón, pero acompañado de la interrupción física en un Mini-BeadBeater-8 (Glen Mills Inc.) y aclarando por centrifugación antes del inmunoensayo.

55 Se desarrollaron ensayos de unión a ligando sobre la plataforma electroquimioluminiscente. Saturación del ectodominio KDR-Ig de unión a proteínas VEGF 165 WT o 3S que habían sido capturadas utilizando un anticuerpo VEGF monoclonal no neutralizante; se detectó KDR unido utilizando anti-KDR marcado. Se realizaron todas las medidas en muestras por triplicado. Se utilizó el software Graph-Pad Prism versión 5.0 para el análisis estadístico y la determinación de K_D y los valores IC_{50} .

60

Ejemplo 2

Para determinar si 3S VEGF 165 (SEQ ID NO: 7) retenía o no la actividad mitogénica en relación con la secuencia de WT VEGF 165, se transfectaron establemente células HEK293 que habían sido obtenidas por ingeniería genética para expresar $2,5 \times 10^6$ VEGFR2 por célula (293/KDR; 22) con plásmidos de expresión que codifican el vector solo, VEGF 165 WT o 3S. Se midió la producción de proteína ectópica VEGF por transfectantes utilizando un inmunoensayo de dos sitios con un límite de detección de 37,5 attomoles/25 ul (1,5 pM) VEGF (Figura 3).

Entre los cultivos de masa seleccionados por el marcador, los transfectantes WT produjeron ~ 1.0 ng/ml/24 h proteína VEGF165 en medios acondicionados, los transfectantes 3S produjeron $\sim 2,5$ ng/ml/24 h y la proteína VEGF fue indetectable en el medio de control de vector vacío (Figura 4A, barras blancas). El contenido en VEGF en los extractos de detergente de un bajo volumen de las mismas células fue proporcionalmente más alto, según lo esperado (Figura 4A, barras grises). La masa molecular y el reconocimiento de anticuerpo de la proteína VEGF 16 3S en medios acondicionados fueron indistinguibles de WT (Figura 4B). La unión de saturación de VEGF165 3S en KDR *in vitro* (Figura 4C, cuadrados; $KD \sim 19$ pM) fue equivalente a la unión de VEGF165 WT (Figura 4C, círculos; $KD \sim 23$ pM) y correspondió a los valores de afinidad de unión en estado constante publicados (Ferrara, 2004).

Se midió la tirosil fosforilación de KDR en cada línea celular al cabo de 24 de privación de suero (Figura 4D). El nivel de fosforilación KDR basal en los transfectantes de vector vacío (Figura 4D, barra blanca) fue indistinguible del de la línea celular parental (no se muestra) o los transfectantes 3S (Figura 4D, barra gris oscuro). En cambio, el nivel de fosforilación de KDR del transfectante WT basal fue cuatro veces mayor que el control o 3S (Figura 4D, barra gris claro; $p < 0,001$). Se muestra como referencia el nivel de autofosforilación de KDR del transfectante de vector al cabo de 20 minutos de exposición a proteína VEGF 165 añadida exógenamente (2,5 nM) (Figura 4D, barra negra). En correspondencia con los niveles de activación de KDR entre los transfectantes, se observaron significativas diferencias en la velocidad de proliferación celular en cultivo desde el día 3 en adelante: los transfectantes WT (Figura 4E, cuadrados) crecieron significativamente más deprisa que el control de vector (Figura 4E, círculos) o los transfectantes 3S (Figura 4E, triángulos; $p < 0,001$ entre WT y control o WT y 2S durante 3-5 días). Estos resultados indican que los transfectantes WT tenían señalización de VEGF autocrina adquirida, pero los transfectantes 3S no, incluso aunque la producción de proteína 3S fue más del doble que la de WT. En los ensayos de formación de colonia en agar blando, los transfectantes de vector vacío y los transfectantes 3S crecieron modestamente, si es que lo hicieron (Figura 4F, paneles izquierdo y central), mientras que los transfectantes VEGF165 WT crecieron robustamente (Figura 4F, panel derecho). Todos estos resultados indicaron una pérdida de señalización de VEGF165 3S, a pesar de la unión de KDR normal.

Se evaluó el antagonismo competitivo de la señalización de VEGF165 WT a través de la proteína VEGF165 3S en células intactas e *in vivo* (Figura 5). Se añadieron medios acondicionados concentrados recogidos de transfectantes 3S a células 293/KDR en presencia de proteína VEGF165 WT purificada y los niveles fosfo-KDR (Figura 5A y B). Dado que los medios acondicionados podrían contener otros inhibidores de activación de KDR, se separó selectivamente VEGF165 3S de los medios por inmunosupresión con un anticuerpo anti-VEGF. Se realizó una inmunosupresión simulada en paralelo utilizando un anticuerpo no específico y se midió el contenido de VEGF165 3S de los medios anti-VEGF y inmunosuprimido simulado (Figura 5A). Los niveles de VEGF 3S en los medios no inmunosuprimido e inmunosuprimido simulado fueron prácticamente idénticos (1,93 y 1,89 ng/mg del total de proteína, respectivamente; Figura 5A, barras blancas), mientras que la inmunosupresión con anti-VEGF eliminó un 95 % de la proteína 3S (0,096 ng/mg de total de proteína celular; Figura 5A, barra gris). No se detectó proteína VEGF en los medios de los transfectantes de vector vacío antes o después de la inmunosupresión (Figura 5A, derecha). Se inhibió la autofosforilación de KDR estimulada por proteína VEGF165 purificada (10 ng/ml) en células 293/KDR privadas de suero (Figura 5B, 100 %) modestamente con el medio EGF-inmunosuprimido (Figura 5B, círculos), pero los medios inmunosuprimidos simulados presentaron una inhibición dependiente de dosis significativa, con una inhibición de >80 % con los medios que contenían un exceso 2,5 veces mayor de proteína VEGF 3S (Figura 5B, triángulos). En los ensayos de formación de colonia de agar blando, se inhibió el crecimiento independiente de anclaje robusto de células 293/KDR establemente transfectadas con VEGF165 WT (Figura 5C, panel izquierdo superior) de forma dependiente de dosis con pazopanib, un antagonista selectivo de VEGFR (Figura 5C, paneles central y derecho superior), proporcionando una evidencia más de que la formación de colonia es accionada por la señalización de VEGF/KDR autocrina. La adición de proteína VEGF165 3S a 0,06, 0,15 y 0,6 nM también tuvo como resultado una inhibición dependiente de dosis (Figura 5C, paneles inferiores).

Para determinar si la proteína VEGF165 3S podía o no antagonizar la generación de tumor accionada por KDR, se implantó en animales subcutáneamente células 293/KDR transfectadas con VEGF165 WT (3×10^6 por animal), con el mismo número de células transfectadas con VEGF165 3S o con una suspensión que contenía $1,5 \times 10^6$ células de cada línea. Los grupos de control adicionales recibieron las células 293/KDR de vector vacío (3×10^6 por animal) o células de vector vacío combinadas con transfectantes VEGF WT a $1,5 \times 10^6$ células cada uno. Este último grupo indicó una velocidad de crecimiento de tumores generados a partir de $1,5 \times 10^6$ de transfectantes VEGF WT en presencia de células "neutras" que proporcionaron la misma masa inicial; una velocidad de crecimiento por debajo de este umbral en el grupo en el que se implantaron transfectantes VEGF WT + VEGF 3S se podría atribuir a la inhibición del crecimiento de tumor activado por VEGF WT a través de VEGF165 3S. De hecho, las células 293/KDR transfectadas con VEGF WT formaron tumores con la rapidez máxima (Figura 5D, cuadrados), mientras que los

transflectantes VEGF 3S no formaron tumores antes de terminar el estudio (Figura 5D, triángulos invertidos) y los animales en los que se implantó una mezcla de células WT + 3S (Figura 5D, rombos) formaron tumores a una velocidad significativamente más baja que el grupo de vector vacío + WT de control (Figura 5D, triángulos) a lo largo del estudio ($p < 0,05$). La capacidad de la línea celular parental (Figura 5D, círculos) para formar tumores en ratones en ausencia de formación de colonia de agar blando robusta, indica que la generación de tumor accionó VEGF murino endógeno como paracrina y la ausencia de formación de tumores de los transflectantes 3S (Figura 5D, triángulos) indica el antagonismo de esta ruta. Los estudios con animales indican también que la generación de tumor autocrina accionada por VEGF/KDR a través de los transflectantes VEGF165 WT (Figura 5D, cuadrados), potenciados posiblemente por VEGF murino fue antagonizada competitivamente por proteínas VEGF165 3S secretadas en animales que recibieron la mezcla de células transflectadas WT + 3S (Figura 5D, rombos).

Ejemplo 3

Para los ensayos de proliferación, se sembraron líneas celulares derivadas de 293/KDR en placas de cultivo de 6 pocillos por cuadruplicado. Se midió el número de células por pocillo a intervalos regulares de extracción de células adherentes y haciendo el recuento en un contador de células automático Cellometer (Nexcelom Bioscience). Se realizaron los ensayos de formación de colonia en agar blando tal como se describe (Castagnino et al., 2000).

Se realizaron los ensayos de formación de colonia en agar blando para formación de colonia en agar blando (representativos del crecimiento independiente del anclaje) y se cuantificaron tal como se ha descrito anteriormente. Brevemente, se suspendieron células U87 MG y células U87 MG transflectadas con un plásmido que codifica NK1 60/62/73 en 0,5 % de agarosa Seaplaque (1×10^5 células) en medio de crecimiento por discos de 60 mm por duplicado. Se visualizaron las colonias de células después de la tinción con violeta de yodotetrazolio por microscopía de campo brillante utilizando un microscopio invertido Olympus. Se adquirieron imágenes digitales y se registraron utilizando una vídeo cámara CCD y software IP Lab. En consonancia con los resultados anteriores, las células 293/KDR transflectadas establemente con un plásmido de expresión para VEGF 1165 WT desplegaron un crecimiento independiente de anclaje robusto. El tratamiento con pazopanib, un antagonista competitivo selectivo de VEGFR de unión ATP otro día a 0,3 y 3,0 nM durante dos semanas tuvo como resultado una inhibición dependiente de dosis sustancial de la formación de colonia proporcionan una evidencia adicional de que había sido accionada principalmente por la señalización de VEGF/KDR autocrina. El tratamiento con proteína VEGF 3S a 0,06, 0,15 y 0,6 nM también tuvo como resultado una sustancial inhibición dependiente de dosis, en correspondencia con la inhibición observada de la activación de KDR quinasa.

Ejemplo 4

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las la Guía NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio aplicando los protocolos aprobados. Se inyectaron células 293/KDR establemente transflectadas con VEGF WT o plásmidos de expresión 3S o vector vacío, subcutáneamente a ratones SCID/Beige (Taconic, Inc.; 3×10^6 células por total de animales, tal como se indica en el texto, 5 ratones/grupo) y se midieron los volúmenes de tumor a intervalos regulares, tal como se ha descrito anteriormente (Giubellino et al., 2007). En análisis estadístico y el ajuste de la curva para todos los estudios con animales se realizó utilizando el software GraphPad Prism software versión 5.0.

Para determinar si VEGF 3S podía antagonizar la génesis de tumor accionada por KDR en ratones, se implantaron en grupos de animales ($n = 5$) por vía subcutánea células 293/KDR transflectadas con VEGF WT (3×10^6 por animal) con el mismo número de células transflectadas con VEGF 3S o con una suspensión que contenía la mitad del número de células de cada tipo. Los grupos de control adicionales recibieron células 293/KDR de vector vacío (3×10^6 por animal) o las células de vector vacío combinadas con transflectantes VEGF WT a $1,5 \times 10^6$ células cada uno. Éste último grupo indicó la velocidad de crecimiento de tumores generados a partir de $1,5 \times 10^6$ transflectantes VEGF WE en presencia de células "neutras" que proporcionaron la misma masa inicial; una velocidad de crecimiento por debajo de este umbral en el grupo en el que se infectaron transflectantes VEGF WT + VEGF 3S pudo atribuirse a la inhibición con VEGF3S. De hecho, las células 293/KDR transflectadas con VEGF WT formaron tumores con la máxima rapidez, los tumores de transflectantes VEGF 3S fueron los que crecieron más lentamente y los animales en los que se implantó una mezcla transflectante VEGF WT + VEGF 3S formaron tumores a una velocidad significativamente más lenta que el control VEGF WT + grupo de vector vacío a lo largo de todo el estudio (prueba t de doble cola apareada $P=0,0108$, $t = 4,497$, $df = 4$). Estos resultados indican sólidamente que la generación de tumores accionada por VEGF/KDR autocrina por los transflectantes VEGF WT con una proteína VEGF 3S secretada. En conjunto con los resultados antes obtenidos con HGF/NK1 3S, el presente trabajo refuerza la teoría de que la ocupación de receptor combinada con la interrupción de la unión a HS ternario puede constituir una estrategia general eficaz para antagonizar la señal de los factores de crecimiento de unión a HS.

Ejemplo 5

Se investigó la posibilidad de que VEGF 3S hubiera perdido su actividad biológica debido a una pérdida de la estructura terciaria dimerica por SDS-PAGE y análisis de inmunotransferencia. Se descubrió que, al igual que VEGF165 WT, se detectaron los dímeros y monómeros VEGF 3S con la masa esperado en condiciones no

reductoras y reductoras respectivamente (Figura 7) La figura 7 presenta proteínas VEGF165 3S (VEGF 3S; izquierda) y VEGF165 WT (VEGF WT; centro) en medios acondicionados 24h preparados a partir de transfectantes 293/KDR y proteína VEGF165 purificada recombinante (VEGF 4 ng; derecha), tras SDS-PAGE en condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R) e inmunotransferencia con anti-VEGF. La migración de los patrones de masa molecular (kDa) se indica con flechas. Además de la evidencia expuesta ya en la presente solicitud, estos resultados refuerzan la probabilidad de que los cambios obtenidos por ingeniería genética para el dominio de unión a HS de VEGF no afecten su estructura terciaria.

Tal como se ha anticipado, se descubrió que heparina promovió el agrupamiento de VEGF165 WT, pero no VEGF165 3S (Figura 8). La Figura 8 presenta el agrupamiento mediado por heparina-Sepharose de VEGF165 WT y VEGF165 3S analizado por SDS-PAGE y la inmunodetección con anticuerpo anti-VEGF. Los medios acondicionados VEGF165 WT (izquierda) o VEGF165 3S (derecha) contenían dímeros VEGF (44 kDa) tanto en el sobrenadante (super) como en muestras de heparina-Sepharose (perlas HS) solamente en presencia de BS3. Se observó un complejo de 80 kDa en correspondencia con VEGF tetramérico (y especies de masa superior de número de copias indeterminado) solamente en los medios acondicionados VEGF 165 WT en presencia de heparina (4ª calle desde la izquierda) y no en medios acondicionados VEGF165 3S (4ª calle desde la derecha). Estos hallazgos corroboran también el mecanismo de acción de VEGF 3S como antagonismo de la unión a HS del complejo VEGF/VEGFR que lleva a la inestabilidad de los complejos ligando/receptor/HS y la consiguiente interrupción del a señalización en dirección 3'.

El análisis del espectro del antagonismo de VEGF 3S demostró que VEGF 165 3S inhibió la activación de Akt inducida por el factor de crecimiento de placenta (P1GF) (fosfo-Akt/total Akt) en células EA.hy 926, que expresan VEGFR1 y R2, con una potencia similar a pazopanib (Figura 9A). En cambio, VEGF 3S no bloqueó la activación Akt inducida por VEGF-D en células SCC-25 que expresan VEGFR1, R2 y R3 (Figura 9B, C). Por tanto, el patrón de inhibición de VEGF 3S siguió el patrón de inhibición de unión de VEGFA a VEGFR1 y R2, pero no los homodímeros de VEGFR3, tal como se ha anticipado. La Figura 9 (A) presenta una inhibición dependiente de dosis de la activación Akt inducida por VEGF o P1GF (fosfo Akt/total Akt) en células EA.hy 926. VEGF 3S bloqueó la activación de Akt con VEGF-A (círculos oscuros) o P1GF (cuadrados) con potencia similar a pazopanib (triángulos y triángulos invertidos, respectivamente). La Figura 9 (B) presenta activación Akt dependiente de dosis (fosfo-Akt/total Akt) se midió por inmunoensayos en dos sitios electroquimioluminiscente en extractos detergentes preparados de células de carcinoma de célula escamosa SCC-25 privada de suero intactas estimuladas con VEGF165 (10-1000 pM) o VEGFD (100-10.000 pM) durante 15 minutos a 37 grados C. Las células SCC-25 expresaron los VEGFR. La Fig. 9(C) presenta antagonismo de VEGF165 3S de activación Akt con VEGF-A (a 100 pM) pero no VEGF-D (a 1000 pM). Estos resultados indican que el antagonismo de VEGF165 3S sigue el patrón de la unión de VEGF-A según lo anticipado: la unión de VEGFA a VEGFR1 y R2 debería antagonizarse, mientras que la unión de VEGF-D a homodímeros VEGFR3 no debería quedar afectada.

Se observó que el antagonismo de VEGF165 3S era independiente de la interacción proteína-proteína NRP1-VEGF-A. NRP1 se une al dominio de unión HS VEGF-A principalmente en R165 y de forma secundaria en K147, E152 y E155, i.e., o una superficie opuesta a la de HS. Los estudios de reticulación demostraron además que VEGF165 WT y VEGF165 3S se unen de forma similar a NRP1 *in vitro* (Figura 10A). Funcionalmente, VEGF165 3S antagonizó la señalización de VEGF de manera similar en células derivadas de 293/KDR, que carecen de NRP1 (Figura 10B, calles 4-6) y en células EA.hy 926 que son NRP1 positivas (Figura 10B, calle 2).

En la Figura 10(A) Análisis de reticulación de afinidad de unión de NRP1 a VEGF165 WT y VEGF165 3S. Se añadió NRP1-Fc recombinante purificado (Sino Biologies) tal como se indica (-NRP1 o +NRP1) a medios acondicionados 24h desde células 293/KDR transfectadas de vector (calles de la izquierda), transfectantes 293/KDR/VEGF 3S (calles centrales) o transfectantes 293/KDR/VEGF WT (calles de la derecha) en ausencia (-) o presencia (+) del reactivo de reticulación BS3 (Thermo Fisher Pierce). Se resolvieron las muestras por SDS-PAGE en condiciones reductoras, se transfirieron a PVDF y se inmunodetectaron con anticuerpo anti-fc (panel de la izquierda; Thermo Fisher Pierce) o anti-VEGF (paneles inferiores; R&D Systems). Se detectó una banda de 160 kDa que se correspondió con un complejo 1:1 de dímero NRP1-Fc y VEGF con ambos anticuerpos específicamente en presencia de NRP1- fc en medios de transfectantes 293/KDR/VEGF 3S y transfectantes 293/KDR/VEGF WT pero no el control de vector. Se observó otra banda de aproximadamente 250 kDa con el mismo patrón; la estequiometría de este complejo no es determinante. La forma monomérica (22 kDa) está presente en las calles en las que se añadieron los medios VEGF y sirve como control de carga. Se captura VEGF dimérico (44 kDa) tanto de medios 293/KDR/VEGF 3S y medios 293/KDR/VEGF WT solamente en presencia de BS3 en las condiciones reductoras SDS-PAGE utilizadas.

Figura 10(B). La abundancia relativa de proteína NRP1 (panel superior) en células de adenocarcinoma de próstata PC3 (calle 1), células EA.hy 926 (calle 2), células HEK293 (calle 3), células transfectadas con vector 293/KDR (calle 4), células 293/KDR/VEGF165 WT (calle 5) y células 293/KDR/VEGF165 3S (calle 6), determinadas por SDS-PAGE e inmunotransferencia con anti-NRP1 (Señalización de Célula). En el panel inferior se muestra inmunotransferencia de GAPDH de las mismas muestras como control de carga.

Procedimientos experimentales

- 5 Reactivos y cultivo de células: Las proteínas VEGF purificadas y los anticuerpos para VEGF165 y CD44 fueron de R&D Systems, ABR Affinity Bioreagent and Santa Cruz Biotech. Pazopanib fue de Tocris. La heparina y bitonina fueron de Sigma; el tetrámero y oligómero de HS fueron de Neoparin. Las líneas celulares 184B5, U87 MG, SK-LMS-1, B16, PC3M, eA.hy 926 y SCC-25 fueron cultivadas según se ha descrito (Athauda et al., 2006; Giubellino et al., 2007; Lalla et al., 2003). Las células 293/KDR fueron de SibTech y se mantuvieron según se ha descrito (Backer et al., 2005). Los reactivos de transfección fueron de Amaxa Biosystems.
- 10 Se generaron plásmidos para VEGF165: Plásmidos para expresión en mamífero de VEGF165 WT (R123, R124 y R159) y VEGF165 3S (R123E/R124E/R159E) bajo el control de un promotor de CMV desde clones Gateway Entry (Invitrogen) y poseían la secuencia de péptido de señal de VEGF165 nativo y resistencia G418.
- 15 Inmunoensayos: Se determinó el contenido de KDR y VEGF en lisados de células, extractos de tejido y medios acondicionados utilizando inmunoensayos electroquimioluminiscentes en 2 sitios desarrollados para su uso con la tecnología Meso Escala Descubrimiento (MSD). Lector de placa Sector Imager 2400 (Gaithersburg, MD). La activación de KDR en lisados celulares y extractos de tejido de tumor incluyó la detección paralela con anticuerpos anti-receptor y anticuerpos anti-fosfo-receptor específicos o 4G10 (Millipore). Se prepararon lisados celulares de manera similar para análisis de (fosfo-) Akt activado y el total de Akt utilizando inmunoensayos de MSD. Se realizaron todas las mediciones en muestras por triplicado. Se utilizó el software GraphPad Prism versión 5.0 para los análisis estadísticos: se interpolaron los valores del contenido en proteínas determinado por inmunoensayo en 2 sitios desde las curvas patrón por análisis de regresión no lineal (ecuación logística de 4 parámetros); se ajustaron las curvas de unión competitiva y saturación, tras la determinación de la unión específica y asumiendo un modelo de unión en un sitio.
- 20
- 25 Reticulación de afinidad covalente: Ensayos. Se investigó el agrupamiento mediado por heparina de VEGF165 WT y VEGF165 3S utilizando medios acondicionados concentrados de transfectantes 293/KDR/VEGF165 WT o 293/KDR/VEGF165 3S incubados a 40C durante 16 h en presencia de Heparina Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare). Se utilizaron perlas de Heparina Sepharose tano como fuente de heparina como para capturar eficazmente el VEGF agrupado por heparina de medios acondicionados tras la reticulación. Ac continuación, se incubaron las muestras con o sin BS3 a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la aglomeración de las muestras con una breve centrifugación, se obtuvieron muestras desde los sobrenadantes para análisis SDS-PAGE e inmunotransferencia. A continuación, se lavaron las perlas a través de cinco ciclos de centrifugación/resuspensión en PBS y se eluyeron las proteínas unidas con tampón de muestra SDS-PAGE en ebullición. A continuación, se resolvieron el sobrenadante y las muestras capturadas en las perlas por SDS-PAGE en condiciones de reducción, se transfirieron a PVDF y se inmunodetectaron con anticuerpo anti-VEGF.
- 30
- 35

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> BOTTARO, DONALD P. CECCHI, FABIOLA
- <120> ANTAGONISTAS DE FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR Y MÉTODOS PARA SU USO
- 45 <130> 6137NCI-31-PCT
- <150> 61/639.230
- <151> 27-04-2012
- 50 <160> 69
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 55 <211> 576
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- 60 <221> CDS
- <222> (1)..(576)
- <400> 1

ES 2 648 487 T3

atg aac ttt ctg ctg agc tgg gtg cac tgg tcc ctg gcc ctg ctg ctg	48
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu	
1 5 10 15	
tac ctg cac cac gcc aag tgg tcc cag gcc gct cct atg gcc gag ggc	96
Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly	
20 25 30	
gga ggc cag aac cac cac gag gtg gtg aaa ttc atg gac gtg tac cag	144
Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln	
35 40 45	
cgg agc tac tgc cac ccc atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag gaa	192
Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu	
50 55 60	
tac ccc gac gag atc gag tac atc ttc aag ccc agc tgc gtg ccc ctg	240
Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu	
65 70 75 80	
atg aga tgc ggc ggc tgc tgc aac gac gag ggc ctg gaa tgc gtg ccc	288
Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro	
85 90 95	
acc gag gaa tcc aac atc acc atg cag atc atg cgg atc aag ccc cac	336
Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His	
100 105 110	
cag ggc cag cat atc ggc gag atg agc ttc ctg cag cac aac aag tgc	384
Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys	
115 120 125	
gag tgc cgg ccc aag aag gac cgg gcc aga cag gaa aac ccc tgc ggc	432
Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly	
130 135 140	
ccc tgc agc gag cgg aga aag cac ctg ttc gtg cag gac ccc cag acc	480
Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr	
145 150 155 160	
tgc aag tgc tcc tgc aag aac acc gac agc cgg tgc aag gcc cgg cag	528
Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln	
165 170 175	
ctg gaa ctg aac gag cgg acc tgc aga tgc gac aag ccc aga cgg taa	576
Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg	
180 185 190	

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

5

<400> 2

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Pro Arg Arg
 165

5 <210> 4
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

ES 2 648 487 T3

Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His
1 5 10 15

Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr
20 25 30

Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys
35 40 45

Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
50 55

5 <210> 5
<211> 576
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(576)

<400> 5

ES 2 648 487 T3

atg aac ttt ctg ctg agc tgg gtg cac tgg tcc ctg gcc ctg ctg ctg	48
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu	
1 5 10 15	
tac ctg cac cac gcc aag tgg tcc cag gcc gct cct atg gcc gag ggc	96
Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly	
20 25 30	
gga ggc cag aac cac cac gag gtg gtg aaa ttc atg gac gtg tac cag	144
Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln	
35 40 45	
cgg agc tac tgc cac ccc atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag gaa	192
Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu	
50 55 60	
tac ccc gac gag atc gag tac atc ttc aag ccc agc tgc gtg ccc ctg	240
Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu	
65 70 75 80	
atg aga tgc ggc ggc tgc tgc aac gac gag ggc ctg gaa tgc gtg ccc	288
Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro	
85 90 95	
acc gag gaa tcc aac atc acc atg cag atc atg cgg atc aag ccc cac	336
Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His	
100 105 110	
cag ggc cag cat atc ggc gag atg agc ttc ctg cag cac aac aag tgc	384
Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys	
115 120 125	
gag tgc cgg ccc aag aag gac cgg gcc aga cag gaa aac ccc tgc ggc	432
Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly	
130 135 140	
ccc tgc agc gag gag gaa aag cac ctg ttc gtg cag gac ccc cag acc	480
Pro Cys Ser Glu Glu Glu Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr	
145 150 155 160	
tgc aag tgc tcc tgc aag aac acc gac agc cgg tgc aag gcc cgg cag	528
Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln	
165 170 175	
ctg gaa ctg aac gag cgg acc tgc gaa tgc gac aag ccc aga cgg taa	576
Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Glu Cys Asp Lys Pro Arg Arg	
180 185 190	

<210> 6
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6

5

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 7

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Pro Arg Arg
 165

5 <210> 8
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 8

ES 2 648 487 T3

Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Glu Glu Lys His
1 5 10 15

Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr
20 25 30

Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys
35 40 45

Glu Cys Asp Lys Pro Arg Arg
50 55

5 <210> 9
<211> 576
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(576)

<400> 9

ES 2 648 487 T3

atg aac ttt ctg ctg agc tgg gtg cac tgg tcc ctg gcc ctg ctg ctg	48
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu	
1 5 10 15	
tac ctg cac cac gcc aag tgg tcc cag gcc gct cct atg gcc gag ggc	96
Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly	
20 25 30	
gga ggc cag aac cac cac gag gtg gtg aaa ttc atg gac gtg tac cag	144
Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln	
35 40 45	
cgg agc tac tgc cac ccc atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag gaa	192
Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu	
50 55 60	
tac ccc gac gag atc gag tac atc ttc aag ccc agc tgc gtg ccc ctg	240
Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu	
65 70 75 80	
atg aga tgc ggc ggc tgc tgc aac gac gag ggc ctg gaa tgc gtg ccc	288
Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro	
85 90 95	
acc gag gaa tcc aac atc acc atg cag atc atg cgg atc aag ccc cac	336
Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His	
100 105 110	
cag ggc cag cat atc ggc gag atg agc ttc ctg cag cac aac aag tgc	384
Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys	
115 120 125	
gag tgc cgg ccc aag aag gac cgg gcc aga cag gaa aac ccc tgc ggc	432
Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly	
130 135 140	
ccc tgc agc gag gag gaa aag cac ctg ttc gtg cag gac ccc cag acc	480
Pro Cys Ser Glu Glu Glu Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr	
145 150 155 160	
tgc aag tgc tcc tgc aag aac acc gac agc cgg tgc aag gcc cgg cag	528
Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln	
165 170 175	
ctg gaa ctg aac gag cgg acc tgc aga tgc gac aag ccc aga cgg taa	576
Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg	
180 185 190	

<210> 10
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 10

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11

5

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Pro Arg Arg
 165

5
 <210> 12
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

ES 2 648 487 T3

atg aac ttt ctg ctg agc tgg gtg cac tgg tcc ctg gcc ctg ctg ctg	48
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu	
1 5 10 15	
tac ctg cac cac gcc aag tgg tcc cag gcc gct cct atg gcc gag ggc	96
Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly	
20 25 30	
gga ggc cag aac cac cac gag gtg gtg aaa ttc atg gac gtg tac cag	144
Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln	
35 40 45	
cgg agc tac tgc cac ccc atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag gaa	192
Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu	
50 55 60	
tac ccc gac gag atc gag tac atc ttc aag ccc agc tgc gtg ccc ctg	240
Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu	
65 70 75 80	
atg aga tgc ggc ggc tgc tgc aac gac gag ggc ctg gaa tgc gtg ccc	288
Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro	
85 90 95	
acc gag gaa tcc aac atc acc atg cag atc atg cgg atc aag ccc cac	336
Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His	
100 105 110	
cag ggc cag cat atc ggc gag atg agc ttc ctg cag cac aac aag tgc	384
Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys	
115 120 125	
gag tgc cgg ccc aag aag gac cgg gcc aga cag gaa aac ccc tgc ggc	432
Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly	
130 135 140	
ccc tgc agc gag cgg aga aag cac ctg ttc gtg cag gac ccc cag acc	480
Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr	
145 150 155 160	
tgc aag tgc tcc tgc aag aac acc gac agc cgg tgc aag gcc cgg cag	528
Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln	
165 170 175	
ctg gaa ctg aac gag cgg acc tgc gaa tgc gac aag ccc aga cgg taa	576
Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Glu Cys Asp Lys Pro Arg Arg	
180 185 190	

<210> 14
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 14

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 15

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Pro Arg Arg
 165

5

<210> 16
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 16

ES 2 648 487 T3

Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His
 1 5 10 15

Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr
 20 25 30

Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys
 35 40 45

Glu Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 50 55

5 <210> 17
 <211> 576
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(576)

<400> 17

ES 2 648 487 T3

atg aac ttt ctg ctg agc tgg gtg cac tgg tcc ctg gcc ctg ctg ctg	48
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu	
1 5 10 15	
tac ctg cac cac gcc aag tgg tcc cag gcc gct cct atg gcc gag ggc	96
Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly	
20 25 30	
gga ggc cag aac cac cac gag gtg gtg aaa ttc atg gac gtg tac cag	144
Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln	
35 40 45	
cgg agc tac tgc cac ccc atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag gaa	192
Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu	
50 55 60	
tac ccc gac gag atc gag tac atc ttc aag ccc agc tgc gtg ccc ctg	240
Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu	
65 70 75 80	
atg aga tgc ggc ggc tgc tgc aac gac gag ggc ctg gaa tgc gtg ccc	288
Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro	
85 90 95	
acc gag gaa tcc aac atc acc atg cag atc atg cgg atc aag ccc cac	336
Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His	
100 105 110	
cag ggc cag cat atc ggc gag atg agc ttc ctg cag cac aac aag tgc	384
Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys	
115 120 125	
gag tgc cgg ccc aag aag gac cgg gcc aga cag gaa aac ccc tgc ggc	432
Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly	
130 135 140	
ccc tgc agc gag cgg gaa aag cac ctg ttc gtg cag gac ccc cag acc	480
Pro Cys Ser Glu Arg Glu Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr	
145 150 155 160	
tgc aag tgc tcc tgc aag aac acc gac agc cgg tgc aag gcc cgg cag	528
Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln	
165 170 175	
ctg gaa ctg aac gag cgg acc tgc aga tgc gac aag ccc aga cgg taa	576
Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg	
180 185 190	

<210> 18
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 18

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 19
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 19

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Pro Arg Arg
 165

<210> 20
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 20

5

ES 2 648 487 T3

Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Glu Lys His
1 5 10 15

Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr
20 25 30

Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys
35 40 45

Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
50 55

<210> 21
<211> 576
5 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(576)

<400> 21

ES 2 648 487 T3

atg aac ttt ctg ctg agc tgg gtg cac tgg tcc ctg gcc ctg ctg ctg	48
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu	
1 5 10 15	
tac ctg cac cac gcc aag tgg tcc cag gcc gct cct atg gcc gag ggc	96
Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly	
20 25 30	
gga ggc cag aac cac cac gag gtg gtg aaa ttc atg gac gtg tac cag	144
Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln	
35 40 45	
cgg agc tac tgc cac ccc atc gag aca ctg gtg gac atc ttc cag gaa	192
Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu	
50 55 60	
tac ccc gac gag atc gag tac atc ttc aag ccc agc tgc gtg ccc ctg	240
Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu	
65 70 75 80	
atg aga tgc ggc ggc tgc tgc aac gac gag ggc ctg gaa tgc gtg ccc	288
Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro	
85 90 95	
acc gag gaa tcc aac atc acc atg cag atc atg cgg atc aag ccc cac	336
Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His	
100 105 110	
cag ggc cag cat atc ggc gag atg agc ttc ctg cag cac aac aag tgc	384
Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys	
115 120 125	
gag tgc cgg ccc aag aag gac cgg gcc aga cag gaa aac ccc tgc ggc	432
Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly	
130 135 140	
ccc tgc agc gag gag aga aag cac ctg ttc gtg cag gac ccc cag acc	480
Pro Cys Ser Glu Glu Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr	
145 150 155 160	
tgc aag tgc tcc tgc aag aac acc gac agc cgg tgc aag gcc cgg cag	528
Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln	
165 170 175	
ctg gaa ctg aac gag cgg acc tgc aga tgc gac aag ccc aga cgg taa	576
Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg	
180 185 190	

<210> 22
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 22

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 23
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 23

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Pro Arg Arg
 165

- <210> 24
- <211> 55
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 24

ES 2 648 487 T3

Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Glu Arg Lys His
 1 5 10 15

Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr
 20 25 30

Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys
 35 40 45

Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 50 55

5 <210> 25
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (149)..(150)
 <223> Xaa es Asp o Glu

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (185)..(185)
 <223> Xaa es Asp o Glu

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

5 <210> 26
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (123)..(124)
 <223> Xaa es Asp o Glu

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (159)..(159)
 <223> Xaa es Asp o Glu

<400> 26

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys Pro Arg Arg
 165

5 <210> 27
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13)..(14)
 <223> Xaa es Asp o Glu

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (49) .. (49)
 <223> Xaa es Asp o Glu

<400> 27

ES 2 648 487 T3

Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Xaa Xaa Lys His
 1 5 10 15

Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr
 20 25 30

Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys
 35 40 45

Xaa Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 50 55

5 <210> 28
 <211> 6072
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Plásmido que contiene secuencia de tipo silvestre de VEGF 165 HS (6072 pb ADN circular)

15 <220>
 <221> Promotor
 <222> (232)..(819)
 <223> /gen="pCMV"
 /producto="CMV promotor (-601 a +15)"

20 <220>
 <221> Promotor
 <222> (863)..(882)
 <223> /gen="pT7"
 /producto="T7 promotor"

25 <220>
 <221> misc_recomb
 <222> (911)..(932)
 <223> /gen="attB1"
 /producto="sitio recombinante attB1"

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (938)..(1513)
 <223> /gen="Hs.VEGF165"

35 <220>
 <221> misc_recomb
 <222> (1515)..(1536)
 <223> /gen="attB2"
 /producto="sitio recombinante attB2 "

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1562)..(1603)
 <223> /gen="V5"

45 <220>
 <221> polypA_site
 <222> (1630)..(1901)
 <223> /gen="pA" /producto="TK poliA"

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1937)..(2365)

<223> /gen="f1" /producto="origen f1"

<220>
<221> Promotor
5 <222> (2392)..(2700)
<223> /gen="pS" /producto="promotor SV40"

<220>
<221> misc_feature
10 <222> (2775)..(3569)
<223> /gen="neo"

<220>
<221> polyA_signal
15 <222> (3745)..(3875)

<220>
<221> misc_feature
20 <222> (4258)..(4931)
<223> /gen="oriP" /producto="origen pUC"

<220>
<221> misc_feature
25 <222> (5076)..(5936)
<223> /gen="bla"

<400> 28

ES 2 648 487 T3

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata	300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc	360
cccgccatt gacgtcaata atgacgatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgcca cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgcccgata catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca	600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcaactatag ggagacccaa gctggctagt	900
taagctatca acaagtttgt acaaaaaagt tggcaccatg aactttctgc tgagctgggt	960
gcaactggtcc ctggccctgc tgctgtacct gcaccacgcc aagtgggtccc aggccgtcc	1020
tatggccgag ggcggaggcc agaaccacca cgaggtggtg aaattcatgg acgtgtacca	1080
gcgagactac tgccacccca tcgagacact ggtggacatc ttccaggaat accccgacga	1140
gatcgagtac atcttcaagc ccagctgctg gccctgatg agatgcggcg gctgctgcaa	1200
cgacgagggc ctggaatgcg tgcccaccga ggaatccaac atcaccatgc agatcatgcg	1260
gatcaagccc caccagggcc agcatatcgg cgagatgagc ttctctgagc acaacaagtg	1320
cgagtgccgg cccaagaagg accgggcccag acaggaaaac ccctgcggcc cctgcagcga	1380
gcgagaaaag cacctgttcg tgcaggacct ccagacctgc aagtgctcct gcaagaacac	1440
cgacagccgg tgcaaggccc ggcagctgga actgaacgag cggacctgca gatgcgacaa	1500
gcccagacgg taatcaactt tcttgtacaa agtggttgat ctagagggcc cgcggttcga	1560
aggtaagcct atccctaacc ctctcctcgg tctcgattct acgcgtaccg gttagtaatg	1620

ES 2 648 487 T3

agtttaaaccg ggggaggcta actgaaacac ggaaggagac aataccggaa ggaacccgcg 1680
 ctatgacggc aataaaaaga cagaataaaa cgcacgggtg ttgggtcgtt tgttcataaa 1740
 cgcgggggttc ggtcccaggg ctggcactct gtcgataccc caccgagacc ccattggggc 1800
 caatacgccc gcgtttcttc cttttcccca ccccaccccc caagttcggg tgaaggccca 1860
 gggctcgcag ccaacgtcgg ggcggcaggc cctgccatag cagatctgcg cagctggggc 1920
 tctagggggt atccccacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt 1980
 acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc 2040
 ccttcctttc tcgccacggt cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg gggcatccct 2100
 ttaggggtcc gatttagtgc tttacggcac ctcgacccca aaaaacttga ttaggggtgat 2160
 ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc 2220
 acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaacc tatctcggtc 2280
 tattcttttg atttataagg gattttgggg atttcggcct attgggttaa aaatgagctg 2340
 attaacaaa aatttaacgc gaattaattc tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtggaa 2400
 agtcccagc ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa 2460
 ccaggtgtgg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 2520
 attagtcagc aaccatagtc ccgccctaa ctccgcccat cccgcccta actccgccca 2580
 gttccgccca ttctccgccc catggctgac taattttttt tatttatgca gagccgagg 2640
 ccgcctctgc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg cttttttgga ggcctaggct 2700
 tttgcaaaaa gctccgggga gcttgatata ccattttcgg atctgatcaa gagacaggat 2760
 gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg 2820
 tggagaggct attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccg 2880
 tgttccggct gtcagcgcag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg 2940
 ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc 3000
 cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggag 3060
 aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca 3120
 tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccca ttcgaccacc 3180
 aagcgaaca tcgcatcgag cgagcacgta ctcgatgga agccggctct gtcgatcagg 3240
 atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg 3300
 cgcgatgcc cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata 3360
 tcatggtgga aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg 3420
 accgctatca ggacatagcg ttggctaccg gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat 3480

ES 2 648 487 T3

gggctgaccg cttcctcgtg ctttacggta tcgccgctcc cgattcgcag cgcacgcct 3540
 tctatgcct tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgcga aatgaccgac 3600
 caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt ctatgaaag 3660
 ttgggcttcg gaatcgtttt cggggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc 3720
 atgctggagt tcttcgcca ccccaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa 3780
 agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt 3840
 ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgtatac cgtcgacctc tagctagagc 3900
 ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca 3960
 cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa 4020
 ctcacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag 4080
 ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttcc 4140
 gcttcctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 4200
 cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 4260
 tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 4320
 cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 4380
 aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 4440
 cctgttccga cctgcgctt taccggatac ctgtccgctt ttctcccttc ggggaagcgtg 4500
 gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat ctcaagtcgg tgtaggtcgt tcgctccaag 4560
 ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag cccgaccgct gcgccttacc cggtactat 4620
 cgtcttgagt ccaaccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 4680
 aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 4740
 tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc 4800
 ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt 4860
 tttgtttga agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 4920
 ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gtttaaggat tttggtcatg 4980
 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca 5040
 atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 5100
 cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 5160
 ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 5220
 ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 5280
 agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattggtg ccgggaagct 5340
 agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacggtg ttgccattgc tacaggcatc 5400

ES 2 648 487 T3

```

gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg      5460
cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gtccttcggt tcctccgatc      5520
gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat      5580
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag      5640
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat      5700
aataccgctc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg      5760
cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca      5820
cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga      5880
aggcaaatg ccgcaaaaaa ggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc      5940
ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata      6000
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg      6060
ccacctgacg tc                                                                6072

```

```

5 <210> 29
   <211> 6072
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

10 <220>
   <223> Plásmido que contiene Hs.VEGF165 R149E/R150E/R185E (6072 pb ADN circular)

15 <220>
   <221> Promotor
   <222> (232)..(819)
   <223> /gen="pCMV"
   /producto=" promotor CMV (-601 a +15)"

20 <220>
   <221> Promotor
   <222> (863)..(882)
   <223> /gen="pT7"
   /producto=" promotor T7"

25 <220>
   <221> misc_recomb
   <222> (911)..(932)
   <223> /gen="attB1"
   /producto="sitio recombinante attB1"

30 <220>
   <221> misc_feature
   <222> (938)..(1513)
   <223> /gen="Hs.VEGF165 R149E/R150E/R185E"

35 <220>
   <221> misc_recomb
   <222> (1515)..(1536)
   <223> /gen="attB2"
   /producto="sitio recombinante attB2"

40 <220>
   <221> misc_feature
   <222> (1562)..(1603)

```

ES 2 648 487 T3

<223> /gen="V5"

5 <220>
<221> polypA_site
<222> (1630)..(1901)
<223> /gen="pA"
/producto="TK poliA"

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (1937)..(2365)
<223> /gen="f1"
/producto="origen f1"

15 <220>
<221> Promotor
<222> (2392)..(2700)
<223> /gen="pS"
/producto="promotor SV40"

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (2775)..(3569)
<223> /gen="neo"

25 <220>
<221> polypA_site
<222> (3745)..(3875)
<223> /gen="pA"
/producto="SV40 poliA"

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (4258)..(4931)
<223> /gen="oriP"
/producto="origen pUC"

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (5076)..(5936)
<223> /gen="bla"

40 <400> 29

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60

ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120

cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180

ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240

gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300

tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360

cccgccatt gacgtcaata atgacgatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420

45 attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt 480

ES 2 648 487 T3

atcatatgcc aagtagcccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgt acaactcgcg ccattgacg caaatgggcg 780
 gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcaactatag ggagacccaa gctggctagt 900
 taagctatca acaagtttgt acaaaaaagt tggcaccatg aactttctgc tgagctgggt 960
 gcactgggtcc ctggccctgc tgctgtacct gcaccacgcc aagtgggtccc aggccgctcc 1020
 tatggccgag ggcggaggcc agaaccacca cgaggtgggtg aaattcatgg acgtgtacca 1080
 gcggagctac tgccacccca tcgagacact ggtggacatc ttccaggaat accccgacga 1140
 gatcgagtac atcttcaagc ccagctgcgt gccctgatg agatgcggcg gctgctgcaa 1200
 cgacgagggc ctggaatgcg tgcccaccga ggaatccaac atcaccatgc agatcatgcg 1260
 gatcaagccc caccagggcc agcatatcgg cgagatgagc ttctgcagc acaacaagtg 1320
 cgagtgccgg cccaagaagg accgggccag acaggaaaac ccctgcggcc cctgcagcga 1380
 ggaggaaaag cacctgttcg tgcaggacc ccagacctgc aagtgctcct gcaagaacac 1440
 cgacagccgg tgcaaggccc ggcagctgga actgaacgag cggacctgcg aatgcgacaa 1500
 gccagacgg taatcaactt tcttgtaaa agtggtgat ctagagggcc cgcggttcga 1560
 aggtaagcct atccctaacc ctctcctcgg tctcgattct acgcgtaccg gttagtaatg 1620
 agtttaaacy ggggaggcta actgaaacac ggaaggagac aataccgga ggaaccgcg 1680
 ctatgacggc aataaaaaga cagaataaaa cgcacgggtg ttgggtcgtt tgttcataaa 1740
 cgcggggttc ggtcccagg ctggcactct gtcgataccc caccgagacc ccattggggc 1800
 caatacggcc gcgtttcttc cttttccca cccaccccc caagttcggg tgaaggccca 1860
 gggctcgcag ccaacgtcgg ggcggcagg cctgccatag cagatctgcg cagctggggc 1920
 tctagggggt atccccacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt 1980
 acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctcctt cgctttcttc 2040
 ccttcctttc tcgccacgtt cgcggcttt ccccgtaag ctctaaatcg gggcatccct 2100
 ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctgcaccca aaaaacttga ttaggtgat 2160
 ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc 2220
 acgttcttta atagtggact cttgttcaa actggaacaa cactcaacc tatctcgtc 2280
 tattcttttg atttataagg gattttggg atttcggcct attggttaa aatgagctg 2340

ES 2 648 487 T3

atttaacaaa aatttaacgc gaattaattc tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtgtggaa 2400
 agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa 2460
 ccagggtgtgg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 2520
 attagtcagc aaccatagtc cggcccctaa ctccgcccct cccgccccta actccgccc 2580
 gttccgccc ttctccgccc catggctgac taatTTTTTT tatttatgca gaggccgagg 2640
 ccgctctgc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg cTTTTTTGGA ggcctaggct 2700
 tttgcaaaaa gctcccggga gcttgtatat ccattttcgg atctgatcaa gagacaggat 2760
 gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg 2820
 tggagaggct attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccg 2880
 tgttccggct gtcagcgag gggcgcccgg ttctTTTTGT caagaccgac ctgtccggtg 2940
 ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc 3000
 cttgcgagc tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggag 3060
 aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca 3120
 tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccc ttcgaccacc 3180
 aagcgaacaa tcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga agccggtctt gtogatcagg 3240
 atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgccagcoga actgttcgcc aggctcaagg 3300
 cgcgcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata 3360
 tcatggtgga aatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg 3420
 accgctatca ggacatagcg ttggctacc gtgatattgc tgaagagctt gggggcgaat 3480
 gggctgaccg cttcctcgtg ctttacggta tcgcccctcc cgattcgcag cgcacgcct 3540
 tctatgcct tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgcga aatgaccgac 3600
 caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgcccctt ctatgaaagg 3660
 ttgggcttcg gaatcgtttt cggggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc 3720
 atgctggagt tcttcgccc ccccaacttg tttattgcag cttataatgy ttacaaataa 3780
 agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattTTTTT cactgcattc tagttgtggt 3840
 ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgtatac cgtcgacctc tagctagagc 3900
 ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca 3960
 cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatag agtgagctaa 4020
 ctcacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct gtogtgccag 4080
 ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttcc 4140
 gcttccctgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgctcggc tgcggcgagc ggtatcagct 4200
 cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 4260

ES 2 648 487 T3

tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg cgcggttgct ggcgtttttc	4320
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga	4380
aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct	4440
cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc ggggaagcgtg	4500
gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag	4560
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttata cggtaaactat	4620
cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac	4680
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac	4740
tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc	4800
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt	4860
tttgtttga agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc	4920
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg	4980
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca	5040
atctaaagta tatatgagta aacttgggtc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca	5100
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag	5160
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac	5220
ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc	5280
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct	5340
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc	5400
gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg	5460
cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gtccttcgg tcctccgatc	5520
gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtggtt tcaactcatg ttatggcagc actgcataat	5580
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag	5640
tcattctgag aatagtgtat gggcgaccg agttgctctt gcccgcgctc aatacgggat	5700
aataccgcbc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg	5760
cgaaaactct caaggatctt accgctggtg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca	5820
cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga	5880
aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcatactc	5940
ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata	6000
tttgaatgta tttagaaaaa taacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg	6060
ccacctgacg tc	6072

<210> 30
<211> 6072

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> Plásmido que contiene Hs.VEGF165 R149E/R150E (6072 pb ADN circular)

10
 <220>
 <221> Promotor
 <222> (232)..(819)
 <223> /gen="pCMV"
 /producto="Promotor CMV (-601 a +15)"

15
 <220>
 <221> Promotor
 <222> (863)..(882)
 <223> /gen="pT7"
 /producto="promotor T7"

20
 <220>
 <221> misc_recomb
 <222> (911)..(932)
 <223> /gen="attB1"
 /producto="sitio de recombinación attB1"

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (938)..(1513)
 <223> /gen="Hs.VEGF165 R149E/R150E"

30
 <220>
 <221> misc_recomb
 <222> (1515)..(1536)
 <223> /gen="attB2"
 /producto=" sitio de recombinación attB2"

35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1562)..(1603)
 <223> /gen="V5"

40
 <220>
 <221> polyA_site
 <222> (1630)..(1901)
 <223> /gen="pA"
 /producto="TK polyA"

45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1937)..(2365)
 <223> /gen="f1"
 /producto=" origen f1 "

50
 <220>
 <221> Promotor
 <222> (2392)..(2700)
 <223> /gen="pS"
 /producto =" promotor SV40 "

55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2775)..(3569)
 <223> /gen="neo"

60
 <220>
 <221> polyA_site
 <222> (3745)..(3875)

65
 <220>
 <221> polyA_site
 <222> (3745)..(3875)

ES 2 648 487 T3

<223> /gen="pA" /producto="SV40 poliA"

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (4258)..(4931)

<223> /gen="oriP" /producto="origen pUC "

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (5076)..(5936)

<223> /gen="bla"

<400> 30

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagtattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtcat agccatata	300
tggagttcgg cgttacataa cttacggtaa atggcccggc tggctgaccg cccaacgacc	360
cccggcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca	600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagaccaa gctggctagt	900
taagctatca acaagtttgt acaaaaaagt tggcaccatg aactttctgc tgagctgggt	960
gcactgggtcc ctggccctgc tgctgtacct gcaccacgcc aagtggccc aggccgctcc	1020
tatggccgag ggcggaggcc agaaccacca cgaggtggtg aaattcatgg acgtgtacca	1080
gcgagctac tgccaccca tcgagacact ggtggacatc ttccaggaat accccgacga	1140
gatcgagtac atcttcaagc ccagctgctg gccctgatg agatgcggcg gctgctgcaa	1200
cgacgagggc ctggaatgcg tgcccaccga ggaatccaac atcaccatgc agatcatgcg	1260

15

ES 2 648 487 T3

gatcaagccc caccagggcc agcatatcgg cgagatgagc ttcctgcagc acaacaagtg 1320
cgagtgccgg cccaagaagg accggggccag acaggaaaac ccctgcggcc cctgcagcga 1380
ggaggaaaag cacctgttcg tgcaggaccc ccagacctgc aagtgtcctt gcaagaacac 1440
cgacagccgg tgcaaggccc ggcagctgga actgaacgag cggacctgca gatgcgacaa 1500
gcccagacgg taatcaactt tcttgtacaa agtggttgat ctagagggcc cgcggttcga 1560
aggtaagcct atcccctaacc ctctcctcgg tctcgtattct acgcgtaccg gttagtaatg 1620
agtttaaacg ggggaggcta actgaaacac ggaaggagac aataccggaa ggaacccgcg 1680
ctatgacggc aataaaaaga cagaataaaa cgcacgggtg ttgggtcgtt tgttcataaa 1740
cgcgggggtc ggtcccaggg ctggcactct gtcgataccc caccgagacc ccattggggc 1800
caatacggcc gcgtttcttc cttttcccca ccccaccccc caagttcggg tgaaggccca 1860
gggctcgcag ccaacgtcgg ggcggcaggc cctgccatag cagatctgcg cagctggggc 1920
tctagggggt atccccacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt 1980
acgcgcagcg tgaccgtac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgttttcttc 2040
ccttcctttc tcgccacggt cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg gggcatccct 2100
ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctcgacccca aaaaacttga ttagggatgat 2160
ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc 2220
acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaacc tatctcggtc 2280
tattcttttg atttataagg gattttgggg atttcggcct attgggttaa aatgagctg 2340
atthaacaaa aatttaacgc gaattaattc tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtgggaa 2400
agtccccagc ctccccagca ggcagaagta tgcaaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa 2460
ccagggtgtg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 2520
attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa ctccgcccac cccgccccta actccgccc 2580
gttccgccc tctcctcgccc catggctgac taattttttt tatttatgca gaggccgagg 2640
ccgctctgct ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg ctttttttga ggcctaggct 2700
tttgcaaaaa gctcccggga gcttgatat ccatthttogg atctgatcaa gagacaggat 2760
gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg 2820
tgagagggct attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatccgccc 2880
tgttccggct gtcagcgcag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccgggtg 2940
ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcggtc 3000
cttgccgagc tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggag 3060
aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca 3120

ES 2 648 487 T3

tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccc a ttcgaccacc 3180
 aagcgaaaca tcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg 3240
 atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg 3300
 cgcgcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata 3360
 tcatggtgga aatggccgc tttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg 3420
 accgctatca ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat 3480
 gggctgaccg ctctcctgtg ctttacggta tcgccgctcc cgattcgcag cgcacgcct 3540
 tctatcgcct tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgcga aatgaccgac 3600
 caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgctt ctatgaaagg 3660
 ttgggcttcg gaatcgttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc 3720
 atgctggagt tcttcgccc ccccaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa 3780
 agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt 3840
 ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgtatac cgtcgacctc tagctagagc 3900
 ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca 3960
 cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatag agtgagctaa 4020
 ctcacattaa ttgcgttgcg ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag 4080
 ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttcc 4140
 gcttctcgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 4200
 cactcaaagg cgtaataacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 4260
 tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 4320
 cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 4380
 aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 4440
 cctgttccga ccctgcgct taccggatac ctgtccgct ttctccctc ggaagcgtg 4500
 gcgctttctc aatgctcagc ctgtaggat ctcagttcgg tgtaggctgt tcgctccaag 4560
 ctgggctgtg tgacagacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttacc cggtaactat 4620
 cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 4680
 aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 4740
 tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc 4800
 ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt 4860
 tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 4920
 ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg 4980
 agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca 5040

ES 2 648 487 T3

```

atctaaagta tatatgagta aacttgggtct gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca      5100
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgctcgtgtag      5160
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac      5220
ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc      5280
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg cggggaagct      5340
agagtaagta gttcgcctcgt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc      5400
gtggtgtcac gctcgtcgtt tgggatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg      5460
cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gtccttcggt tcctccgatc      5520
gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtggtta tcaactcatgg ttatggcagc actgcataat      5580
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag      5640
tcattctgag aatagtgtat gggcgaccg agttgctctt gcccgcgctc aatcgggat      5700
aataccgctc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg      5760
cgaaaactct caaggatctt accgctggtg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca      5820
cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga      5880
aggcaaaatg ccgcaaaaaa ggaataagg gcgacacgga aatggtgaat actcactctc      5940
ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata      6000
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg      6060
ccacctgacg tc                                                                6072

```

```

5 <210> 31
  <211> 6072
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

10 <220>
  <223> Plásmido que contiene Hs.VEGF165 R185E (6072 pb ADN circular)

15 <220>
  <221> Promotor
  <222> (232)..(819)
  <223> /gen="pCMV"
  /producto="Promotor CMV (-601 a +15)"

20 <220>
  <221> Promotor
  <222> (863)..(882)
  <223> /gen="pT7"
  /producto=" promotor T7"

25 <220>
  <221> misc_recomb
  <222> (911)..(932)
  <223> /gen="attB1"
  /producto=" sitio de recombinación attB1"

30 <220>
  <221> misc_feature
  <222> (938)..(1513)
  <223> /gen="Hs.VEGF165 R185E"

```

ES 2 648 487 T3

5 <220>
 <221> misc_recomb
 <222> (1515)..(1536)
 <223> /gen="attB2"
 /producto=" sitio de recombinación attB2"

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1562)..(1603)
 <223> /gen="V5"

15 <220>
 <221> polyA_site
 <222> (1630)..(1901)
 <223> /gen="pA"
 /producto="TK polyA" /SECDrawAs="Gen"

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1937)..(2365)
 <223> /gen="f1"
 /producto=" origen f1 "

25 <220>
 <221> Promotor
 <222> (2392)..(2700)
 <223> /gen="pS"
 /producto=" promotor SV40"

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2775)..(3569)
 <223> /gen="neo"

35 <220>
 <221> polyA_site
 <222> (3745)..(3875)
 <223> /gen="pA"
 /producto="SV40 poliA"

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4258)..(4931)
 <223> /gen="oriP"
 /producto=" origen pUC"

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5076)..(5936)
 <223> /gen="bla"

<400> 31

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgcactct cagtacaatc tgctctgatg 60

ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120

ES 2 648 487 T3

cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc occattgacg caaatgggcg 780
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagt 900
 taagctatca acaagtttgt acaaaaaagt tggcaccatg aactttctgc tgagctgggt 960
 gcactggtcc ctggccctgc tgctgtacct gcaccacgcc aagtgggtccc aggccgctcc 1020
 tatggccgag ggcggaggcc agaaccacca cgaggtggtg aaattcatgg acgtgtacca 1080
 gcgagactac tgccacccca tcgagacact ggtggacatc ttccaggaat accccgacga 1140
 gatcgagtac atcttcaagc ccagctgcgt gccctgatg agatgcggcg gctgctgcaa 1200
 cgacgagggc ctggaatgcg tgcccaccga ggaatccaac atcaccatgc agatcatgcg 1260
 gatcaagccc caccagggcc agcatatcgg cgagatgagc ttcctgcagc acaacaagtg 1320
 cgagtgccgg cccaagaagg accgggccag acaggaaaac ccctgcggcc cctgcagcga 1380
 gcggagaaaag cacctgttcg tgcaggacct ccagacctgc aagtgtcct gcaagaacac 1440
 cgacagccgg tgcaaggccc ggcagctgga actgaacgag cggacctgcg aatgcgacaa 1500
 gccagacggg taatcaactt tcttgtacaa agtggttgat ctagagggcc cgcggttcga 1560
 aggtaagcct atccctaacc ctctcctcgg tctcgattct acgcgtaccg gttagtaatg 1620
 agtttaaacg ggggaggcta actgaaacac ggaaggagac aataccggaa ggaacccgcg 1680
 ctatgacggc aataaaaaga cagaataaaa cgcacgggtg ttgggtcggt tgttcataaa 1740
 cgcgggggttc ggtcccaggg ctggcactct gtcgataccc caccgagacc ccattggggc 1800
 caatacgcgc gcgtttcttc cttttcccca ccccaccccc caagttcggg tgaaggccca 1860
 gggctcgcag ccaacgtcgg ggcggcaggc cctgccatag cagatctgcg cagctggggc 1920
 tctagggggt atccccacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt 1980

ES 2 648 487 T3

acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc 2040
 ccttcctttc tcgccacggt cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg gggcatccct 2100
 ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctcgaccca aaaaacttga ttagggatgat 2160
 ggttcacgta gtgggcatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc 2220
 acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaacct tatctcggtc 2280
 tattcttttg atttataagg gattttgggg atttcggcct attgggtaaa aaatgagctg 2340
 atttaacaaa aatttaacgc gaattaattc tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtgtgaa 2400
 agtcccagc ctcccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa 2460
 ccaggtgtgg aaagtccca ggctcccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 2520
 attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa ctccgccat cccgcccta actccgcca 2580
 gttccgcca ttctccgcc catggctgac taattttttt tatttatgca gaggccgagg 2640
 ccgctctgc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg cttttttgga ggcctaggct 2700
 tttgcaaaaa gctcccggga gcttgatat ccattttcgg atctgatcaa gagacaggat 2760
 gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg 2820
 tggagaggct attcggctat gactggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccc 2880
 tgttccggct gtcagcgcag gggcggccg ttctttttgt caagaccgac ctgtccgggtg 2940
 ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcttc 3000
 cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg 3060
 aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc acctgctcc tgccgagaaa gtatccatca 3120
 tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgcca ttcgaccacc 3180
 aagcgaaca tcgcatcgag cgagcacgta ctcgatgga agccggtctt gtogatcagg 3240
 atgatctgga cgaagagcat caggggctcg gccagccga actgttcgcc aggtcaagg 3300
 cgcgcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg tgaccatgg cgatgcctgc ttgccgaata 3360
 tcatggtgga aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg 3420
 accgctatca ggacatagcg ttggctacct gtgatattgc tgaagagctt gggggcgaat 3480
 gggctgaccg cttcctcgtg ctttaocgta tcgccgctcc cgattcgcag cgcacgcct 3540
 tctatgcct tottgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgcga aatgaccgac 3600
 caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccctt ctatgaaagg 3660
 ttgggcttcg gaatcgttt cggggacgcc ggctggatga tctccagcg cggggatctc 3720
 atgctggagt tottcgcca ccccaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa 3780
 agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt 3840
 ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgtatac cgtcgacctc tagctagagc 3900

ES 2 648 487 T3

ttggcgtaat	catggtcata	gctgtttcct	gtgtgaaatt	gttatccgct	cacaattcca	3960
cacaacatac	gagccggaag	cataaagtgt	aaagcctggg	gtgcctaatag	agtgagctaa	4020
ctcacattaa	ttgcgttgcg	ctcactgccc	gctttccagt	cgggaaacct	gtcgtgccag	4080
ctgcattaat	gaatcgcca	acgcgcgggg	agaggcgggt	tgcgtattgg	gcgctcttcc	4140
gcttcctcgc	tactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgcggcgagc	ggtatcagct	4200
cactcaaagg	cggtaatacg	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	4260
tgagcaaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	4320
cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	4380
aacccgacag	gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	4440
cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac	ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgtg	4500
gcgctttctc	aatgctcacg	ctgtaggtat	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	4560
ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	cccgaccgct	gdcgcttacc	cggtaaactat	4620
cgtcttgagt	ccaacccggt	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	4680
aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggg	gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	4740
tacggctaca	ctagaaggac	agtatttggg	atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	4800
ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	cggtggtttt	4860
tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	4920
ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	gaaaactcac	gttaagggat	tttggctatg	4980
agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	cttttaaat	aaaaatgaag	ttttaaataca	5040
atctaaagta	tatatgagta	aacttggctc	gacagttacc	aatgcttaat	cagtgaggca	5100
cctatctcag	cgatctgtct	atctcgttca	tccatagttg	cctgactccc	cgctcgttag	5160
ataactaoga	tacgggaggg	cttaccatct	ggccccagtg	ctgcaatgat	accgcgagac	5220
ccacgctcac	cggctccaga	tttatcagca	ataaaccagc	cagccggaag	ggccgagcgc	5280
agaagtggtc	ctgcaacttt	atccgcctcc	atccagtcta	ttaattggtg	ccgggaagct	5340
agagtaagta	gttcgccagt	taatagtttg	cgcaacgttg	ttgccattgc	tacaggcatc	5400
gtggtgtcac	gctcgtcgtt	tggtatggct	tcattcagct	ccggttccca	acgatcaagg	5460
cgagttacat	gatcccccat	gttgtgcaaa	aaagcgggta	gctccttcgg	tcctccgatac	5520
gttgtcagaa	gtaagttggc	cgcagtggtta	tactcatggg	ttatggcagc	actgcataat	5580
tctcttactg	tcatgccatc	cgtaagatgc	ttttctgtga	ctggtgagta	ctcaaccaag	5640
tcattctgag	aatagtgtat	gcggcgaccg	agttgctctt	gcccggcgtc	aatacgggat	5700
aataccgcgc	cacatagcag	aactttaaaa	gtgctcatca	ttggaaaacg	ttcttcgggg	5760

ES 2 648 487 T3

	cgaaaactct caaggatctt accgctggtg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca	5820
	cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga	5880
	aggcaaatg cgcgcaaaaaa ggggaataagg ggcacacgga aatggtgaat actcactc	5940
	ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata	6000
	tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg	6060
	ccacctgacg tc	6072
5	<210> 32 <211> 6072 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Plásmido que contiene Hs.VEGF165 R150E (6072 pb ADN circular)	
15	<220> <221> Promotor <222> (232)..(819) <223> /gen="pCMV" /producto="Promotor CMV (-601 a +15)"	
20	<220> <221> Promotor <222> (863)..(882) <223> /gen="pT7" /producto="T7 promotor"	
25	<220> <221> misc_recomb <222> (911)..(932) <223> /gen="attB1" /producto=" sitio de recombinación attB1"	
30	<220> <221> misc_feature <222> (938)..(1513) <223> /gen="Hs.VEGF165 R150E"	
35	<220> <221> misc_recomb <222> (1515)..(1536) <223> /gen="attB2" /producto=" sitio de recombinación attB2"	
40	<220> <221> misc_feature <222> (1562)..(1603) <223> /gen="V5"	
45	<220> <221> polyp_site <222> (1630)..(1901) <223> /gen="pA" /producto="TK poliA"	
50	<220> <221> misc_feature <222> (1937)..(2365) <223> /gen="f1" /producto=" origen f1"	
55		

ES 2 648 487 T3

5
 <220>
 <221> Promotor
 <222> (2392)..(2700)
 <223> /gen="pS" /producto=" promotor SV40 "

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2775)..(3569)
 <223> /gene-"neo"

15
 <220>
 <221> polyA_site
 <222> (3745)..(3875)
 <223> /gen="pA" /producto="SV40 poliA"

20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4258)..(4931)
 <223> /gen="oriP" /producto=" origen pUC"

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5076)..(5936)
 <223> /gen="bla"

<400> 32

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggctcgt gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata	300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc	360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgcccgata catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca	600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgctgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acgggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcaactatag ggagacccaa gctggctagt	900

ES 2 648 487 T3

taagctatca	acaagtttgt	acaaaaaagt	tggcaccatg	aactttctgc	tgagctgggt	960
gcaactgggcc	ctggccctgc	tgctgtacct	gcaccacgcc	aagtgggtccc	aggccgctcc	1020
tatggccgag	ggcggaggcc	agaaccacca	cgaggtggtg	aaattcatgg	acgtgtacca	1080
gcggagctac	tgccacccca	tcgagacact	ggtggacatc	ttccaggaat	accccgacga	1140
gatcgagtac	atcttcaagc	ccagctgcgt	gccctgatg	agatgcggcg	gctgctgcaa	1200
cgacgagggc	ctggaatgcg	tgcccaccga	ggaatccaac	atcaccatgc	agatcatgcg	1260
gatcaagccc	caccagggcc	agcatatcgg	cgagatgagc	ttcctgcagc	acaacaagtg	1320
cgagtgccgg	ccaagaagg	accgggcccag	acaggaaaac	ccctgcggcc	cctgcagcga	1380
gcgggaaaag	cacctgttcg	tgcaggaccc	ccagacctgc	aagtgtcctc	gcaagaacac	1440
cgacagccgg	tgcaaggccc	ggcagctgga	actgaacgag	cggacctgca	gatgcgacaa	1500
gccagacgg	taatcaactt	tcttgtacaa	agtggtgat	ctagagggcc	cgcggttcga	1560
aggtaagcct	atccctaacc	ctctcctcgg	tctcgattct	acgcgtaccg	gttagtaatg	1620
agtttaaacg	ggggaggcta	actgaaacac	ggaaggagac	aataccggaa	ggaacccgcg	1680
ctatgacggc	aataaaaaga	cagaataaaa	cgcacgggtg	ttgggtcgtt	tgttcataaa	1740
cgcggggttc	ggtcccaggg	ctggcactct	gtcgataccc	caccgagacc	ccattggggc	1800
caatacgccc	gcgtttcttc	cttttcccca	ccccaccccc	caagttcggg	tgaaggccca	1860
gggctcgcag	ccaacgtcgg	ggcggcaggc	cctgccatag	cagatctgcg	cagctggggc	1920
tctagggggg	atccccacgc	gccctgtagc	ggcgcattaa	gcgcggcggg	tgtggtggtt	1980
acgcgcagcg	tgaccgctac	acttgccagc	gccctagegc	ccgctccttt	cgctttcttc	2040
ccttcctttc	tcgccacggt	cgccggcttt	ccccgtcaag	ctctaaatcg	gggcatccct	2100
ttagggttcc	gatttagtgc	tttacggcac	ctcgacccca	aaaaacttga	ttaggggtgat	2160
ggttcacgta	gtgggccatc	gccctgatag	acggtttttc	gccctttgac	gttggagtcc	2220
acgttcttta	atagtggact	cttgttccaa	actggaacaa	cactcaacc	tatctcggtc	2280
tattcttttg	atttataagg	gattttgggg	atctcggcct	attgggttaa	aaatgagctg	2340
atthaacaaa	aatttaacgc	gaattaattc	tgtggaatgt	gtgtcagtta	gggtgtggaa	2400
agtccccagg	ctccccagca	ggcagaagta	tgcaaagcat	gcactctcaat	tagtcagcaa	2460
ccagggtgtg	aaagtcccca	ggctccccag	caggcagaag	tatgcaaagc	atgcatctca	2520
attagtacgc	aaccatagtc	ccgcccctaa	ctccgcccct	cccgccccta	actcccacca	2580
gttccgcccc	ttctccgccc	catggctgac	taattttttt	tatttatgca	gaggccgagg	2640
ccgcctctgc	ctctgagcta	ttccagaagt	agtgaggagg	cttttttggg	ggcctaggct	2700
tttgcaaaaa	gctccccgga	gcttgatat	ccattttcgg	atctgatcaa	gagacaggat	2760

ES 2 648 487 T3

gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg 2820
tggagaggct attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccg 2880
tgttccggct gtcagcgcag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg 2940
ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc 3000
cttgccgacg tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattggggc 3060
aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca 3120
tggtgatgac aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgcca ttccaccacc 3180
aagcgaaca tcgcatcgag cgagcacgta ctccgatgga agccggtctt gtccatcagg 3240
atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgcagccga actgttcgcc aggctcaagg 3300
cgcgcatgcc cgacggcgag gatctcgtcg tgaccatgg cgatgcctgc ttgccgaata 3360
tcatggtgga aatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg 3420
accgctatca ggacatagcg ttggctaccg gtgatattgc tgaagagctt gggggcgaat 3480
gggctgaccg cttcctcgtg ctttacggta tcgccgctcc cgattcgcag cgcacgcct 3540
tctatcgctt tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgcga aatgaccgac 3600
caagcgcgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgctt ctatgaaagg 3660
ttgggcttcg gaatcgtttt cggggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc 3720
atgctggagt tcttcgcca ccccaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa 3780
agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt 3840
ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgtatac cgtcgacctc tagctagagc 3900
ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca 3960
cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa 4020
ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtccgtccag 4080
ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgatttgg gcgctcttcc 4140
gcttctcgc tcaactgact gctgcgctcg gtcgctcggc tgcggcgagc ggtatcagct 4200
cactcaaagg cgtaatacgt gttatccaca gaatcagggg ataacgcagc aaagaacatg 4260
tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgcttgc ggcgtttttc 4320
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 4380
aaccgcagc gactataaag ataccaggcg tttcccctg gaagctccct cgtgcgctct 4440
cctgttccga cctgcccgtt taccggatac ctgtccgctt ttctccctc gggaagcgtg 4500
gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat ctcaagtccg tgtaggtcgt tcgctccaag 4560
ctgggctgtg tgcacgaacc cccgcttcag cccgaccgct gcgccttacc cggtaactat 4620
cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 4680

ES 2 648 487 T3

```

aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 4740
tacgggctaca ctagaaggac agtattttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 4800
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt 4860
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 4920
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg 4980
agattatcaa aaagatcctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatac 5040
atctaaagta tatatgagta aacttggctt gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 5100
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 5160
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 5220
ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 5280
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattggtg ccgggaagct 5340
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc 5400
gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 5460
cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggta gtccttcgg tcctccgatc 5520
gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgta tcaactcatg ttatggcagc actgcataat 5580
tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag 5640
tcattctgag aatagtgtat gggcgaccg agttgctctt gcccgcgctc aatacgggat 5700
aataccgcbc cacatagcag aactttaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg 5760
cgaaaactct caaggatcct accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca 5820
cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga 5880
aggcaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatggtgaat actcactctc 5940
ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata 6000
tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg 6060
ccacctgacg tc 6072

```

- 5 <210> 33
- <211> 6072
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Plásmido que contiene Hs.VEGF165 R149E (6072 bp ADN circular)

- 15 <220>
- <221> Promotor
- <222> (232)..(819)
- <223> /gen="pCMV"
- /producto="Promotor CMV (-601 a +15)"

- <220>
- <221> Promotor
- <222> (863)..(882)

<223> /gen="pT7"
 /producto=" promotor T7"

5 <220>
 <221> misc_recomb
 <222> (911)..(932)
 <223> /gen="attB1"
 /producto=" sitio de recombinación attB1"

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (938)..(1513)
 <223> /gen="Hs.VEGF165 R149E"

15 <220>
 <221> misc_recomb
 <222> (1515)..(1536)
 <223> /gen="attB2"
 /producto=" sitio de recombinación attB2"

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1562)..(1603)
 <223> /gen="V5"

25 <220>
 <221> polyA_site
 <222> (1630)..(1901)
 <223> /gen="pA"
 /producto="TK poliA"

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1937)..(2365)
 <223> /gen="f1"
 /producto=" origen f1 "

35 <220>
 <221> Promotor
 <222> (2392)..(2700)
 <223> /gen="pS"
 /producto=" promotor SV40"

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2775)..(3569)
 <223> /gen="neo"

45 <220>
 <221> polypA_site
 <222> (3745)..(3875)
 <223> /gen="pA"
 /producto="SV40 poliA"

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4258)..(4931)
 <223> /gen="oriP" /producto=" origen pUC"

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5076)..(5936)
 <223> /gen="bla"

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5076)..(5936)
 <223> /gen="bla"

65 <400> 33

ES 2 648 487 T3

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgcactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggctcgt gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
tggagtcccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
aaaatcaacg ggactttcca aatgtcgtg acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagt 900
taagctatca acaagtttgt acaaaaaagt tggcaccatg aactttctgc tgagctgggt 960
gcaactggctc ctggccctgc tgctgtacct gcaccacgcc aagtggctcc aggccgctcc 1020
tatggccgag ggcggaggcc agaaccacca cgaggtggtg aaattcatgg acgtgtacca 1080
gcggagctac tgccacccca tcgagacact ggtggacatc ttccaggaat accccgacga 1140
gatcgagtac atcttcaagc ccagctgctg gccctgatg agatgcggcg gctgctgcaa 1200
cgacgagggc ctggaatgcg tgcccaccga ggaatccaac atcaccatgc agatcatgcg 1260
gatcaagccc caccagggcc agcatatcgg cgagatgagc ttctgcagc acaacaagtg 1320
cgagtgccgg cccaagaagg accgggcccag acaggaaaac ccctgcggcc cctgcagcga 1380
ggagagaaag cacctgttcg tgcaggacc ccagacctgc aagtgtctct gcaagaacac 1440
cgacagccgg tgcaaggccc ggcagctgga actgaacgag cggacctgca gatgcgacaa 1500
gccagacgg taatcaactt tcttgtacaa agtggttgat ctagagggcc cgcggttcga 1560
aggtaacct atccctaacc ctctcctcgg tctcgattct acgcgtaccg gttagtaatg 1620
agtttaaacy ggggaggcta actgaaacac ggaaggagac aataccggaa ggaaccgcg 1680

ES 2 648 487 T3

ctatgacggc aataaaaaga cagaataaaa cgcacgggtg ttgggtcgtt tgttcataaa	1740
cgcgggggttc ggtcccaggg ctggcactct gtcgataccc caccgagacc ccattggggc	1800
caatacgccc gcgtttcttc cttttcccca ccccaccccc caagttcggg tgaaggccca	1860
gggctcgcag ccaacgtcgg ggcggcaggc cctgccatag cagatctgcg cagctggggc	1920
tctagggggt atccccacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt	1980
acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc	2040
ccttcctttc tcgccacgtt cgccggcctt ccccgtaag ctctaaatcg gggcatccct	2100
ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctcgacccca aaaaacttga ttaggtgat	2160
ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc	2220
acgttcttta atagtggact cttggtccaa actggaacaa cactcaaccc tatctcggtc	2280
tattcttttg atttataagg gattttgggg atttcggcct attggttaaa aatgagctg	2340
atthaacaaa aatttaacgc gaattaattc tgtggaatgt gtgtcagtta ggggtgaggaa	2400
agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcactctcaat tagtcagcaa	2460
ccagggtggt aaagtcccca ggctccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca	2520
attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa ctccgcccac ccgccccta actccgcca	2580
gttccgcccc ttctccgcc catggctgac taattttttt tatttatgca gaggccgagg	2640
ccgctctgc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg cttttttgga ggcctaggct	2700
tttgcaaaaa gctcccggga gcttgatat ccattttcgg atctgatcaa gagacaggat	2760
gaggatcgtt tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg	2820
tggagaggct attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccg	2880
tgttccggct gtcagcgcag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg	2940
ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc	3000
cttgccgagc tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg	3060
aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca	3120
tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccca ttcgaccacc	3180
aagcgaacaa tcgcatcgag cgagcacgta ctcgatgga agccggctct gtcgatcagg	3240
atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgcagccga actgttcgcc aggctcaagg	3300
cgcgatgcc cgacggcgag gatctcgtcg tgaccatgg cgatgcctgc ttgccgaata	3360
tcatggtgga aatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg	3420
accgctatca ggacatagcg ttggctacc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat	3480
gggctgaccg cttcctcgtg ctttacggta tcgccctcc cgattcgcag cgcacgcct	3540

ES 2 648 487 T3

tctatcgctt tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgcga aatgaccgac 3600
caagcgacgc ccaacctgcc atcaogagat ttcgattcca cgcgccctt ctatgaaag 3660
ttgggcttcg gaatcgtttt cggggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc 3720
atgctggagt tcttcgcca cccaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa 3780
agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt 3840
ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgtatac cgtcgacctc tagctagagc 3900
ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaaattcca 3960
cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatag agtgagctaa 4020
ctcacattaa ttgctgtgag ctcaactgcc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag 4080
ctgcattaat gaatcgcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttcc 4140
gcttctctgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 4200
cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 4260
tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcttgct ggcgtttttc 4320
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 4380
aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttcccctg gaagctccct cgtgcgctct 4440
cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgct ttctccctc gggagcgtg 4500
gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat ctcaagtccg tgtaggtcgt tcgctccaag 4560
ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag cccgaccgct gcgccttacc cggtaactat 4620
cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 4680
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 4740
tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc 4800
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt 4860
tttgtttgca agcagcagat tacgcgaga aaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 4920
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gtaaggat tttggtcatg 4980
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca 5040
atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 5100
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 5160
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 5220
ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 5280
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct 5340
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacggtt ttgccattgc tacaggcatc 5400
gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaag 5460

ES 2 648 487 T3

cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gtccttcgg tcctccgatc 5520
 gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtggtta tcactcatgg ttatggcagc actgcataat 5580
 tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctgggtgagta ctcaaccaag 5640
 tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat 5700
 aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg 5760
 cgaaaactct caaggatctt accgctggtg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca 5820
 cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga 5880
 aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatggtgaat actcatactc 5940
 ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata 6000
 tttgaatgta tttagaaaaa taaacaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg 6060
 ccacctgacg tc 6072

<210> 34
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 34

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

Glu Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 210 215

<210> 35
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 210 215

<210> 36
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 36

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

Glu Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 210 215

<210> 37
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 37

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 210 215

<210> 38
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 210 215

<210> 39
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> *Felis catus*

5

<400> 39

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

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

Glu His Lys Pro His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 35 40 45

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

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

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

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

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

10

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

<210> 40
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

5

<400> 40

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

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

Glu His Lys Pro His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 648 487 T3

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

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

<210> 41
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

5

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

<210> 42

ES 2 648 487 T3

<211> 190
 <212> PRT
 <213> *Equus caballus*

5 <400> 42

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

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

Glu His Lys Thr His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10 <210> 43
 <211> 190
 <212> PRT
 <213> *Rattus norvegicus*

15 <400> 43

ES 2 648 487 T3

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

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

Glu Gln Lys Ser His Glu Val Ile Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg
 35 40 45

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

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

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

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

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

Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Thr Lys Pro Glu Asn His Cys Glu Pro
 130 135 140

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

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

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

<210> 45
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> *Gallus gallus*
 <400> 45

5

ES 2 648 487 T3

Met Asn Phe Leu Leu Thr Trp Ile His Trp Gly Leu Ala Ala Leu Leu
 1 5 10 15

Tyr Leu Gln Ser Ala Glu Leu Ser Lys Ala Ala Pro Ala Leu Gly Asp
 20 25 30

Gly Glu Arg Lys Pro Asn Glu Val Ile Lys Phe Leu Glu Val Tyr Glu
 35 40 45

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

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

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

Val Asp Val Tyr Asn Val Thr Met Glu Ile Ala Arg Ile Lys Pro His
 100 105 110

Gln Ser Gln His Ile Ala His Met Ser Phe Leu Gln His Ser Lys Cys
 115 120 125

Asp Cys Arg Pro Lys Lys Asp Val Lys Asn Lys Gln Glu Asn His Cys
 130 135 140

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

Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Phe Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ser Arg
 165 170 175

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

<210> 46
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> *Xenopus laevis*

5

<400> 46

ES 2 648 487 T3

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

Tyr Ile Pro Leu Ala Gln Leu Ser Gly Ala Ala Pro Met Pro Gly Glu
 20 25 30

Gly Asp His Lys Pro Thr Glu Val Val Lys Phe Leu Lys Val Tyr Glu
 35 40 45

Arg Ser Met Cys Gln Val Arg Glu Ile Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu
 50 55 60

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

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

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

Ile Ser Gln His Ile Met Asp Met Ser Phe Gln Gln His Ser His Cys
 115 120 125

Glu Cys Arg Pro Lys Lys Glu Val Lys Ile Lys Gln Glu Asn His Cys
 130 135 140

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

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

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

Arg Arg

<210> 47
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 47

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

115 120 125

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

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

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

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

<210> 48
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 48

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 49
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 49

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro
 165 170 175

Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala
 180 185 190

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

Arg

<210> 50
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 50

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
210 215

<210> 51
<211> 232
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 648 487 T3

<400> 51

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 225 230

ES 2 648 487 T3

<210> 52
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 52

```

Met Thr Asp Arg Gln Thr Asp Thr Ala Pro Ser Pro Ser Tyr His Leu
 1           5           10           15

Leu Pro Gly Arg Arg Arg Thr Val Asp Ala Ala Ala Ser Arg Gly Gln
      20           25           30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg
      35           40           45

Gly Val Ala Leu Lys Leu Phe Val Gln Leu Leu Gly Cys Ser Arg Phe
      50           55           60

Gly Gly Ala Val Val Arg Ala Gly Glu Ala Glu Pro Ser Gly Ala Ala
 65           70           75           80

Arg Ser Ala Ser Ser Gly Arg Glu Glu Pro Gln Pro Glu Glu Gly Glu
      85           90           95

Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Arg Gly Pro Gln Trp Arg Leu Gly
      100          105          110

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

Ser Ala Pro Ala Ala Arg Ala Pro Gln Ala Leu Ala Arg Ala Ser Gly
      130          135          140

Arg Gly Gly Arg Val Ala Arg Arg Gly Ala Glu Glu Ser Gly Pro Pro
 145          150          155          160

His Ser Pro Ser Arg Arg Gly Ser Ala Ser Arg Ala Gly Pro Gly Arg
  
```

ES 2 648 487 T3

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

<210> 53
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 53

Met Thr Asp Arg Gln Thr Asp Thr Ala Pro Ser Pro Ser Tyr His Leu

ES 2 648 487 T3

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

ES 2 648 487 T3

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

Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg
 275 280 285

Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln
 290 295 300

His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu
 305 310 315 320

Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln
 325 330 335

Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys
 340 345 350

Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys
 355 360 365

Pro Arg Arg
 370

<210> 54
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 54

Met Thr Asp Arg Gln Thr Asp Thr Ala Pro Ser Pro Ser Tyr His Leu
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Arg Arg Arg Thr Val Asp Ala Ala Ala Ser Arg Gly Gln
 20 25 30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg
 35 40 45

Gly Val Ala Leu Lys Leu Phe Val Gln Leu Leu Gly Cys Ser Arg Phe
 50 55 60

Gly Gly Ala Val Val Arg Ala Gly Glu Ala Glu Pro Ser Gly Ala Ala
 65 70 75 80

Arg Ser Ala Ser Ser Gly Arg Glu Glu Pro Gln Pro Glu Glu Gly Glu
 85 90 95

10

ES 2 648 487 T3

Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Arg Gly Pro Gln Trp Arg Leu Gly
 100 105 110

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

Ser Ala Pro Ala Ala Arg Ala Pro Gln Ala Leu Ala Arg Ala Ser Gly
 130 135 140

Arg Gly Gly Arg Val Ala Arg Arg Gly Ala Glu Glu Ser Gly Pro Pro
 145 150 155 160

His Ser Pro Ser Arg Arg Gly Ser Ala Ser Arg Ala Gly Pro Gly Arg
 165 170 175

Ala Ser Glu Thr Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu
 180 185 190

Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro
 195 200 205

Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met
 210 215 220

Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp
 225 230 235 240

Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser
 245 250 255

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

Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg
 275 280 285

Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln
 290 295 300

His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu
 305 310 315 320

Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys
 325 330 335

Lys Ser Arg Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe
 340 345 350

ES 2 648 487 T3

Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser
 355 360 365

Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys
 370 375 380

Asp Lys Pro Arg Arg
 385

<210> 55
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 55

Met Thr Asp Arg Gln Thr Asp Thr Ala Pro Ser Pro Ser Tyr His Leu
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Arg Arg Arg Thr Val Asp Ala Ala Ala Ser Arg Gly Gln
 20 25 30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg
 35 40 45

Gly Val Ala Leu Lys Leu Phe Val Gln Leu Leu Gly Cys Ser Arg Phe
 50 55 60

Gly Gly Ala Val Val Arg Ala Gly Glu Ala Glu Pro Ser Gly Ala Ala
 65 70 75 80

Arg Ser Ala Ser Ser Gly Arg Glu Glu Pro Gln Pro Glu Glu Gly Glu
 85 90 95

Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Arg Gly Pro Gln Trp Arg Leu Gly
 100 105 110

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

Ser Ala Pro Ala Ala Arg Ala Pro Gln Ala Leu Ala Arg Ala Ser Gly
 130 135 140

Arg Gly Gly Arg Val Ala Arg Arg Gly Ala Glu Glu Ser Gly Pro Pro
 145 150 155 160

His Ser Pro Ser Arg Arg Gly Ser Ala Ser Arg Ala Gly Pro Gly Arg
 165 170 175

10

ES 2 648 487 T3

Ala Ser Glu Thr Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu
180 185 190

Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro
195 200 205

Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met
210 215 220

Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp
225 230 235 240

Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser
245 250 255

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

Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg
275 280 285

Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln
290 295 300

His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu
305 310 315 320

Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys
325 330 335

Lys Ser Arg Tyr Lys Ser Trp Ser Val Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu
340 345 350

Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser
355 360 365

Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn
370 375 380

Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
385 390 395

<210> 56
<211> 412
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 56

ES 2 648 487 T3

Met Thr Asp Arg Gln Thr Asp Thr Ala Pro Ser Pro Ser Tyr His Leu
1 5 10 15

Leu Pro Gly Arg Arg Arg Thr Val Asp Ala Ala Ala Ser Arg Gly Gln
20 25 30

Gly Pro Glu Pro Ala Pro Gly Gly Gly Val Glu Gly Val Gly Ala Arg
35 40 45

Gly Val Ala Leu Lys Leu Phe Val Gln Leu Leu Gly Cys Ser Arg Phe
50 55 60

Gly Gly Ala Val Val Arg Ala Gly Glu Ala Glu Pro Ser Gly Ala Ala
65 70 75 80

Arg Ser Ala Ser Ser Gly Arg Glu Glu Pro Gln Pro Glu Glu Gly Glu
85 90 95

Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Arg Gly Pro Gln Trp Arg Leu Gly
100 105 110

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

Ser Ala Pro Ala Ala Arg Ala Pro Gln Ala Leu Ala Arg Ala Ser Gly
130 135 140

Arg Gly Gly Arg Val Ala Arg Arg Gly Ala Glu Glu Ser Gly Pro Pro
145 150 155 160

His Ser Pro Ser Arg Arg Gly Ser Ala Ser Arg Ala Gly Pro Gly Arg
165 170 175

Ala Ser Glu Thr Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu
180 185 190

Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro
195 200 205

Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met
210 215 220

Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp
225 230 235 240

Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser
245 250 255

ES 2 648 487 T3

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

Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg
275 280 285

Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln
290 295 300

His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu
305 310 315 320

Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys
325 330 335

Lys Ser Arg Tyr Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys
340 345 350

Leu Met Pro Trp Ser Leu Pro Gly Pro His Pro Cys Gly Pro Cys Ser
355 360 365

Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys
370 375 380

Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu
385 390 395 400

Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
405 410

<210> 57
<211> 191
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 57

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

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

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

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

10

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 58
<211> 191
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 58

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 59
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 59

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 648 487 T3

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

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

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

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

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

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

Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 225 230

<210> 60
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 60

Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys
 1 5 10 15

Lys Ser Arg

10

<210> 61
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 61

Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys
 1 5 10 15

Lys Ser Arg Tyr Lys Ser Trp Ser Val
 20 25

20

<210> 62
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 62

ES 2 648 487 T3

Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys
 1 5 10 15

Lys Ser Arg Tyr Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys
 20 25 30

Leu Met Pro Trp Ser Leu Pro Gly
 35 40

5 <210> 63
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 63

Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln Lys Arg Lys Arg Lys
 1 5 10 15

Lys Ser Arg Tyr Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val Gly Ala Arg Cys Cys
 20 25 30

Leu Met Pro Trp Ser Leu Pro Gly Pro His
 35 40

10 <210> 64
 <211> 74
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 64

Ala Arg Gln Glu Lys Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg
 20 25 30

Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys
 35 40 45

Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu
 50 55 60

Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 65 70

20 <210> 65
 <211> 80
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*

<400> 65

ES 2 648 487 T3

Ala Arg Gln Glu Lys Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr Lys Ser Trp Ser Val Pro Cys
 20 25 30

Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln
 35 40 45

Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg
 50 55 60

Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 65 70 75 80

<210> 66
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 66

5

Ala Arg Gln Glu Lys Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val
 20 25 30

Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met Pro Trp Ser Leu Pro Gly Pro Cys Gly
 35 40 45

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

Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
 65 70 75 80

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 85 90 95

10

<210> 67
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 67

15

ES 2 648 487 T3

Ala Arg Gln Glu Lys Lys Lys Ser Val Arg Gly Lys Gly Lys Gly Gln
 1 5 10 15

Lys Arg Lys Arg Lys Lys Ser Arg Tyr Lys Ser Trp Ser Val Tyr Val
 20 25 30

Gly Ala Arg Cys Cys Leu Met Pro Trp Ser Leu Pro Gly Pro His Pro
 35 40 45

Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro
 50 55 60

Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala
 65 70 75 80

Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg
 85 90 95

Arg

5 <210> 68
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 68

Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His
 1 5 10 15

Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr
 20 25 30

Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys
 35 40 45

Arg Ser Leu Thr Arg Lys Asp
 50 55

10
 15 <210> 69
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 69

Ser Leu Thr Arg Lys Asp
 1 5

20

REIVINDICACIONES

1. Una variante de polipéptido de factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF) para su uso en un método para tratar una enfermedad, **caracterizada por** angiogénesis patológica, comprendiendo dicho método la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad farmacéuticamente eficaz de la variante de péptido de VEGF, comprendiendo la variante de polipéptido de VEGF un dominio de tirosina quinasa y un dominio de unión a heparan sulfato C-terminal, en donde dicha variante de polipéptido tiene una o más alteraciones de aminoácido con respecto a un polipéptido VEGF nativo en el dominio de unión a heparan sulfato C-terminal, en la que dicha variante del polipéptido se une a heparina con una afinidad menor que dicho VEGF nativo y en donde la variante de polipéptido se selecciona del grupo que consiste en:

(1) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 25 en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 25 es un aminoácido ácido, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 123, 124 y 159 de la SEQ ID NO: 26 es un aminoácido ácido y un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 27 en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 13, 14 y 49 de la SEQ ID NO:27 es un aminoácido ácido;

(2) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 13, 14 y 49 de la secuencia SEQ ID NO: 4 es un aminoácido ácido; la SEQ ID NO: 64, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 31, 32 y 67 de la secuencia SEQ ID NO: 64 es un aminoácido ácido; la SEQ ID NO:65, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 37, 38 y 73 de la secuencia SEQ ID NO: 65 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO:67, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 54, 55 y 90 de la secuencia SEQ ID NO:67 es un aminoácido ácido y la SEQ ID NO: 68, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 13, 14 y 49 de la secuencia SEQ ID NO: 68 es un aminoácido ácido;

(3) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 47, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 47 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 48, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 8 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 49, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 167, 168 y 203 de la SEQ ID NO: 49 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 50, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 173, 174 y 209 de la SEQ ID NO: 50 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 51, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 190, 191 y 226 de la SEQ ID NO: 51 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 52, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 329, 330 y 365 de la SEQ ID NO: 52 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 53, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 329, 330 y 365 de la SEQ ID NO: 53 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 54, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 347, 348 y 383 de la SEQ ID NO: 54 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 55, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 353, 354 y 389 de la SEQ ID NO: 55 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 56, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 370, 371 y 406 de la SEQ ID NO: 56 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO:57, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 57 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 58, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO:58 es un aminoácido ácido y la SEQ ID NO: 59, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 190, 191 y 226 de la SEQ ID NO: 59 es un aminoácido ácido; y

(4) un polipéptido que tiene los aminoácidos en las posiciones identificadas en (1), (2) o (3) y que tiene al menos un 95 % de identidad con un polipéptido de (1), (2) o (3) y que es un antagonista competitivo de señalización de VEGF y angiogénesis,

en donde el aminoácido ácido es E o D.

2. La variante de polipéptido de VEGF para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el aminoácido ácido es E.

3. La variante de polipéptido de VEGF para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la enfermedad **caracterizada por** una angiogénesis patológica es cáncer, degeneración macular o retinopatía diabética.

4. La variante de polipéptido de VEGF para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el cáncer es un cáncer metastásico.

5. Un método para crear un polipéptido capaz de inhibir la angiogénesis: (1) proporcionando un VEGF nativo que comprende un dominio de unión a heparina C-terminal y (2) modificando dicho VEGF nativo para formar una variante de VEGF, en donde la variante de VEGF se selecciona del grupo que consiste en:

(1) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos del grupo que consiste en la SEQ ID NO:25 en la que el aminoácido en las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 25 es un aminoácido ácido, un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 26 en la que el aminoácido en las posiciones 123, 124 y 159 de la

SEQ ID NO: 26 es un aminoácido ácido y un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 27 en la que el aminoácido en las posiciones 13, 14 y 49 de la SEQ ID NO: 27 es un aminoácido ácido; y

(2) un polipéptido que tiene los aminoácidos en las posiciones identificadas en (1) y que tiene al menos un 95 % de identidad con un polipéptido de (1) y que es un antagonista competitivo de la señalización de VEGF y la angiogénesis;

en donde el aminoácido ácido es E o D.

6. El método de la reivindicación 5, en el que la variante de polipéptido se selecciona del grupo que consiste en:

(1) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO:24; y

(2) un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad con un polipéptido de (1) y que es un antagonista competitivo de la señalización de VEGF y la angiogénesis, preferentemente en el que la variante de polipéptido comprende la SEQ ID NO: 7.

7. El método de la reivindicación 5, en el que la variante de polipéptido se selecciona del grupo que consiste en:

(1) la forma madura de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38; y

(2) un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad con un polipéptido de (1) y que es un antagonista competitivo de la señalización de VEGF y la angiogénesis;

(3) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:4, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 13, 14 y 49 de la secuencia SEQ ID NO: 4 es un aminoácido ácido; la SEQ ID NO: 64, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 31, 32 y 67 de la secuencia SEQ ID NO: 64 es un aminoácido ácido; la SEQ ID NO: 65, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 37, 38 y 73 de la secuencia SEQ ID NO:65 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO:67, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 54, 55 y 90 de la secuencia SEQ ID NO:67 es un aminoácido ácido y la SEQ ID NO: 68, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 13, 14 y 49 de la secuencia SEQ ID NO: 68 es un aminoácido ácido; y

(4) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:47, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 47 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 48, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 48 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 49, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 167, 168 y 203 de la SEQ ID NO: 49 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 50, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 173, 174 y 209 de la SEQ ID NO: 50 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 51, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 190, 191 y 226 de la SEQ ID NO: 51 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 52, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 329, 330 y 365 de la SEQ ID NO: 52 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 53, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 329, 330 y 365 de la SEQ ID NO: 53 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 54, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 347, 348 y 383 de la SEQ ID NO: 54 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 55, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 353, 354 y 389 de la SEQ ID NO: 55 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 56, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 370, 371 y 406 de la SEQ ID NO: 56 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 57, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 57 es un aminoácido ácido, la SEQ ID NO: 58, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 149, 150 y 185 de la SEQ ID NO: 58 es un aminoácido ácido y SEQ ID NO: 59, en la que el aminoácido de al menos una de las posiciones 190, 191 y 226 de la SEQ ID NO: 59 es un aminoácido ácido; y

(5) un polipéptido que tiene al menos un 95 % de identidad con un polipéptido de (3) o (4) y que es un antagonista competitivo de la señalización de VEGF y la angiogénesis; en el que el aminoácido ácido es E o D.

8. El método de la reivindicación 5, en el que el aminoácido ácido es E.

9. El método de la reivindicación 5 en el que la afinidad de la variante de polipéptido para VEGFR-1 (FLT-1) y VEGFR-2 (KDR/FLK-1) se mantiene sustancialmente en comparación con dicho VEGF nativo.

10. El método de la reivindicación 5 en el que dicha variante de polipéptido antagoniza la activación de señal KDR.

11. Un polinucleótido que codifica una variante de polipéptido de factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un método para tratamiento de una enfermedad caracterizada por angiogénesis patológica.

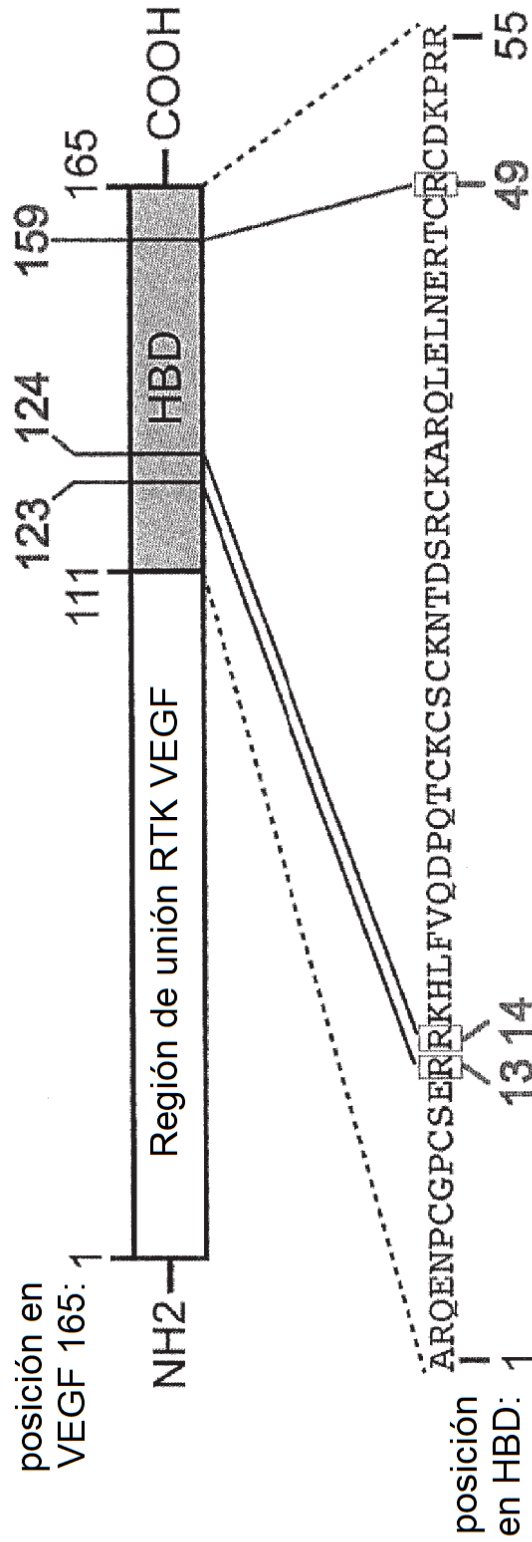
12. El polinucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el polinucleótido comprende la SEQ ID NO: 5.

Figura 1A

Posición	Secuencia	Acceso	Especies
	péptido de señal 1-26 ▲ péptido maduro		
1	MNPLLSWVHWSLALLLHAKWSQAPMAE--GGQNHHEVVAFMDVYQRSYCHPIETLVDLFOEYDPDEIEYIFKPSQV	NP_001165097	H sapiens (Humano)
1	MNPLLSWVHWSLALLLHAKWSQAPMA--DGEHKPHEVVAFMDVYQSYCRPIETLVDLFOEYDPDEIEYIFKPSQV	NP_001009854	F catus (Gato)
1	MNPLLSWVHWSLALLLHAKWSQAPMA--GGEHPHEVVAFMDVYQSYCRPIETLVDLFOEYDPDEIEYIFKPSQV	NP_001103972	C familiaris (Perro)
1	MNPLLSWVHWSLALLLHAKWSQAPMA--EGGOKPHEVVAFMDVYQSYCRPIETLVDLFOEYDPDEIEYIFKPSQV	NP_776641	B Taurus (Bovino)
1	MNPLLSWVHWSLALLLHAKWSQAPMA--EGEHTHEVVAFMDVYQSYCRPIETLVDLFOEYDPDEIEYIFKPSQV	NP_001075290	E caballus (Caballo)
1	MNPLLSWVHWSLALLLHAKWSQAPMT--EGEQKAHEVVAFMDVYQSYCRPIETLVDLFOEYDPDEIEYIFKPSQV	EDM18778	R norvegicus (Rata)
1	MNPLLSWVHWSLALLLHAKWSQAPMT--EGEQKSHEVIAKPMVYQSYCRPIETLVDLFOEYDPDEIEYIFKPSQV	AAH61468	M musculus (Ratón)
1	MNPLLSWVHWSLALLLHAKWSQAPAL--GDGERKPNVIFLVEVRSFCRPIETLVDLFOEYDPDEIEYIFRPSQV	NP_001103825	G gallus (Pollo)
1	MNPLLSWVHWSLALLLHAKWSQAPNP--GEGDHRKPTVVAFKLVYBRSMQVREILLVDLFOEYDPDEIEYIFKPSQV	NP_001091254	X Laevis (Rana)
80	LMRCGGCCNDEGLECVPTSESNITMQIMRIKPHQGHGEMSLQHNKCECRPKD--NARQENPCGPCSER--RKHLFVQ	NP_001165097	H sapiens (Humano)
79	LMRCGGCCNDEGLECVPTSEFNITMQIMRIKPHQGHGEMSLQHSKCECRPKD--NAR--ENPCGPCSER--RKHLFVQ	NP_001009854	F catus (Gato)
79	LMRCGGCCNDEGLECVPTSEFNITMQIMRIKPHQGHGEMSLQHSKCECRPKD--NARQENPCGPCSER--RKHLFVQ	NP_001103972	C familiaris (Perro)
79	LMRCGGCCNDEGLECVPTSEFNITMQIMRIKPHQGHGEMSLQHNKCECRPKD--NARQENPCGPCSER--RKHLFVQ	NP_776641	B Taurus (Bovino)
79	LMRCGGCCNDEGLECVPTSEFNITMQIMRIKPHQGHGEMSLQHSKCECRPKD--NARQENPCGPCSER--RKHLFVQ	NP_001075290	E caballus (Caballo)
79	LMRCAGCCNDEALECVPTSESNITMQIMRIKPHQGHGEMSLQHSRCECRPKD--NTRPENHCPCSER--RKHLFVQ	EDM18778	R norvegicus (Rata)
79	LMRCAGCCNDEALECVPTSESNITMQIMRIKPHQGHGEMSLQHSRCECRPKD--NTRPENHCPCSER--RKHLFVQ	AAH61468	M musculus (Ratón)
80	LMRCAGCCGDEGLECVPTSESNITMQIMRIKPHQGHGEMSLQHSKDCRCPKDDVNRQENHCPCSER--RKHLFVQ	NP_001103825	G gallus (Pollo)
80	LMRCAGCCNDEGLECVPTSESNITMQIMRIKPHQGHGEMSLQHSKDCRCPKDDVNRQENHCPCSER--RKHLFVQ	NP_001091254	X Laevis (Rana)
157	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	NP_001165097	H sapiens (Humano)
155	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	NP_001009854	F catus (Gato)
156	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	NP_001103972	C familiaris (Perro)
156	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	NP_776641	B Taurus (Bovino)
156	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	NP_001075290	E caballus (Caballo)
156	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	EDM18778	R norvegicus (Rata)
158	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	AAH61468	M musculus (Ratón)
158	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	NP_001103825	G gallus (Pollo)
160	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	NP_001091254	X Laevis (Rana)
	dominio de unión a heparina		
	dominio de unión a heparina		
157	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	191 SEQ ID NO:2	
155	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	189 SEQ ID NO:39	
156	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	190 SEQ ID NO:40	
156	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	190 SEQ ID NO:41	
156	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	190 SEQ ID NO:42	
156	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	190 SEQ ID NO:43	
156	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	190 SEQ ID NO:44	
158	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	192 SEQ ID NO:45	
160	DPQTCCKSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR	194 SEQ ID NO:46	
	dominio de unión a heparina		

Figura 1B

Isoformas VEGFA con HBD mínimo: Grupo 1



Secuencias Grupo 1

NP_001165097.1	NP_001020539.2
NP_001165100.1	BAG70265.1
NP_001028928.1	BAG70136.1

Figura 1C

Isoformas VEGFA que contienen HBD empalmado: Grupo 2

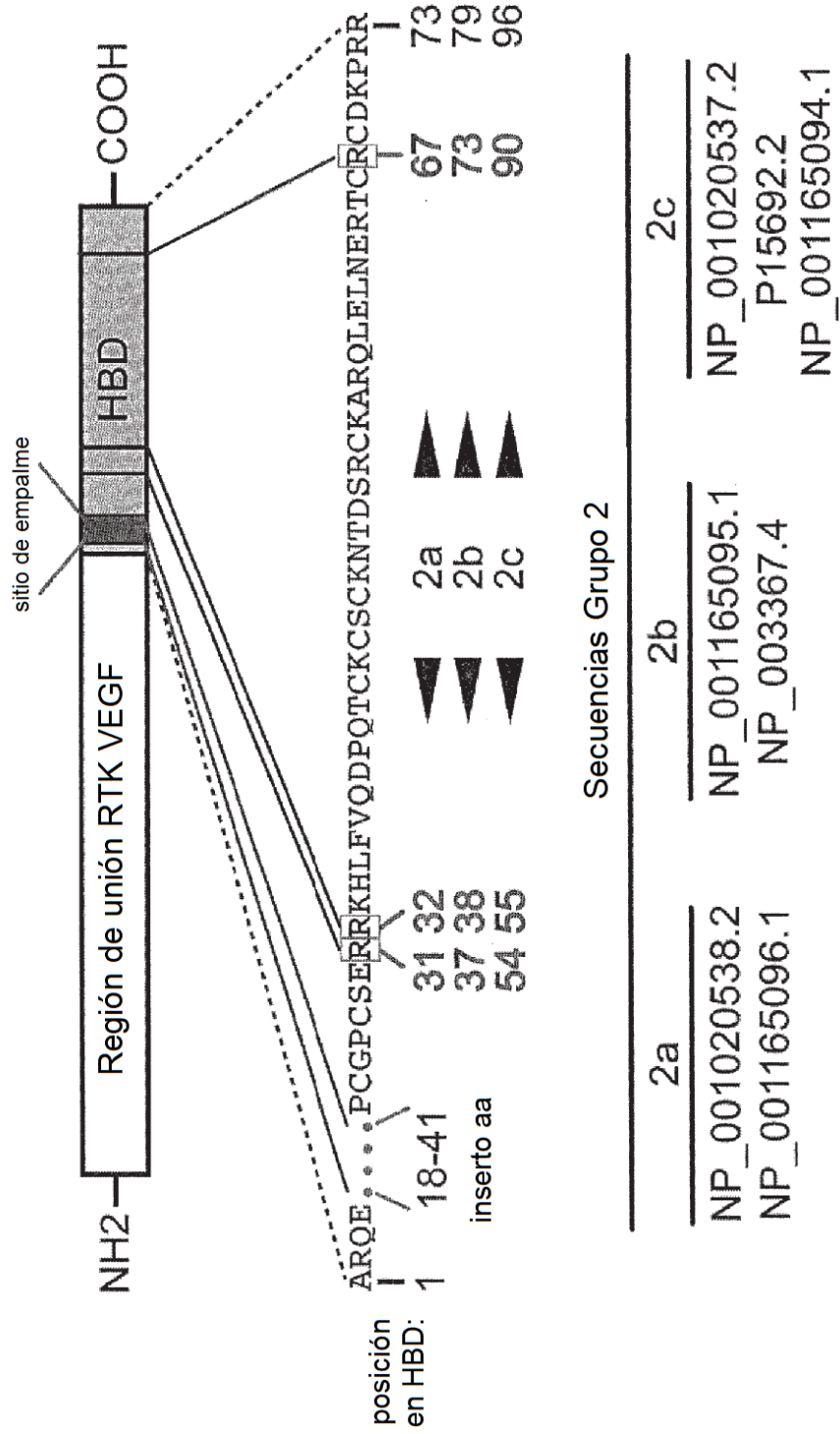


Figura 2

Dominio de unión
HS VEGF 165

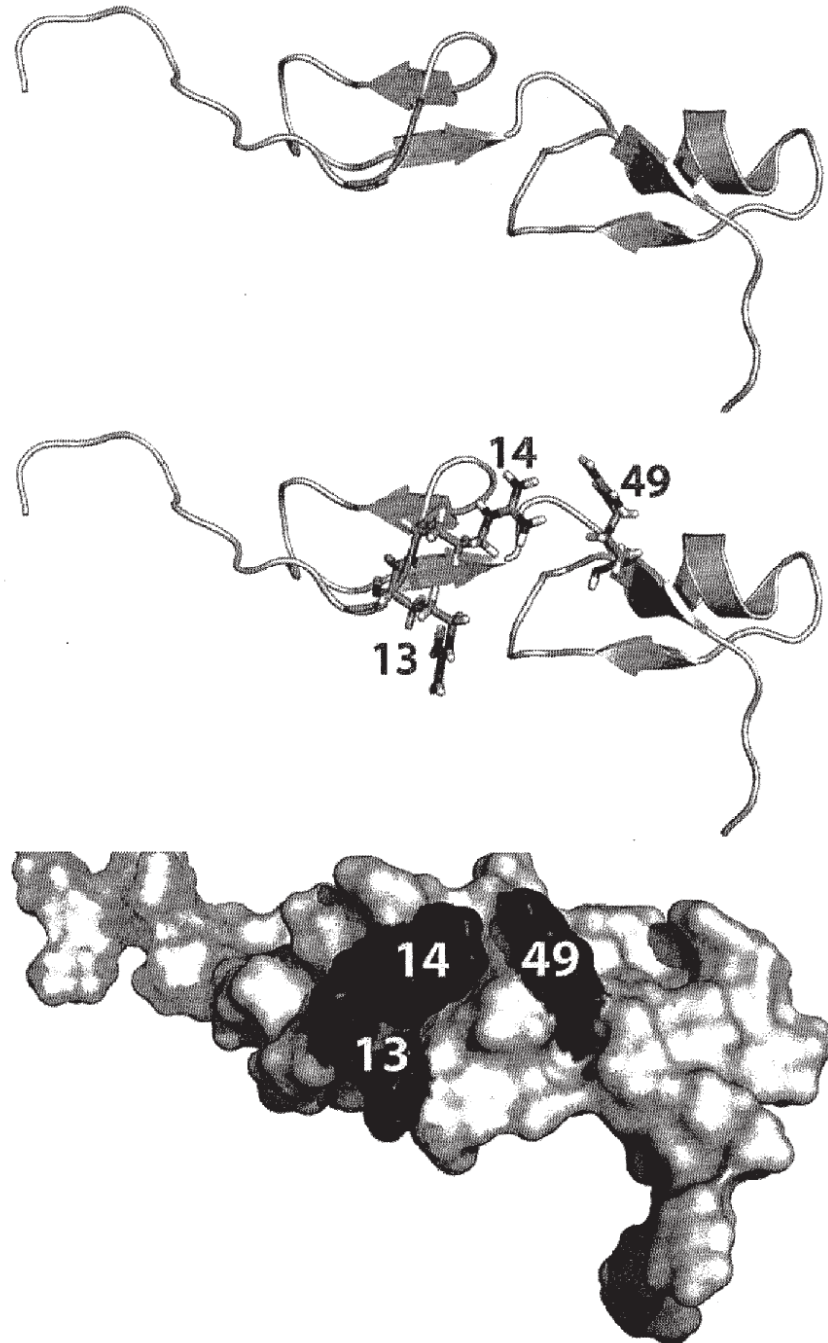


Figura 3

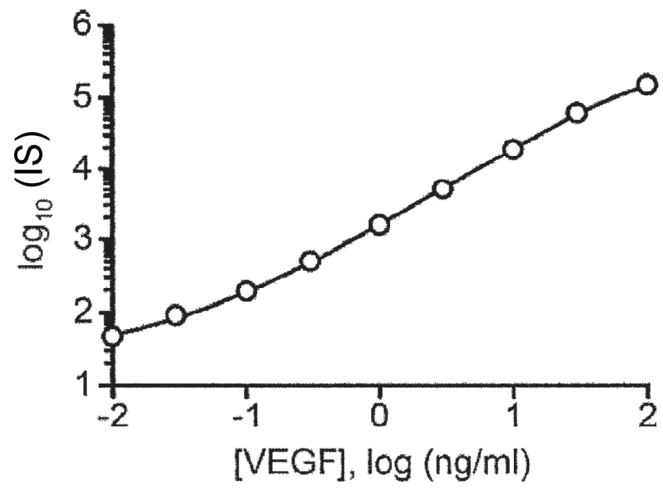


Figura 4

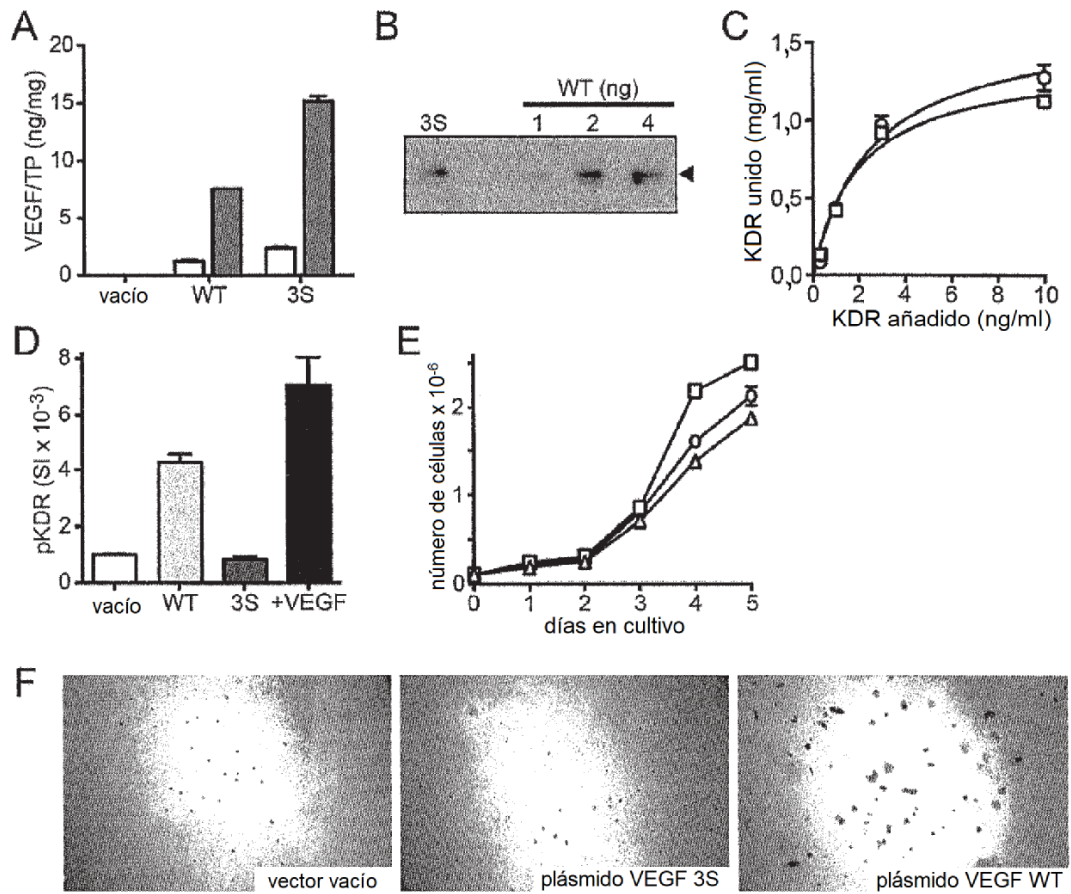
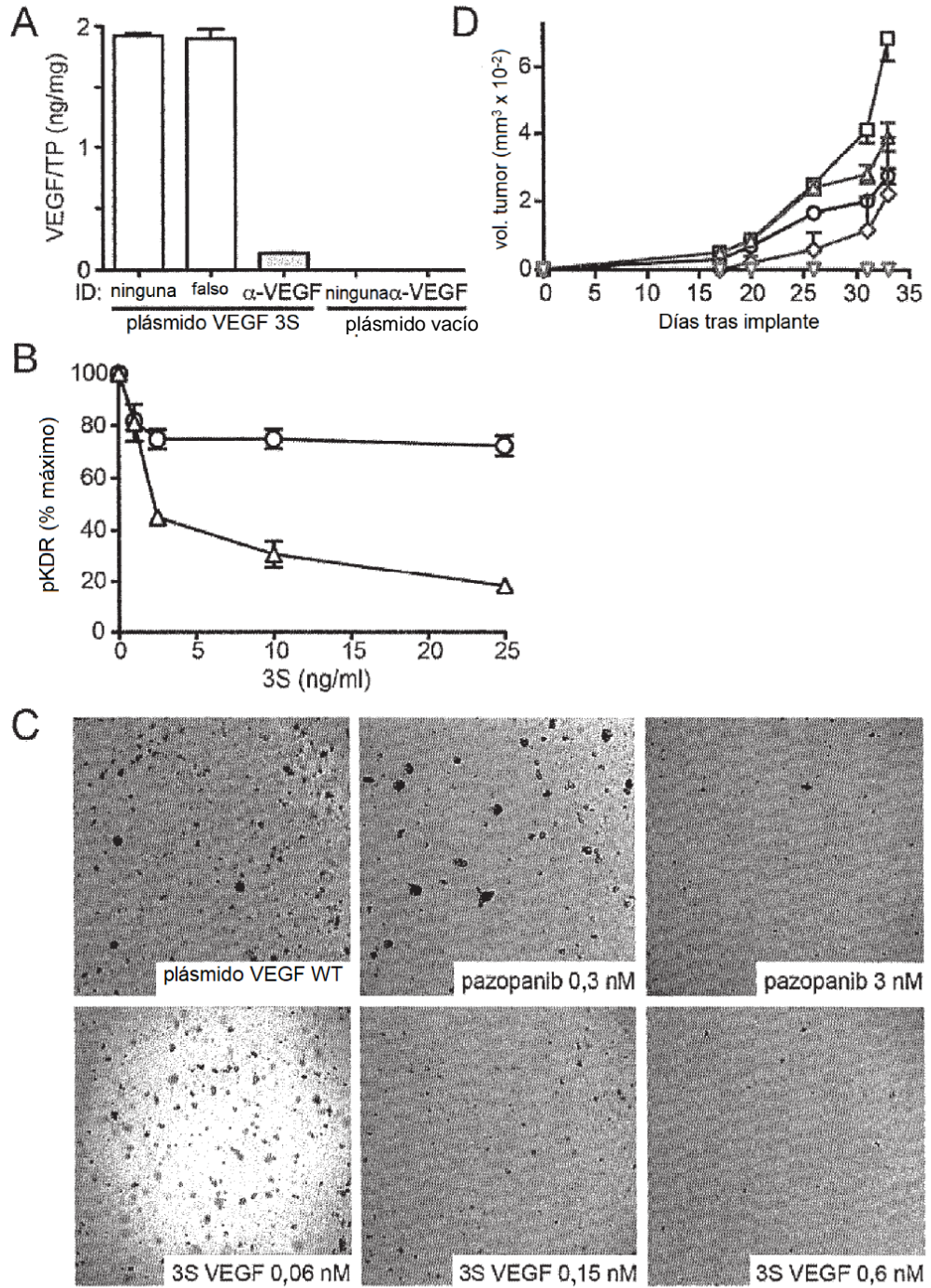


Figura 5



CLUSTAL W (1.83) alineamiento de secuencia múltiple: todas las isoformas hVEGFA

```

GRUPO 1
NP_001165097.1 -----
NP_001165100.1 -----
NP_001028928.1 MTRQTDTAPSPSYHLLPGRRTVDAASRGQGPPEPAGGGVEGVGARGVALKLFVQLLG
NP_001020539.2 MTRQTDTAPSPSYHLLPGRRTVDAASRGQGPPEPAGGGVEGVGARGVALKLFVQLLG
BAG70265.1 -----
BAG70136.1 -----
GRUPO 2
NP_001020538.2 MTRQTDTAPSPSYHLLPGRRTVDAASRGQGPPEPAGGGVEGVGARGVALKLFVQLLG
NP_001165096.1 -----
NP_001165095.1 -----
NP_003367.4 MTRQTDTAPSPSYHLLPGRRTVDAASRGQGPPEPAGGGVEGVGARGVALKLFVQLLG
NP_001020537.2 MTRQTDTAPSPSYHLLPGRRTVDAASRGQGPPEPAGGGVEGVGARGVALKLFVQLLG
P15692.2 -----
NP_001165094.1 -----

GRUPO 1
NP_001165097.1 -----
NP_001165100.1 -----
NP_001028928.1 CSRFGAVVVEAGEAEPSGAARSASSGREGPEPEEGEEEEEKEEERGPQWRLGARKPGSWT
NP_001020539.2 CSRFGAVVVEAGEAEPSGAARSASSGREGPEPEEGEEEEEKEEERGPQWRLGARKPGSWT
BAG70265.1 -----
BAG70136.1 -----
GRUPO 2
NP_001020538.2 CSRFGAVVVEAGEAEPSGAARSASSGREGPEPEEGEEEEEKEEERGPQWRLGARKPGSWT
NP_001165096.1 -----
NP_001165095.1 -----
NP_003367.4 CSRFGAVVVEAGEAEPSGAARSASSGREGPEPEEGEEEEEKEEERGPQWRLGARKPGSWT
NP_001020537.2 CSRFGAVVVEAGEAEPSGAARSASSGREGPEPEEGEEEEEKEEERGPQWRLGARKPGSWT
P15692.2 -----
NP_001165094.1 -----

```

Figura 6

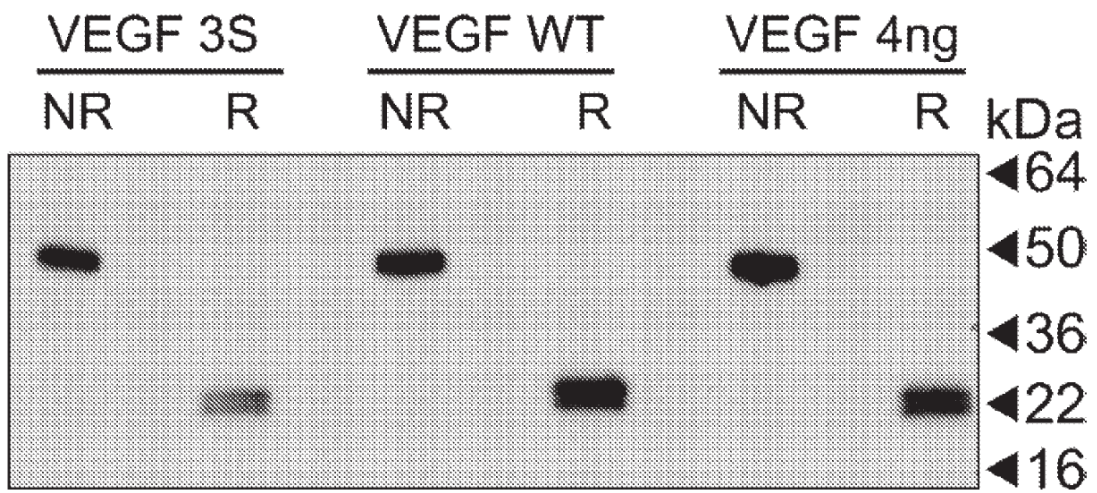


Figura 7

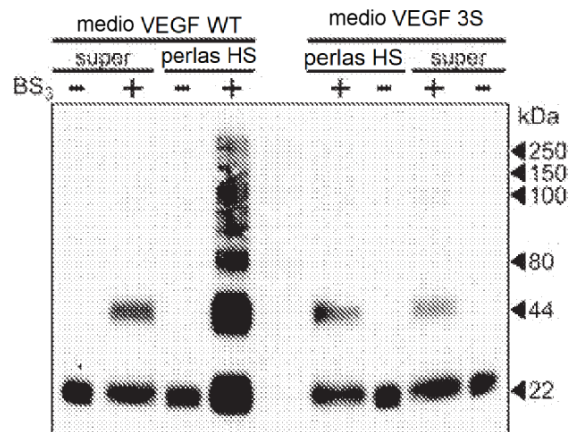


Figura 8

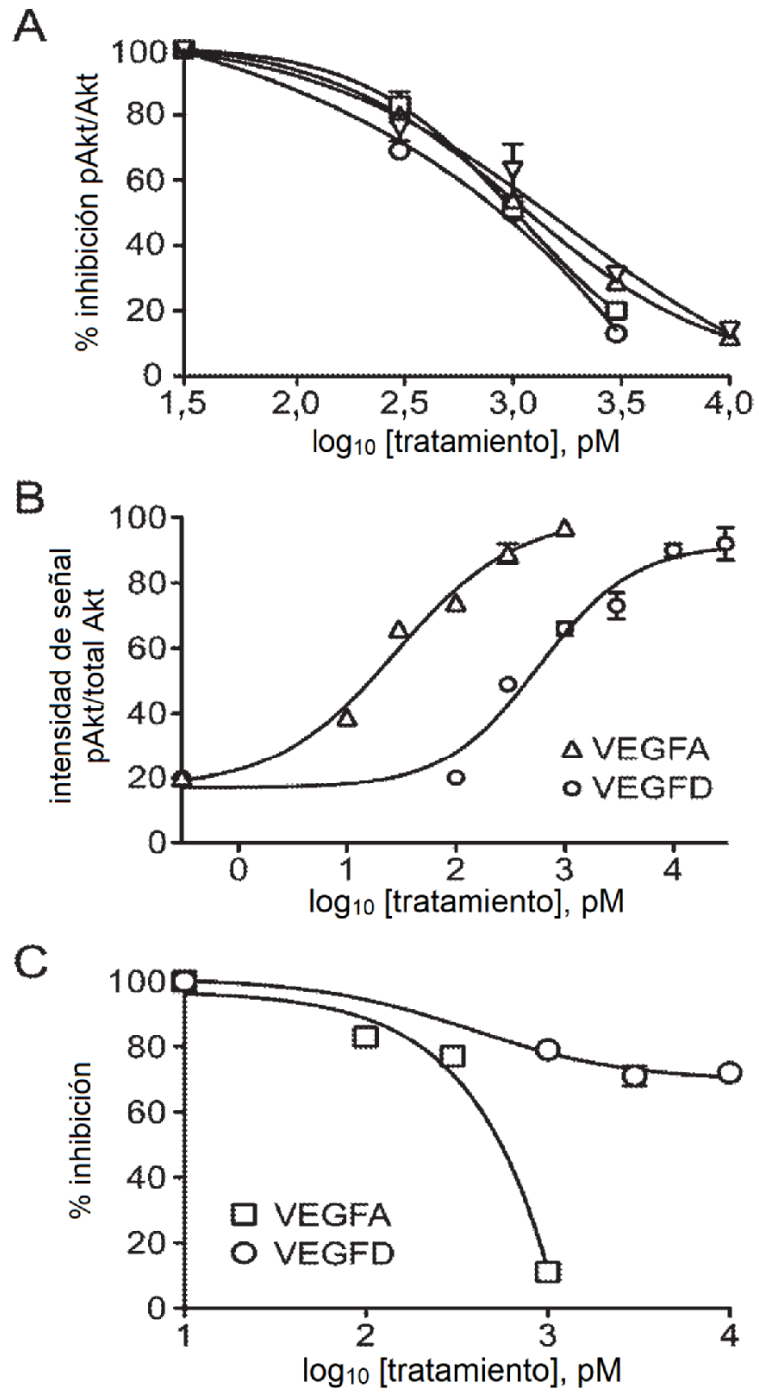


Figura 9

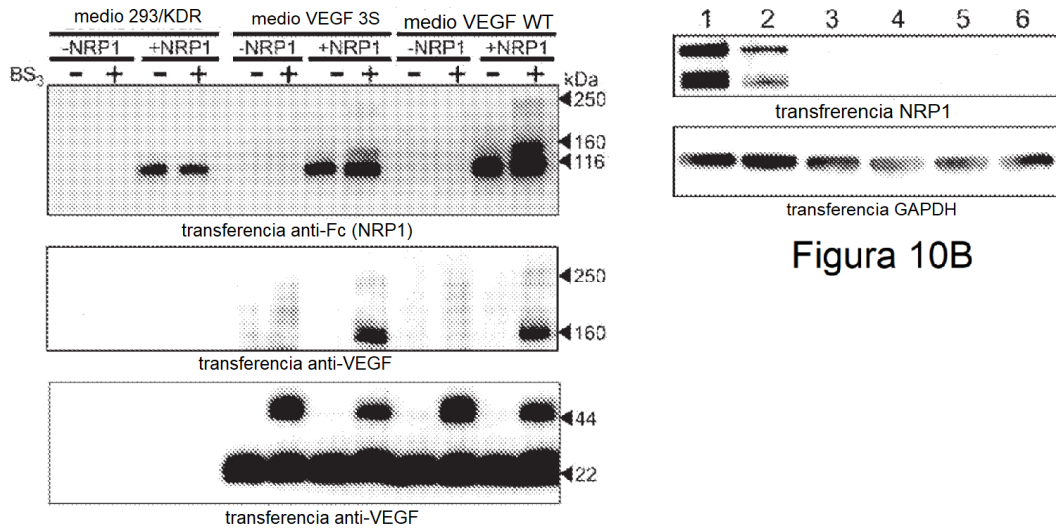


Figura 10B

Figura 10A