

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 623**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62	(2006.01)
C07K 14/71	(2006.01)
C07K 14/715	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 27/02	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)
A61P 9/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2008 PCT/IB2008/000901**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2008 WO08132568**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2008 E 08788817 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2126092**

54 Título: **Proteínas de fusión que se unen a factores de crecimiento**

30 Prioridad:

27.02.2007 US 891769 P

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

05.11.2018

73 Titular/es:

**APROGEN, INC. (100.0%)
BioModel System Park (E-18), KAIST 373-1
Guseong-dong, Yuseong-gu
Daejeon 305-701, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, HAK-ZOO;
KOH, YOUNG, JUN;
KIM, HO-MIN;
JUNG, KEEHOON;
JEON, CHOONJOO y
KOH, GOU, YOUNG**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 688 623 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

Proteínas de fusión que se unen a factores de crecimiento

5 **Antecedentes de la invención****1. Campo de la invención:**

10 La presente invención se refiere al campo de las composiciones anti-angiogénesis. La presente invención también se refiere a una composición que se une de forma sincrónica a dos factores de crecimiento o citocinas diferentes.

2. Descripción de los antecedentes:

15 Existen tres receptores de VEGF conocidos, VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3 en seres humanos. VEGFR1 humano consiste en 1.338 aminoácidos, separados por tres regiones principales: un dominio extracelular que consiste en siete dominios de tipo inmunoglobulina (Ig), un dominio transmembrana y un dominio de tirosina quinasa intracelular (entrada UniProtKB/Swiss-Prot P17948) (**Figura 1**). VEGFR2 y VEGFR3 están organizados de manera similar y muestran aproximadamente 80% de identidad con VEGFR1 en el dominio tirosina quinasa.

20 La activación de VEGFR1 y VEGFR2 por la unión de VEGF-A juega un papel crucial para el crecimiento, la migración y la supervivencia de las células endoteliales sanguíneas, que son procesos esenciales para la angiogénesis y la vasculogénesis, mientras que la activación de VEGFR3 mediante la unión de VEGF-C y VEGF-D juegan un papel principal para el crecimiento, la migración y la supervivencia de las células endoteliales linfáticas, que son procesos esenciales para la linfangiogénesis (Shibuya M y Claesson-Welsh L, Exp. Cell Research 312: 549-560, 2006; Alitalo K, et al., Nature 438:946-953) indicado específicamente de otro modo.

25 La afinidad de VEGF-A por VEGFR1 es aproximadamente 10 veces mayor que la de VEGFR2. Entre 7 dominios de tipo Ig de VEGFR1, el dominio 2 de tipo Ig es esencial para la unión a VEGF-A (**Figura 2**). Sin embargo, el dominio 2 de tipo Ig de VEGFR1 contiene muchos aminoácidos alcalinos y su punto isoelectrónico teórico (pI) es 9,19 (herramienta Compute pI/Mw para entradas Swiss-Prot/TrEMBL, http://kr.expasy.org/tools/pi_tool.html). Por lo tanto, el dominio 2 de tipo Ig de VEGFR1 *per se* no se puede utilizar como proteína terapéutica con propiedad de receptor señuelo porque tiene propiedades farmacocinéticas bajas.

35 La tirosina quinasa con inmunoglobulina y el dominio 2 de homología con inmunoglobulina y factor de crecimiento epidérmico (Tie2) es un receptor tirosina quinasa (RTK) expresado predominantemente en células endoteliales y células hematopoyéticas (Dumont DJ, et al., Oncogene 8: 1293-1301, 1993). Tie2 es crítico para la vasculogénesis, la angiogénesis y la hematopoyesis (Yancopoulos GD, et al., Nature 407:242-248, 2000). Se han identificado cuatro ligandos Tie2: angiopoyetina-1 (Ang1), angiopoyetina-2 (Ang2), angiopoyetina-3 (Ang3) y angiopoyetina-4 (Ang4) (Yancopoulos GD, et al., Nature 407:242-248, 2000). Aunque Ang1 parece ser un activador obligado de Tie2, Ang2 parece tener efectos específicos del contexto, activando este receptor en algunas células mientras bloquea la activación de Tie2 en otras células o en diferentes condiciones (Yancopoulos GD, et al., Nature 407:242-248, 2000).

40 El Tie2 humano consta de 1.124 aminoácidos, separados por tres regiones principales: un dominio extracelular que consiste en dos dominios de tipo Ig, tres dominios de tipo EGF, un dominio de tipo Ig, tres de tipo III de fibronectina; un dominio transmembrana y un dominio de tirosina quinasa intracelular (entrada UniProtKB/Swiss-Prot Q02763) (**Figura 1**).

45 Entre los subdominios extracelulares de Tie2, el dominio 2 de tipo Ig es esencial para la unión a angiopoyetina, pero el dominio 1 de tipo Ig y tres dominios de tipo EGF parecen ser necesarios para la unión estable de la angiopoyetina (**Figura 2**). Es importante destacar que estos subdominios contienen muchos aminoácidos ácidos y su punto isoelectrónico teórico (pI) es 6,55 (herramienta Compute pI/Mw para entradas Swiss-Prot/TrEMBL, http://kr.expasy.org/tools/pi_tool.html). Por lo tanto, estos dominios *per se* se podrían utilizar como proteína terapéutica porque podrían tener un alto valor farmacocinético.

50 De las proteínas de la familia VEGF y angiopoyetina, VEGF-A y angiopoyetina-2 (Ang2) son moléculas críticas para la angiogénesis tumoral (Holash, J. et al., Science 1999; 284:1994-1998; Holash, J. et al., Oncogene 1999; 18:5356-5362) y la metástasis (Saaristo, A. et al., Oncogene 2000; 19:6122-6129), la degeneración macular relacionada con la edad (Otani, A. et al., Invest Ophthalmol. Vis.-Sci., 1999; 40:1912-1920), la retinopatía diabética (Watanabe, D. et al., Am. J. Ophthalmol. 2005; 139:476-481), la artritis reumatoide (Fearon, U. et al., J. Rheumatol. 2003; 30:260-268; Paleolog, E.M. et al., Arthritis Res. 2002; 4:S81-S90), la psoriasis (Kuroda, K. et al., J. Invest Dermatol. 2001; 116:713-720), la inflamación aguda y crónica (McDonald, D.M. et al., Am. J. Respi. Cri. Care Med. 2001; 164:S39-S45; Roviezzo, F. et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005; 314:738-744), la aterosclerosis (Lim HS, et al., Atherosclerosis, 2005; 180:113-118) y las enfermedades proliferativas linfáticas tales como la linfangiogénesis tumoral (Scavelli, C. et al., Leukemia 2004; 18:1054-1058) y la metástasis linfática (Sfiligoi, C. et al., Int. J. Cancer

2003; 103:466-474). Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar un bloqueo sincrónico de VEGF-A y Ang2, preferiblemente con un receptor señuelo, intradiacuerpo (anticuerpo doble) o ARN de interferencia para tratar enfermedades asociadas con VEGF-A y/o Ang2. El documento WO03/020906 A describe productos conjugados de proteína multivalente (MVP) con múltiples dominios de unión a ligando de diferentes receptores para el direccionamiento a múltiples ligandos que están implicados en la regulación del crecimiento celular y la neovascularización. Estas MVP se produjeron utilizando vectores de expresión de sus moléculas de ácido nucleico correspondientes que se unieron operativamente a cebadores. Estas MVP se pueden utilizar para tratar diversas afecciones asociadas con la proliferación celular anómala y la angiogénesis.

10 Compendio de la invención

La invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica:

- 15 (a) la secuencia de nucleótidos expuesta en la Tabla 1 a la que se hace referencia como DAAP núm. 1;
- (b) la secuencia de nucleótidos expuesta en la Tabla 1 a la que se hace referencia como DAAP núm. 13;
- (c) la secuencia de nucleótidos expuesta en la Tabla 1 a la que se hace referencia como DAAP núm. 14;
- (d) la secuencia de nucleótidos expuesta en la Tabla 1 a la que se hace referencia como DAAP núm. 15; o
- 20 (e) una secuencia de nucleótidos que, como resultado de la degeneración del código genético, difiere de la secuencia de nucleótidos de (a), (b), (c) y (d), que codifica una secuencia de aminoácidos idéntica a la expresada a partir de la misma.

La invención también se refiere a un vector que incluye todas las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente. El vector es un vector de expresión.

25 La invención también se refiere a un sistema de anfitrión-vector para la producción de un polipéptido de fusión que incluye el vector de expresión descrito anteriormente en una célula anfitriona adecuada. Tal célula anfitriona adecuada puede incluir una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula de mamífero.

30 La invención también se refiere a un polipéptido de fusión codificado por cualquiera de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas anteriormente.

35 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir un polipéptido de fusión que incluye células en crecimiento del sistema de anfitrión-vector descrito anteriormente, en condiciones que permiten la producción del polipéptido de fusión y la recuperación del polipéptido de fusión así producido. Tal polipéptido de fusión se puede modificar por acetilación o pegilación. La acetilación se puede realizar con un exceso molar de reactivo de acetilación que varía desde al menos aproximadamente un exceso molar de 10 veces a un exceso molar de aproximadamente 100 veces. La pegilación puede ser con PEG 10K o 20K.

40 En otro aspecto más, la invención se dirige a las utilidades, que incluyen la administración a un mamífero que lo necesita, de una cantidad eficaz del polipéptido de fusión descrito en la presente memoria. En ciertos aspectos, la actividad de bloqueo del crecimiento de los vasos sanguíneos puede ser útil para el tratamiento del cáncer, la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética y la artritis reumatoide.

45 En otro aspecto más, la invención se dirige a la utilización, para atenuar o prevenir el crecimiento tumoral en un mamífero, que incluye la administración a un mamífero que lo necesita, de una cantidad eficaz del polipéptido de fusión descrito en la presente memoria.

50 En otro aspecto más, la invención se dirige a la utilización, para atenuar o prevenir el edema en un mamífero, que incluye la administración a un mamífero que lo necesita, de una cantidad eficaz del polipéptido de fusión descrito en la presente memoria. El edema puede ser edema de retina y edema cerebral.

55 En otro aspecto más, la invención se refiere a la utilización, para atenuar o prevenir la formación de ascitis en un mamífero, que incluye la administración a un mamífero que lo necesita, de una cantidad eficaz del polipéptido de fusión descrito en la presente memoria. La ascitis puede estar asociada con el cáncer de ovario.

60 En otro aspecto más, la invención se dirige a la utilización en el tratamiento de la artritis reumatoide o la retinopatía diabética.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se comprenderá más completamente a partir de la descripción detallada proporcionada a continuación, y de los dibujos adjuntos que se proporcionan a modo de ilustración solamente, y por lo tanto no son

limitantes de la presente invención, y en donde;

La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de VEGFR1 humano separado por tres regiones principales: un dominio extracelular que consiste en siete dominios de tipo inmunoglobulina (Ig), un dominio transmembrana y un dominio de tirosina quinasa intracelular. La Figura 1 también muestra un diagrama esquemático de Tie2 humano separado por tres regiones principales: un dominio extracelular que consiste en dos dominios de tipo Ig, tres dominios de tipo EGF, un dominio de tipo III de fibronectina; un dominio transmembrana y un dominio de tirosina quinasa intracelular.

La Figura 2 muestra las interacciones estructurales para la unión entre Ang2 y Tie2 y entre VEGF y VEGFR1. El dominio 2 de tipo Ig de Tie2 es esencial para la unión a angiopoyetina, y el dominio 1 de tipo Ig y tres dominios de tipo EGF parecen ser necesarios para la unión estable de angiopoyetina, mientras que el dominio 2 de tipo Ig de VEGFR1 es esencial para la unión de VEGF-A.

Las Figuras 3A y 3B muestran diagramas esquemáticos de construcciones DAAP (núm. 1, núm. 2, núm. 3 y núm. 4). La Figura 3A muestra conjuntos de subdominios de dominios extracelulares de Tie2 y VEGFR1, y la Figura 3B muestra los aminoácidos correspondientes de Tie2 y VEGFR1. EcoR1 y Xho1 son sitios de enzimas de restricción.

La Figura 4 muestra diagramas esquemáticos de construcciones génicas con respecto a vectores pCMV-dhfr y pCMV-DAAP-dhfr.

La Figura 5 muestra diagramas esquemáticos de construcciones de DAAP (núm. 1, núm. 11, núm. 12, núm. 13, núm. 14, núm. 15, núm. 16 y núm. 17) para conjuntos de subdominio de dominios extracelulares de Tie2 y VEGFR1, y sus correspondientes aminoácidos de Tie2 y VEGFR1.

La Figura 6 muestra diagramas esquemáticos de construcciones DAAP (núm. 11, núm. 12, núm. 13, núm. 14, núm. 15, núm. 16 y núm. 17) para conjuntos de subdominios de dominios extracelulares de Tie2 y VEGFR1, y sus correspondientes aminoácidos de Tie2 y VEGFR1.

La Figura 7 muestra el análisis de transferencia Western para proteínas DAAP (núm. 1, núm. 2, núm. 3, núm. 4, núm. 11, núm. 12, núm. 13, núm. 14, núm. 15, núm. 16 y núm. 17), trampa de VEGF, Tie2-Fc y Fc.

La Figura 8 muestra un diagrama esquemático del ensayo de unión ELISA para DAAP a VEGF-A.

La Figura 9 muestra un diagrama esquemático del ensayo de unión ELISA para DAAP a Ang2.

La Figura 10 muestra los resultados del ensayo de unión ELISA para DAAP a VEGF-A y Ang2.

Las Figuras 11A y 11B muestran un ensayo de unión para la unión competitiva de DAAP a VEGF-A y Ang2.

Las Figuras 12A-12D muestran el análisis de transferencia Western después de la unión *in vitro* de DAAP a VEGF-A y Ang2.

La Figura 13 muestra un diagrama esquemático de la unión sincrónica de VEGF y angiopoyetina a DAAP.

La Figura 14 muestra el tamaño y el estado dimérico de IgFc, DAAP núm. 1, trampa de VEGF y Tie2-Fc. Las proteínas se produjeron en células CHO, se purificaron con cromatografía de afinidad de Sefarosa Proteína A, se cargaron ~2 µg en condiciones reductora y no reductoras en SDS-PAGE, y se tiñeron con azul de Coomassie.

Las Figuras 15A y 15B muestran análisis ELISA de constantes de afinidad de DAAP núm. 1, trampa de VEGF y Tie2-Fc para (A) VEGF-A y (B) Ang2.

Las Figuras 16A y 16B muestran análisis ELISA de unión potenciada adicionalmente de DAAP núm. 1 a VEGF-A o Ang2 cuando DAAP núm. 1 está ocupada previamente con (A) Ang2 o (B) VEGF-A.

La Figura 17 muestra ensayos *in vitro* de interacción y precipitación para detectar interacciones físicas entre DAAP núm. 1, trampa de VEGF o Tie2-Fc y varios tipos indicados de VEGF y angiopoyetinas.

La Figura 18 muestra los valores teóricos del punto isoelectrico de diferentes DAAP.

La Figura 19 muestra un diagrama esquemático del ensayo de unión a matriz extracelular.

La Figura 20 muestra un ensayo ELISA para la unión a la matriz extracelular para diferentes DAAP.

La Figura 21 muestra un ensayo ELISA para la unión a la matriz extracelular para concentraciones más altas de DAAP núm. 1, trampa de VEGF y Tie2-Fc.

La Figura 22 muestra un diagrama esquemático de análisis farmacocinético utilizando ratón.

La Figura 23 muestra los perfiles farmacocinéticos de Fc, DAAP núm. 1, trampa de VEGF y Tie2-Fc.

La Figura 24 muestra un diagrama esquemático de la generación del modelo de tumor de implantación de GFP-LLC y los esquemas de tratamiento de PBS, Fc, DAAP núm. 1, trampa de VEGF y Tie2-Fc.

Las Figuras 25A y 25B muestran los efectos de PBS, Fc, DAAP núm. 1, trampa de VEGF y Tie2-Fc sobre el crecimiento tumoral de GFP-LLC de acuerdo con la Figura 24. A. presenta una fotografía del tamaño tumoral 29 días después de la implantación del tumor y a los 24 días de los tratamientos. B. presenta cambios en los volúmenes tumorales (media ± ET) en cada grupo (n = 4).

La Figura 26 muestra imágenes representativas de vasos sanguíneos en los tumores de ratones tratados con Fc, trampa de VEGF o DAAP núm. 1.

La Figura 27 muestra un diagrama esquemático de generación de modelo de ROP y esquemas de tratamiento de PBS, Fc, DAAP núm. 1, trampa de VEGF y Tie2-Fc.

Las Figuras 28A-28F muestran los efectos de PBS, Fc, DAAP núm. 1, trampa de VEGF y Tie2-Fc en las vasculaturas retinianas del modelo de ratón ROP. A, B, C y D muestran las vasculaturas retinianas de toda la retina, el disco óptico, la porción media y la porción marginal. E y F muestran los efectos de PBS, Fc, DAAP núm. 1, trampa de VEGF y Tie2-Fc sobre el área de mechones neovasculares y la densidad marginal de los

vasos sanguíneos en el modelo de ROP.

Las Figuras 29A-29B muestran la creación de animales modelo de artritis reumatoide. A. muestra un diagrama esquemático para la generación del modelo de ratón experimental de la artritis reumatoide inducida por colágeno tipo II (AIC) y el tiempo de tratamiento. B. muestra puntuaciones medias de artritis clínica en las patas que se determinaron y cuantificaron basándose en la gravedad de la hinchazón, el eritema y la rigidez articular en los momentos indicados.

Las Figuras 30A-30B muestran el tratamiento de la artritis reumatoide. A. muestra hallazgos radiográficos representativos de las articulaciones de rodilla y tobillo de los ratones con AR tratados con los agentes indicados. B. muestra puntuaciones radiográficas de destrucción ósea en las articulaciones de la rodilla, el tobillo y el tarso metatarsiano de los ratones AIC tratados con los agentes indicados. Los valores son la media \pm DT.

Las Figuras 31A-31B muestran el tratamiento de la artritis reumatoide. A. muestra hallazgos histopatológicos representativos de las articulaciones de rodilla y tobillo de los ratones AIC tratados con los agentes indicados durante 18 días. B. muestra puntuaciones histopatológicas de anomalía ósea en las articulaciones de rodilla y tobillo de los ratones AIC tratados con los agentes indicados durante 18 días. Los valores son la media \pm DT.

La TABLA 1 muestra las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de DAAP núm. 1, DAAP núm. 2, DAAP núm. 3, DAAP núm. 4, DAAP núm. 11, DAAP núm. 12, DAAP núm. 13, DAAP núm. 14, DAAP núm. 15, DAAP núm. 16, DAAP núm. 17. En particular, SEQ ID NO: 1 representa la hebra efectora del ácido nucleico representado para DAAP núm. 1. SEQ ID NO: 2 representa la secuencia de aminoácidos representada para DAAP núm. 1.

SEQ ID NO: 3 representa la hebra efectora del ácido nucleico representado para DAAP núm. 2. SEQ ID NO: 4 representa la secuencia de aminoácidos representada para DAAP núm. 2.

SEQ ID NO: 5 representa la hebra efectora del ácido nucleico representado para DAAP núm. 3. SEQ ID NO: 6 representa la secuencia de aminoácidos representada para DAAP núm. 3.

SEQ ID NO: 7 representa la hebra efectora del ácido nucleico representado para DAAP núm. 4. SEQ ID NO: 8 representa la secuencia de aminoácidos representada para DAAP núm. 4.

SEQ ID NO: 9 representa la hebra efectora del ácido nucleico representado para DAAP núm. 11. SEQ ID NO: 10 representa la secuencia de aminoácidos representada para DAAP núm. 11.

SEQ ID NO: 11 representa la hebra efectora del ácido nucleico representado para DAAP núm. 12. SEQ ID NO: 12 representa la secuencia de aminoácidos representada para DAAP núm. 12.

La SEQ ID NO: 13 representa la hebra efectora del ácido nucleico representado para DAAP núm. 13. SEQ ID NO: 14 representa la secuencia de aminoácidos representada para DAAP núm. 13.

SEQ ID NO: 15 representa la hebra efectora del ácido nucleico representado para DAAP núm. 14. SEQ ID NO: 16 representa la secuencia de aminoácidos representada para DAAP núm. 14.

SEQ ID NO: 17 representa la hebra efectora del ácido nucleico representado para DAAP núm. 15. SEQ ID NO: 18 representa la secuencia de aminoácidos representada para DAAP núm. 15.

SEQ ID NO: 19 representa la hebra efectora del ácido nucleico representado para DAAP núm. 16. SEQ ID NO: 20 representa la secuencia de aminoácidos representada para DAAP núm. 16.

SEQ ID NO: 21 representa la hebra efectora del ácido nucleico representado para DAAP núm. 17. SEQ ID NO: 22 representa la secuencia de aminoácidos representada para DAAP núm. 17.

Descripción detallada de la invención

En la presente solicitud, "un", "una, y "uno" se utilizan para referirse tanto a objetos individuales como a una pluralidad de objetos.

Según se utiliza en la presente memoria, "aproximadamente" o "sustancialmente" generalmente proporcionan un margen que no esté limitado a un número exacto. Por ejemplo, según se utiliza en el contexto de la longitud de una secuencia polipeptídica, "aproximadamente" o "sustancialmente" indica que el polipéptido no debe limitarse al número de aminoácidos mencionado. Se pueden incluir algunos aminoácidos añadidos o restados del extremo N o del extremo C siempre que esté presente la actividad funcional tal como su actividad de unión.

Según se utiliza en la presente memoria, la administración "combinada con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

Según se utiliza en la presente memoria, "aminoácido" y "aminoácidos" se refieren a todos los L- α -aminoácidos que se producen de forma natural. Se pretende que esta definición incluya norleucina, ornitina y homocisteína.

Según se utiliza en la presente memoria, en general, el término "variante de secuencia de aminoácidos" se refiere a moléculas con algunas diferencias en sus secuencias de aminoácidos en comparación con un polipéptido de referencia (p.ej., secuencia nativa). Las alteraciones de aminoácidos pueden ser sustituciones, inserciones, deleciones o cualquier combinación deseada de tales cambios en una secuencia de aminoácidos nativa.

Las variantes por sustitución son aquellas en las que se ha eliminado al menos un residuo de aminoácido en una secuencia nativa y se ha insertado un aminoácido diferente en su lugar en la misma posición. Las sustituciones pueden ser únicas, donde solo se ha sustituido un aminoácido en la molécula, o pueden ser múltiples, donde se han sustituido dos o más aminoácidos en la misma molécula.

5 Los sustitutos de un aminoácido dentro de la secuencia se pueden seleccionar entre otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparragina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (alcalinos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. También se incluyen dentro del alcance de la invención proteínas o fragmentos o derivados de los mismos que muestran la misma o similar actividad biológica y derivados que se modifican diferencialmente durante o después de la traducción, p.ej., por glicosilación, escisión proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etcétera.

15 Las variantes de inserción son aquellas con uno o más aminoácidos insertados inmediatamente adyacentes a un aminoácido en una posición particular en una secuencia de aminoácidos nativa. Inmediatamente adyacente a un aminoácido significa conectado al grupo funcional α -carboxi o α -amino del aminoácido.

20 Las variantes de delección son aquellas con uno o más aminoácidos eliminados en la secuencia de aminoácidos nativa. Habitualmente, las variantes de delección tendrán uno o dos aminoácidos eliminados en una región particular de la molécula.

25 Según se utiliza en la presente memoria, "antagonista" se refiere a un ligando que tiende a anular la acción de otro ligando, como un ligando que se une a un receptor celular sin provocar una respuesta biológica.

30 Las actividades biológicas preferidas de los ligandos de la presente invención incluyen la capacidad de inhibir la permeabilidad vascular. La capacidad de inhibir la permeabilidad vascular será útil para el tratamiento de afecciones médicas y enfermedades tales como retinopatía diabética, edema y ascitis. Las actividades biológicas preferidas de los ligandos de la presente invención incluyen la capacidad de mantener la integridad de las células endoteliales (incluida la prevención de la apoptosis). La capacidad para mantener la integridad de las células endoteliales será útil para el tratamiento de afecciones médicas y enfermedades tales como el tratamiento con manitol, la irradiación y la sepsis.

35 También se contempla que las proteínas de fusión DAAP se marquen con una marca detectable, tal como un radioisótopo, una etiqueta fluorescente, una etiqueta enzimática o una etiqueta quimioluminiscente para determinar la interacción de unión ligando-receptor. Como tales, también se contemplan sistemas de ensayo que emplean la molécula química.

40 Según se utiliza en la presente memoria, los "portadores" incluyen portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que se exponen a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el portador farmacéuticamente aceptable es una solución acuosa con el pH tamponado. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS®.

55 Según se utiliza en la presente memoria, "que consiste esencialmente en" cuando se utiliza en el contexto de una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos se refiere a la secuencia que es esencial para llevar a cabo la función prevista del aminoácido codificado por el ácido nucleico.

60 Según se utiliza en la presente memoria, "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para efectuar resultados clínicos o bioquímicos beneficiosos o deseados. Se puede administrar una cantidad eficaz una o más veces. Para los fines de esta invención, una cantidad eficaz de un compuesto inhibidor es una cantidad que es suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, ralentizar o retrasar la progresión del estado de enfermedad.

Según se utiliza en la presente memoria, "fragmentos" o "derivados funcionales" se refiere a variantes de secuencias de aminoácidos biológicamente activas y fragmentos de los ligandos o receptores nativos de la presente invención, así como a modificaciones covalentes, incluyendo derivados obtenidos por reacción con agentes de derivatización orgánicos, modificaciones post-traduccionales, derivados con polímeros no proteináceos e inmunoadhesinas.

Según se utiliza en la presente memoria, "célula anfitriona" incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor de un vector de esta invención. Las células anfitrionas incluyen la progenie de una sola célula anfitriona, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en el complemento de ADN total) a la célula parental original debido a una mutación y/o cambio natural, accidental o deliberado.

Según se utiliza en la presente memoria, "ligando" se refiere a cualquier molécula o agente, o compuesto que se une específicamente de forma covalente o transitoria a una molécula tal como un polipéptido. Cuando se utiliza en cierto contexto, el ligando puede incluir un anticuerpo. En otro contexto, "ligando" puede referirse a una molécula que se pretende que esté unida por otra molécula con alta afinidad, tal como en una trampa de ligando.

Según se utiliza en la presente memoria, "mamífero" para el tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos seres humanos, animales domésticos y de granja, y de zoológicos, de deporte o animales de compañía, tales como perros, gatos, ganado vacuno, caballos, ovejas, cerdos, etcétera. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Según se utiliza en la presente memoria, "portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptables" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, agentes antibacterianos y antifúngicos de recubrimiento, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar en las composiciones ingredientes activos complementarios.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para una fácil administración y una uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación según se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociado con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del material activo y el efecto terapéutico particular que se debe lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de tal material activo para el tratamiento de enfermedades en sujetos vivos que padecen una enfermedad en los que la salud corporal está deteriorada.

El ingrediente activo principal se compone para la administración conveniente y eficaz en cantidades eficaces con un portador farmacéuticamente aceptable adecuado en forma de unidad de dosificación. Una forma de dosificación unitaria puede contener por ejemplo, el compuesto activo principal en cantidades que varían de 0,5 µg a aproximadamente 2.000 mg. Expresado en proporciones, el compuesto activo generalmente está presente en aproximadamente 0,5 µg/ml de portador. En el caso de composiciones que contienen ingredientes activos complementarios, las dosificaciones se determinan mediante la referencia a la dosis habitual y a la forma de administración de dichos ingredientes.

Según se utiliza en la presente memoria, "muestra" o "muestra biológica" son mencionadas en su sentido más amplio, e incluyen cualquier muestra biológica obtenida de un individuo, fluido corporal, línea celular, cultivo de tejidos u otra fuente que pueda contener un factor de unión químico, dependiendo del tipo de ensayo que se vaya a realizar. Como se indica, las muestras biológicas incluyen fluidos corporales, como semen, linfa, sueros, plasma, orina, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, etc. Los métodos para obtener biopsias de tejidos y fluidos corporales de mamíferos son bien conocidos en la técnica.

Según se utiliza en la presente memoria, "sujeto" es un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

Según se utiliza en la presente memoria, la unión "sincrónica" o "de manera sincrónica" se refiere a la unión de la proteína DAAP a dos o más proteínas designadas simultáneamente si las proteínas están disponibles para la unión.

Según se utiliza en la presente memoria, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, sin empeoramiento), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, alivio o paliación del estado de la enfermedad, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. "Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos en los que se debe prevenir el trastorno. "Paliar" una enfermedad significa que el grado y/o las manifestaciones clínicas no deseables de un estado de enfermedad se reducen y/o el curso del tiempo de la progresión se ralentiza o se alarga,

en comparación con una situación sin tratamiento.

Según se utilizan en la presente memoria, "vector", "vector polinucleotídico", "construcción" y "construcción polinucleotídica" se utilizan de forma indistinta en la presente memoria. Un vector polinucleotídico de esta invención puede estar en cualquiera de varias formas, que incluyen, pero no se limitan a, ARN, ADN, ARN encapsulado en un recubrimiento retroviral, ADN encapsulado en un recubrimiento de adenovirus, ADN empaquetado en otra forma viral o de tipo viral (tal como el herpes simple y las adenoestructuras, tales como las poliamidas).

Angiogénesis inflamatoria.

La angiogénesis se define como la formación de vasos nuevos a partir de vasos sanguíneos preexistentes y es un proceso importante en la salud y la enfermedad. La perpetuación de la angiogénesis en enfermedades inflamatorias, tales como la artritis reumatoide, las espondiloartropatías, la psoriasis, la retinopatía diabética, la arterosclerosis, podría facilitar la entrada de células inflamatorias en las regiones patológicas. Estos trastornos asociados con la angiogénesis perpetuada se consideran enfermedades de "angiogénesis inflamatoria". Varios mediadores angiogénicos, que incluyen factores de crecimiento, citocinas, metaloproteinasas de la matriz, macromoléculas de la matriz, receptores de adherencia celular, quimiocinas y receptores de quimiocinas, se han implicado en la angiogénesis inflamatoria. Existe una red reguladora en los tejidos inflamados que está involucrada en la regulación al alza o a la baja de la angiogénesis. (Lainer-Carr y Brahn *Nature Clinical Practice Rheumatology* 3, 434-442, 2007).

El inicio y la propagación de la angiogénesis inflamatoria pueden ocurrir de acuerdo con la siguiente situación. (1) Distintos estímulos (reacción autoinmunitaria, inflamación aguda y crónica, hipoxia aguda y crónica, proliferación de células tumorales, necrosis y apoptosis) provocan la activación de macrófagos residentes y otros fagocitos que causan la liberación de mediadores proinflamatorios. (2) Estos factores derivados de fagocitos activan las células endoteliales para producir moléculas de adherencia, quimiocinas y citocinas. (3) Las moléculas de adherencia y los factores solubles del endotelio activado reclutan y estimulan los fagocitos circulantes aumentando de ese modo la masa de células reactivas. (4) Los fagocitos activados por la remodelación tisular, a su vez, liberan factores solubles que promueven el crecimiento y la migración de las células endoteliales para formar nuevos vasos. La efectividad de los estímulos angiogénicos derivados de fagocitos debe alcanzar una "masa crítica", por lo tanto, la etapa (4) es posible solo después del reclutamiento de fagocitos adicionales.

Factores de crecimiento y citocinas

Se puede elaborar cualquier factor de crecimiento y citocina que se desee que se una simultáneamente, incluidos aquellos que tienen efectos similares sobre la progresión de la enfermedad. Los factores de crecimiento y las citocinas abarcados por la presente invención incluyen, sin limitación, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, P1GF, PDGF, angiopoyetina-1, angiopoyetina-2, angiopoyetina-3, angiopoyetina-4, HGF, EGF, FGF, TNF- α , interleucina-1 β , interleucina-6, interleucina-12, TGF- β , RANKL, etcétera.

Polipéptidos de fusión candidatos para la unión a factores de crecimiento y citocinas

Al poner en práctica la presente invención, se puede utilizar un método para preparar los polipéptidos de fusión que implica los siguientes criterios para preparar selectivamente el polipéptido de fusión. Las regiones de unión de los diferentes receptores para dos o más factores de crecimiento con un efecto similar sobre la progresión de la enfermedad, pueden estar ligadas para bloquear las acciones de los factores de crecimiento dobles, triples o múltiples simultáneamente. Los nuevos polipéptidos de fusión candidatos se pueden escrutar para determinar sus afinidades de unión sincrónicas y se pueden someter a prueba para determinar actividades de neutralización contra factores de crecimiento y citocinas para la unión de cualquier combinación de factores de crecimiento y citocinas. Por ejemplo, VEGF-A y TNF- α ; VEGF-A e interleucina-1 β ; VEGF-A y VEGF-C; VEGF-C y angiopoyetina; VEGF-C y TNF- α ; TNF- α y angiopoyetina; y VEGF-C y HGF. Se puede crear y utilizar cualquier combinación de factores de crecimiento de acuerdo con la presente invención. Las combinaciones se pueden aplicar a la unión triple o múltiple a tres o más factores de crecimiento y no están confinadas a un doble bloqueo enumerado en la presente memoria.

Construcciones de ácidos nucleicos

También se proporciona un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención como se describe en la presente memoria, en donde la molécula de ácido nucleico se une operativamente a una secuencia de control de la expresión. También se proporciona un sistema de anfitrión-vector para la producción de un polipéptido de fusión que comprende el vector de expresión de la invención que se ha introducido en una célula anfitriona adecuada para la expresión del polipéptido de fusión. La célula anfitriona adecuada puede ser una célula bacteriana tal como *E. coli*, una célula de levadura, tal como *Pichia pastoris*, una célula de insecto, tal como *Spodoptera frugiperda*, o una célula de mamífero, tal como una célula COS o CHO.

La presente invención también proporciona métodos para producir los polipéptidos de fusión de la invención

haciendo crecer células del sistema de anfitrión-vector descrito en la presente memoria, en condiciones que permitan la producción del polipéptido de fusión y la recuperación del polipéptido de fusión así producido. Los polipéptidos de fusión útiles para poner en práctica la presente invención se pueden preparar por expresión en un sistema de expresión procariótico o eucariótico.

5 El gen recombinante se puede expresar y el polipéptido se puede purificar utilizando cualquier número de métodos. El gen se puede subclonar en un vector de expresión bacteriano, tal como, por ejemplo, pero no a modo de limitación, pZER0.

10 Los polipéptidos de fusión se pueden purificar mediante cualquier técnica que permita la formación posterior de una proteína estable biológicamente activa. Por ejemplo, y no a modo de limitación, los factores se pueden recuperar de las células como proteínas solubles o como cuerpos de inclusión, a partir de los cuales se pueden extraer cuantitativamente por medio de hidrocloreuro de guanidinio 8 M y diálisis. Para purificar adicionalmente los factores, se puede utilizar cualquier cantidad de métodos de purificación, que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de intercambio iónico convencional, cromatografía de afinidad, cromatografías de diferentes azúcares, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de fase inversa o filtración en gel.

20 Cuando se utiliza en la presente memoria, el polipéptido de fusión incluye moléculas funcionalmente equivalentes en las que los residuos de aminoácido se sustituyen por residuos dentro de la secuencia dando como resultado un cambio silencioso o conservativo. Por ejemplo, se pueden sustituir uno o más residuos de aminoácido dentro de la secuencia por otro aminoácido de una polaridad similar que actúa como un equivalente funcional, dando como resultado una alteración silenciosa o conservativa. Los sustitutos de un aminoácido dentro de la secuencia se pueden seleccionar entre otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparragina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (alcalinos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. También se incluyen dentro del alcance de la invención proteínas o fragmentos o derivados de las mismas que muestran la misma o similar actividad biológica y derivados que se modifican diferencialmente durante o después de la traducción, p.ej., por glicosilación, escisión proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc.

30 Las células que expresan los polipéptidos de fusión de la invención se modifican genéticamente para producirlos mediante, por ejemplo, técnicas de transfección, transducción, electroporación o microinyección.

35 Además, la presente invención contempla el uso de los polipéptidos de fusión descritos en la presente memoria en forma etiquetada.

Cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la técnica para la inserción de fragmentos de ADN en un vector se puede utilizar para construir vectores de expresión que codifican los polipéptidos de fusión de la invención utilizando señales de control de la transcripción/traducción apropiadas y secuencias codificantes de proteínas. Estos métodos pueden incluir técnicas de ADN recombinante y técnicas sintéticas *in vitro* y recombinaciones *in vivo* (recombinación genética). La expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica los polipéptidos de fusión de la invención se puede regular mediante una segunda secuencia de ácido nucleico de modo que el polipéptido de fusión se expresa en un anfitrión transformado con la molécula de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de los polipéptidos de fusión descritos en la presente memoria se puede controlar mediante cualquier elemento promotor/potenciador conocido en la técnica. Los promotores que se pueden utilizar para controlar la expresión del polipéptido de fusión incluyen, pero no se limitan a, la repetición terminal larga como describen Squinto et al., (1991, Cell 65:1-20); la región del promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, Nature 290:304-310), el promotor de CMV, la repetición terminal 5' de M-MuLV del promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787-797), el promotor de la timidina quinasa del herpes (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:144-1445), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42); vectores de expresión procarióticos tales como el promotor de β -lactamasa (Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731), o el promotor *lac* (DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25), véanse también "Useful proteins from recombinant bacteria" en Scientific American, 1980, 242:74-94; elementos promotores de levadura u otros hongos tales como el promotor Gal 4, el promotor de ADH (alcohol deshidrogenasa), el promotor de PGK (fosfoglicerol quinasa), el promotor de fosfatasa alcalina y las siguientes regiones de control transcripcional animal, que muestran especificidad tisular y se han utilizado en animales transgénicos: región de control del gen de elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); la región de control del gen de insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122), la región de control del gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Celda. Biol. 7:1436-1444), la región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder et al., 1986, Cell 45:

485-495), la región de control del gen de la albúmina que es activa en el hígado (Pinkert et al., 1987, Genes y Devel. 1:268-276), la región de control del gen de alfa-fetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf et al., 1985, Mol. Celda. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58); la región de control del gen de alfa 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171), la región de control del gen de la beta-globina que es activa en las células mieloides (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94); la región de control del gen de proteína alcalina de mielina que es activa en células oligodendrocíticas en el cerebro (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); la región de control del gen de la cadena 2 ligera de miosina que es activa en el músculo esquelético (Shani, 1985, Nature 314:283-286), y la región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrópica que es activa en el hipotálamo (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

Así, de acuerdo con la invención, los vectores de expresión capaces de replicarse en un anfitrión bacteriano o eucariótico que comprende ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de fusión como se describe en la presente memoria, y en particular DAAP modificada, se utilizan para transfectar el anfitrión y de este modo dirigir la expresión de semejante ácido nucleico para producir polipéptidos de fusión que después se pueden recuperar en una forma biológicamente activa. Según se utiliza en la presente memoria, una forma biológicamente activa incluye una forma capaz de unirse al receptor relevante y causar una función diferenciada y/o influir en el fenotipo de la célula que expresa el receptor. Tales formas biológicamente activas bloquearían, por ejemplo, las fosforilaciones de los receptores VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 y Tie2, o la inhibición de la síntesis del ADN celular.

Los vectores de expresión que contienen los insertos de ácido nucleico se pueden identificar, sin limitación, por medio de al menos tres enfoques generales: (a) hibridación ADN-ADN, (b) presencia o ausencia de funciones de genes "marcadores" y (c) expresión de secuencias insertadas. En el primer enfoque, la presencia de ácidos nucleicos foráneos insertados en un vector de expresión se puede detectar mediante hibridación de ADN-ADN utilizando sondas que comprenden secuencias que son homólogas a secuencias de ácido nucleico insertadas. En el segundo enfoque, el sistema de vector/anfitrión recombinante se puede identificar y seleccionar de acuerdo con la presencia o ausencia de ciertas funciones de genes "marcadores" (p.ej., actividad de timidina quinasa, resistencia a antibióticos, fenotipo de transformación, formación de cuerpos de oclusión en baculovirus, etc.) causada por la inserción de secuencias de ácidos nucleicos foráneos en el vector. Por ejemplo, si se inserta una secuencia de ácido nucleico *eff* dentro de la secuencia del gen marcador del vector, los recombinantes que contienen el inserto se pueden identificar por la ausencia de la función del gen marcador. En el tercer enfoque, los vectores de expresión recombinantes se pueden identificar ensayando el producto del ácido nucleico foráneo expresado por las construcciones recombinantes. Tales ensayos se pueden basar, por ejemplo, en las propiedades físicas o funcionales del producto de ácido nucleico de interés, por ejemplo, mediante la unión de un ligando a un receptor o parte de la misma que puede estar etiquetada, por ejemplo, con un anticuerpo detectable o porción del mismo o la unión a anticuerpos producidos contra la proteína de interés o una porción de la misma.

El polipéptido de fusión, en particular DAAP modificado de la presente invención, se puede expresar en las células anfitrionas de forma transitoria, constitutiva o permanente.

La invención de la presente memoria proporciona adicionalmente el desarrollo de un polipéptido de fusión como agente terapéutico para el tratamiento de pacientes que padecen trastornos que implican células, tejidos u órganos que expresan los receptores VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 o Tie2. Tales moléculas se pueden utilizar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal, o en un método de diagnóstico.

Las dosis eficaces útiles para tratar estas u otras enfermedades o trastornos se pueden determinar utilizando métodos conocidos por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Fingl, et al., The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman y Gilman, eds. Macmillan Publishing Co, Nueva York, pág. 1-46 (1975). Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la invención incluyen los polipéptidos de fusión descritos anteriormente en un portador líquido, sólido o semisólido farmacológicamente aceptable, unido a un portador o molécula de direccionamiento (p.ej., anticuerpo, hormona, factor de crecimiento, etc.) y/o incorporado en liposomas, microcápsulas y preparación de liberación controlada antes de la administración *in vivo*. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender un polipéptido de fusión en una solución acuosa, tal como agua estéril, solución salina, tampón de fosfato o solución de dextrosa. Alternativamente, los agentes activos pueden estar comprendidos en una formulación sólida (p.ej., cera) o semisólida (p.ej., gelatinosa) que se puede implantar en un paciente que necesite semejante tratamiento. La vía de administración puede ser cualquier modo de administración conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, vía intravenosa, intratecal, subcutánea, intrauterina, mediante inyección en el tejido afectado, intraarterialmente, intranasalmente, oralmente, o mediante un dispositivo implantado.

La administración puede dar como resultado la distribución del agente activo de la invención en todo el organismo o en un área localizada. Por ejemplo, en algunas afecciones que implican regiones distantes del sistema nervioso, puede ser deseable la administración intravenosa o intratecal del agente. En algunas situaciones, se puede colocar un implante que contenga el agente activo en el área lesionada o cerca de esta. Los implantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, espuma gelificada, cera, pulverización o implantes basados en micropartículas.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos de fusión

descritos en la presente memoria, en un vehículo farmacológicamente aceptable. Las composiciones se pueden administrar sistémica o localmente. Se puede utilizar cualquier modo de administración apropiado conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, inyección intravenosa, intratecal, intraarterial, intranasal, oral, subcutánea, intraperitoneal, o mediante inyección local o implante quirúrgico. También se proporcionan formulaciones de liberación sostenida.

Terapia génica

En una realización específica, los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican el polipéptido quimérico se administran para prevenir la extravasación vascular y para la vasculogénesis terapéutica, por medio de terapia génica. La terapia génica se refiere a la terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta realización de la invención, los ácidos nucleicos producen su proteína codificada que media un efecto terapéutico.

Cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica se puede utilizar de acuerdo con la presente invención. Los métodos ilustrativos se describen a continuación.

Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 12:488-505 (1993); Wu y Wu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); Mayo, *TIBTECH* 11 (5):155-215 (1993). Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante que se pueden utilizar son descritos por Ausubel et al., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990).

En un aspecto preferido, las secuencias de ácido nucleico pueden codificar un polipéptido quimérico-Angl o Tie2, en el que las secuencias de ácido nucleico son parte de vectores de expresión que expresan los polipéptidos en un anfitrión adecuado. En particular, tales secuencias de ácido nucleico tienen promotores unidos operablemente a la región codificante de polipéptido, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico del tejido. En otra realización particular, se utilizan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes de polipéptidos y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando de ese modo la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller y Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., *Nature* 342:435-438 (1989).

El suministro de los ácidos nucleicos a un paciente puede ser directo, en cuyo caso el paciente se expone directamente a los vectores que contienen ácidos nucleicos o vectores que portan los ácidos nucleicos, o indirecto, en cuyo caso, las células se transforman primero con los ácidos nucleicos *in vitro*, después se trasplantan al paciente. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

En una realización específica, las secuencias de ácido nucleico se administran directamente *in vivo*, donde se expresan para producir el producto codificado. Esto se puede lograr mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica, p.ej., construyéndolos como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolos de forma que se vuelvan intracelulares, p.ej., mediante infección utilizando vectores retrovirales defectuosos o atenuados u otros vectores virales, o mediante inyección directa de ADN desnudo, o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes transfectantes, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o administrándolos en conexión con un péptido que se sabe que entra en el núcleo, administrándolos en conexión con un ligando sujeto a endocitosis mediada por receptor (véase, p.ej., Wu y Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987)) (que se puede utilizar para localizar tipos de células que expresan específicamente los receptores) etcétera. En otra realización, se pueden formar complejos de ácido nucleico-ligando en los que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para desorganizar los endosomas, lo que permite que el ácido nucleico evite la degradación lisosomal. En otra realización más, el ácido nucleico puede ser elegido como diana *in vivo* para la captación y expresión específicas de células, eligiendo como diana un receptor específico. Alternativamente, el ácido nucleico se puede introducir intracelularmente e incorporar dentro del ADN de la célula anfitriona para la expresión, mediante recombinación homóloga (Koller y Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., *Nature* 342:435-438 (1989)).

En una realización específica, se utilizan vectores virales que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido que se va a utilizar en terapia génica se clonan en uno o más vectores, lo que facilita el suministro del gen a un paciente. Los vectores retrovirales, los vectores adenovirales y los virus adenoasociados son ejemplos de vectores virales que se pueden utilizar. Los vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el empaquetamiento correcto del genoma viral y la integración en el ADN de la célula anfitriona.

Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para suministrar genes al epitelio respiratorio porque naturalmente infectan el epitelio respiratorio donde causan una enfermedad leve. Otras dianas para los sistemas de suministro basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y el músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no están en división. Además, también se ha propuesto el uso de virus adenoasociados (AAV) para la terapia génica.

Otro enfoque para la terapia génica implica la transferencia de un gen a las células en el cultivo de tejidos mediante métodos tales como la electroporación, la lipofección, la transfección mediada por fosfato de calcio o la infección viral. Habitualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. A continuación, las células se colocan bajo selección para aislar aquellas células que han absorbido y expresan el gen transferido. Esas células se suministran después a un paciente.

En esta realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Semejante introducción se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo pero no limitado a transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o de bacteriófago que contiene las secuencias de ácidos nucleicos, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. Se conocen numerosos mecanismos en la técnica para la introducción de genes foráneos en células y se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención, con la condición de que no se interrumpan las funciones fisiológicas y de desarrollo necesarias de las células receptoras. La técnica debería proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que el ácido nucleico sea expresable por la célula y preferiblemente heredable y expresable por su progenie celular.

Las células en las que se puede introducir un ácido nucleico para fines de terapia génica abarcan cualquier tipo de célula disponible, deseado, e incluyen, pero no se limitan a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, p.ej., como las obtenidas a partir de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etcétera.

En una realización preferida, la célula utilizada para la terapia génica es autóloga para el paciente.

En una realización en la que se utilizan células recombinantes en terapia génica, las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido se introducen en las células de manera que sean expresables por las células o su progenie, y las células recombinantes se administran a continuación *in vivo* para que realicen su efecto terapéutico. En una realización específica, se utilizan células madre o progenitoras. Potencialmente se puede utilizar cualquier célula madre y/o progenitora que se pueda aislar y mantener *in vitro* de acuerdo con esta realización de la presente invención.

En una realización específica, el ácido nucleico que se va a introducir para fines de terapia génica comprende un promotor inducible unido operablemente a la región codificante, de forma que la expresión del ácido nucleico sea controlable controlando la presencia o ausencia del inductor de transcripción apropiado.

Composición Terapéutica

En una realización, la presente invención se refiere al tratamiento de diversas enfermedades que se caracterizan por una extravasación vascular o una falta de formación de vasos sanguíneos. De esta manera, el compuesto terapéutico de la invención se puede administrar a pacientes humanos que sufren o son propensos a padecer la enfermedad proporcionando compuestos que activan Tie2.

La formulación de los compuestos terapéuticos es generalmente conocida en la técnica y se puede hacer referencia convenientemente a Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., EE.UU. Por ejemplo, se pueden administrar de aproximadamente 0,05 µg a aproximadamente 20 mg por kilogramo de peso corporal por día. El régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente o la dosis se puede reducir proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. El compuesto activo se puede administrar de una manera conveniente, por ejemplo por vía oral o intravenosa (cuando es soluble en agua), intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica o en supositorio o se puede implantar (p.ej., utilizando moléculas de liberación lenta por vía intraperitoneal o utilizando células p.ej., monocitos o células dendríticas sensibilizadas *in vitro* y transferirlas de manera adoptiva al receptor). Dependiendo de la vía de administración, se puede requerir que el péptido sea recubierto con un material para protegerlo de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar dichos ingredientes.

Por ejemplo, el bajo carácter lipófilo de los péptidos permitirá que sean destruidos en el tracto gastrointestinal por

enzimas capaces de escindir enlaces peptídicos y en el estómago por hidrólisis ácida. Para administrar péptidos por medio de una administración que no sea parenteral, se recubrirán, o se administrarán, con un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, los péptidos se pueden administrar en un coadyuvante, coadministrado con inhibidores de enzimas o en liposomas. Los coadyuvantes contemplados en la presente memoria incluyen resorcinoles, tensioactivos no iónicos tales como polioxietileno oleil éter y n-hexadecil polietileno éter. Los inhibidores enzimáticos incluyen inhibidor de la tripsina pancreática, diisopropilfluorofosfato (DEP) y trasilol. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales.

Los compuestos activos también se pueden administrar por vía parenteral o intraperitoneal. Las dispersiones también se pueden preparar en polietilenglicoles líquidos de glicerol y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de agentes tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tiomersal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir mediante el uso en la composición de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con otros diversos ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos estériles en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la técnica de liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Cuando los péptidos están adecuadamente protegidos como se describió anteriormente, el compuesto activo se puede administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un portador comestible asimilable, o se puede encerrar en una cápsula de gelatina dura o blanda, o se puede comprimir en comprimidos, o se puede incorporar directamente con los alimentos de la dieta. Para la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y utilizar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Tales composiciones y preparaciones deben contener al menos 1% en peso de compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones puede, por supuesto, variar y puede estar convenientemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 80% del peso de la unidad. La cantidad de compuesto activo en tales composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosificación adecuada. Las composiciones o preparaciones preferidas de acuerdo con la presente invención se preparan de manera que una forma unitaria de dosificación oral contenga entre aproximadamente 0,1 µg y 2000 mg de compuesto activo.

Los comprimidos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: un aglutinante tal como goma tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y se puede añadir un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina o un agente aromatizante tal como menta, aceite de gaulteria o aroma de cereza. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un portador líquido. Pueden estar presentes otros diversos materiales como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas pueden estar recubiertos con goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y aromatizante como aroma de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material utilizado para preparar cualquier forma unitaria de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto activo se puede incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

Sistemas de suministro

Se conocen diversos sistemas de suministro y se pueden utilizar para administrar un compuesto de la invención, p.ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor, construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos o composiciones se pueden administrar por cualquier ruta conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p.ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir los compuestos o composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central mediante cualquier ruta adecuada, que incluye la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede ser facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un reservorio, tal como un reservorio Ommaya. La administración pulmonar también se puede emplear, p.ej., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de aerosolización.

En una realización específica, puede ser deseable administrar los compuestos o composiciones farmacéuticas de la invención localmente en el área que necesita tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, p.ej., junto con un vendaje para heridas después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, mediante un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas sialásticas o fibras. Preferiblemente, cuando se administra una proteína, que incluye un anticuerpo o un péptido de la invención, se debe tener cuidado de utilizar materiales a los que la proteína no se absorba. En otra realización, el compuesto o composición se puede suministrar en una vesícula, en particular un liposoma. En otra realización más, el compuesto o composición se puede suministrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede utilizar una bomba. En otra realización, se pueden utilizar materiales poliméricos. En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca de la diana terapéutica, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica.

Marcas

Las marcas enzimáticas adecuadas incluyen, por ejemplo, las del grupo oxidasa, que catalizan la producción de peróxido de hidrógeno por reacción con el sustrato. La glucosa oxidasa es particularmente preferida ya que tiene buena estabilidad y su sustrato (glucosa) se encuentra fácilmente disponible. La actividad de una marca de oxidasa se puede analizar midiendo la concentración de peróxido de hidrógeno formado por la reacción anticuerpo/sustrato marcado con enzima. Además de las enzimas, otras marcas adecuadas incluyen radioisótopos, tales como yodo (^{125}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{111}In), y tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), y marcas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

A continuación se proporcionan marcas adecuadas adicionales para los anticuerpos específicos del complejo de Ang1 quimérico, Tie2 o de Ang1/Tie2 quimérico de la presente invención. Los ejemplos de las marcas enzimáticas adecuadas incluyen malato deshidrogenasa, δ -5-esteroide isomerasa, levadura-alcohol deshidrogenasa, α -glicerol fosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, asparraginasa, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa.

Los ejemplos de marcas radioisotópicas adecuadas incluyen ^3H , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{57}To , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{152}Eu , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{217}Ci , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , etc. ^{111}In es el isótopo preferido cuando se utiliza la formación de imágenes *in vivo* ya que evita el problema de la deshalogenación de polipéptidos marcados con ^{125}I o ^{131}I por el hígado. Además, este radionucleótido tiene una energía de emisión gamma más favorable para las imágenes. Por ejemplo, ^{111}In acoplado con anticuerpos monoclonales con 1-(P-isotiocianatobencil)-DPTA ha mostrado poca absorción en tejidos no tumorales, particularmente en el hígado, y por lo tanto mejora la especificidad de la localización del tumor.

Los ejemplos de marcas isotópicas no radioactivas adecuadas incluyen ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Tr y ^{56}Fe .

Los ejemplos de marcas fluorescentes adecuadas incluyen una marca ^{152}Eu , una marca de fluoresceína, una marca de isotiocianato, una marca de rodamina, una marca de ficoeritrina, una marca de ficocianina, una marca de alooficocianina, una marca de o-ftaldehído y una marca de fluorescamina.

Los ejemplos de marcas de toxina adecuadas incluyen, toxina de Pseudomonas, toxina de difteria, ricina y toxina de cólera.

Los ejemplos de marcas quimioluminiscentes incluyen una marca luminal, una marca isoluminal, una marca de éster de acridinio aromático, una marca de imidazol, una marca de sal de acridinio, una marca de éster de oxalato, una

marca de luciferina, una marca de luciferasa y una marca de aequorina.

Los ejemplos de agentes de contraste de resonancia magnética nuclear incluyen núcleos de metales pesados tales como Gd, Mn y hierro. El deuterio también puede ser utilizado. También existen otros agentes de contraste para EPR, PET u otros mecanismos de formación de imágenes, que son conocidos por los expertos en la técnica.

Las técnicas típicas para unir las marcas descritas anteriormente a los polipéptidos son proporcionadas por Kennedy et al. (1976) Clin. Chim. Acta 70:1-31 y Schurs et al. (1977) Clin. Chim. Acta 81:1-40. Las técnicas de acoplamiento incluyen el método del glutaraldehído, el método del peryodato, el método de la dimaleimida, el método del éster de m-maleimidobencil-N-hidroxi-succinimida.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Protocolo experimental

Se clonaron construcciones génicas que codificaban cuatro proteínas de fusión ensambladas diferentes (DAAP núm. 1, DAAP núm. 2, DAAP núm. 3 y DAAP núm. 4) (**Figura 3A y 3B**) que consisten en el dominio 1 de tipo Ig de Tie2 humana, el dominio 2 de tipo Ig de Tie2 humana, tres dominios de tipo EGF de Tie2 humana, el dominio de tipo Ig de VEGFR1 humano y el dominio Fc de IgG humana en el vector pCMV-dhfr (Hwang SJ, et al., Protein Express Purif. 2005; 39:175-183) (**Figura 4**).

Dado que solo DAAP núm. 1 mostraba una unión sincrónica a VEGF-A y Ang2, se realizaron adicionalmente siete formas modificadas (DAAP núm. 11, DAAP núm. 12, DAAP núm. 13, DAAP núm. 14, DAAP núm. 15, DAAP núm. 16 y DAAP núm. 17) de las construcciones del gen DAAP núm. 1 que codificaban las proteínas de fusión capaces de unirse a VEGF-A y Ang2. (**Figura 5 y Figura 6**).

Todas las proteínas recombinantes de DAAP se obtuvieron mediante expresión transitoria en células HEK293 (Colección de Cultivos Tipo Americana, Manassas, VA) utilizando la transfección liposómica con Effectene de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Inc., Hilden, Alemania). El sobrenadante se recogió de las células transfectadas después de 48-96 horas. Las proteínas recombinantes se purificaron utilizando cromatografía de afinidad con Proteína A - Sefarosa, con posterior elución con ácido y neutralización. Después de la purificación, la proteína se cuantificó utilizando el ensayo de Bradford y se confirmó con tinción con azul de Coomassie de un gel de SDS-PAGE. Para el análisis de transferencia Western, se mezclaron cien nanogramos de cada muestra con tampón de muestra, se desnaturalizaron con calor durante 10 min, se procesaron con SDS-PAGE al 10% y se transfirieron por electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con leche desnatada al 5% en solución tampón Tris (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,05% y se sometió a transferencia Western con anticuerpo anti-Fc humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Dilución 1:10.000; Sigma-Aldrich A0170) para detectar las proteínas fusionadas con Fc. La señal se visualizó mediante detección quimioluminiscente de acuerdo con el protocolo del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech) utilizando un escáner de quimioluminiscencia (LAS-1000, Fuji Film, Tokio) (**Figura 7**).

La capacidad de unión de la proteína recombinante DAAP a VEGF-A o Ang2 se midió mediante el ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) (**Figura 8 y Figura 9**). Dosecientos nanogramos de VEGF-A₁₆₅ (producido a partir de células CHO) (en lo sucesivo VEGF-A) o Ang2 (producido a partir de células CHO) en 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) se dividieron en alícuotas en placas de 96 pocillos y se incubaron a 4°C durante la noche. Después de lavar la placa 3 veces con 400 µl de PBS cada vez, se realizó un bloqueo con la solución de bloqueo (albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en 100 µl de PBS) a 37°C durante 2 horas. Se añadieron 100 nanogramos de cada proteína DAAP en 100 µl de solución de bloqueo a la placa, y se incubaron a 37°C durante 2 horas. La misma cantidad de proteína recombinante de trampa de VEGF (Holash, J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 99: 11393-11398), Tie2-Fc o Fc se añadió y se incubó de la misma manera que un control positivo y negativo. Después de lavar la placa 3 veces con 400 µl de PBS cada vez, se añadieron 50 µl de anticuerpo anti-Fc humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (dilución 1:10.000, Sigma-Aldrich A0170) a la placa, y se incubaron a 37°C durante 2 horas. Después de lavar la placa 3 veces con 400 µl de PBS cada vez, se añadieron 50 µl de solución de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich T0440) a la placa, y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de HCl 1 M y se analizaron los colores reactivos a una densidad óptica de 415 nm mediante un lector de ELISA (BioRad M680).

Las células recombinantes de ovario de hámster chino (rCHO) que expresan la trampa de VEGF (CHO-VT1) se establecieron siguiendo un método descrito anteriormente (Hwang SJ, et al., Protein Express Purif. 2005; 39:175-183). Brevemente, las células CHO-VT1 se establecieron por transfección de un vector que contenía los genes de dihidrofolato reductasa (*dhfr*) y la trampa de VEGF (Holash J. et al., PNAS 99:11393-11398, 2002) en células CHO con deficiencia de *dhfr* (CRL-9096, Colección de Cultivos Tipo Americana, Manassas, Virginia, EE.UU.). Esto estuvo seguido de amplificación del gen mediado por *dhfr*/metotrexato (MTX). Las tres células rCHO estables que

secretaban la trampa de VEGF se seleccionaron con concentraciones de MTX amplificadas en serie (0,02-1,0 μ M, Sigma-Aldrich). Entre ellas, se eligió una línea celular que expresaba la mayor cantidad de trampa de VEGF y se denominó "CHO-VT1". Las células CHO-VT1 se cultivaron y se mantuvieron en medio de Dulbecco modificado de Iscove con suplemento de suero bovino fetal dializado al 5% (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) y MTX 1 μ M (Sigma-Aldrich). Para la producción de proteína trampa de VEGF recombinante, las células CHO-VT1 se inocularon a 2×10^5 células/ml en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 100 ml de medio en un agitador orbital (Vision, Bucheon, Corea) a 110 rpm en una incubadora con 5% de CO₂ humidificada a 37°C. Después de los días indicados, el medio de cultivo que contenía la proteína recombinante trampa de VEGF se purificó utilizando cromatografía de afinidad con Proteína-A Sefarosa, elución con ácido y posterior neutralización. Después de la purificación, la proteína se cuantificó utilizando el ensayo de Bradford y se confirmó con tinción con azul de Coomassie de un gel de SDS-PAGE. El análisis mostró que se recogieron aproximadamente 10 mg/l de trampa de VEGF.

Ejemplo 2

Los análisis ELISA indicaron que DAAP núm. 1, DAAP núm. 14, DAAP núm. 16 y DAAP núm. 17 eran susceptibles de unión a VEGF-A y Ang2 (**Figura 10**). DAAP núm. 2, DAAP núm. 3, DAAP núm. 4, DAAP núm. 11 y Fc no fueron susceptibles de unión a VEGF-A y Ang2 (**Figura 10**). DAAP núm. 12 y trampa de VEGF fueron susceptibles de una unión preferente y selectiva a VEGF-A, mientras que DAAP núm. 13 y Tie2-Fc fueron susceptibles de una unión preferente y selectiva a VEGF-A (**Figura 10**). Debido a que la susceptibilidad de unión de DAAP núm. 1 y DAAP núm. 14 a VEGF-A y/o la de Ang2 era comparable a la de la trampa de VEGF o Tie2-Fc, DAAP núm. 1 y DAAP núm. 14 son probablemente los candidatos más fuertes para un mayor desarrollo como proteínas terapéuticas.

Para examinar si la proteína recombinante de DAAP es capaz de unirse sincrónicamente a VEGF y Ang2, se preincubaron 100 ng de cada proteína recombinante de DAAP (DAAP núm. 1, DAAP núm. 12, DAAP núm. 13, DAAP núm. 14, DAAP núm. 15, DAAP núm. 16 y DAAP núm. 17) con cantidades en serie (0 ng, 10 ng, 100 ng, 1.000 ng) de Ang2 o VEGF-A en 100 μ l de solución de bloqueo a 37°C durante 2 horas antes de su adición a las placas recubiertas con VEGF-A o Ang2 para el ELISA como se describió anteriormente. La misma cantidad de proteína recombinante trampa de VEGF, Tie2-Fc o Fc se preincubó con las cantidades en serie de Ang2 o VEGF-A de la misma manera que un control positivo y negativo. La preincubación de Ang2 o VEGF-A ocupó el sitio de unión de las proteínas DAAP a Ang2 o VEGF-A. En la preincubación de Ang2, DAAP núm. 1, DAAP núm. 12, DAAP núm. 14, DAAP núm. 16, DAAP núm. 17 y trampa de VEGF fueron susceptibles de unión a VEGF (**Figura 11A**). En comparación, en la preincubación de VEGF, DAAP núm. 1, DAAP núm. 13, DAAP núm. 14, DAAP núm. 16, DAAP núm. 17 y Tie2-Fc fueron susceptibles de unión a Ang2 (**Figura 11B**). Por lo tanto, DAAP núm. 1, DAAP núm. 14, DAAP núm. 16 y DAAP núm. 17 son susceptibles de unión de manera sincrónica de VEGF-A y Ang2 (**Figura 12**).

Para un análisis más detallado de las susceptibilidades de unión de DAAP núm. 1, DAAP núm. 14, trampa de VEGF y Tie2-Fc a VEGF-A y Ang2, se realizaron ensayos de unión *in vitro* (**Figura 13**). Se incubaron quinientos nanogramos de cada DAAP núm. 1, DAAP núm. 14, trampa de VEGF o Tie2-Fc con 100 ng de VEGF-A etiquetado con FLAG, Ang2 etiquetado con FLAG, o tanto VEGF-A como Ang2 en 500 μ l de solución tampón Tris (Tris 50 mM NaCl 100 mM, pH 7,5) que contenía Nonidet P-40 al 1,0% a 4°C durante 2 horas. A continuación, se añadieron 20 μ l de esferas de Proteína A agarosa (Oncogene) y se incubaron a 4°C durante otras 2 horas. Las muestras conjugadas con Proteína-A se lavaron 3 veces con 1 ml de solución tampón Tris que contenía Nonidet P-40 al 1,0%. Las muestras se hicieron eluir con tampón de muestra y se desnaturalizaron por calor. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE al 10% y se transfirieron por electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% en solución tampón Tris (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) que contenía Triton X-100 al 0,05% y se inmunotransfirieron mediante transferencia Western con anticuerpo anti-FLAG M2 de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Dilución 1:10.000; Sigma-Aldrich A8592) para detectar VEGF-A etiquetado con FLAG y Ang2 etiquetado con FLAG unidos. La señal se visualizó mediante detección quimioluminiscente de acuerdo con el protocolo del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech) utilizando un escáner de quimioluminiscencia (LAS-1000, Fuji Film, Tokio). La unión *in vitro* indicó que DAAP núm. 1 y DAAP núm. 14 son susceptibles de unión sincrónica a VEGF-A y Ang2 (**Figura 12, Figuras 13A y 13B**). La trampa de VEGF era susceptible de unión a VEGF-A pero no a Ang2 (**Figura 13C**) mientras que Tie2-Fc mostró unión a Ang2 pero no a VEGF-A (**Figura 13D**).

Ejemplo 3

Basándose en los hallazgos anteriores, DAAP núm. 1 se investigó adicionalmente para determinar su uso como una proteína terapéutica. Las células recombinantes de ovario de hámster chino (rCHO) que expresaban DAAP núm. 1 (CHO-DAAP núm. 1) se establecieron siguiendo un método descrito anteriormente (Hwang SJ, et al., Protein Express Purif. 2005; 39:175-183). Brevemente, las células CHO-DAAP núm. 1 se establecieron por transfección de un vector que contenía la construcción del gen de la dihidrofolato reductasa (*dhfr*) y DAAP núm. 1 a células CHO con deficiencia de *dhfr* (CRL-9096, Colección de Cultivos Tipo Americana, Manassas, Virginia, EE.UU.). Esto estuvo seguido de amplificación del gen mediada por *dhfr*/metotrexato (MTX). Las células rCHO estables que secretaban

DAAP núm. 1 se seleccionaron con concentraciones amplificadas en serie de MTX (0,02-1,0 μ M, Sigma-Aldrich). Para la producción de proteína recombinante DAAP núm. 1, las células CHO-DAAP núm. 1 se inocularon a 2×10^5 células/ml en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 100 ml de medio en un agitador orbital (Vision, Bucheon, Corea) a 110 rpm en una incubadora con 5% de CO₂ humidificada a 37°C. Después de los días indicados, el medio de cultivo que contenía la proteína recombinante DAAP núm. 1 se purificó utilizando una cromatografía de afinidad con Proteína-A sefarosa, elución con ácido y posterior neutralización. Después de la purificación, se examinaron el tamaño y el estado dimérico de DAAP núm. 1 en condiciones reductoras y no reductoras mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. **(Figura 14)**. El análisis indica que DAAP núm. 1 es una proteína dimérica (~150 kDa) **(Figura 14)**.

Ejemplo 4

Las susceptibilidades de unión de las proteínas Fc, DAAP núm. 1, trampa de VEGF y Fc a VEGF-A y Ang2 se midieron utilizando el método ELISA. Para la unión a VEGF-A, la placa de 96 pocillos se recubrió con 200 ng de VEGF-A en 100 μ l de PBS por cada pocillo durante la noche. Después de lavar la placa 3 veces con 400 μ l de PBS cada vez, la placa se bloqueó con albúmina de suero bovino al 1% en 100 μ l de PBS a 37°C durante 2 horas. Después de lavar 3 veces con PBS, se incubaron cantidades variables (0, 0,001, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3 nM) de la proteína DAAP núm. 1, Fc, trampa de VEGF o Tie2-Fc en solución de bloqueo a 37°C durante 2 horas. Después de lavar 3 veces con PBS, se incubaron 50 μ l de anticuerpo anti-Fc humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (dilución 1:10.000, Sigma-Aldrich A0170) en solución de bloqueo a 37°C durante 2 h. Después de lavar 3 veces con PBS, se añadieron 50 μ l de solución de TMB (Sigma-Aldrich T0440) a cada pocillo, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μ l de HCl 1 M y se analizaron los colores reactivos a una densidad óptica de 415 nm mediante un lector de ELISA (BioRad M680). Para la unión a Ang2, la placa de 96 pocillos se recubrió con Ang2 de la misma manera descrita anteriormente y también se midieron las susceptibilidades de unión de las proteínas Fc, DAAP núm. 1, trampa de VEGF y Fc a Ang2 de la misma manera descrita anteriormente.

Estos ensayos para las susceptibilidades de unión revelaron que la Kd de DAAP núm. 1 a VEGF-A era ~5 pM y la Kd de la trampa de VEGF a VEGF-A era ~1 pM, mientras que la Kd de DAAP núm. 1 a Ang2 era ~10 nM y la Kd de Tie2-Fc a Ang2 era ~50 nM **(Figura 15)**. La trampa de VEGF no presentó unión a Ang2, Tie2-Fc no presentó unión a VEGF-A **(Figura 15)**.

Ejemplo 5

Debido a que DAAP núm. 1 alberga sitios de unión tanto para VEGF-A como para Ang2, su actividad de unión a VEGF-A o Ang2 puede verse afectada por su cambio conformacional cuando un sitio de DAAP núm. 1 es ocupado primero o ocupado previamente con Ang2 o VEGF-A.

Para probar si la ocupación previa del sitio de unión a VEGF-A de DAAP núm. 1 con VEGF-A influye en la susceptibilidad de unión de Ang2, se incubó previamente la proteína DAAP núm. 1 recombinante con una cantidad creciente (0, 10, 30 100, 300, 1.000 ng/ μ l) de VEGF-A, después se realizó el ensayo ELISA de unión a Ang2 antes mencionado. Por el contrario, para probar si la ocupación previa del sitio de unión a Ang2 de DAAP núm. 1 con Ang2 influye en la susceptibilidad de unión de VEGF-A, se incubó previamente la proteína recombinante DAAP núm. 1 con cantidades crecientes (0, 10, 30, 100, 300, 1000 ng/ μ l) de Ang2, después se realizó el ensayo ELISA de unión a VEGF mencionado anteriormente. Como control, se incubó previamente la proteína trampa de VEGF recombinante con una cantidad creciente (0, 10, 30, 100, 300, 1000 ng/ μ l) de Ang2, después se realizó el ensayo ELISA de unión a VEGF antes mencionado. Como control, se incubó previamente la proteína Tie2-Fc recombinante con una cantidad creciente (0, 10, 30 100, 300, 1000 ng/ μ l) de VEGF-A, después se realizó el ensayo ELISA de unión a Ang2 antes mencionado.

Curiosamente, la ocupación previa de Ang2 a DAAP núm. 1 mejoró la actividad de unión de DAAP núm. 1 a VEGF-A. **(Figura 16A)**. Además, la ocupación previa de VEGF-A con DAAP núm. 1 mejoró la actividad de unión de DAAP núm. 1 a Ang2. **(Figura 16B)**. En comparación, la ocupación previa de VEGF-A con DAAP núm. 1 inhibió la unión adicional de VEGF-A a DAAP núm. 1, y la ocupación previa de Ang2 con DAAP núm. 1 inhibió la unión adicional de Ang2 a DAAP núm. 1 **(Figura 16)**. Tres experimentos repetidos mostraron hallazgos similares. Estos datos indican que DAAP núm. 1 es capaz de unirse simultáneamente tanto a VEGF-A como a Ang2.

Ejemplo 6

Para un análisis más detallado de la susceptibilidad de unión de DAAP núm. 1, se llevó a cabo la unión *in vitro* mediante un ensayo de interacción y precipitación ("pull-down") en presencia de varios tipos de proteínas VEGF y angiopoyetina (n = 3) **(Figura 17)**. Cada 200 ng de proteínas etiquetadas con FLAG (VEGF-A165 humano, VEGF-A164 de ratón, VEGF-A189 humano, VEGF-A121 humano, VEGF-C humano, VEGF-E, Ang2 humana, Ang2 de ratón, Ang1 humana, Ang4 humana, y Angptl4 de ratón) se incubaron con 500 ng de DAAP núm. 1, trampa de VEGF

y Tie2-Fc en 500 µl de solución de tampón Tris (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) que contenía Nonidet P-40 al 1,0% a 4°C durante 2 horas. A continuación, se añadieron 20 µl de esferas de Proteína-A agarosa (Oncogene) y se incubaron a 4°C durante otras 2 h. Las muestras conjugadas con Proteína-A se lavaron 3 veces con 1 ml de solución de tampón Tris que contenía Nonidet P-40 al 1,0%. Las muestras se hicieron eluir con tampón de muestra y se desnaturalizaron por calor. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE al 10% y se transfirieron por electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% en solución de tampón Tris que contenía Triton X-100 al 0,05% y se inmunotransfirieron mediante transferencia Western con anticuerpo anti-FLAG M2 de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (dilución 1:10.000; Sigma-Aldrich A8592). La señal se visualizó mediante detección quimioluminiscente de acuerdo con el protocolo del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech) utilizando un escáner de quimioluminiscencia (LAS-1000, Fuji Film, Tokio). Después de la extracción, la membrana se volvió a sondear para DAAP, trampa de VEGF y Tie2-Fc con anticuerpo anti-Fc humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (dilución 1:10.000, Sigma-Aldrich A0170). DAAP núm. 1 es susceptible de unión a VEGF-A165 humano, VEGF-A164 de ratón, VEGF-A189 humano, VEGF-A121 humano, Ang2 humana, Ang2 de ratón, Ang4 humana, mientras que la trampa de VEGF es susceptible de unión a VEGF-A165 humano, VEGF-A164 de ratón, VEGF-A189 humano y VEGF-A121 humano y Tie2-Fc es susceptible de unión a Ang2 humana, Ang2 de ratón y Ang4 humana (**Figura 17**).

Los valores teóricos del pl en proteínas DAAP recombinantes, dominio 2 de tipo Ig de VEGFR1 que contiene la proteína Fc [VEGFR1(2)-Fc], dominios 2 y 3 de tipo Ig de VEGFR1 que contiene la proteína Fc [VEGFR1(2-3)-Fc], trampa de VEGF y Tie2-Fc se muestran en la **Figura 18**.

Ejemplo 7

En general, los valores más altos de pl de las proteínas se correlacionan con una mayor unión a la matriz extracelular (MEC). La mayor unión a MEC de las proteínas también se correlaciona con propiedades farmacocinéticas inferiores. Se incubaron placas de 96 pocillos recubiertas con MEC (Becton Dickinson Núm. Cat. 354607) con tampón de bloqueo (BSA al 1% en PBS) a 37°C durante 2 horas, se lavaron 3 veces con 400 µl de PBS cada vez. A continuación, se añadieron cantidades variables (0, 0,1, 0,3, 1,0, 3,3, 10, 33, 100 ng) de cada proteína DAAP recombinante en tampón de bloqueo a la placa, y se incubaron a 37°C durante 2 horas (**Figura 19**). Después de lavar la placa 3 veces con 400 µl de PBS cada vez, se añadieron 50 µl de anticuerpo anti-Fc humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (dilución 1:10.000, Sigma-Aldrich A0170) a la placa, y se incubaron a 37°C durante 2 horas. Después de lavar la placa 3 veces con 400 µl de PBS cada vez, se añadieron 50 µl de solución de TMB (Sigma-Aldrich T0440) a la placa, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de HCl 1 M y se analizaron los colores reactivos a una densidad óptica de 415 nm mediante un lector de ELISA (BioRad M680) (**Figura 19**).

El ensayo de unión a MEC reveló que DAAP núm. 1, DAAP núm. 14, DAAP núm. 15 y Tie2-Fc presentaban una unión a MEC muy baja, DAAP núm. 17 y la trampa de VEGF relativamente baja, DAAP núm. 16 moderada y VEGFR1 (2-3)-Fc muy alta, respectivamente (**Figura 20**). Por lo tanto, DAAP núm. 1, DAAP núm. 14, DAAP núm. 15 y Tie2-Fc podrían tener propiedades farmacocinéticas relativamente altas.

El ensayo de unión a MEC se realizó adicionalmente con concentraciones más altas de proteínas DAAP núm. 1, trampa de VEGF y Tie2-Fc. La placa de 96 pocillos recubierta con MEC (Becton Dickinson Núm. Cat. 354607) se incubó con 100 µl de tampón de bloqueo (BSA al 2% en PBS) a 37°C durante 2 horas. La placa se lavó 3 veces con 400 µl de PBS cada vez. A continuación, se añadieron cantidades variables (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 nM) de cada una de las proteínas recombinantes de DAAP núm. 1, trampa de VEGF, Tie2-Fc en tampón de bloqueo a la placa, y se incubaron a 37°C durante 2 horas. Después de lavar 3 veces con PBS, se añadieron a la placa 50 µl de anticuerpo anti-Fc humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (dilución 1:10.000, Sigma-Aldrich A0170) y se incubaron a 37°C durante 2 horas. Después de lavar 3 veces con PBS, se incubaron 50 µl de anticuerpo anti-Fc humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (dilución 1:10.000, Sigma-Aldrich A0170) en solución de bloqueo a 37°C durante 2 h. Después de lavar 3 veces con PBS, se añadieron 50 µl de solución de TMB (Sigma-Aldrich T0440) a cada pocillo, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de HCl 1 M y se analizaron los colores reactivos a una densidad óptica de 415 nm mediante un lector de ELISA (BioRad M680). Este ensayo de unión a MEC (n = 4) reveló que la unión a MEC de DAAP núm. 1 era baja, de Tie2-Fc era muy baja y de la trampa de VEGF era relativamente alta, respectivamente (**Figura 21**).

Ejemplo 8

Se realizó un análisis farmacocinético convencional (n = 3). Se inyectaron 100 µg de proteína recombinante de Fc, DAAP núm. 1, trampa de VEGF o Tie2-Fc por vía subcutánea a ratones C57BL/6 macho de 8 semanas de edad (~25 g de peso corporal), a continuación se tomaron muestras de sangre de la vena de la cola a 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 96 y 144 horas (**Figura 22**). Los niveles en suero de las proteínas DAAP núm. 1 y trampa de VEGF se midieron mediante el método de ELISA de unión a VEGF-A, y Tie2-Fc se midió mediante el método de ELISA de unión a

Ang2. El nivel en suero de la proteína Fc se midió mediante el método ELISA Sándwich utilizando anticuerpo monoclonal de ratón contra IgG1 humana (clon núm. 2C11, Abcam AB1927) como anticuerpo de captura y anticuerpo anti-Fc humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (1:10.000 dilución; Sigma-Aldrich A0170) como anticuerpo de detección. La semivida (T1/2) de Fc, DAAP núm. 1, trampa de VEGF y Tie2-Fc fue -200 h, -48 h, -24 h y -12 h (**Figura 23**). Por lo tanto, la desaparición de DAAP núm. 1 en la sangre fue más lenta que la de la trampa de VEGF en la sangre después de la administración subcutánea (**Figura 23**).

Ejemplo 9

Para examinar el efecto de DAAP núm. 1 sobre el crecimiento del tumor, se implantaron por vía subcutánea 1×10^6 de células de carcinoma de pulmón de Lewis marcadas con proteína fluorescente verde (GFP-LLC) en la región afeitada del flanco derecho de ratones C57BL/6 macho de 8 semanas de edad. Cinco días después de la implantación, los ratones se dividieron en 5 grupos para el tratamiento: Grupo 1 (n = 4), PBS (100 μ l), Grupo 2 (n = 4), Fc (25 mg/kg), Grupo 3 (n = 4), DAAP núm. 1 (25 mg/kg); Grupo 4 (n = 4), trampa de VEGF (25 mg/kg); Grupo 5 (n = 4), Tie2-Fc (25 mg/kg). Estos agentes se administraron mediante inyección subcutánea en días alternos (**Figura 24**). El tamaño del tumor en crecimiento se midió cada 6 días mediante calibres utilizando la fórmula, ancho x largo x profundidad x 0,5.

En comparación con el tratamiento con PBS de control, DAAP núm. 1 y la trampa de VEGF produjeron una marcada inhibición del crecimiento tumoral LLC, mientras que Fc y Tie2-Fc no produjeron inhibición significativa del crecimiento tumoral LLC (**Figura 25**). La inhibición del crecimiento tumoral por DAAP núm. 1 fue más marcada que la de la trampa de VEGF (**Figura 25**). Por lo tanto, la potencia de la inhibición del crecimiento tumoral es DAAP núm. 1 > trampa de VEGF > Tie2-Fc > Fc > PBS.

Ejemplo 10

Para examinar los cambios en los vasos sanguíneos del tumor, en los días indicados, los ratones a los que se habían implantado células GFP-LLC se anestesiaron mediante inyección intramuscular de una combinación de anestésicos (80 mg/kg de ketamina y 12 mg/kg de xilazina), y los tumores se fijaron por perfusión vascular sistémica de paraformaldehído al 1% en PBS, se extrajeron, se incluyeron con medio de congelación tisular (Leica, Nussioch, Alemania) y se crio-seccionaron a 10 μ m de espesor. Después de bloquear con suero de burro al 5% en PBST (Triton X-100 al 0,3% en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente, los tejidos seccionados se incubaron con anticuerpo anti-PECAM-1 de ratón, clon de hámster 2H8, 1:1.000 (Chemicon International, Temecula, CA). Después de varios lavados en PBST, las muestras se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpo anti-IgG de hámster conjugado con Cy3, 1:1.000 (Jackson ImmunoResearch). Se visualizaron las señales fluorescentes, y se obtuvieron imágenes digitales utilizando un microscopio invertido Zeiss, un microscopio Zeiss ApoTome o un microscopio confocal Zeiss LSM 510 equipado con láseres de argón y helio-neón (Carl Zeiss). Las mediciones de la morfometría y las densidades de los vasos sanguíneos en las secciones de tejido tumoral se realizaron con inmunotinción PECAM-1 utilizando un análisis fotográfico en el soporte lógico ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) o utilizando un microscopio Zeiss ApoTome acoplado a una cámara monocromática de dispositivo de carga acoplada (CCD) y un soporte lógico de análisis de imágenes (AxioVision, Zeiss).

A los 29 días de la implantación de las células GFP-LLC, se formaron densidades más altas y vasos sanguíneos bien conectados en el tumor LLC tratado con PBS (**Figura 26**). Se observó el recorte de los vasos sanguíneos del tumor mediante el tratamiento con trampa de VEGF (**Figura 26**), mientras que se observó el recorte y el estrechamiento de los vasos sanguíneos del tumor mediante el tratamiento con DAAP núm.1 (**Figura 26**).

Ejemplo 11

La angiogénesis ocular anormal que acompaña a la extravasación vascular y el edema en la retina es una causa principal de la retinopatía diabética y de la degeneración macular relacionada con la edad. El modelo de ratón con angiogénesis ocular anormal se puede preparar mediante la exposición del ratón neonatal a una atmósfera hiperóxica, es decir, "retina del prematuro (ROP) o retinopatía inducida por oxígeno" (**Figura 27**). La retinopatía inducida por oxígeno se introdujo en ratones C57/BL6 de tipo salvaje. Los ratones recién nacidos y su madre lactante fueron expuestos a 75% de oxígeno (se utilizó el controlador de oxígeno de la cámara PRO-OX 110) entre el día 7 después del nacimiento (P7) y P12 que produjo obliteración de los vasos y cese del desarrollo vascular en los lechos capilares de la retina central (**Figura 27**). El retorno de los animales a unas condiciones de aire de la sala de normoxia en P12 produce una retina central isquémica e hipóxica, y da como resultado la neovascularización prerretiniana (**Figura 27**). En cada grupo {control con PBS (n = 4), Fc (n = 4), Tie2-Fc (n = 4), trampa de VEGF (n = 4), DAAP (n = 4)}, los animales P12 recibieron una inyección subcutánea de cada proteína (25 mg/kg) cada dos días hasta P16 y se sacrificaron en P17 (**Figura 27**).

A continuación, se realizaron los montajes completos de retina y la tinción inmunohistoquímica para vasos sanguíneos de la siguiente manera. Los globos oculares se enuclearon de los ratones de inmediato y se fijaron en

paraformaldehído al 4% (PFA) a 4°C durante 2 horas. Las retinas se aislaron en PBS, se bloquearon 1 hora a 25°C con Triton X-100 en TBS al 0,3% (TBS-T) que contenía suero de burro (al 5% Jackson Immuno Research) y se tiñeron con anticuerpo PECAM-1, clon de hámster 2H8, Dilución 1:1.000 (Chemicon International, Temecula, CA) durante la noche a 4°C. Después de lavar seis veces en TBS-T, las muestras se incubaron con anticuerpo de anti-IgG de hámster conjugado con Cy3 dilución 1:1.000 durante 4 h a 25°C. Después de lavar otras seis veces en TBS-T, las retinas se montaron completamente en portaobjetos de microscopio Superfrost/Plus (12-550-15, Fisher) con el fotorreceptor hacia abajo e incrustado en el reactivo VECTASHIELD (Vector).

La vasculatura retiniana P17 teñida con PECAM-1 mostró un patrón de la retina de vasos sanguíneos completos para cada grupo (**Figura 28A**). En la región del disco óptico de alto aumento, se detectó un mayor número de vénulas retinianas en brote en los grupos tratados con PBS, Fc y Tie2-Fc, mientras que el número de vénulas retinianas en brote se redujo marcadamente en los grupos con DAAP núm. 1 y VEGF (**Figura 28B**). El número de micromechones vasculares en los vasos retinianos, una característica típica de la retinopatía, se incrementó en gran medida en los grupos tratados con PBS, Fc y Tie2-Fc, mientras que el número de micromechones vasculares en las vénulas retinianas se redujo notablemente en los grupos tratados con DAAP núm. 1 y trampa de VEGF (**Figura 28C**). La densidad de los vasos sanguíneos y la tortuosidad del margen retiniano se incrementaron en gran medida en los grupos tratados con PBS, Fc y Tie2-Fc, mientras que estos se redujeron notablemente en los grupos tratados con DAAP núm. 1 y trampa de VEGF (**Figura 28D**). El análisis de cuantificación reveló que la formación de micromechones vasculares inducida por ROP en los vasos retinianos y el aumento de la densidad de los vasos retinianos marginales se inhibieron potentemente mediante los tratamientos con DAAP núm. 1 y trampa de VEGF (**Figura 28E y 28F**). De estos, la potencia de DAAP núm. 1 fue mayor que la de la trampa de VEGF. Estos datos indican que DAAP núm. 1 es más eficaz que la trampa de VEGF para el tratamiento de pacientes con retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad.

La angiogénesis inflamatoria es un sello distintivo y un factor contribuyente crítico en la progresión de la artritis reumatoide (Lainer-Carr y Brahn, 2007, Nature Clinical Practice Rheumatology 3:434-442). Por lo tanto, si se inhibe la angiogénesis inflamatoria, se podría reducir la progresión y la destrucción articular de la AR. Para la inducción de artritis inducida por colágeno (CIA) como modelo de ratón experimental de AR, se inmunizaron ratones DBA/1J macho por vía intradérmica en la base de la cola con colágeno bovino de tipo II emulsionado en un volumen igual de coadyuvante completo de Freund (**Figura 29A**). Tres semanas después, los ratones recibieron un refuerzo de la misma manera (**Figura 29A**). Los ratones con AIC se trataron mediante inyecciones subcutáneas de tampón de control (n = 5), Fc-proteína (25 mg/kg) (n = 5), trampa de VEGF (25 mg/kg) (n = 6) o DAAP núm. 1 (25 mg/kg) (n = 6) dos veces por semana durante 18 días (**Figura 29A**). La gravedad de la enfermedad se puntuó clínicamente para cada pata con el siguiente sistema: grado 0, sin hinchazón; grado 1, ligera hinchazón y eritema; 2, edema pronunciado; 3, rigidez de la articulación (**Figura 29B**). El análisis radiográfico se realizó utilizando imágenes mamográficas modificadas y las puntuaciones se determinaron en las articulaciones de la rodilla, el tobillo y el tarso metatarsiano (**Figura 30**). A los 18 días del inicio de los tratamientos, también se realizó un análisis histopatológico y se determinaron las puntuaciones (**Figura 31**). En general, la trampa de VEGF y DAAP núm. 1 aliviaron las puntuaciones clínicas y las anomalías radiológicas e histológicas, mientras que el tampón de control y la proteína Fc no produjeron ningún efecto atenuante en la gravedad de la enfermedad y la destrucción articular de la AR. Sin embargo, notablemente, el efecto de DAAP núm. 1 es superior al efecto de la trampa de VEGF en la reducción de la puntuación clínica y las progresiones de las anomalías radiográficas e histopatológicas de la AR. Por lo tanto, DAAP núm. 1 podría ser un agente terapéutico potencial para tratar a los pacientes con AR.

No se debe considerar que la presente invención tenga un alcance limitado por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria. De hecho, varias modificaciones de la invención, además de las descritas en la presente memoria, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y de las figuras adjuntas. Se pretende que tales modificaciones entren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración de la presente invención, y no a modo de limitación.

TABLA 1

DAAP núm. 1

```

      10      20      30      40      50      60
ATG GAC TCT TTA GCC AGC TTA GTT CTC TGT GGA GTC AGC TTG CTC CTT TCT GGA ACT GTG
TAC CTG AGA AAT CCG TCG AAT CAA GAG ACA CCT CAG TCG AAC GAG GAA AGA CCT TGA CAC
Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Leu Ser Gly Thr Val
1 _____ 5 _____ SECUENCIA SEÑAL hTIE2 _____ 15 _____ 20

      70      80      90      100     110     120
GAA GGT GCC ATG GAC TTG ATC TTG ATC AAT TCC CTA CCT CTT GTA TCT GAT GCT GAA ACA
CTT CCA CGG TAC CTG AAC TAG AAC TAG TTA AGG GAT GGA GAA CAT AGA CTA CGA CTT TGT
Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu Pro Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr
21_22 23 _____ 25 _____ DOMINIO 1 IG hTIE2 _____ 35 _____ 40

      130     140     150     160     170     180
TCT CTC ACC TGC ATT GCC TCT GGG TGG CGC CCC CAT GAG CCC ATC ACC ATA GGA AGG GAC
AGA GAG TGG ACG TAA CCG AGA CCC ACC GCG GGG GTA CTC GGG TGG TGG TAT CCT TCC CTG
Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly Trp Arg Pro His Glu Pro Ile Thr Ile Gly Arg Asp
41 _____ 45 _____ DOMINIO 1 IG hTIE2 _____ 55 _____ 60

      190     200     210     220     230     240
TTT GAA GCC TTA ATG AAC CAG CAC CAG GAT CCG CTG GAA GTT ACT CAA GAT GTG ACC AGA
AAA CTT CGG AAT TAC TTG GTC GTG GTC CTA GGC GAC CTT CAA TGA GTT CTA CAC TGG TCT
Phe Glu Ala Leu Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg
61 _____ 65 _____ DOMINIO 1 IG hTIE2 _____ 75 _____ 80

      250     260     270     280     290     300
GAA TGG GCT AAA AAA GTT GTT TGG AAG AGA GAA AAG GCT AGT AAG ATC AAT GGT GCT TAT
CTT ACC CGA TTT TTT CAA CAA ACC TTC TCT CTT TTC CGA TCA TTC TAG TTA CCA CGA ATA
Glu Trp Ala Lys Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile Asn Gly Ala Tyr
81 _____ 85 _____ DOMINIO 1 IG hTIE2 _____ 95 _____ 100

      310     320     330     340     350     360
TTC TGT GAA GGG CGA GTT CGA GGA GAG GCA ATC AGG ATA CGA ACC ATG AAG ATG CGT CAA
AAG ACA CTT CCC GCT CAA GCT CCT CTC CGT TAG TCC TAT GCT TGG TAC TTC TAC GCA GTT
Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg Ile Arg Thr Met Lys Met Arg Gln
101 _____ 105 _____ DOMINIO 1 IG hTIE2 _____ 115 _____ 120

      370     380     390     400     410     420
CAA GCT TCC TTC CTA CCA GCT ACT TTA ACT ATG ACT GTG GAC AAG GGA GAT AAC GTG AAC
GTT CGA AGG AAG GAT GGT CGA TGA AAT TGA TAC TGA CAC CTG TTC CCT CTA TTG CAC TTG
Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn
121 122 _____ 125 _____ DOMINIO 2 IG hTIE2 _____ 135 _____ 140

      430     440     450     460     470     480
ATA TCT TTC AAA AAG GTA TTG ATT AAA GAA GAA GAT GCA GTG ATT TAC AAA AAT GGT TCC
TAT AGA AAG TTT TTC CAT AAC TAA TTT CTT CTT CTA CGT CAC TAA ATG TTT TTA CCA AGG
Ile Ser Phe Lys Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser
141 _____ 145 _____ DOMINIO 2 IG hTIE2 _____ 155 _____ 160

      490     500     510     520     530     540
TTC ATC CAT TCA GTG CCC CGG CAT GAA GTA CCT GAT ATT CTA GAA GTA CAC CTG CCT CAT
AAG TAG GTA AGT CAC GGG GCC GTA CTT CAT GGA CTA TAA GAT CTT CAT GTG GAC GGA GTA
Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val His Leu Pro His
161 _____ 165 _____ DOMINIO 2 IG hTIE2 _____ 175 _____ 180

      550     560     570     580     590     600
GCT CAG CCC CAG GAT GCT GGA GTG TAC TCG GCC AGG TAT ATA GGA GGA AAC CTC TTC ACC
CGA GTC GGG GTC CTA CGA CCT CAC ATG AGC CGG TCC ATA TAT CCT CCT TTG GAG AAG TGG
Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr
181 _____ 185 _____ DOMINIO 2 IG hTIE2 _____ 195 _____ 200

      610     620     630     640     650     660
TCG GCC TTC ACC AGG CTG ATA GTC CGG AGA TGT GAA GCC CAG AAG TGG GGA CCT GAA TGC
AGC CGG AAG TGG TCC GAC TAT CAG GCC TCT ACA CTT CGG GTC TTC ACC CCT GGA CTT ACG
Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys
201 _____ 205 _____ DOMINIO 2 IG hTIE2 _____ 213 214_215 _____ 220
    
```

ES 2 688 623 T3

```

        670          680          690          700          710          720
        *          *          *          *          *          *
AAC CAT CTC TGT ACT GCT TGT ATG AAC AAT GGT GTC TGC CAT GAA GAT ACT GGA GAA TGC
TTG GTA GAG ACA TGA CGA ACA TAC TTG TTA CCA CAG ACG GTA CTT CTA TGA CCT CTT ACG
Asn His Leu Leu Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys
221_____225_____DOMINIO 1 TIPO EGF hTIE2_____235_____240

        730          740          750          760          770          780
        *          *          *          *          *          *
ATT TGC CCT CCT GGG TTT ATG GGA AGG ACG TGT GAG AAG GCT TGT GAA CTG CAC ACG TTT
TAA ACG GGA GGA CCC AAA TAC CCT TCC TGC ACA CTC TTC CGA ACA CTT GAC GTG TGC AAA
Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu Leu His Thr Phe
241_____245_____DOMINIO 1 TIPO EGF hTIE2_____253_____255_____260

        790          800          810          820          830          840
        *          *          *          *          *          *
GGC AGA ACT TGT AAA GAA AGG TGC AGT GGA CAA GAG GGA TGC AAG TCT TAT GTG TTC TGT
CCG TCT TGA ACA TTT CTT TCC ACG TCA CCT GTT CTC CCT ACG TTC AGA ATA CAC AAG ACA
Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys
261_____265_____DOMINIO 2 TIPO EGF hTIE2_____275_____280

        850          860          870          880          890          900
        *          *          *          *          *          *
CTC CCT GAC CCC TAT GGG TGT TCC TGT GCC ACA GGC TGG AAG GGT CTG CAG TGC AAT GAA
GAG GGA CTG GGG ATA CCC ACA AGG ACA CGG TGT CCG ACC TTC CCA GAC GTC ACG TTA CTT
Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu
281_____285_____DOMINIO 2 TIPO EGF hTIE2_____295_____300

        910          920          930          940          950          960
        *          *          *          *          *          *
GCA TGC CAC CCT GGT TTT TAC GGG CCA GAT TGT AAG CTT AGS TGC AGC TGC AAC AAT GGG
CGT ACG GTG GGA CCA AAA ATG CCC GST CTA ACA TTC GAA TCC ACG TCG ACG TTG TTA CCC
Ala Cys His Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly
301_____305_____DOMINIO 3 TIPO EGF hTIE2_____315_____320

        970          980          990          1000          1010          1020
        *          *          *          *          *          *
GAG ATG TGT GAT CGC TTC CAA GGA TGT CTC TGC TCT CCA GGA TGG CAG GGG CTC CAG TGT
CTC TAC ACA CTA CCG AAG GTT CCT ACA GAG ACG AGA GGT CCT ACC GTC CCC GAG GTC ACA
Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln Gly Leu Gln Cys
321_____325_____DOMINIO 3 TIPO EGF hTIE2_____335_____340

        1030          1040          1050          1060          1070          1080
        *          *          *          *          *          *
GAG AGA GAA GGC ATA CCG AGG ATG GST AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC CCC
CTC TCT CPT CCG TAT GGC TCC TAC CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG GGG
Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro
341_____345_____DOMINIO 2 IG hVEGFR1_____348_____349_____360

        1090          1100          1110          1120          1130          1140
        *          *          *          *          *          *
GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT ACG TCA CCT
CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT GGA
Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro
361_____365_____DOMINIO 2 IG hVEGFR1_____375_____380

        1150          1160          1170          1180          1190          1200
        *          *          *          *          *          *
AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA CGC
TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT GCG
Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg
381_____385_____DOMINIO 2 IG hVEGFR1_____395_____400

        1210          1220          1230          1240          1250          1260
        *          *          *          *          *          *
ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA GGG
TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT CCC
Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly
401_____405_____DOMINIO 2 IG hVEGFR1_____415_____420

        1270          1280          1290          1300          1310          1320
        *          *          *          *          *          *
CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA CAT
GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT GTA
Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His
421_____425_____DOMINIO 2 IG hVEGFR1_____435_____440

        1330          1340          1350          1360          1370          1380
        *          *          *          *          *          *
CGA CAA CTC GAG GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG

```


DAAP núm. 2

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATG GAC TCT TTA GCC AGC TTA GTT CTC TGT GGA GTC AGC TTG CTC CTT TCT GGA ACT GTG
TAC CTG AGA AAT CGG TCG AAT CAA GAG ACA CCT CAG TCG AAC GAG GAA AGA CCT TGA CAC
Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Ser Gly Thr Val
1_____5_____SECUENCIA SEÑAL hTIE2_____15_____20

      70      80      90      100     110     120
      *      *      *      *      *      *
GAA GGT GCT TCC TTC CTA CCA GCT ACT TTA ACT ATG ACT GTG GAC AAG GGA GAT AAC GTG
CTT CCA CGA AGG AAG GAT GGT CGA TGA AAT TGA TAC TGA CAC CTG TTC CCT CTA TTG CAC
Glu Gly Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val
21_22_23_____25_____DOMINIO 2 IG hTIE2_____35_____40

      130     140     150     160     170     180
      *      *      *      *      *      *
AAC ATA TCT TTC AAA AAG GTA TTG ATT AAA GAA GAA GAT GCA GTG ATT TAC AAA AAT GGT
TTG TAT AGA AAG TTT TTC CAT AAC TAA TTT CTT CTT CTA CGT CAC TAA ATG TTT TTA CCA
Asn Ile Ser Phe Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly
41_____45_____DOMINIO 2 IG hTIE2_____55_____60

      190     200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *      *
TCC TTC ATC CAT TCA GTG CCC CGG CAT GAA GTA CCT GAT ATT CTA GAA GTA CAC CTG CCT
AGG AAG TAG GTA AGT CAC GGG GCC GTA CTT CAT GGA CTA TAA GAT CTT CAT GTG GAC GGA
Ser Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val His Leu Pro
61_____65_____DOMINIO 2 IG hTIE2_____75_____80

      250     260     270     280     290     300
      *      *      *      *      *      *
CAT GCT CAG CCC CAG GAT GCT GGA GTG TAC TCG GCC AGG TAT ATA GGA GGA AAC CTC TTC
GTA CGA GTC GGG GTC CTA CGA CCT CAC ATG AGC CGG TCC ATA TAT CCT CCT TTG GAG AAG
His Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe
81_____85_____DOMINIO 2 IG hTIE2_____95_____100

      310     320     330     340     350     360
      *      *      *      *      *      *
ACC TCG GCC TTC ACC AGG CTG ATA GTC CGG AGA TGT GAA GCC GGT AGA CCT TTC GTA GAG
TGG AGC CGG AAG TGG TCC GAC TAT CAG GCC TCT ACA CTT CGG CCA TCT GGA AAG CAT CTC
Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val Arg Arg Cys Glu Ala Gly Arg Pro Phe Val Glu
101_____105_____DOMINIO 2 IG hTIE2_____114_____120

      370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *
ATG TAC AGT GAA ATC CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC
TAC ATG TCA CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG
Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro
121_____125_____DOMINIO 2 IG hVEGFR1_____135_____140

      430     440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *      *
TGC CGG GTT ACG TCA CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG
ACG GCC CAA TGC AGT GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC
Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu
141_____145_____DOMINIO 2 IG hVEGFR1_____155_____160

      490     500     510     520     530     540
      *      *      *      *      *      *
ATC CCT GAT GGA AAA CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA
TAG GGA CTA CCT TTT GGG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT
Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala
161_____165_____DOMINIO 2 IG hVEGFR1_____175_____180

      550     560     570     580     590     600
      *      *      *      *      *      *
ACG TAC AAA GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG
TGC ATG TTT CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC
Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys
181_____185_____DOMINIO 2 IG hVEGFR1_____195_____200

      610     620     630     640     650     660
      *      *      *      *      *      *
ACA AAC TAT CTC ACA CAT CGA CAA CTC GAG GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA
TGT TTG ATA GAG TGT GTA GCT GTT GAG CTC CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT
Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Leu Glu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
201_____205_____DOMINIO hFC_____208_____209_210_____220

      670     680     690     700     710     720
      *      *      *      *      *      *

```

ES 2 688 623 T3

GCA CCT GAA CAG CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC
CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
221 _____ 225 _____ DOMINIO hFC _____ 235 _____ 240

730 740 750 760 770 780
* * * * *
CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC
GAG TAG TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
241 _____ 245 _____ DOMINIO hFC _____ 255 _____ 260

790 800 810 820 830 840
* * * * *
CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG
GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
261 _____ 265 _____ DOMINIO hFC _____ 275 _____ 280

850 860 870 880 890 900
* * * * *
CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC
GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
281 _____ 285 _____ DOMINIO hFC _____ 295 _____ 300

910 920 930 940 950 960
* * * * *
CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC
GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG GAG GGT CGG
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
301 _____ 305 _____ DOMINIO hFC _____ 315 _____ 320

970 980 990 1000 1010 1020
* * * * *
CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC
GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
321 _____ 325 _____ DOMINIO hFC _____ 335 _____ 340

1030 1040 1050 1060 1070 1080
* * * * *
CTG CCC CCA TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA
GAC GGG GGT AGG GCC CTC CTC TAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
341 _____ 345 _____ DOMINIO hFC _____ 355 _____ 360

1090 1100 1110 1120 1130 1140
* * * * *
GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC
CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
361 _____ 365 _____ DOMINIO hFC _____ 375 _____ 380

1150 1160 1170 1180 1190 1200
* * * * *
TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC
ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC GAG
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
381 _____ 385 _____ DOMINIO hFC _____ 395 _____ 400

1210 1220 1230 1240 1250 1260
* * * * *
ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG
TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
401 _____ 405 _____ DOMINIO hFC _____ 415 _____ 420

1270 1280 1290 1300 1310
* * * * *
GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA (SEQ ID NO:3)
CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *** (SEQ ID NO:4)
421 _____ 425 _____ DOMINIO hFC _____ 435 _____ 438

ES 2 688 623 T3

DAAP núm. 3

```

      10          20          30          40          50          60
      *          *          *          *          *          *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG GCG GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu
1_____5_____15_____20
          SECUENCIA SEÑAL hVEGFR1
      70          80          90          100         110         120
      *          *          *          *          *          *
ACA GGA TCT AGT TCA GGT GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC CCC GAA ATT
TGT CCT AGA TCA AGT CCA CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG GGG CTT TAA
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Tyr Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile
21_____25_____26_____27_____40
          DOMINIO 2 IG hVEGFR1
      130         140         150         160         170         180
      *          *          *          *          *          *
ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT ACG TCA CCT AAC ATC
TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT GGA TTG TAG
Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile
41_____45_____55_____60
          DOMINIO 2 IG hVEGFR1
      190         200         210         220         230         240
      *          *          *          *          *          *
ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA CGC ATA ATC
TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT GCG TAT TAG
Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile
61_____65_____75_____80
          DOMINIO 2 IG hVEGFR1
      250         260         270         280         290         300
      *          *          *          *          *          *
TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA GGG CTT CTG
ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT CCC GAA GAC
Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu
81_____85_____95_____100
          DOMINIO 2 IG hVEGFR1
      310         320         330         340         350         360
      *          *          *          *          *          *
ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA CAT CGA CAA
TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT GTA GCT GTT
Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln
101_____105_____115_____120
          DOMINIO 2 IG hVEGFR1
      370         380         390         400         410         420
      *          *          *          *          *          *
GCT TCC TTC CTA CCA GCT ACT TTA ACT ATG ACT GTG GAC AAG GGA GAT AAC GTG AAC ATA
CGA AGG AAG GAT GGT CGA TGA AAT TGA TAC TGA CAC CTG TTC CCT CTA TTG CAC TTG TAT
Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn Ile
121_____125_____135_____140
          DOMINIO 2 IG hTIE2
      430         440         450         460         470         480
      *          *          *          *          *          *
TCT TTC AAA AAG GTA TTG ATT AAA GAA GAA GAT GCA GTG ATT TAC AAA AAT GGT TCC TTC
AGA AAG TTT TTC CAT AAC TAA TTT CTT CTT CTA CGT CAC TAA ATG TTT TTA CCA AGG AAG
Ser Phe Lys Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser Phe
141_____145_____155_____160
          DOMINIO 2 IG hTIE2
      490         500         510         520         530         540
      *          *          *          *          *          *
ATC CAT TCA GTG CCC CGG CAT GAA GTA CCT GAT ATT CTA GAA GTA CAC CTG CCT CAT GCT
TAG GTA AGT CAC GGG GCC GTA CTT CAT GGA CTA TAA GAT CTT CAT GTG GAC GGA GTA CGA
Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val His Leu Pro His Ala
161_____165_____175_____180
          DOMINIO 2 IG hTIE2
      550         560         570         580         590         600
      *          *          *          *          *          *
CAG CCC CAG GAT GCT GGA GTG TAC TCG GCC AGG TAT ATA GGA GGA AAC CTC TTC ACC TCG
GTC GGG GTC CTA CGA CCT CAC ATG AGC CGG TCC ATA TAT CCT CCT TTG GAG AAG TGG AGC
Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr Ser
181_____185_____195_____200
          DOMINIO 2 IG hTIE2
      610         620         630         640         650         660
      *          *          *          *          *          *
GCC TTC ACC AGG CTG ATA GTC CGG AGA TGT GAA GCC CAG AAG TGG GGA CCT GAA TGC AAC
CGG AAG TGG TCC GAC TAT CAG GCC TCT ACA CTT CGG GTC TTC ACC CCT GGA CTT ACG TTG
Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn
201_____205_____212_____213_____215_____220
          DOMINIO 2 IG hTIE2
      670         680         690         700         710         720
      *          *          *          *          *          *

```

ES 2 688 623 T3

CAT CTC TGT ACT GCT TGT ATG AAC AAT GGT GTC TGC CAT GAA GAT ACT GGA GAA TGC ATT
GTA GAG ACA TGA CGA ACA TAC TTG TTA CCA CAG ACG GTA CTT CTA TGA CCT CTT ACG TAA
His Leu Cys Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys Ile
221 225 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 1 235 240

730 740 750 760 770 780
* * * * *
TGC CCT CCT GGG TTT ATG GG DOMINIO 1 TIPO EGF hTIE2 T TGT GAA CTG CAC ACG TTT GGC
ACG GGA GGA CCC AAA TAC CCT TCC TGC ACA CTC TTC CGA ACA CTT GAC GTG TGC AAA CCG
Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu Leu His Thr Phe Gly
241 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 1 242 243 245 260

790 800 810 820 830 840
* * * * *
AGA ACT TGT Af DOMINIO 1 TIPO EGF hTIE2 AA GAG GGA TGC AAG TCT TAT GTG TTC TGT CTC
TCT TGA ACA TTT CTT TCC ACG TCA CCT GTT CTC CCT ACG TTC AGA ATA CAC AAG ACA GAG
Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys Leu
261 265 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 2 275 280

850 860 870 880 890 900
* * * * *
CCT GAC CCC TAT GGG TGT TCC DOMINIO 2 TIPO EGF hTIE2 ; GGT CTG CAG TGC AAT GAA GCA
ACG CTG GGG ATA CCC ACA AGG ACA CGG TGT CCG ACC TTC CCA GAC GTC ACG TTA CTT CGT
Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala
281 285 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 2 295 299 300

910 920 930 940 950 960
* * * * *
TGC CAC CCT GGT TTT TAC GGG DOMINIO 2 TIPO EGF hTIE2 ; TGC AGC TGC AAC AAT GGG GAG
ACG GTG GGA CCA AAA ATG CCC GGT CTA ACA TTC GAA TCC ACG TCG ACG TTG TTA CCC CTC
Cys His Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly Glu
301 305 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 3 315 320

970 980 990 1000 1010 1020
* * * * *
ATG TGT GAT CGC TTC CAA GGA DOMINIO 3 TIPO EGF hTIE2 ; GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA
TAC ACA CTA GCG AAG GTT CCT ACA GAG ACG AGA GAG CTC CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT
Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Leu Glu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
321 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 3 331 332 hFC DOMAIN 340

1030 1040 1050 1060 1070 1080
* * * * *
CCG TGC CCA GC DOMINIO 3 TIPO EGF hTIE2 ;A CCG TCA GTC TTC DOMINIO hFC CCA AAA CCC
GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
341 345 hFC DOMAIN 355 360

1090 1100 1110 1120 1130 1140
* * * * *
AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG AC DOMINIO hFC ACA TGC GTG GTG GAC GTG AGC
TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CTG CAC TCG
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
361 365 hFC DOMAIN 375 380

1150 1160 1170 1180 1190 1200
* * * * *
CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC A DOMINIO hFC G GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC
GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
381 385 hFC DOMAIN 385 400

1210 1220 1240 1250 1260
* * * * *
AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC
TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
401 405 hFC DOMAIN 415 420

1270 1280 1290 1300 1310 1320
* * * * *
GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT G DOMINIO hFC C AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC
CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
421 425 hFC DOMAIN 435 440

1330 1340 1350 1360 1370 1380
* * * * *
CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC A DOMINIO hFC C AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG
GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
441 445 hFC DOMAIN 455 460

DOMINIO hFC

ES 2 688 623 T3

```

      1390          1400          1410          1420          1430          1440
      *            *            *            *            *            *
GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC
CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTC CTC TAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
461_____465_____hFC DOMAIN_____475_____480

      1450          1460          DOMINIO hFC          1480          1490          1500
      *            *            *            *            *            *
CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG
GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
481_____485_____hFC DOMAIN_____495_____500

      1510          1520          DOMINIO hFC          1540          1550          1560
      *            *            *            *            *            *
GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC
CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
501_____505_____hFC DOMAIN_____515_____520

      1570          1580          DOMINIO hFC          1600          1610          1620
      *            *            *            *            *            *
AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG
TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC
Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
521_____525_____hFC DOMAIN_____535_____540

      1630          1640          DOMINIO hFC          1660          1670          1680
      *            *            *            *            *            *
ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA
TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
541_____545_____hFC DOMAIN_____555_____560

1683
*
TGA (SEQ ID NO:5)
ACT
*** (SEQ ID NO:6)
561

```

DAAP núm. 4

```

      10          20          30          40          50          60
      *          *          *          *          *          *
ATG GTC AGC TAC TGG GAC ACC GGG GTC CTG TGC GCG CTG CTC AGC TGT CTG CTT CTC
TAC CAG TCG ATG ACC CTG TGG CCC CAG GAC GAC ACG GCG GAC GAG TCG ACA GAC GAA GAG
Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser Cys Leu Leu Leu
1_____5_____hVEGFR1 SIGNAL SEQUENCE_____15_____20

      70          8 SECUENCIA SEÑAL hVEGFR1          100          110          120
      *          *          *          *          *          *
ACA GGA TCT AGT TCA GGT GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC CCC GAA ATT
TGT CCT AGA TCA AGT CCA CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG GGG CTT TAA
Thr Gly Ser Ser Ser Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile
21_____25_____26_____27_____hVEGFR1 IG DOMAIN 2_____40

      130          140          15( DOMINIO 2 IG hVEGFR1          170          180
      *          *          *          *          *          *
ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT ACG TCA CCT AAC ATC
TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT GGA TTG TAG
Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile
41_____45_____hVEGFR1 IG DOMAIN 2_____55_____60

      190          200          DOMINIO 2 IG hVEGFR1          220          230          240
      *          *          *          *          *          *
ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA CGC ATA ATC
TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT GCG TAT TAG
Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile
61_____65_____hVEGFR1 IG DOMAIN 2_____75_____80

      250          260          DOMINIO 2 IG hVEGFR1          280          290          300
      *          *          *          *          *          *
TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA GGG CTT CTG
ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT CCC GAA GAC
Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu
81_____85_____hVEGFR1 IG DOMAIN 2_____95_____100

      310          320          DOMINIO 2 IG hVEGFR1          340          350          360
      *          *          *          *          *          *
ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA CAT CGA CAA
TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT GTA GCT GTT
Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln
101_____105_____hVEGFR1 IG DOMAIN 2_____115_____120

      370          380          DOMINIO 2 IG hVEGFR1          400          410          420
      *          *          *          *          *          *
GCT TCC TTC CTA CCA GCT ACT TTA ACT ATG ACT GTG GAC AAG GGA GAT AAC GTG AAC ATA
CGA AGG AAG GAT GGT CGA TGA AAT TGA TAC TGA CAC CTG TTC CCT CTA TTG CAC TTG TAT
Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn Ala
121_____125_____hTIE2 IG DOMAIN 2_____135_____140

      430          440          DOMINIO 2 IG hTIE2          460          470          480
      *          *          *          *          *          *
TCT TTC AAA AAG GTA TTG ATT AAA GAA GAA GAT GCA GTG ATT TAC AAA AAT GGT TCC TTC
AGA AAG TTT TTC CAT AAC TAA TTT CTT CTT CTA CGT CAC TAA ATG TTT TTA CCA AGG AAG
Ser Phe Lys Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser Phe
141_____145_____hTIE2 IG DOMAIN 2_____155_____160

      490          500          DOMINIO 2 IG hTIE2          520          530          540
      *          *          *          *          *          *
ATC CAT TCA GTG CCC CGG CAT GAA GTA CCT GAT ATT CTA GAA GTA CAC CTG CCT CAT GCT
TAG GTA AGT CAC GGG GCC GTA CTT CAT GGA CTA TAA GAT CTT CAT GTG GAC GGA GTA CGA
Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val His Leu Pro His Ala
161_____165_____hTIE2 IG DOMAIN 2_____175_____180

      550          560          DOMINIO 2 IG hTIE2          580          590          600
      *          *          *          *          *          *
CAG CCC CAG GAT GCT GGA GTG TAC TCG GCC AGG TAT ATA GGA GGA AAC CTC TTC ACC TCG
GTC GGG GTC CTA CGA CCT CAC ATG AGC CGG TCC ATA TAT CCT CCT TTG GAG AAG TGG AGC
Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr Ser
181_____185_____hTIE2 IG DOMAIN 2_____195_____200

      DOMINIO 2 IG hTIE2

      610          620          630          640          650          660
      *          *          *          *          *          *
GCC TTC ACC AGG CTG ATA GTC CGG AGA TGT GAA GCC CTC GAG GAC AAA ACT CAC ACA TGC
CGG AAG TGG TCC GAC TAT CAG GCC TCT ACA CTT CGG GAG CTC CTG TTT TGA GTG TGT ACG
Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val Arg Arg Cys Glu Ala Leu Glu Asp Lys Thr His Thr Cys
201_____205_____hTIE2 IG DOMAIN 2_____212_____213_____hFC DOMAIN_____220

      670          DOMINIO 2 IG hTIE2          700          DOMINIO hFC          720
      *          *          *          *          *          *

```

ES 2 688 623 T3

```

CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA
GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
221_____225_____hFC DOMAIN_____235_____240

          730          740          750          760          770          780
          *          *          *          *          *          *
CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC Cc DOMINIO hFC AG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG
GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
241_____245_____hFC DOMAIN_____255_____260

          790          800          810          820          830          840
          *          *          *          *          *          *
AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG T DOMINIO hFC AC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT
TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
261_____265_____hFC DOMAIN_____275_____280

          850          860          870          880          890          900
          *          *          *          *          *          *
GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG Cj DOMINIO hFC ic ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC
CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
281_____285_____hFC DOMAIN_____295_____300

          910          920          930          940          950          960
          *          *          *          *          *          *
ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG Af DOMINIO hFC ig TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA
TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
301_____305_____hFC DOMAIN_____315_____320

          970          980          990          1000          1010          1020
          *          *          *          *          *          *
GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA A DOMINIO hFC AA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA
CGG GAG GGT CCG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
321_____325_____hFC DOMAIN_____335_____340

          1030          1040          1050          1060          1070          1080
          *          *          *          *          *          *
CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC Cc DOMINIO hFC ig ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC
GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTC CTC TAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
341_____345_____hFC DOMAIN_____355_____360

          1090          1100          1110          1120          1130          1140
          *          *          *          *          *          *
TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC A DOMINIO hFC ic GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG
ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
361_____365_____hFC DOMAIN_____375_____380

          1150          1160          1170          1180          1190          1200
          *          *          *          *          *          *
CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG c DOMINIO hFC TG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC
GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
381_____385_____hFC DOMAIN_____395_____400

          1210          1220          1240          1250          1260
          *          *          *          *          *
TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC
ATG TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
401_____405_____hFC DOMAIN_____415_____420

          1270          1280          1290          1300          1310          1320
          *          *          *          *          *          *
GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC c DOMINIO hFC AG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT
CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
421_____425_____hFC DOMAIN_____435_____440

1326
*
AAA TGA (SEQ ID NO:7)          DOMINIO hFC
TTT ACT
Lys *** (SEQ ID NO:8)
441_442

```

DAAP#11

DAPP núm. 11

```

      20      30      40      50      60
*
ATG GAC TCT TTA GCC AGC TTA GTT CTC TGT GGA GTC AGC TTG CTC CTT TCT GGA ACT GTG
TAC CTG AGA AAT CGG TCG AAT CAA GAG ACA CCT CAG TCG AAC GAG GAA AGA CCT TGA CAC
Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Ser Gly Thr Val
1 _____ 5 _____ hTIE2 SIGNAL SEQUENCE _____ 15 _____ 20

      70      80      90      100      110      120
*
GAA GGT GCC ATG GAC TTG ATC SECUENCIA SEÑAL hTIE2 CTT GTA TCT GAT GCT GAA ACA
CTT CCA CGG TAC CTG AAC TAG AAC TAG TTA AGG GAT GGA GAA CAT AGA CTA CGA CTT TGT
Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu Pro Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr
21 22 23 _____ 25 _____ hTIE2 IG DOMAIN 1 _____ 35 _____ 40

      130      140      150      160      170      180
*
TCT CTC ACC TGC ATT GCC TCT GGG DOMINIO 1 IG hTIE2 GAG CCC ATC ACC ATA GGA AGG GAC
AGA GAG TGG ACG TAA CGG AGA CCC ACC GCG GGG GTA CTC GGG TAG TGG TAT CCT TCC CTG
Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly Trp Arg Pro His Glu Pro Ile Thr Ile Gly Arg Asp
41 _____ 45 _____ hTIE2 IG DOMAIN 1 _____ 55 _____ 60

      190      200      210      220      230      240
*
TTT GAA GCC TTA ATG AAC CAG CAC DOMINIO 1 IG hTIE2 GAA GTT ACT CAA GAT GTG ACC AGA
AAA CTT CGG AAT TAC TTG GTC GTG GTC CTA GGC GAC CTT CAA TGA GTT CTA CAC TGG TCT
Phe Glu Ala Leu Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg
61 _____ 65 _____ hTIE2 IG DOMAIN 1 _____ 75 _____ 80

      250      260      270      280      290      300
*
GAA TGG GCT AAA AAA GTT GTT TGG DOMINIO 1 IG hTIE2 GCT AGT AAG ATC AAT GGT GCT TAT
CTT ACC CGA TTT TTT CAA CAA ACC TTC TCT CTT TTC CGA TCA TTC TAG TTA CCA CGA ATA
Glu Trp Ala Lys Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile Asn Gly Ala Tyr
81 _____ 85 _____ hTIE2 IG DOMAIN 1 _____ 95 _____ 100

      310      320      330      340      350      360
*
TTC TGT GAA GGG CGA GTT CGA GGA DOMINIO 1 IG hTIE2 ATA CGA ACC ATG AAG ATG CGT CAA
AAG ACA CTT CCC GCT CAA GCT CCT CTC CGT TAG TCC TAT GCT TGG TAC TTC TAC GCA GTT
Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg Ile Arg Thr Met Lys Met Arg Gln
101 _____ 105 _____ hTIE2 IG DOMAIN 1 _____ 115 _____ 120

      370      380      390      400      410      420
*
CAA GCT TCC TTC CTA CCA GCT ACT DOMINIO 1 IG hTIE2 GTG GAC AAG GGA GAT AAC GTG AAC
GTT CGA AGG AAG GAT GGT CGA TGA AAT TGA TAC TGA CAC CTG TTC CCT CTA TTG CAC TTG
Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn
121 122 _____ 125 _____ hTIE2 IG DOMAIN 2 _____ 135 _____ 140

      430      440      450      460      470      480
*
ATA TCT TTC AAA AAG GTA TTG ATT DOMINIO 2 IG hTIE2 GCA GTG ATT TAC AAA AAT GGT TCC
TAT AGA AAG TTT TTC CAT AAC TAA TTT CTT CTT CTA CGT CAC TAA ATG TTT TTA CCA AGG
Ile Ser Phe Lys Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser
141 _____ 145 _____ hTIE2 IG DOMAIN 2 _____ 155 _____ 160

      490      500      510      520      530      540
*
TTC ATC CAT TCA GTG CCC CGG CAT DOMINIO 2 IG hTIE2 ATT CTA GAA GTA CAC CTG CCT CAT
AAG TAG GTA AGT CAC GGG GCC GTA CTT CAT GGA CTA TAA GAT CTT CAT GTG GAC GGA GTA
Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val His Leu Pro His
161 _____ 165 _____ hTIE2 IG DOMAIN 2 _____ 175 _____ 180

      550      560      570      580      590      600
*
GCT CAG CCC CAG GAT GCT GGA GTG DOMINIO 2 IG hTIE2 TAT ATA GGA GGA AAC CTC TTC ACC
CGA GTC GGG GTC CTA CGA CCT CAC ATG AGC CGG TCC ATA TAT CCT CCT TTG GAG AAG TGG
Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr
181 _____ 185 _____ hTIE2 IG DOMAIN 2 _____ 195 _____ 200

      610      620      630      640      650      660
*
TCG GCC TTC ACC AGG CTG ATA GTC CGG AGA TGT GAA GCC GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG
AGC CGG AAG TGG TCC GAC TAT CAG GCC TCT ACA CTT CGG CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC
Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val Arg Arg Cys Glu Ala Gly Arg Pro Phe Val Glu Met
201 _____ 205 _____ hTIE2 IG DOMAIN 2 _____ 213 214 215 _____ 220

      670      680      690      700      710      720
*
DOMINIO 2 IG hTIE2

```

ES 2 688 623 T3

```

TAC AGT GAA ATC CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC
ATG TCA CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG
Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys
221_____225_____hVEGF1 IG DOMAIN 2_____215_____240

          730          740  DOMINIO 2 IG hVEGF1  760          770          780
          *          *          *          *          *          *
CGG GTT ACG TCA CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC
GCC CAA TGC AGT GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG
Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile
241_____245_____hVEGF1 IG DOMAIN 2_____255_____260

          790          800  DOMINIO 2 IG hVEGF1  820          830          840
          *          *          *          *          *          *
CCT GAT GGA AAA CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG
GGA CTA CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT
Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
261_____265_____hVEGF1 IG DOMAIN 2_____275_____280

          850          860  DOMINIO 2 IG hVEGF1  880          890          900
          *          *          *          *          *          *
TAC AAA GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA
ATG TTT CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT
Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr
281_____285_____hVEGF1 IG DOMAIN 2_____295_____300

          910          920  DOMINIO 2 IG hVEGF1  940          950          960
          *          *          *          *          *          *
AAC TAT CTC ACA CAT CGA CAA CTC GAG GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA
TTG ATA GAG TGT GTA GCT GTT GAG CTC CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT
Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Leu Glu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
301_____305_____307 308_____310_____hFC DOMAIN_____320

          970          980          990          DOMINIO hFC  1010          1020
          *          *          *          *          *          *
CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC
GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
321_____325_____hFC DOMAIN_____335_____340

          1030          1040          DOMINIO hFC  1060          1070          1080
          *          *          *          *          *          *
ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT
TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
341_____345_____hFC DOMAIN_____355_____360

          1090          1100          DOMINIO hFC  1120          1130          1140
          *          *          *          *          *          *
GAG GTC AAG TTC AAC TGG ATC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG
CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAG CTC CCG CAC CTC CAC GTA TTA CCG TTC TGT TTC GGC
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
361_____365_____hFC DOMAIN_____375_____380

          1150          1160          DOMINIO hFC  1180          1190          1200
          *          *          *          *          *          *
CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG
GCC CTC CTC ATG TTG TGT TGC ATG TTC ACG CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
381_____385_____hFC DOMAIN_____395_____400

          DOMINIO hFC

          1210          1220          1230          1240          1250          1260
          *          *          *          *          *          *
GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC
CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG GAG GGT CGG GGG
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
401_____405_____hFC DOMAIN_____415_____420

          1270          1280          DOMINIO hFC  1300          1310          1320
          *          *          *          *          *          *
ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG
TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
421_____425_____hFC DOMAIN_____435_____440

          1330          1340          DOMINIO hFC  1360          1370          1380
          *          *          *          *          *          *
CCC CCA TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC
GGG GGT AGG GCC CTC CTC TAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
441_____445_____hFC DOMAIN_____455_____460

          DOMINIO hFC

```

ES 2 688 623 T3

```

      1390      1400      1410      1420      1430      1440
      *        *        *        *        *        *
TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC
AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
461 _____ 465 _____ hFC DOMAIN _____ 475 _____ 480

      1450      1460      DOMINIO hFC      1480      1490      1500
      *        *        *        *        *        *
AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC
TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC GAG TGG
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
481 _____ 485 _____ hFC DOMAIN _____ 495 _____ 500

      1510      1520      DOMINIO hFC      1540      1550      1560
      *        *        *        *        *        *
GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT
CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
501 _____ 505 _____ hFC DOMAIN _____ 515 _____ 520

      1570      1580      DOMINIO hFC      1600      1610
      *        *        *        *        *
CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA (SEQ ID NO:9)
GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *** (SEQ ID NO:10)
521 _____ 525 _____ hFC DOMAIN _____ 535 _____ 537

```

DOMINIO hFC

DAAP núm. 12

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
ATG GAC TCT TTA GCC AGC TTA GTT CTC TGT GGA GTC AGC TTG CTC CTT TCT GGA ACT GTG
TAC CTG AGA AAT CGG TCG AAT CAA GAG ACA CCT CAG TCG AAC GAG GAA AGA CCT TGA CAC
Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Ser Gly Thr Val
1      5      15      20
      *      *      *      *      *      *
      70      80      SECUENCIA SEÑAL hTIE2      100      110      120
      *      *      *      *      *      *
GAA GGT GCT TCC TTC CTA CCA GCT ACT TTA ACT ATG ACT GTG GAC AAG GGA GAT AAC GTG
CTT CCA CGA AGG AAG GAT GGT CGA TGA AAT TGA TAC TGA CAC CTG TTC CCT CTA TTG CAC
Glu Gly Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val
21 22 23 25      hTIE2 IG DOMAIN 2      35      40
      *      *      *      *      *      *
      130     140     DOMINIO 2 IG hTIE2      160     170     180
      *      *      *      *      *      *
AAC ATA TCT TTC AAA AAG GTA TTG ATT AAA GAA GAA GAT GCA GTG ATT TAC AAA AAT GGT
TTG TAT AGA AAG TTT TTC CAT AAC TAA TTT CTT CTT CTA CGT CAC TAA ATG TTT TTA CCA
Asn Ile Ser Phe Lys Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly
41      45      hTIE2 IG DOMAIN 2      55      60
      *      *      *      *      *      *
      190     200     DOMINIO 2 IG hTIE2      220     230     240
      *      *      *      *      *      *
TCC TTC ATC CAT TCA GTG CCC CGG CAT GAA GTA CCT GAT ATT CTA GAA GTA CAC CTG CCT
AGG AAG TAG GTA AGT CAC GGG GCC GTA CTT CAT GGA CTA TAA GAT CTT CAT GTG GAC GGA
Ser Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val His Leu Pro
61      65      hTIE2 IG DOMAIN 2      75      80
      *      *      *      *      *      *
      250     260     DOMINIO 2 IG hTIE2      280     290     300
      *      *      *      *      *      *
CAT GCT CAG CCC CAG GAT GCT GGA GTG TAC TCG GCC AGG TAT ATA GGA GGA AAC CTC TTC
GTA CGA GTC GGG GTC CTA CGA CCT CAC ATG AGC CGG TCC ATA TAT CCT CCT TTG GAG AAG
His Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe
81      85      hTIE2 IG DOMAIN 2      95      100
      *      *      *      *      *      *
      310     320     DOMINIO 2 IG hTIE2      340     350     360
      *      *      *      *      *      *
ACC TCG GCC TTC ACC AGG CTG ATA GTC CGG AGA TGT GAA GCC CAG AAG TGG GGA CCT GAA
TGG AGC CGG AAG TGG TCC GAC TAT CAG GCC TCT ACA CTT CGG GTC TTC ACC CCT GGA CTT
Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro
101     105     hTIE2 IG DOMAIN 2      114 115     120
      *      *      *      *      *      *
      370     380     DOMINIO 2 IG hTIE2      400     410     420
      *      *      *      *      *      *
TGC AAC CAT CTC TGT ACT GCT TGT ATG AAC AAT GGT GTC TGC CAT GAA GAT ACT GGA GAA
ACG TTG GTA GAG ACA TGA CGA ACA TAC TTG TTA CCA CAG ACG GTA CTT CTA TGA CCT CTT
Cys Asn His Leu Cys Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu
121     125     hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 1      135     140
      *      *      *      *      *      *
      430     440     DOMINIO 1 TIPO EGF hTIE2      460     470     480
      *      *      *      *      *      *
TGC ATT TGC CCT CCT GGG TTT ATG GGA AGG ACG TGT GAG AAG GCT TGT GAA CTG CAC ACG
ACG TAA ACG GGA GGA CCC AAA TAC CCT TCC TGC ACA CTC TTC CGA ACA CTT GAC GTG TGC
Cys Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu Leu His Thr
141     145     hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 1      154 155     160
      *      *      *      *      *      *
      490     500     DOMINIO 1 TIPO EGF hTIE2      520     530     540
      *      *      *      *      *      *
TTT GGC AGA ACT TGT AAA GAA AGG TGC AGT GGA CAA GAG GGA TGC AAG TCT TAT GTG TTC
AAA CCG TCT TGA ACA TTT CTT TCC ACG TCA CCT GTT CTC CCT ACG TTC AGA ATA CAC AAG
Phe Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe
161     165     hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 2      175     180
      *      *      *      *      *      *
      550     560     DOMINIO 2 TIPO EGF hTIE2      580     590     600
      *      *      *      *      *      *
TGT CTC CCT GAC CCC TAT GGG TGT TCC TGT GCC ACA GGC TGG AAG GGT CTG CAG TGC AAT
ACA GAG GGA CTG GGG ATA CCC TAC AGG ACA CGG TGT CCG ACC TTC CCA GAC GTC ACG TTA
Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn
181     185     hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 2      195     200
      *      *      *      *      *      *
      610     620     DOMINIO 2 TIPO EGF hTIE2      640     650     660
      *      *      *      *      *      *
GAA GCA TGC CAC CCT GGT TTT TAC GGG CCA GAT TGT AAG CTT AGG TGC AGC TGC AAC AAT
CTT CGT ACG GTG GGA CCA AAA ATG CCC GGT CTA ACA TTC GAA TCC ACG TCG ACG TTG TTA
Glu Ala Cys His Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn
201 202     205     hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 3      215     220
      *      *      *      *      *      *
      670     680     DOMINIO 3 TIPO EGF hTIE2      700     710     720
      *      *      *      *      *      *
GGG GAG ATG TGT GAT CGC TTC CAA GGA TGT CTC TGC TCT CCA GGA TGG CAG GGG CTC CAG

```

ES 2 688 623 T3

```

CCC CTC TAC ACA CTA GCG AAG GTT CCT ACA GAG ACG AGA GGT CCT ACC GTC CCC GAG GTC
Gly Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln Gly Leu Gln
221 _____ 225 _____ hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 3 _____ 235 _____ 240

          730          740          750          760          770          780
          *          *          *          *          *          *
TGT GAG AGA GAA GGC ATA CC DOMINIO 3 TIPO EGF hTIE2 TC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC
ACA CTC TCT CTT CCG TAT GGC TCC TAC CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG
Cys Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile
241 _____ 245 _____ 249 250 _____ hVEGFR1 IG DOMAIN 2 _____ 260

          790          800          810          820          830          840
          *          *          *          *          *          *
CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG C DOMINIO 2 IG hVEGFR1 ; GTT ACG TCA
GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT
Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser
261 _____ 265 _____ hVEGFR1 IG DOMAIN 2 _____ 275 _____ 280

          850          860          870          880          890          900
          *          *          *          *          *          *
CCT AAC ATC ACT GTT ACT TTA A DOMINIO 2 IG hVEGFR1 ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA
GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT
Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys
281 _____ 285 _____ hVEGFR1 IG DOMAIN 2 _____ 295 _____ 300

          910          920          930          940          950          960
          *          *          *          *          *          *
CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA ; DOMINIO 2 IG hVEGFR1 A AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA
GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT
Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile
301 _____ 305 _____ hVEGFR1 IG DOMAIN 2 _____ 315 _____ 320

          970          980          990          1000          1010          1020
          *          *          *          *          *          *
GGG CTT CTG ACC TGT GAA GCA ; DOMINIO 2 IG hVEGFR1 S TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA
CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT
Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr
321 _____ 325 _____ hVEGFR1 IG DOMAIN 2 _____ 335 _____ 340

          1030          1040          1050          1060          1070          1080
          *          *          *          *          *          *
CAT CGA CAA CTC GAG GAC AAA A DOMINIO 2 IG hVEGFR1 _ _ ; TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG
GTA GCT GTT GAG CTC CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC
His Arg Gln Leu Glu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
341 _____ 343 344 345 _____ hFC DOMAIN _____ 355 _____ 360

          1090          1100          1110          1120          1130          1140
          *          *          *          *          *          *
GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC C DOMINIO hFC C AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG
CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
361 _____ 365 _____ hFC DOMAIN _____ 375 _____ 380

          1150          1160          1170          1180          1190          1200
          *          *          *          *          *          *
ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG G DOMINIO hFC C CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC
TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
381 _____ 385 _____ hFC DOMAIN _____ 395 _____ 400

          1210          1220          1230          1240          1250          1260
          *          *          *          *          *          *
AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG C DOMINIO hFC CC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG
TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
401 _____ 405 _____ hFC DOMAIN _____ 415 _____ 420

          1270          1280          1290          1300          1310          1320
          *          *          *          *          *          *
TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC A DOMINIO hFC _ _ C GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT
ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
421 _____ 425 _____ hFC DOMAIN _____ 435 _____ 440

          1330          1340          1350          1360          1370          1380
          *          *          *          *          *          *
GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC T DOMINIO hFC CC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC
CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
441 _____ 445 _____ hFC DOMAIN _____ 455 _____ 460

          1390          1400          1410          1420          1430          1440
          *          *          *          *          *          *
          _____ 1410 _____ DOMINIO hFC _____ 1420 _____ 1440

```

ES 2 688 623 T3

```

ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG
TAG AGG TTT CGG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
461_____465_____hFC DOMAIN_____475_____480

      1450      1460      DOMINIO hFC      1480      1490      1500
      *          *          *          *          *          *
GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC
CTC CTC TAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
481_____485_____hFC DOMAIN_____495_____500

      1510      1520      DOMINIO hFC      1540      1550      1560
      *          *          *          *          *          *
GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT
CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
501_____505_____hFC DOMAIN_____515_____520

      1570      1580      DOMINIO hFC      1600      1610      1620
      *          *          *          *          *          *
CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC
GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
521_____525_____hFC DOMAIN_____535_____540

      1630      1640      DOMINIO hFC      1660      1670      1680
      *          *          *          *          *          *
AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC
TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
541_____545_____hFC DOMAIN_____555_____560

      1690      1700      DOMINIO hFC
      *          *          *
TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA (SEQ ID NO:11)
ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *** (SEQ ID NO:12)
561_____565_____hFC DOMAIN_____573

```

DOMINIO hFC

ES 2 688 623 T3

DAAP núm. 13

```

      10          20          30          40          50          60
      *          *          *          *          *          *
ATG GAC TCT TTA GCC AGC TTA GTT CTC TGT GGA GTC AGC TTG CTC CTT TCT GGA ACT GTG
TAC CTG AGA AAT CGG TCG AAT CAA GAG ACA CCT CAG TCG AAC GAG GAA AGA CCT TGA CAC
Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Leu Ser Gly Thr Val
1 _____ 5 _____ SECUENCIA SEÑAL hTIE2 _____ 15 _____ 20

      70          80          90          100         110         120
      *          *          *          *          *          *
GAA GGT GCC ATG GAC TTG ATC AAT TCC CTA CCT CTT GTA TCT GAT GCT GAA ACA
CTT CCA CGG TAC CTG AAC TAG AAC TAG TTA AGG GAT GGA GAA CAT AGA CTA CGA CTT TGT
Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu Pro Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr
21 _22_ 23 _____ 25 _____ DOMINIO 1 IG hTIE2 _____ 35 _____ 40

      130         140         150         160         170         180
      *          *          *          *          *          *
TCT CTC ACC TGC ATT GCC TCT GGG TGG CGC CCC CAT GAG CCC ATC ACC ATA GGA AGG GAC
AGA GAG TGG ACG TAA CGG AGA CCC ACC GCG GGG GTA CTC GGG TAG TGG TAT CCT TCC CTG
Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly Trp Arg Pro His Glu Pro Ile Thr Ile Gly Arg Asp
41 _____ 45 _____ DOMINIO 1 IG hTIE2 _____ 55 _____ 60

      190         200         210         220         230         240
      *          *          *          *          *          *
TTT GAA GCC TTA ATG AAC CAG CAC CAG GAT CCG CTG GAA GTT ACT CAA GAT GTG ACC AGA
AAA CTT CGG AAT TAC TTG GTC GTG GTC CTA GGC GAC CTT CAA TGA GTT CTA CAC TGG TCT
Phe Glu Ala Leu Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg
61 _____ 65 _____ DOMINIO 1 IG hTIE2 _____ 75 _____ 80

      250         260         270         280         290         300
      *          *          *          *          *          *
GAA TGG GCT TTA AAA GTT GTT TGG AAG AGA GAA AAG GCT AGT AAG ATC AAT GGT GCT TAT
CTT ACC CGA TTT TTT CAA CAA ACC TTC TCT CTT TTC CGA TCA TTC TAG TTA CCA CGA ATA
Glu Trp Ala Lys Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile Asn Gly Ala Tyr
81 _____ 85 _____ DOMINIO 1 IG hTIE2 _____ 95 _____ 100

      310         320         330         340         350         360
      *          *          *          *          *          *
TTC TGT GAA GGG CGA GTT CGA GGA GAG GCA ATC AGG ATA CGA ACC ATG AAG ATG CGT CAA
AAG ACA CTT CCC GCT CAA GCT CCT CTC CGT TAG TCC TAT GCT TGG TAC TTC TAC GCA GTT
Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg Ile Arg Thr Met Lys Met Arg Gln
101 _____ 105 _____ DOMINIO 1 IG hTIE2 _____ 115 _____ 120

      370         380         390         400         410         420
      *          *          *          *          *          *
CAA GCT TCC TTA CTA CCA GTT ACT TTA ACT ATG ACT GTG GAC AAG GGA GAT AAC GTG AAC
GTT CGA AGG AAG GAT GGT CGA TGA AAT TGA TAC TGA CAC CTG TTC CCT CTA TTG CAC TTG
Gln Ala Ser Phe Lys Val Leu Ile Lys Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn
121 122 _____ 125 _____ DOMINIO 2 IG hTIE2 _____ 135 _____ 140

      430         440         450         460         470         480
      *          *          *          *          *          *
ATA TCT TTC AAA AAG GTA TTG ATT AAA GAA GAA GAT GCA GTG ATT TAC AAA AAT GGT TCC
TAT AGA AAG TTT TTC CAT AAC TAA TTT CTT CTT CTA CGT CAC TAA ATG TTT TTA CCA AGG
Ile Ser Phe Lys Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser
141 _____ 145 _____ DOMINIO 2 IG hTIE2 _____ 155 _____ 160

      490         500         510         520         530         540
      *          *          *          *          *          *
TTC ATC CAT TCA GTG CCC CGG CAT GAA GTA CCT GAT ATT CTA GAA GTA CAC CTG CCT CAT
AAG TAG GTA AGT CAC GGG GCC GTA CTT CAT GGA CTA TAA GAT CTT CAT GTG GAC GGA GTA
Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val His Leu Pro His
161 _____ 165 _____ DOMINIO 2 IG hTIE2 _____ 175 _____ 180

      550         560         570         580         590         600
      *          *          *          *          *          *
GCT CAG CCC CAG GAT GCT GGA GTG TAC TCG GCC AGG TAT ATA GGA GGA AAC CTC TTC ACC
CGA GTC GGG GTC CTA CGA CCT CAC ATG AGC CGG TCC ATA TAT CCT CCT TTG GAG AAG TGG
Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr
181 _____ 185 _____ DOMINIO 2 IG hTIE2 _____ 195 _____ 200

      610         620         630         640         650         660
      *          *          *          *          *          *
TCG GCC TTC ACC AGG CTG ATA GTC CGG AGA TGT GAA GCC CAG AAG TGG GGA CCT GAA TGC
AGC CGG AAG TGG TCC GAC TAT CAG GCC TCT ACA CTT CGG GTC TTC ACC CCT GGA CTT ACG
Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys
201 _____ 205 _____ DOMINIO 2 IG hTIE2 _____ 213 214 215 _____ 220

      670         680         690         700         710         720
      *          *          *          *          *          *

```

ES 2 688 623 T3

```

AAC CAT CTC TGT ACT GCT TGT ATG AAC AAT GGT GTC TGC CAT GAA GAT ACT GGA GAA TGC
TTG GTA GAG ACA TGA CGA ACA TAC TTG TTA CCA CAG ACG GTA CTT CTA TGA CCT CTT ACG
Asn His Leu Cys Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys
221_____225_____hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 1_____235_____240

          730          740          750          760          770          780
          *          *          *          *          *          *
ATT TGC CCT CCT GGG TTT ATC DOMINIO 1 TIPO EGF hTIE2 GCT TGT GAA CTG CAC ACG TTT
TAA ACG GGA GGA CCC AAA TAC CCT TCC TGC ACA CTC TTC CGA ACA CTT GAC GTG TGC AAA
Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu Leu His Thr Phe
241_____245_____hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 1_____253 254 255_____260

          790          800          810          820          830          840
          *          *          *          *          *          *
GGC AGA ACT TGT AAA GA DOMINIO 1 TIPO EGF hTIE2 GGA TGC AAG TCT TAT GTG TTC TGT
CCG TCT TGA ACA TTT CTT TCC ACG TCA CCT GTT CTC CCT ACG TTC AGA ATA CAC AAG ACA
Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys
261_____265_____hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 2_____275_____280

          850          860          870          880          890          900
          *          *          *          *          *          *
CTC CCT GAC CCC TAT GGG TGT DOMINIO 2 TIPO EGF hTIE2 AAG GGT CTG CAG TGC AAT GAA
GAG GGA CTG GGG ATA CCC ACA AGG ACA CGG TGT CCG ACC TTC CCA GAC GTC ACG TTA CTT
Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu
281_____285_____hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 2_____295_____300

          910          920          930          940          950          960
          *          *          *          *          *          *
GCA TGC CAC CCT GGT TTT TAC CCC GGT GAA TGT GAA AGG TGC AGC TGC AAC AAT GGG
CCT ACG GTG GGA CCA AAA ATG CCC GGT CTA ACA TTC GAA TCC ACG TCG ACG TTG TTA CCC
Ala Cys His Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly
301_____305_____hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 3_____315_____320

          970          980          990          1000          1010          1020
          *          *          *          *          *          *
GAG ATG TGT GAT CGC TTC CAG GGT GAA TGT GAA GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GGT
CTC TAC ACA CTA CCG AAG GTT CCT ACA GAG ACG AGA GGT CCT ACC GTC CCC GAG GTC CTA
Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln Gly Leu Gln Cys
321_____325_____hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 3_____335_____340

          1030          1040          1050          1060          1070          1080
          *          *          *          *          *          *
GAG AGA GAA GGC ATA CCG AGC DOMINIO 3 TIPO EGF hTIE2 TTT ATT AGT GAT ACA GGT AGA
CTC TCT CTT CCG TAT GGC TCC TAC AGA CGT TAG ATA TAT AAA TAA TCA CTA TGT CCA TCT
Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Ser Ala Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg
341_____345_____hVEGFR1 IG DOMAIN 2_____348 349_____360

          1090          1100          1110          1120          1130          1140
          *          *          *          *          *          *
CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC CCC GAA DOMINIO 2 IG hVEGFR1 AA GGA AGG GAG
GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC
Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu
361_____365_____hVEGFR1 IG DOMAIN 2_____375_____380

          1150          1160          1170          1180          1190          1200
          *          *          *          *          *          *
CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT A DOMINIO 2 IG hVEGFR1 GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA
GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT
Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro
381_____385_____hVEGFR1 IG DOMAIN 2_____395_____400

          1210          1220          1230          1240          1250          1260
          *          *          *          *          *          *
CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC
GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG
Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile
401_____405_____hVEGFR1 IG DOMAIN 2_____415_____420

          1270          1280          1290          1300          1310          1320
          *          *          *          *          *          *
ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA G DOMINIO 2 IG hVEGFR1 TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG
TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC
Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly
421_____425_____hVEGFR1 IG DOMAIN 2_____435_____440

          1330          1340          1350          1360          1370          1380
          *          *          *          *          *          *
CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT c DOMINIO 2 IG hVEGFR1 GAG GAC AAA ACT CAC ACA TGC
GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT GTA GCT GTT GAG CTC CTG TTT TGA GTG TGT ACG
His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Leu Glu Asp Lys Thr His Thr Cys
441_____445_____hFC DOMAIN_____450 452 453_____460

```

DOMINIO hFC

ES 2 688 623 T3

```

1390      1400      1410      1420      1430      1440
*        *        *        *        *        *
CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA
GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
461_____465_____hFC DOMAIN_____475_____480_____

1450      1460      1470      1480      1490      1500
*        *        *        *        *        *
CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC c DOMINIO hFC .G GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG
GGG TTC CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
481_____485_____hFC DOMAIN_____495_____500_____

1510      1520      1530      1540      1550      1560
*        *        *        *        *        *
AGC CAC GAA GAC CCT GAG GTC AAG Tj DOMINIO hFC ; GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT
TCG GTG CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
501_____505_____hFC DOMAIN_____515_____520_____

1570      1580      1590      1600      1610      1620
*        *        *        *        *        *
GCC AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG cF DOMINIO hFC ; ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC
CGG TTC TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
521_____525_____hFC DOMAIN_____535_____540_____

1630      1640      1650      1660      1670      1680
*        *        *        *        *        *
ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG A DOMINIO hFC .G TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA
TGG CAG GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
541_____545_____hFC DOMAIN_____555_____560_____

1690      1700      1710      1720      1730      1740
*        *        *        *        *        *
GCC CTC CCA GCC CCC ATC GAG AAA ; DOMINIO hFC AA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA
CGG GAG GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
561_____565_____hFC DOMAIN_____575_____580_____

1750      1760      1770      1780      1790      1800
*        *        *        *        *        *
CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC c DOMINIO hFC .G ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC
GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTC CTC TAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
581_____585_____hFC DOMAIN_____595_____600_____

1810      1820      1830      1840      1850      1860
*        *        *        *        *        *
TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG
ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
601_____605_____hFC DOMAIN_____615_____620_____

1870      1880      1890      1900      1910      1920
*        *        *        *        *        *
CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG ( DOMINIO hFC TG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC
GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
621_____625_____hFC DOMAIN_____635_____640_____

1930      1940      1950      1960      1970      1980
*        *        *        *        *        *
TAC AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG A DOMINIO hFC .G CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC
ATG TCG TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
641_____645_____hFC DOMAIN_____655_____660_____

1990      2000      2010      2020      2030      2040
*        *        *        *        *        *
GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC c DOMINIO hFC .G AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT
CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
661_____665_____hFC DOMAIN_____675_____680_____

```

```

2046
*
AAA TGA (SEQ ID NO:13)      DOMINIO hFC

TTT ACT
Lys *** (SEQ ID NO:14)
681_682

```

DAAP#14

DAP núm. 14

```

                20          30          40          50          60
*
ATG GAC TCT TTA GCC AGC TTA GTT CTC TGT GGA GTC AGC TTG CTC CTT TCT GGA ACT GTG
TAC CTG AGA AAT CGG TCG AAT CAA GAG ACA CCT CAG TCG AAC GAG GAA AGA CCT TGA CAC
Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Leu Ser Gly Thr Val
1 _____ 5 _____ hTIE2 SIGNAL SEQUENCE _____ 15 _____ 20

                70          80          90          100          110          120
*
GAA GGT GCC ATG GAC TTG ATC SECUENCIA SEÑAL hTIE2 _____ CTT GTA TCT GAT GCT GAA ACA
CTT CCA CGG TAC CTG AAC TAG AAC TAG TTA AGG GAT GGA GAA CAT AGA CTA CGA CTT TGT
Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu Pro Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr
21__22__23 _____ 25 _____ hTIE2 IG DOMAIN 1 _____ 35 _____ 40

                130          140          150          160          170          180
*
TCT CTC ACC TGC ATT GCC TCT GGC DOMINIO 1 IG hTIE2 _____ GAG CCC ATC ACC ATA GGA AGG GAC
AGA GAG TGG ACG TAA CGG AGA CCC ACC GCG GGG GTA CTC GGG TAG TGG TAT CCT TCC CTG
Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly Trp Arg Pro His Glu Pro Ile Thr Ile Gly Arg Asp
41 _____ 45 _____ hTIE2 IG DOMAIN 1 _____ 55 _____ 60

                190          200          210          220          230          240
*
TTT GAA GCC TTA ATG AAC CAG CAC DOMINIO 1 IG hTIE2 _____ GAA GTT ACT CAA GAT GTG ACC AGA
AAA CTT CGG AAT TAC TTG GTC GTG GTC CTA GGC GAC CTT CAA TGA GTT CTA CAC TGG TCT
Phe Glu Ala Leu Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg
61 _____ 65 _____ hTIE2 IG DOMAIN 1 _____ 75 _____ 80

                250          260          270          280          290          300
*
GAA TGG GCT AAA AAA GTT GTT TGG DOMINIO 1 IG hTIE2 _____ GCT AGT AAG ATC AAT GGT GCT TAT
CTT ACC CGA TTT TTT CAA CAA ACC TTC TCT CTT TTC CGA TCA TTC TAG TTA CCA CGA ATA
Glu Trp Ala Lys Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile Asn Gly Ala Tyr
81 _____ 85 _____ hTIE2 IG DOMAIN 1 _____ 95 _____ 100

                310          320          330          340          350          360
*
TTC TGT GAA GGG CGA GTT CGA GGA DOMINIO 1 IG hTIE2 _____ ATA CGA ACC ATG AAG ATG CGT CAA
AAG ACA CTT CCC GCT CAA GCT CCT CTC CGT TAG TCC TAT GCT TGG TAC TTC TAC GCA GTT
Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg Ile Arg Thr Met Lys Met Arg Gln
101 _____ 105 _____ hTIE2 IG DOMAIN 1 _____ 115 _____ 120

                370          380          390          400          410          420
*
CAA GCT TCC TTC CTA CCA GCT ACT DOMINIO 1 IG hTIE2 _____ GTG GAC AAG GGA GAT AAC GTG AAC
GTT CGA AGG AAG GAT GGT CGA TGA AAT TGA TAC TGA CAC CTG TTC CCT CTA TTG CAC TTG
Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn
121 122 _____ 125 _____ hTIE2 IG DOMAIN 2 _____ 135 _____ 140

                430          440          450          460          470          480
*
ATA TCT TTC AAA AAG GTA TTG ATT DOMINIO 2 IG hTIE2 _____ GCA GTG ATT TAC AAA AAT GGT TCC
TAT AGA AAG TTT TTC CAT AAC TAA TTT CTT CTT CTA CGT CAC TAA ATG TTT TTA CCA AGG
Ile Ser Phe Thr Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser
141 _____ 145 _____ hTIE2 IG DOMAIN 2 _____ 155 _____ 160

                490          500          510          520          530          540
*
TTC ATC CAT TCA GTG CCC CGG CAI DOMINIO 2 IG hTIE2 _____ ATT CTA GAA GTA CAC CTG CCT CAT
AAG TAG GTA AGT CAC GGG GCC GTA CTT CAT GGA CTA TAA GAT CTT CAT GTG GAC GGA GTA
Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val His Leu Pro His
161 _____ 165 _____ hTIE2 IG DOMAIN 2 _____ 175 _____ 180

                550          560          570          580          590          600
*
GCT CAG CCC CAG GAT GCT GGA GTG DOMINIO 2 IG hTIE2 _____ TAT ATA GGA GGA AAC CTC TTC ACC
CGA GTC GGG GTC CTA CGA CCT CAC ATG AGC CGG TCC ATA TAT CCT CCT TTG GAG AAG TGG
Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr
181 _____ 185 _____ hTIE2 IG DOMAIN 2 _____ 195 _____ 200

                610          620          630          640          650          660
*
TCG GCC TTC ACC AGG CTG ATA GTC CGG AGA TGT GAA GCC CAG AAG TGG GGA CCT GAA TGC
AGC CGG AAG TGG TCC GAC TAT CAG GCC TCT ACA CTT CGG GTC TTC ACC CCT GGA CTT ACG
Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys
201 _____ 205 _____ hTIE2 IG DOMAIN 2 _____ 213 214 215 _____ 220

                670          680          690          700          710          720
*
DOMINIO 2 IG hTIE2 _____
    
```

ES 2 688 623 T3

AAC CAT CTC TGT ACT GCT TGT ATG AAC AAT GGT GTC TGC CAT GAA GAT ACT GGA GAA TGC
 TTG GTA GAG ACA TGA CGA ACA TAC TTG TTA CCA CAG ACG GTA CTT CTA TGA CCT CTT ACG
 Asn His Leu Cys Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys
 221 225 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 1 235 240

730 740 750 760 770 780
 * * * * *
 ATT TGC CCT CCT GGG TTT ATG DOMINIO 2 TIPO EGF hTIE2 G GCT TGT GAA CTG CAC ACG TTT
 TAA ACG GGA GGA CCC AAA TAC CCT TCC TGC ACA CTC TTC CGA ACA CTT GAC GTG TGC AAA
 Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu Leu His Thr Phe
 241 245 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 1 253 254 255 260

790 800 810 820 830 840
 * * * * *
 GGC AGA ACT TGT AAA GAA DOMINIO 2 TIPO EGF hTIE2 JAG GGA TGC AAG TCT TAT GTG TTC TGT
 CCG TCT TGA ACA TTT CTT TCC ACG TCA CCT GTT CTC CCT ACG TTC AGA ATA CAC AAG ACA
 Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys
 261 265 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 2 275 280

850 860 870 880 890 900
 * * * * *
 CTC CCT GAC CCC TAT GGG TGT DOMINIO 2 TIPO EGF hTIE2 G AAG GGT CTG CAG TGC AAT GAA
 GAG GGA CTG GGG ATA CCC ACA AGG ACA CGG TGT CCG ACC TTC CCA GAC GTC ACG TTA CTT
 Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu
 281 285 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 2 295 300

910 920 930 940 950 960
 * * * * *
 GCA TGC CAC CCT GGT TTT ATC DOMINIO 2 TIPO EGF hTIE2 T AGG TGC AGC TGC AAC AAT GGG
 CGT ACG GTG GGA CCA AAA ATG CCC GGT CTA ACA TTC GAA TCC ACG TCG ACG TTG TTA CCC
 Ala Cys His Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly
 301 305 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 3 315 320

970 980 990 1000 1010 1020
 * * * * *
 GAG ATG TGT GAT CGC TTC CAA DOMINIO 3 TIPO EGF hTIE2 A GGA TGG CAG GGG CTC CAG TGT
 CTC TAC ACA CTA GCG AAG GTT CCT ACA GAG ACG AGA GGT CCT ACC GTC CCC GAG GTC ACA
 Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln Gly Leu Gln Cys
 321 325 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 3 335 340

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 * * * * *
 GAG AGA GAA GGC ATA CCG AGG DOMINIO 3 TIPO EGF hTIE2 A GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG
 CTC TCT CTT CCG TAT GGC TCC TAC AAA TAA TCA CTA TGT CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC
 Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met
 341 345 hVEGFR1 IG DOMAIN 2 348 349 360

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 * * * * *
 TAC AGT GAA ATC CCC GAA ATT ATA CAC ATG ACT DOMINIO 2 IG hVEGFR1 GTC ATT CCC TGC
 ATG TCA CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG
 Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys
 361 365 hVEGFR1 IG DOMAIN 2 375 380

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 * * * * *
 CGG GTT ACG TCA CCT AAC ATC AC DOMINIO 2 IG hVEGFR1 TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC
 GCC CAA TGC AGT GGA TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG
 Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile
 381 385 hVEGFR1 IG DOMAIN 2 395 400

1210 1220 1240 1250 1260
 * * * * *
 CCT GAT GGA AAA CGC ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG
 GGA CTA CCT TTT GCG TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC
 Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
 401 405 hVEGFR1 IG DOMAIN 2 415 420

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 * * * * *
 TAC AAA GAA ATA GGG CTT CTG AC DOMINIO 2 IG hVEGFR1 AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA
 ATG TTT CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT
 Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr
 421 425 hVEGFR1 IG DOMAIN 2 435 440

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 * * * * *
 AAC TAT CTC ACA CAT CGA CAA C DOMINIO 2 IG hVEGFR1 ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA
 TTG ATA GAG TGT GTA GCT GTT GAG CTC CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT
 Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Leu Glu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 441 445 447 448 hFC DOMAIN 460

DOMINIO hFC

ES 2 688 623 T3

```

1390      1400      1410      1420      1430      1440
*         *         *         *         *         *
CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC
GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGG GAG
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
461_____465_____hFC DOMAIN_____475_____480

1450      1460      1470      1480      1490      1500
*         *         *         *         *         *
ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC DOMINIO hFC 3TG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT
TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT CTG GGA
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
481_____485_____hFC DOMAIN_____495_____500

1510      1520      1530      1540      1550      1560
*         *         *         *         *         *
GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG Gz DOMINIO hFC 3 GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG
CTC CAG TTC AAG TFG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT TTC GGC
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
501_____505_____hFC DOMAIN_____515_____520

1570      1580      1590      1600      1610      1620
*         *         *         *         *         *
CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG Tz DOMINIO hFC c AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG
GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG GTC
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
521_____525_____hFC DOMAIN_____535_____540

1630      1640      1650      1660      1670      1680
*         *         *         *         *         *
GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC A2 DOMINIO hFC c TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC
CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG GAG GGT CGG GGG
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
541_____545_____hFC DOMAIN_____555_____560

1690      1700      1710      1720      1730      1740
*         *         *         *         *         *
ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC p DOMINIO hFC 3C CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG
TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG TGG GAC
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
561_____565_____hFC DOMAIN_____575_____580

1750      1760      1770      1780      1790      1800
*         *         *         *         *         *
CCC CCA TCC CGG GAG GAG ATG ACC p DOMINIO hFC 3C AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC
GGG GGT AGG GCC CTC CTC TAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
581_____585_____hFC DOMAIN_____595_____600

1810      1820      1830      1840      1850      1860
*         *         *         *         *         *
TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC
AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
601_____605_____hFC DOMAIN_____615_____620

1870      1880      1890      1900      1910      1920
*         *         *         *         *         *
AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC Tc DOMINIO hFC ; TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC
TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC GAG TGG
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
621_____625_____hFC DOMAIN_____635_____640

1930      1940      1950      1960      1970      1980
*         *         *         *         *         *
GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG Gc DOMINIO hFC c TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT
CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
641_____645_____hFC DOMAIN_____655_____660

1990      2000      2010      2020      2030
*         *         *         *         *
CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG A1 DOMINIO hFC G TCT CCG GGT AAA TGA (SEQ ID NO:15)
GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *** (SEQ ID NO:16)
661_____665_____hFC DOMAIN_____675_____677

```

DOMINIO hFC

DAAP núm. 15

```

      10          20          30          40          50          60
ATG GAC TCT TTA GCC AGC TTA GTT CTC TGT GGA GTC AGC TTG CTC CTT TCT GGA ACT GTG
TAC CTG AGA AAT CGG TCG AAT CAA GAG ACA CCT CAG TCG AAC GAG GAA AGA CCT TGA CAC
Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Ser Gly Thr Val
1      5      15      20
      70          80          90          100         110         120
GAA GGT GCC ATG GAC TTG ATC TTG ATC AAT TCC CTA CCT CTT GTA TCT GAT GCT GAA ACA
CTT CCA CGG TAC CTG AAC TAG AAC TAG TTA AGG GAT GGA GAA CAT AGA CTA CGA CTT TGT
Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu Pro Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr
21 22 23 24 25      30      35      40
      SECUENCIA SEÑAL hTIE2
      130         140         150         160         170         180
TCT CTC ACC TGC ATT GCC TCT GGG TGG CGC CCC CAT GAG CCC ATC ACC ATA GGA AGG GAC
AGA GAG TGG ACG TAA CGG AGA CCC ACC GCG GGG GTA CTC GGG TAG TGG TAT CCT TCC CTG
Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly Trp Arg Pro His Ser Leu Val Thr Ile Gly Arg Asp
41 42 43 44 45      50      55      60
      DOMINIO 1 IG hTIE2
      190         200         210         220         230         240
TTT GAA GCC TTA ATG AAC CAG CAC CAG GAT CCG CTG GAA GTT ACT CAA GAT GTG ACC AGA
AAA CTT CGG AAT TAC TTG GTC GTG GTC CTA GGC GAC CTT CAA TGA GTT CTA CAC TGG TCT
Phe Glu Ala Leu Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg
61 62 63 64 65      70      75      80
      DOMINIO 1 IG hTIE2
      250         260         270         280         290         300
GAA TGG GCT AAA AAA GTT GTT TGG AAG AGA GAA AAG GCT AGT AAG ATC AAT GGT GCT TAT
CTT ACC CGA TTT TTT CAA CAA ACC TTC TCT CTT TTC CGA TCA TTC TAG TTA CCA CGA ATA
Glu Trp Ala Lys Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile Asn Gly Ala Tyr
81 82 83 84 85      90      95      100
      DOMINIO 1 IG hTIE2
      310         320         330         340         350         360
TTC TGT GAA GGG CGA GTT CGA GGA GAG GCA ATC AGG ATA CGA ACC ATG AAG ATG CGT CAA
AAG ACA CTT CCC GCT CAA GCT CCT CTC CGT TAG TCC TAT GCT TGG TAC TTC TAC GCA GTT
Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg Thr Met Lys Met Arg Gln
101 102 103 104 105      110      115      120
      DOMINIO 1 IG hTIE2
      370         380         390         400         410         420
CAA GCT TCC TTC CTA CCA GCT ACT TTA ACT ATG ACT GTG GAC AAG GGA GAT AAC GTG AAC
GTT CGA AGG AAG GAT GGT CGA TGA AAT TGA TAC TGA CAC CTG TTC CCT CTA TTG CAC TTG
Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn
121 122 123 124 125      130      135      140
      DOMINIO 1 IG hTIE2
      430         440         450         460         470         480
ATA TCT TTC AAA AAG GTA TTG ATT AAA GAA GAA GAT GCA GTG ATT TAC AAA AAT GGT TCC
TAT AGA AAG TTT TTC CAT AAC TAA TTT CTT CTT CTA CGT CAC TAA ATG TTT TTA CCA AGG
Ile Ser Phe Lys Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser
141 142 143 144 145      150      155      160
      DOMINIO 1 IG hTIE2
      490         500         510         520         530         540
TTC ATC CAT TCA GTG CCC CGG CAT GAA GTA CCT GAT ATT CTA GAA GTA CAC CTG CCT CAT
AAG TAG GTA AGT CAC GGG GCC GTA CTT CAT GGA CTA TAA GAT CTT CAT GTG GAC GGA GTA
Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val His Leu Pro His
161 162 163 164 165      170      175      180
      DOMINIO 1 IG hTIE2
      550         560         570         580         590         600
GCT CAG CCC CAG GAT GCT GGA GTG TAC TCG GCC AGG TAT ATA GGA GGA AAC CTC TTC ACC
CGA GTC GGG GTC CTA CGA CCT CAC ATG AGC CGG TCC ATA TAT CCT CCT TTG GAG AAG TGG
Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr
181 182 183 184 185      190      195      200
      DOMINIO 2 IG hTIE2
      610         620         630         640         650         660
TCG GCC TTC ACC AGG CTG ATA GTC CGG AGA TGT GAA GCC CAG AAG TGG GGA CCT GAA TGC
AGC CGG AAG TGG TCC GAC TAT CAG GCC TCT ACA CTT CGG GTC TTC ACC CCT GGA CTT ACG
Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys
201 202 203 204 205      210      215      220
      DOMINIO 2 IG hTIE2
      670         680         690         700         710         720
      *          *          *          *          *          *
      DOMINIO 2 IG hTIE2

```

```

AAC CAT CTC TGT ACT GCT TGT ATG AAC AAT GGT GTC TGC CAT GAA GAT ACT GGA GAA TGC
TTG GTA GAG ACA TGA CGA ACA TAC TTG TTA CCA CAG ACG GTA CTT CTA TGA CCT CTT ACG
Asn His Leu Cys Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys
221_____225_____hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 1_____235_____240

      730          74 DOMINIO 1 TIPO EGF hTIE2          760          770          780
      *          *          *          *          *          *
ATT TGC CCT CCT GGG TTT ATG GGA AGG ACG TGT GAG AAG GCT TGT GAA CTG CAC ACG TTT
TAA ACG GGA GGA CCC AAA TAC CCT TCC TGC ACA CTC TTC CGA ACA CTT GAC GTG TGC AAA
Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu Leu His Thr Phe
241_____245_____hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 1_____253 254 255_____260

      790          820          830          840
      *          *          *          *
GGC AGA ACT TGT AAA GAA AGG TGC AGT GGA CAA GAG GGA TGC AAG TCT TAT GTG TTC TGT
CCG TCT TGA ACA TTT CTT TCC ACG TCA CCT GTT CTC CCT ACG TTC AGA ATA CAC AAG ACA
Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys
261_____265_____hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 2_____275_____280

      850          860 DOMINIO 1 TIPO EGF hTIE2          880          890          900
      *          *          *          *          *
CTC CCT GAC CCC TAT GGG TGT TCC TGT GCC ACA GGC TGG AAG GGT CTG CAG TGC AAT GAA
GAG GGA CTG GGG ATA CCC ACA AGG ACA CGG TGT CCG ACC TTC CCA GAC GTC ACG TTA CTT
Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu
281_____285_____hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 2_____295_____300

      910          920 DOMINIO 1 TIPO EGF hTIE2          940          950          960
      *          *          *          *          *
GCA TGC CAC CCT GGT TTT TAC GGG CCA GAT TGT AAG CTT AGG TGC AGC TGC AAC AAT GGG
CGT ACG GTG GGA CCA AAA ATG CCC GGT CTA ACA TTC GAA TCC ACG TCG ACG TTG TTA CCC
Ala Cys His Pro Tyr Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly
301_____305_____hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 3_____315_____320

      970          980 DOMINIO 3 TIPO EGF hTIE2          1000          1010          1020
      *          *          *          *          *
GAG ATG TGT GAT CGC TTC CAA GGA TGT CTC TGC TCT CCA GGA TGG CAG GGG CTC CAG TGT
CTC TAC ACA CTA GCG AAG GTT CCT ACA GAG ACG AGA GGT CCT ACC GTC CCC GAG GTC ACA
Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln Gly Leu Gln Cys
321_____325_____hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 3_____335_____340

      1030          1040 DOMINIO 3 TIPO EGF hTIE2          1060          1070          1080
      *          *          *          *          *
GAG AGA GAA GGC ATA CCG AGG ATG GAG ATG TAC AGT GAA ATC CCC GAA ATT ATA CAC ATG
CTC TCT CTT CCG TAT GGC TCC TAC CTC TAC ATG TCA CTT TAG GGG CTT TAA TAT GTG TAC
Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met
341_____345_____hVEGFR1 IG DOMAIN 2_____348 349_____360

      1090          1100          1110          1130          1140
      *          *          *          *          *
ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CGG GTT ACG TCA CCT AAC ATC ACT GTT ACT
TGA CTT CTT CCG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA TGA
Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr
361_____365_____hVEGFR1 IG DOMAIN 2_____375_____380

      1150          1160          1180          1190          1200
      *          *          *          *          *
TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA CGC ATA ATC TGG GAC AGT
AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT GCG TAT TAG ACC CTG TCA
Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser
381_____385_____hVEGFR1 IG DOMAIN 2_____395_____400

DOMINIO 2 IG hVEGFR1

      1210          1220          1230          1240          1250          1260
      *          *          *          *          *          *
AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA GGG CTT CTG ACC TGT GAA
TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT CCC GAA GAC TGG ACA CTT
Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
401_____405_____hVEGFR1 IG DOMAIN 2_____415_____420

      1270          1280          1300          1310          1320
      *          *          *          *          *
GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA CAT CGA CAA CTC GAG GAC
CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT GTA GCT GTT GAG CTC CTG
Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Leu Glu Asp
421_____425_____hVEGFR1 IG DOMAIN 2_____435_____438 438_____440

      1330          1340          1360          1370          1380
      *          *          *          *          *
AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC
TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
441_____445_____hFC DOMAIN_____455_____460

```

DOMINIO hFC

DAAP#16

DAAP núm. 16

```

                20          30          40          50          60
ATG GAC TCT TTA GGC AGC TTA GGT CTC TGT GGA GTC AGC TTG CTC CTT TCT GGA ACT GTG
TAC CTG AGA AAT CGG TCG AAT CAA GAG ACA CCT CAG TCG AAC GAG GAA AGA CCT TGA CAC
Met Asp Ser Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Ser Gly Thr Val
1 _____ 5 _____ hTIE2 SIGNAL SEQUENCE _____ 15 _____ 20

                70          80          90          100          110          120
GAA GGT GCC ATG GAC TTG ATC SECUENCIA SEÑAL hTIE2 CT CTT GTA TCT GAT GCT GAA ACA
CTT CCA CGG TAC CTG AAC TAG AAC TAG TTA AGG GAT GGA GAA CAT AGA CTA CGA CTT TGT
Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu Pro Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr
21 22 23 _____ 25 _____ hTIE2 IG DOMAIN 1 _____ 35 _____ 40

                130          140          150          160          170          180
TCT CTC ACC TGG ATT GCC TCT GGT DOMINIO 1 IG hTIE2 GAG CCC ATC ACC ATA GGA AGG GAC
AGA GAG TGG ACG TAA CGG AGA CCC ACC GCG GGG GTA CTC GGG TAG TGG TAT CCT TCC CTG
Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly Trp Arg Pro His Glu Pro Ile Thr Ile Gly Arg Asp
41 _____ 45 _____ hTIE2 IG DOMAIN 1 _____ 55 _____ 60

                190          200          210          220          230          240
TTT GAA GCC TTA ATG AAC CAG CAC DOMINIO 1 IG hTIE2 GAA GTT ACT CAA GAT GTG ACC AGA
AAA CTT CGG AAT TAC TTG GTC GTG GTC CTA GGC GAC CTT CAA TGA GTT CTA CAC TGG TCT
Phe Glu Ala Leu Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg
61 _____ 65 _____ hTIE2 IG DOMAIN 1 _____ 75 _____ 80

                250          260          270          280          290          300
GAA TGG GCT AAA AAA GTT GTT TGT DOMINIO 1 IG hTIE2 GCT AGT AAG ATC AAT GGT GCT TAT
CTT ACC CGA TTT TTT CAA CAA ACC TTC TCT CTT TTC CGA TCA TTC TAG TTA CCA CGA ATA
Glu Trp Ala Lys Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile Asn Gly Ala Tyr
81 _____ 85 _____ hTIE2 IG DOMAIN 1 _____ 95 _____ 100

                310          320          330          340          350          360
TTC TGT GAA GGG CGA GTT CGA GGT DOMINIO 1 IG hTIE2 ATA CGA ACC ATG AAG ATG CGT CAA
AAG ACA CTT CCC GCT CAA GCT CCT CTC CGT TAG TCC TAT GCT TGG TAC TTC TAC GCA GTT
Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg Ile Arg Thr Met Lys Met Arg Gln
101 _____ 105 _____ hTIE2 IG DOMAIN 1 _____ 115 _____ 120

                370          380          390          400          410          420
CAA GCT TCC TTC CTA CCA GCT ACT DOMINIO 1 IG hTIE2 ATG GAC AAG GGA GAT AAC CTG AAC
GTT CGA AGG AAG GAT GGT CGA TGA AAT TGA TAC TGA CAC CTG TTC CCT CTA TTG CAC TTG
Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn
121 122 _____ 125 _____ hTIE2 IG DOMAIN 2 _____ 135 _____ 140

                430          440          450          460          470          480
ATA TCT TTC AAA AAG GTA TTG ATT DOMINIO 2 IG hTIE2 ACA GTG ATT TAC AAA AAT GGT TCC
TAT AGA AAG TTT TTC CAT AAC TAA TTT CTT CTT CTA CGT CAC TAA ATG TTT TTA CCA AGG
Ile Ser Phe Lys Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser
141 _____ 145 _____ hTIE2 IG DOMAIN 2 _____ 155 _____ 160

                490          500          510          520          530          540
TTC ATC CAT TCA GTG CCC CGG CAI DOMINIO 2 IG hTIE2 ATT CTA GAA GTA CAC CTG CCT CAT
AAG TAG GTA AGT CAC GGG GCC GTA CTT CAT GGA CTA TAA GAT CTT CAT GTG GAC GGA GTA
Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val His Leu Pro His
161 _____ 165 _____ hTIE2 IG DOMAIN 2 _____ 175 _____ 180

                550          560          570          580          590          600
GCT CAG CCC CAG GAT GCT GGA GTG DOMINIO 2 IG hTIE2 TAT ATA GGA GGA AAC CTC TTC ACC
CGA GTC GGG GTC CTA CGA CCT CAC ATG AGC CGG TCC ATA TAT CCT CCT TTG GAG AAG TGG
Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr
181 _____ 185 _____ hTIE2 IG DOMAIN 2 _____ 195 _____ 200

                610          620          630          640          650          660
TCG GCC TTC ACC AGG CTG ATA GTC CGG AGA TGT GAA GCC CAG AAG TGG GGA CCT GAA TGC
AGC CGG AAG TGG TCC GAC TAT CAG GCC TCT ACA CTT CGG GTC TTC ACC CCT GGA CTT ACG
Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys
201 _____ 205 _____ hTIE2 IG DOMAIN 2 _____ 213 214 215 _____ 220

                670          680          690          700          710          720
                *          *          *          *          *          *
                DOMINIO 2 IG hTIE2
    
```

ES 2 688 623 T3

AAC CAT CTC TGT ACT GCT TGT ATG AAC AAT GGT GTC TGC CAT GAA GAT ACT GGA GAA TGC
 TTG GTA GAG ACA TGA CGA ACA TAC TTG TTA CCA CAG ACG GTA CTT CTA TGA CCT CTT ACG
 Asn His Leu Cys Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys
 221 225 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 1 235 240

730 740 750 760 770 780
 * * * * *
 ATT TGC CCT CCT GGG TTT ATG DOMINIO 1 TIPO EGF hTIE2 ; GCT TGT GAA CTG CAC ACG TTT
 TAA ACG GGA GGA CCC AAA TAC CCT TCC TGC ACA CTC TTC CGA ACA CTT GAC GTG TGC AAA
 Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu Leu His Thr Phe
 241 245 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 1 253 254 255 260

790 800 810 820 830 840
 * * * * *
 GGC AGA ACT TGT AAA G DOMINIO 1 TIPO EGF hTIE2 _AG GGA TGC AAG TCT TAT GTG TTC TGT
 CCG TCT TGA ACA TTT CTT TCC ACG TCA CCT GTT CTC CCT ACG TTC AGA ATA CAC AAG ACA
 Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys
 261 265 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 2 275 280

850 860 870 880 890 900
 * * * * *
 CTC CCT GAC CCC TAT GGG TGT DOMINIO 2 TIPO EGF hTIE2 _G AAG GGT CTG CAG TGC AAT GAA
 GAG GGA CTG GGG ATA CCC ACA AGG ACA CGG TGT CCG ACC TTC CCA GAC GTC ACG TTA CTT
 Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu
 281 285 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 2 295 300

910 920 930 940 950 960
 * * * * *
 GCA TGC CAC CCT GGT TTT TAC DOMINIO 2 TIPO EGF hTIE2 _T AGG TGC AGC TGC AAC AAT GGG
 CGT ACG GTG GGA CCA AAA ATG CCC GGT CTA ACA TTC GAA TCC ACG TCG ACG TTG TTA CCC
 Ala Cys His Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly
 301 305 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 3 315 320

970 980 990 1000 1010 1020
 * * * * *
 GAG ATG TGT GAT CGC TTC CAA DOMINIO 3 TIPO EGF hTIE2 _A GGA TGG CAG GGG CTC CAG TGT
 CTC TAC ACA CTA GCG AAG GTT CCT ACA GAG ACG AGA GGT CCT ACC GTC CCC GAG GTC ACA
 Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln Gly Leu Gln Cys
 321 325 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 3 335 340

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 * * * * *
 GAG AGA GAA GGC ATA CCG AGG DOMINIO 3 TIPO EGF hTIE2 _A GAG ATG TAC AGT GAA ATC CCC
 CTC TCT CTT CCG TAT GGC TCC TAC CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG GGG
 Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro
 341 345 hVEGFR1 IG DOMAIN 2 348 349 360

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 * * * * *
 GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC DOMINIO 2 IG hVEGFR1 _STT ACG TCA CCT
 CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT GGA
 Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro
 361 365 hVEGFR1 IG DOMAIN 2 375 380

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 * * * * *
 AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AA DOMINIO 2 IG hVEGFR1 _TTG ATC CCT GAT GGA AAA CGC
 TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT GCG
 Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg
 381 385 hVEGFR1 IG DOMAIN 2 395 400

1210 1220 1240 1250 1260
 * * * * *
 ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA GGG
 TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT CCC
 Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly
 401 405 hVEGFR1 IG DOMAIN 2 415 420

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 * * * * *
 CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA G DOMINIO 2 IG hVEGFR1 _T AAG ACA AAC TAT CTC ACA CAT
 GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT GTA
 Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His
 421 425 hVEGFR1 IG DOMAIN 2 435 440

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 * * * * *
 CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA G DOMINIO 2 IG hVEGFR1 _A CCA CGC CCA GTC AAA TTA CTT
 GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAG GTT TAT TCG TGT GGT GCG GGT CAG TTT AAT GAA
 Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gln Ile Ser Thr Pro Arg Pro Val Lys Leu Leu
 441 445 hVEGFR1 IG DOMAIN 3 448 449 450 460

DOMINIO 3 IG hVEGFR1

ES 2 688 623 T3

```

1390          1400          1410          1420          1430          1440
*           *           *           *           *           *
AGA GGC CAT ACT CTT GTC CTC AAT TGT ACT GCT ACC ACT CCC TTG AAC ACG AGA GTT CAA
TCT CCG GTA TGA GAA CAG GAG TTA ACA TGA CGA TGG TGA GGG AAC TTG TGC TCT CAA GTT
Arg Gly His Thr Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Thr Thr Pro Leu Asn Thr Arg Val Gln
461_____465_____hVEGFR1 IG DOMAIN 3_____475_____480

1450          1460          1470          1480          1490          1500
*           *           *           *           *           *
ATG ACC TGG AGT TAC CCT GAT G. DOMINIO 3 IG hVEGFR1 T TCC GTA AGG CGA CGA ATT GAC
TAC TGG ACC TCA ATG GGA CTA CTT TTT TTA TTC TCT CGA AGG CAT TCC GCT GCT TAA CTG
Met Thr Trp Ser Tyr Pro Asp Glu Lys Asn Lys Arg Ala Ser Val Arg Arg Arg Ile Asp
481_____485_____hVEGFR1 IG DOMAIN 3_____495_____500

1510          1520          1530          1540          1550          1560
*           *           *           *           *           *
CAA AGC AAT TCC CAT GCC AAC A. DOMINIO 3 IG hVEGFR1 T ACT ATT GAC AAA ATG CAG AAC
GTT TCG TTA AGG GTA CCG TTG TAT AAG ATG TCA CAA GAA TGA TAA CTG TTT TAC GTC TTG
Gln Ser Asn Ser His Ala Asn Ile Phe Tyr Ser Val Leu Thr Ile Asp Lys Met Gln Asn
501_____505_____hVEGFR1 IG DOMAIN 3_____515_____520

1570          1580          1590          1600          1610          1620
*           *           *           *           *           *
AAA GAC AAA GGA CTT TAT ACT T. DOMINIO 3 IG hVEGFR1 A CCA TCA TTC AAA TCT GTT AAC
TTT CTG TTT CCT GAA ATA TGA ACA GCA CAT TCC TCA CCT GGT AGT AAG TTT AGA CAA TTG
Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Thr Cys Arg Val Arg Ser Gly Pro Ser Phe Lys Ser Val Asn
521_____525_____hVEGFR1 IG DOMAIN 3_____535_____540

1630          1640          1650          1660          1670          1680
*           *           *           *           *           *
ACC TCA GTG CAT ATA TAT GAT A. DOMINIO 3 IG hVEGFR1 A ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC
TGG AGT CAC GTA TAT ATA CTA TTT CGT GAG CTC CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC ACG
Thr Ser Val His Ile Tyr Asp Lys Ala Leu Glu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
541_____545_____549 550_____hFC DOMAIN_____560

1690          1700          1710          DOMINIO hFC          1730          1740
*           *           *           *           *           *
CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC
GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Lys Pro Lys Asp
561_____565_____hFC DOMAIN_____575_____580

1750          1760          1770          DOMINIO hFC          1780          1790          1800
*           *           *           *           *           *           *
ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT G. DOMINIO hFC C GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA
TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG CTT
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu
581_____585_____hFC DOMAIN_____595_____600

1810          1820          DOMINIO hFC          1840          1850          1860
*           *           *           *           *           *
GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA
CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC TGT
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
601_____605_____hFC DOMAIN_____615_____620

1870          1880          1890          DOMINIO hFC          1900          1910          1920
*           *           *           *           *           *           *
AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC . DOMINIO hFC JGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG
TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
621_____625_____hFC DOMAIN_____635_____640

1930          1940          1950          DOMINIO hFC          1960          1970          1980
*           *           *           *           *           *           *
CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG G. DOMINIO hFC ic AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA
GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG GAG GGT
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
641_____645_____hFC DOMAIN_____655_____660

1990          2000          2010          DOMINIO hFC          2020          2030          2040
*           *           *           *           *           *           *
GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC A. DOMINIO hFC G CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC
CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC ATG
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
661_____665_____hFC DOMAIN_____675_____680

2050          2060          2070          DOMINIO hFC          2080          2090          2100
*           *           *           *           *           *           *
ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAG A. DOMINIO hFC C CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC

```

ES 2 688 623 T3

```

TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTC CTC TAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
681_____685_____hFC DOMAIN_____695_____700

      2110          2120          2130          2140          2150          2160
      *            *            *            *            *            *
AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC G DOMINIO hFC 3G GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC
TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
701_____705_____hFC DOMAIN_____715_____720

      2170          2180          2190          2200          2210          2220
      *            *            *            *            *            *
AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG C DOMINIO hFC c GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG
TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TTC
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
721_____725_____hFC DOMAIN_____735_____740

      2230          2240          2250          2260          2270          2280
      *            *            *            *            *            *
CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG C DOMINIO hFC c GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT
GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
741_____745_____hFC DOMAIN_____755_____760

      2290          2300          2310          2320          2330
      *            *            *            *            *
GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG c DOMINIO hFC rc TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA (SEQ ID NO:19)
CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *** (SEQ ID NO:20)
761_____765_____hFC DOMAIN_____775_____779

```

DOMINIO hFC

DAAP núm. 17

```

      10          20          30          40          50          60
      *          *          *          *          *          *
ATG GAC TCT TTA GCC AGC TTA GTT CTC TGT GGA GTC AGC TTG CTC CTT TCT GGA ACT GTG
TAC CTG AGA AAT CGG TCG AAT CAA GAG ACA CCT CAG TCG AAC GAG GAA AGA CCT TGA CAC
Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Ser Gly Thr Val
1_____5_____hTIE2 SIGNAL SEQUENCE_____15_____20

      70          80          100          110          120
      *          *          *          *          *
GAA GGT GCC ATG GAC TTG ATC TTT TCC CTA CCT CTT GTA TCT GAT GCT GAA ACA
CTT CCA CGG TAC CTG AAC TAG AAC TAG TTA AGG GAT GGA GAA CAT AGA CTA CGA CTT TGT
Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu Pro Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr
21__22__23_____25_____hTIE2 IG DOMAIN 1_____35_____40

      130          140          160          170          180
      *          *          *          *          *
TCT CTC ACC TGC ATT GCC TCT GGG TGG CGC CCC CAT GAG CCC ATC ACC ATA GGA AGG GAC
AGA GAG TGG ACG TAA CGG AGA CCC ACC GCG GGG GTA CTC GGG TAG TGG TAT CCT TCC CTG
Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly Trp Arg Pro His Glu Pro Ile Thr Ile Gly Arg Asp
41_____45_____hTIE2 IG DOMAIN 1_____55_____60

      190          200          220          230          240
      *          *          *          *          *
TTT GAA GCC TTA ATG AAC CAG CAC CAG GAT CCG CTG GAA GTT ACT CAA GAT GTG ACC AGA
AAA CTT CGG AAT TAC TTG GTC GTG GTC CTA GGC GAC CTT CAA TGA GTT CTA CAC TGG TCT
Phe Glu Ala Leu Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg
61_____65_____hTIE2 IG DOMAIN 1_____75_____80

      250          260          280          290          300
      *          *          *          *          *
GAA TGG GCT AAA AAA GTT GTT TGG AAG AGA GAA AAG GCT AGT AAG ATC AAT GGT GCT TAT
CTT ACC CGA TTT TTT CAA CAA ACC TTC TCT CTT TTC CGA TCA TTC TAG TTA CCA CGA ATA
Glu Trp Ala Lys Arg Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile Asn Gly Ala Tyr
81_____85_____hTIE2 IG DOMAIN 1_____95_____100

      310          320          340          350          360
      *          *          *          *          *
TTC TGT GAA GGG CGA GTT CGA GGA GAG GCA ATC AGG ATA CGA ACC ATG AAG ATG CGT CAA
AAG ACA CTT CCC GCT CAA GCT CCT CTC CGT TAG TCC TAT GCT TGG TAC TTC TAC GCA GTT
Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg Thr Met Lys Met Arg Gln
101_____105_____hTIE2 IG DOMAIN 1_____115_____120

      370          380          400          410          420
      *          *          *          *          *
CAA GCT TCC TTC CTA CCA GCT ACT TTA ACT ATG ACT GTG GAC AAG GGA GAT AAC GTG AAC
GTT CGA AGG AAG GAT GGT CGA TGA AAT TGA TAC TGA CAC CTG TTC CCT CTA TTG CAC TTG
Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn
121 122_____125_____hTIE2 IG DOMAIN 2_____135_____140

      430          440          460          470          480
      *          *          *          *          *
ATA TCT TTC AAA AAG GTA TTG ATT AAA GAA GAA GAT GCA GTG ATT TAC AAA AAT GGT TCC
TAT AGA AAG TTT TTC CAT AAC TAA TTT CTT CTT CTA CGT CAC TAA ATG TTT TTA CCA AGG
Ile Ser Phe Lys Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser
141_____145_____hTIE2 IG DOMAIN 2_____155_____160

      490          500          520          530          540
      *          *          *          *          *
TTC ATC CAT TCA GTG CCC CGG CAT GAA GTA CCT GAT ATT CTA GAA GTA CAC CTG CCT CAT
AAG TAG GTA AGT CAC GGG GCC GTA CTT CAT GGA CTA TAA GAT CTT CAT GTG GAC GGA GTA
Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val His Leu Pro His
161_____165_____hTIE2 IG DOMAIN 2_____175_____180

      550          560          580          590          600
      *          *          *          *          *
GCT CAG CCC CAG GAT GCT GGA GTG TAC TCG GCC AGG TAT ATA GGA GGA AAC CTC TTC ACC
CGA GTC GGG GTC CTA CGA CCT CAC ATG AGC CGG TCC ATA TAT CCT CCT TTG GAG AAG TGG
Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr
181_____185_____hTIE2 IG DOMAIN 2_____195_____200

      DOMINIO 2 IG hTIE2

      610          620          630          640          650          660
      *          *          *          *          *          *
TCG GCC TTC ACC AGG CTG ATA GTC CGG AGA TGT GAA GCC CAG AAG TGG GGA CCT GAA TGC
AGC CGG AAG TGG TCC GAC TAT CAG GCC TCT ACA CTT CGG GTC TTC ACC CCT GGA CTT ACG
Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys
201_____205_____DOMINIO 2 IG hTIE2_____213 214 215_____220

      670          680          690          700          710          720
      *          *          *          *          *          *

```

ES 2 688 623 T3

AAC CAT CTC TGT ACT GCT TGT ATG AAC AAT GGT GTC TGC CAT GAA GAT ACT GGA GAA TGC
 TTG GTA GAG ACA TGA CGA ACA TAC TTG TTA CCA CAG ACG GTA CTT CTA TGA CCT CTT ACG
 Asn His Leu Cys Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys
 221 225 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 1 235 240

730 740 DOMINIO 1 TIPO EGF hTIE2 760 770 780
 * * * * *
 ATT TGC CCT CCT GGG TTT ATG GGA AGG ACG TGT GAG AAG GCT TGT GAA CTG CAC ACG TTT
 TAA ACG GGA GGA CCC AAA TAC CCT TCC TGC ACA CTC TTC CGA ACA CTT GAC GTG TGC AAA
 Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu Leu His Thr Phe
 241 245 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 1 253 254 255 260

790 DOMINIO 1 TIPO EGF hTIE2 820 830 840
 * * * * *
 GGC AGA ACT TGT AAA GAA AGG TGC AGT GGA CAA GAG GGA TGC AAG TCT TAT GTG TTC TGT
 CCG TCT TGA ACA TTT CTT TCC ACG TCA CCT GTT CTC CCT ACG TTC AGA ATA CAC AAG ACA
 Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys
 261 265 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 2 275 280

850 860 DOMINIO 2 TIPO EGF hTIE2 880 890 900
 * * * * *
 CTC CCT GAC CCC TAT GGG TGT TCC TGT GCC ACA GGC TGG AAG GGT CTG CAG TGC AAT GAA
 GAG GGA CTG GGG ATA CCC ACA AGG ACA CGG TGT CCG ACC TTC CCA GAC GTC ACG TTA CTT
 Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu
 281 285 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 2 295 300

910 920 DOMINIO 2 TIPO EGF hTIE2 940 950 960
 * * * * *
 GCA TGC CAC CCT GGT TTT TAC GGG CCA GAT TGT AAG CTT AGG TGC AGC TGC AAC AAT GGG
 CGT ACG GTG GGA CCA AAA ATG CCC GGT CTA ACA TTC GAA TCC ACG TCG ACG TTG TTA CCC
 Ala Cys His Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly
 301 305 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 3 315 320

970 980 DOMINIO 3 TIPO EGF hTIE2 1000 1010 1020
 * * * * *
 GAG ATG TGT GAT CGC TTC CAA GGA TGT CTC TGC TCT CCA GGA TGG CAG GGG CTC CAG TGT
 CTC TAC ACA CTA GCG AAG GTT CCT ACA GAG ACG AGA GGT CCT ACC GTC CCC GAG GTC ACA
 Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln Gly Leu Gln Cys
 321 325 hTIE2 EGF LIKE DOMAIN 3 335 340

1030 1040 DOMINIO 3 TIPO EGF hTIE2 1060 1070 1080
 * * * * *
 GAG AGA GAA GGC ATA CCG AGG ATG GGT AGA CCT TTC GTA GAG ATG TAC AGT GAA ATC CCC
 CTC TCT CTT CCG TAT GGC TCC TAC CCA TCT GGA AAG CAT CTC TAC ATG TCA CTT TAG GGG
 Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro
 341 345 hVEGFR1 IG DOMAIN 2 348 349 360

1090 1100 1110 DOMINIO 2 IG hVEGFR1 1130 1140
 * * * * *
 GAA ATT ATA CAC ATG ACT GAA GGA AGG GAG CTC GTC ATT CCC TGC CCG GTT ACG TCA CCT
 CTT TAA TAT GTG TAC TGA CTT CCT TCC CTC GAG CAG TAA GGG ACG GCC CAA TGC AGT GGA
 Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro
 361 365 hVEGFR1 IG DOMAIN 2 375 380

1150 1160 DOMINIO 2 IG hVEGFR1 1180 1190 1200
 * * * * *
 AAC ATC ACT GTT ACT TTA AAA AAG TTT CCA CTT GAC ACT TTG ATC CCT GAT GGA AAA CGC
 TTG TAG TGA CAA TGA AAT TTT TTC AAA GGT GAA CTG TGA AAC TAG GGA CTA CCT TTT GCG
 Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg
 381 385 hVEGFR1 IG DOMAIN 2 395 400

DOMINIO 2 IG hVEGFR1

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 * * * * *
 ATA ATC TGG GAC AGT AGA AAG GGC TTC ATC ATA TCA AAT GCA ACG TAC AAA GAA ATA GGG
 TAT TAG ACC CTG TCA TCT TTC CCG AAG TAG TAT AGT TTA CGT TGC ATG TTT CTT TAT CCC
 Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly
 401 405 hVEGFR1 IG DOMAIN 2 415 420

1270 1280 DOMINIO 2 IG hVEGFR1 1300 1310 1320
 * * * * *
 CTT CTG ACC TGT GAA GCA ACA GTC AAT GGG CAT TTG TAT AAG ACA AAC TAT CTC ACA CAT
 GAA GAC TGG ACA CTT CGT TGT CAG TTA CCC GTA AAC ATA TTC TGT TTG ATA GAG TGT GTA
 Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His
 421 425 hVEGFR1 IG DOMAIN 2 435 440

1330 1340 DOMINIO 2 IG hVEGFR1 1360 1370 1380
 * * * * *
 CGA CAA ACC AAT ACA ATC ATA GAT GTG GTT CTG AGT CCG TCT CAT GGA ATT GAA CTA TCT
 GCT GTT TGG TTA TGT TAG TAT CTA CAC CAA GAC TCA GGC AGA GTA CCT TAA CTT GAT AGA
 Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser
 441 445 448 449 450 hVEGFR2 IG DOMAIN 3 460

DOMINIO 3 IG hVEGFR2

ES 2 688 623 T3

```

1390          1400          1410          1420          1430          1440
*           *           *           *           *           *
GTT GGA GAA AAG CTT GTC TTA AAT TGT ACA GCA AGA ACT GAA CTA AAT GTG GGG ATT GAC
CAA CCT CTT TTC GAA CAG AAT TTA ACA TGT CGT TCT TGA CTT GAT TTA CAC CCC TAA CTG
Val Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp
461_____465_____hVEGFR2 IG DOMAIN 3_____475_____480

1450          1460          1470          1480          1490          1500
*           *           *           *           *           *
TTC AAC TGG GAA TAC CCT TCT TCG AAG CAT CAG CAT AAG AAA CTT GTA AAC CGA GAC CTA
AAG TTG ACC CTT ATG GGA AGA AGC TTC GTA GTC GTA TTC TTT GAA CAT TTG GCT CTG GAT
Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg Asp Leu
481_____485_____hVEGFR2 IG DOMAIN 3_____495_____500

1510          1520          1530          1540          1550          1560
*           *           *           *           *           *
AAA ACC CAG TCT GGG AGT GAG ATG AAG AAA TTT TTG AGC ACC TTA ACT ATA GAT GGT GTA
TTG TGG GTC AGA CCC TCA CTC TAC TTC TTT AAA AAC TCG TGG AAT TGA TAT CTA CCA CAT
Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val
501_____505_____hVEGFR2 IG DOMAIN 3_____515_____520

1570          1580          1590          1600          1610          1620
*           *           *           *           *           *
ACC CGG AGT GAC CAA GGA TTG TAC ACC TGT GCA GCA TCC AGT GGG CTG ATG ACC AAG AAG
TTG GCC TCA CTG GTT CCT AAC ATG TGG ACA CGT CGT AGG TCA CCC GAC TAC TGG TTC TTC
Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys
521_____525_____hVEGFR2 IG DOMAIN 3_____535_____540

1630          1640          1650          1660          1670          1680
*           *           *           *           *           *
AAC AGC ACA TTT GTC AGG GTC CAT GAA AAA CTC GAG GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG
TTG TCG TGT AAA CAG TCC CAG GTA CTT TTT GAG CTC CTG TTT TGA GTG TGT ACG GGT GGC
Asn Ser Thr Phe Val Arg Val His Glu Lys Leu Glu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
541_____hVEGFR2 IG DOMAIN 3_____550 551_____hFC DOMAIN_____560

DOMINIO 3 IG hVEGFR2          DOMINIO hFC
1690          1700          1710          1720          1730          1740
*           *           *           *           *           *
TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG
ACG GGT CGT GGA CTT GAG GAC CCC CCT GGC AGT CAG AAG GAG AAG GGG GGT TTT GGG TTC
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
561_____565_____hFC DOMAIN_____575_____580

1750          1760          1770          1780          1790          1800
*           *           *           *           *           *
GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC
CTG TGG GAG TAC TAG AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGT ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTG
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
581_____585_____hFC DOMAIN_____595_____600

DOMINIO hFC
1810          1820          1830          1840          1850          1860
*           *           *           *           *           *
GAA GAC CCT GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG
CTT CTG GGA CTC CAG TTC AAG TTG ACC ATG CAC CTG CCG CAC CTC CAC GTA TTA CGG TTC
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
601_____605_____hFC DOMAIN_____615_____620

1870          1880          1890          1900          1910          1920
*           *           *           *           *           *
ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC
TGT TTC GGC GCC CTC CTC GTC ATG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
621_____625_____hFC DOMAIN_____635_____640

1930          1940          1950          1960          1970          1980
*           *           *           *           *           *
CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC
GAC GTG GTC CTG ACC GAC TTA CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CGG GAG
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
641_____645_____hFC DOMAIN_____655_____660

1990          2000          2010          2020          2030          2040
*           *           *           *           *           *
CCA GCC CCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG
GGT CGG GGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT CCC GTC GGG GCT CTT GGT GTC CAC
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
661_____665_____hFC DOMAIN_____675_____680

2050          2060          2070          2080          2090          2100
*           *           *           *           *           *
TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG

```

ES 2 688 623 T3

```

ATG TGG GAC GGG GGT AGG GCC CTC CTC TAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
681_____685_____DOMINIO hFC_____695_____700

      2110      2120      2130      2140      2150      2160
      *          *          *          *          *          *
GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG
CAG TTT CCG AAG ATA GGG TCG CTG TAG CGG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
701_____705_____DOMINIO hFC_____715_____720

      2170      2180      2190      2200      2210      2220
      *          *          *          *          *          *
AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC
TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
721_____725_____DOMINIO hFC_____735_____740

      2230      2240      2250      2260      2270      2280
      *          *          *          *          *          *
AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG
TTC GAG TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC GTC CCC TTG CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
741_____745_____DOMINIO hFC_____755_____760

      2290      2300      2310      2320      2330      2340
      *          *          *          *          *          *
CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA (SEQ ID NO:21)
GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGC GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GGC CCA TTT ACT
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *** (SEQ ID NO:22)
761_____765_____DOMINIO hFC_____775_____780

```

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos de la siguiente manera:
 - (a) la secuencia de nucleótidos de DAAP núm. 1 representada por SEQ ID NO: 1;
 - (b) la secuencia de nucleótidos de DAAP núm. 13 representada por SEQ ID NO: 13;
 - (c) la secuencia de nucleótidos de DAAP núm. 14 representada por SEQ ID NO: 15;
 - (d) la secuencia de nucleótidos de DAAP núm. 15 representada por SEQ ID NO: 17; o
 - (e) una secuencia de nucleótidos que, como resultado de la degeneración del código genético, difiere de la secuencia de nucleótidos de (a), (b), (c) y (d), pero que codifica una secuencia de aminoácidos idéntica a la expresada a partir de la misma.
2. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la molécula de ácido nucleico está conectada operativamente a una secuencia de control de la expresión.
3. Un sistema de vector anfitrión para la producción de un polipéptido de fusión que comprende el vector de expresión de la reivindicación 2, en una célula anfitriona adecuada, en particular, en donde la célula anfitriona adecuada es una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula de mamífero.
4. Un polipéptido de fusión codificado por la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1.
5. Un método para producir un polipéptido de fusión que comprende células en crecimiento del sistema de vector anfitrión de la reivindicación 3, en condiciones que permiten la producción del polipéptido de fusión y la recuperación del polipéptido de fusión así producido.
6. Un polipéptido de fusión codificado por la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, que se ha modificado por medio de acetilación o pegilación.
7. El uso de un polipéptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 4, para fabricar un medicamento para atenuar o prevenir el crecimiento tumoral en un mamífero, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de fusión.
8. El uso de un polipéptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 4, para fabricar un medicamento para atenuar o prevenir el edema, especialmente el edema cerebral en un ser humano, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de fusión.
9. El uso de un polipéptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 4, para fabricar un medicamento para atenuar o prevenir la formación de ascitis en un ser humano, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de fusión, en particular en donde la ascitis está asociada con cáncer de ovario.
10. El uso de un polipéptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 4, para fabricar un medicamento para tratar la artritis reumatoide en un sujeto, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de fusión.
11. El uso de un polipéptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 4, para fabricar un medicamento para tratar la degeneración macular relacionada con la edad, que comprende administrar por vía subcutánea a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de fusión, en particular codificado por la molécula de ácido nucleico de DAAP núm. 1.
12. El uso de un polipéptido de fusión de acuerdo con la reivindicación 4, para fabricar un medicamento para tratar la retinopatía diabética, que comprende administrar por vía subcutánea a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido de fusión, en particular codificado por la molécula de ácido nucleico de DAAP núm. 1.

Figura 1

Diagramas esquemáticos de VEGFR1 y Tie2

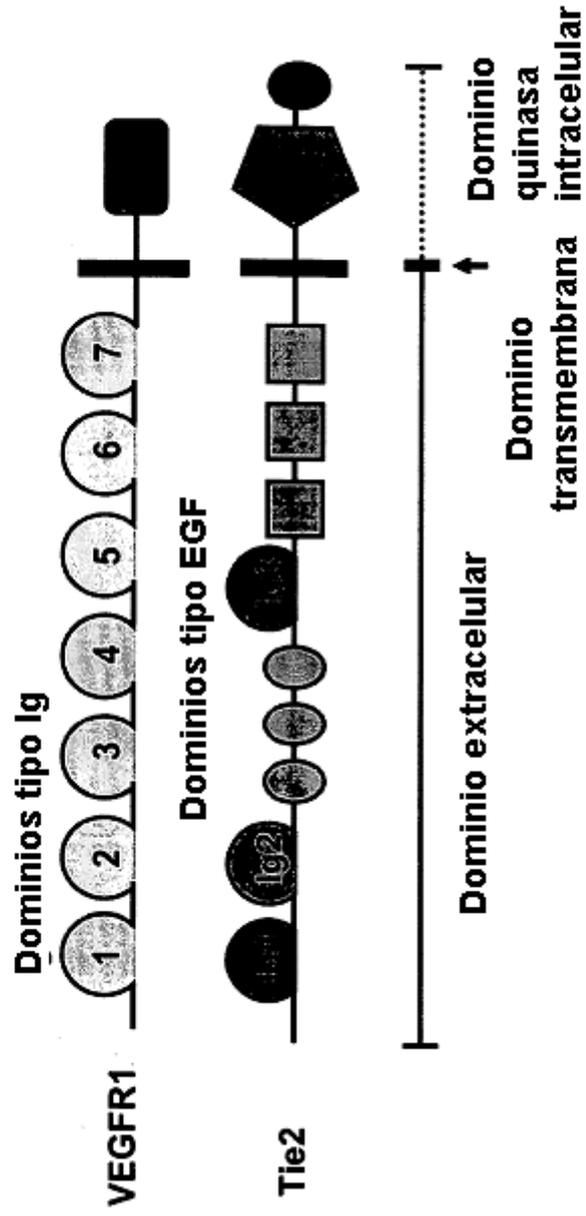
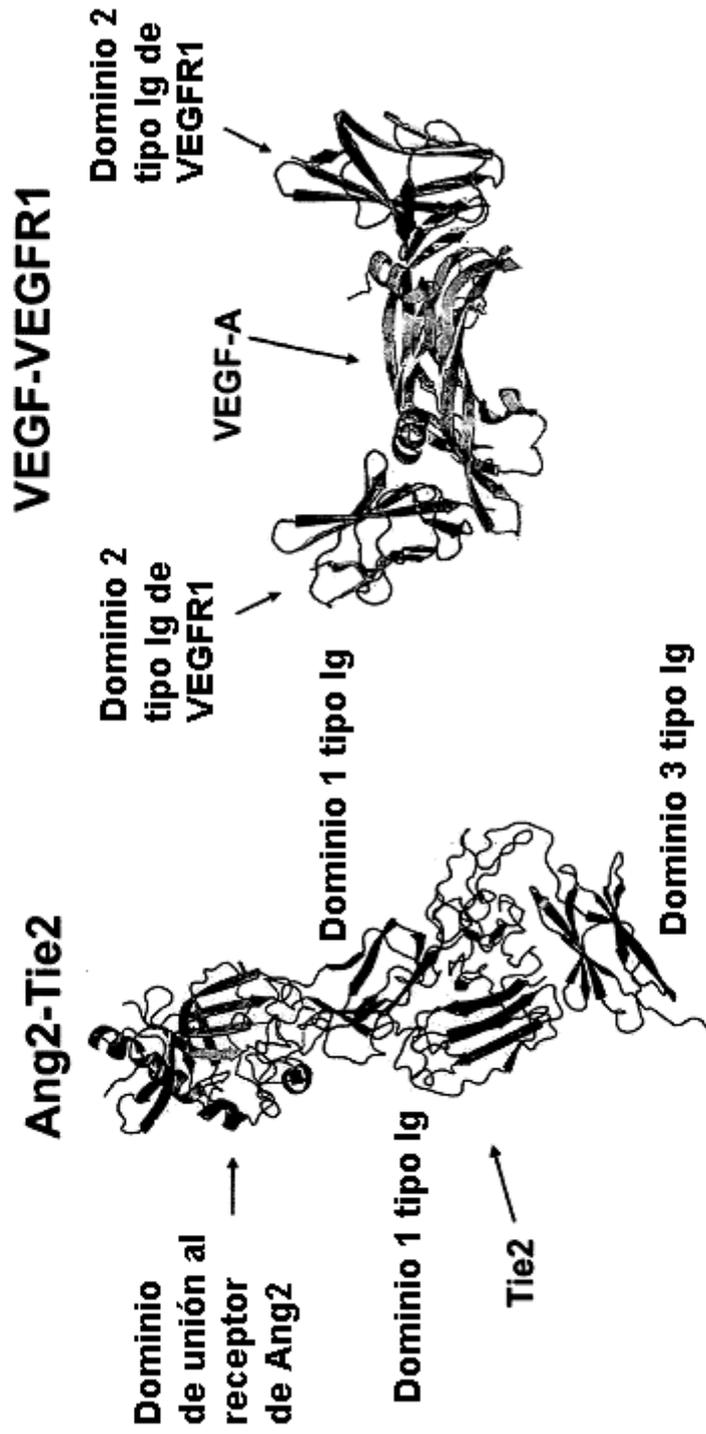


Figura 2

Indicios de la estructura



Diagramas esquemáticos de construcciones DAAP Figura 3

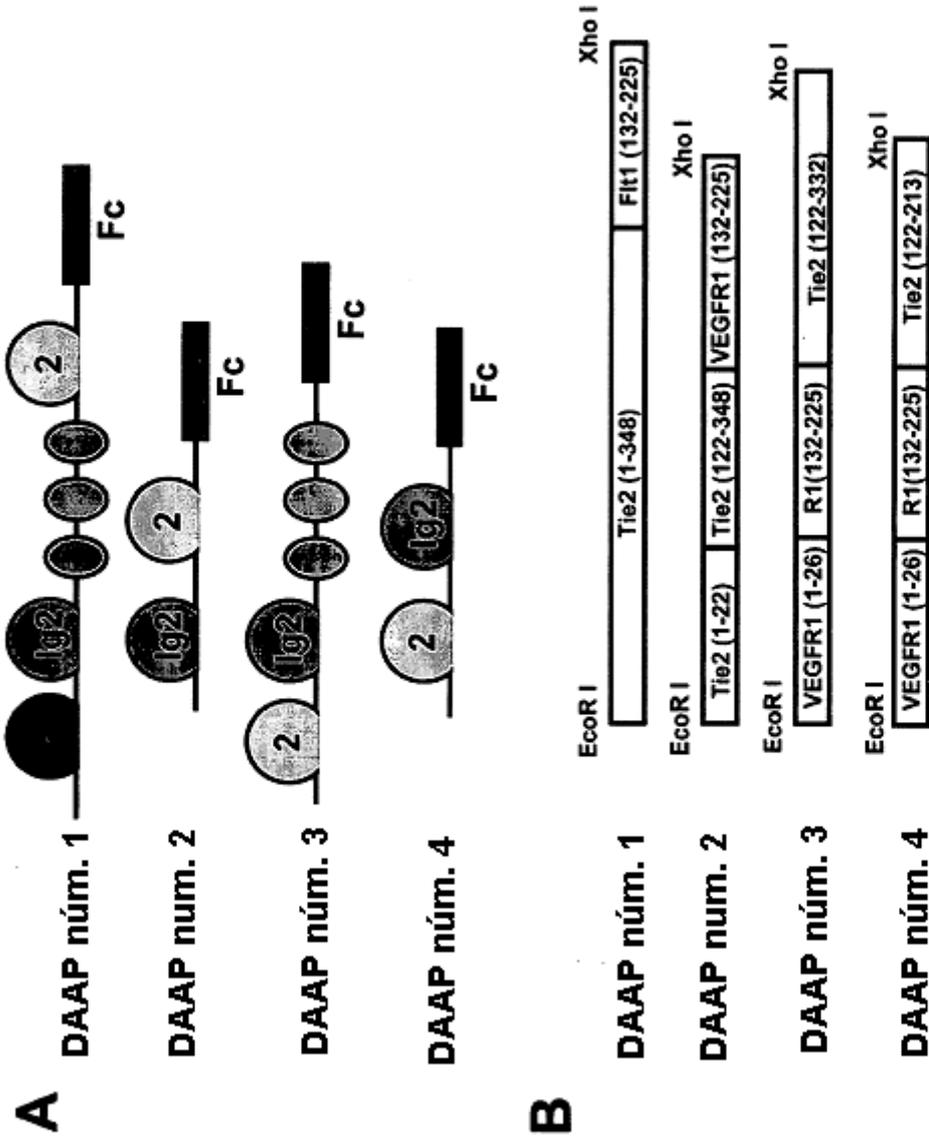


Figura 4

Generación del vector pCMV-dhfr-DAAP

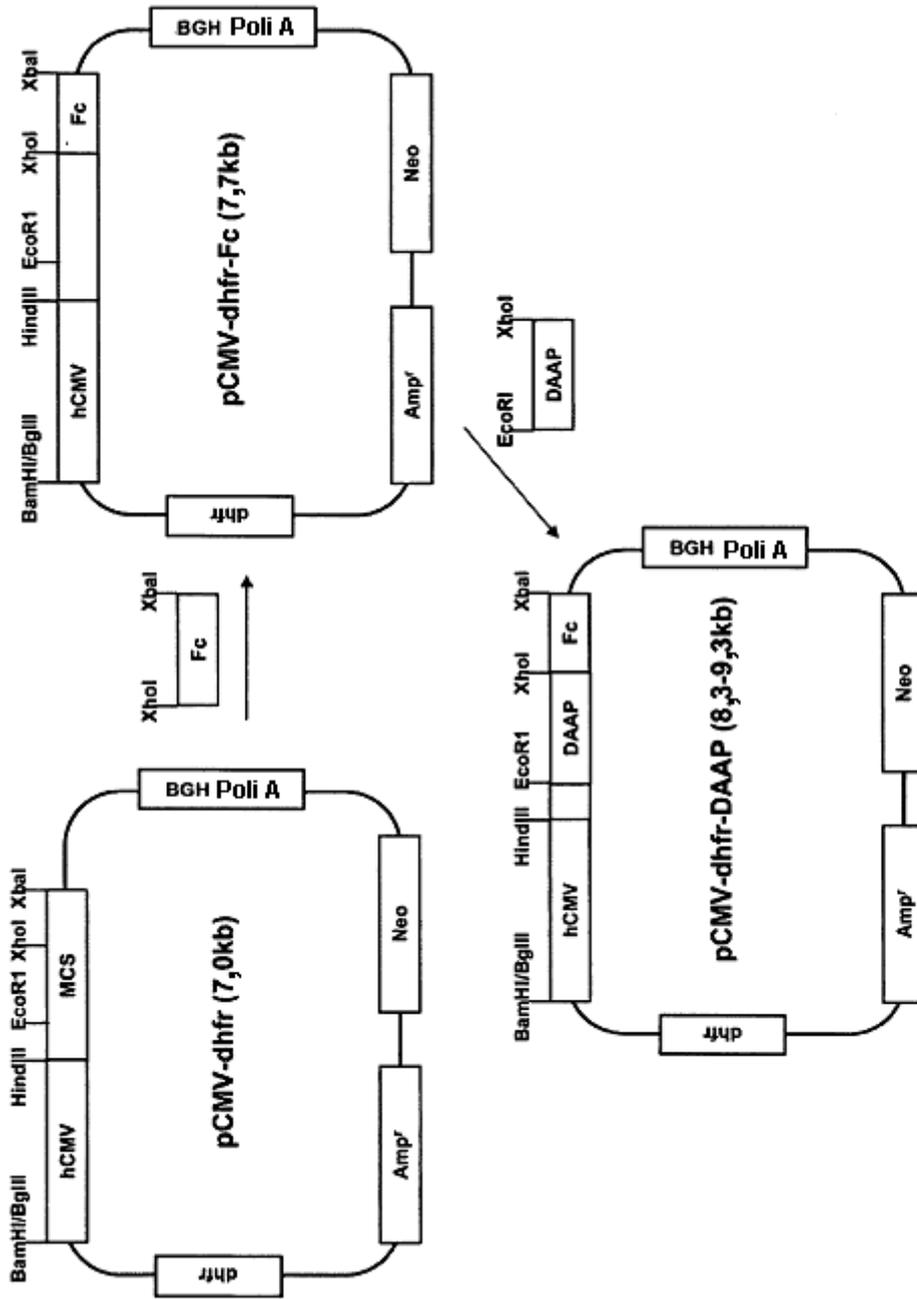


Diagrama esquemático de construcciones DAAP modificadas **Figura 5**

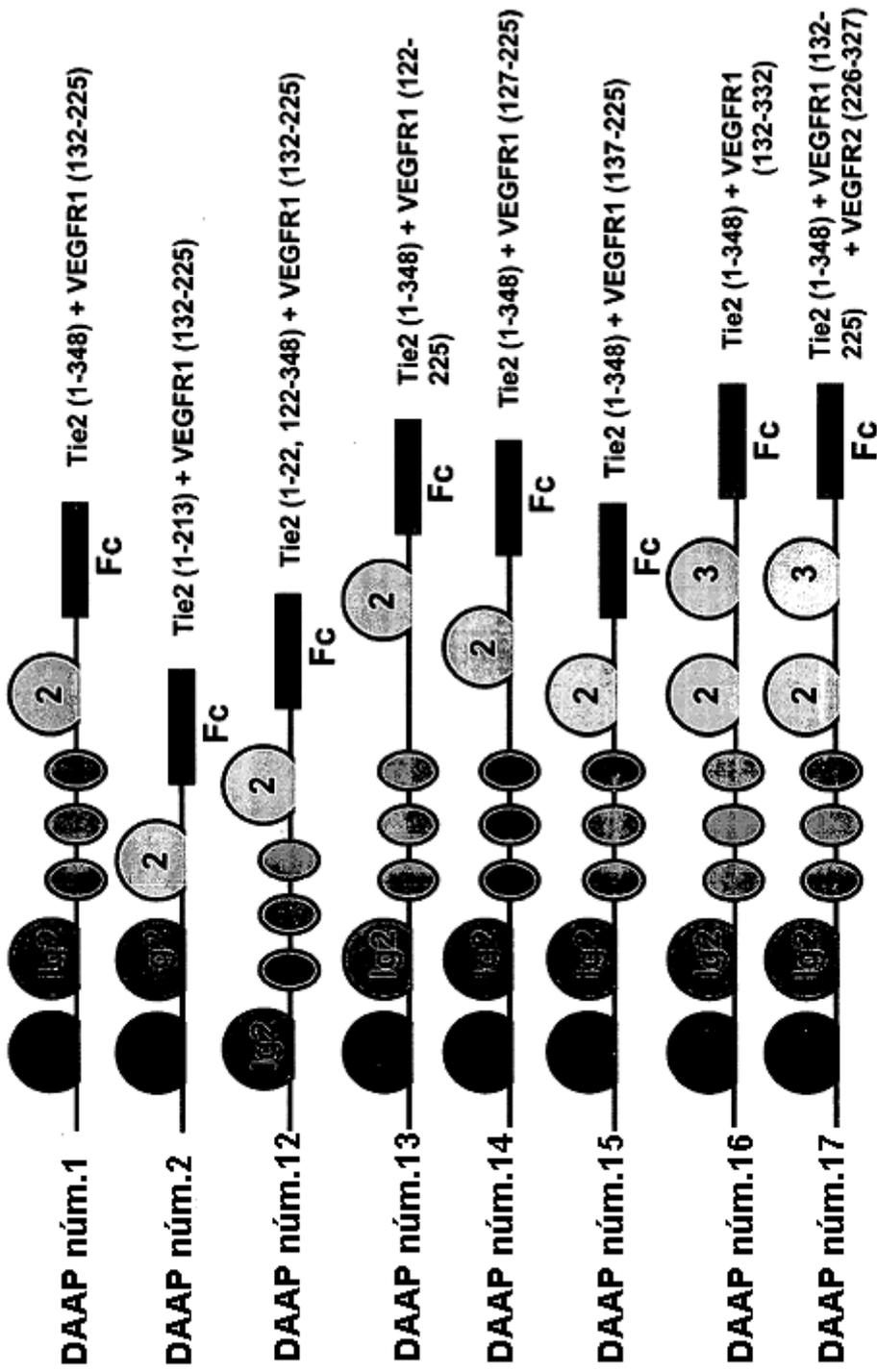


Figura 6

Construcciones génicas esquemáticas de DAAP

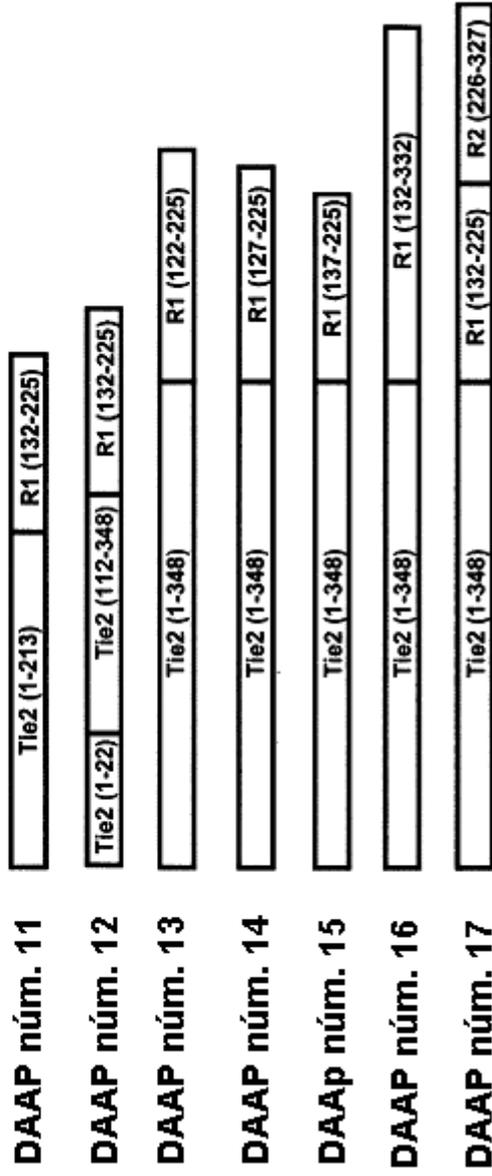


Figura 7

**Análisis de transferencia Western
para la expresión de proteínas de DAAP**

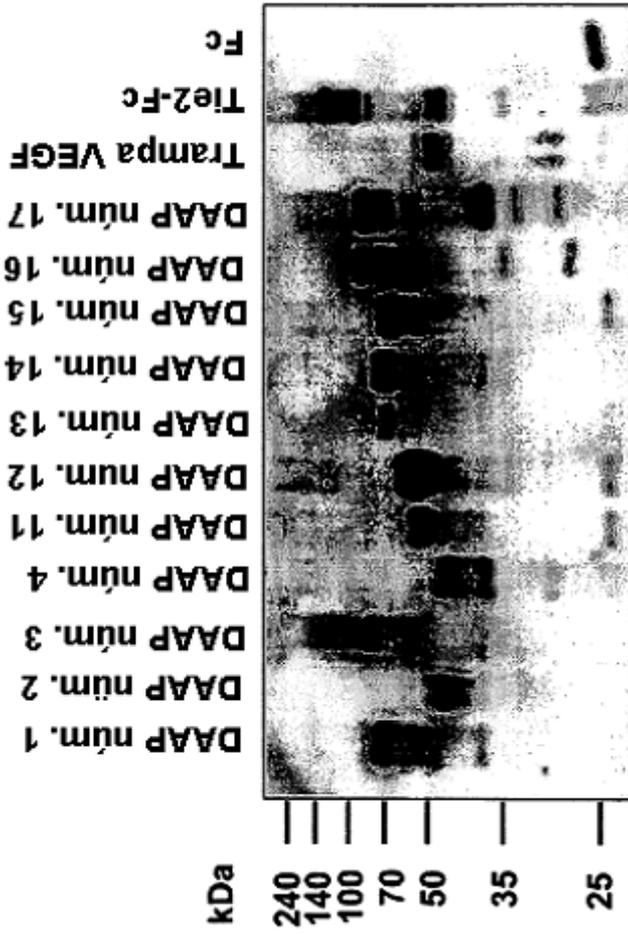


Figura 8

Ensayo de unión ELISA para DAAP a VEGF-A

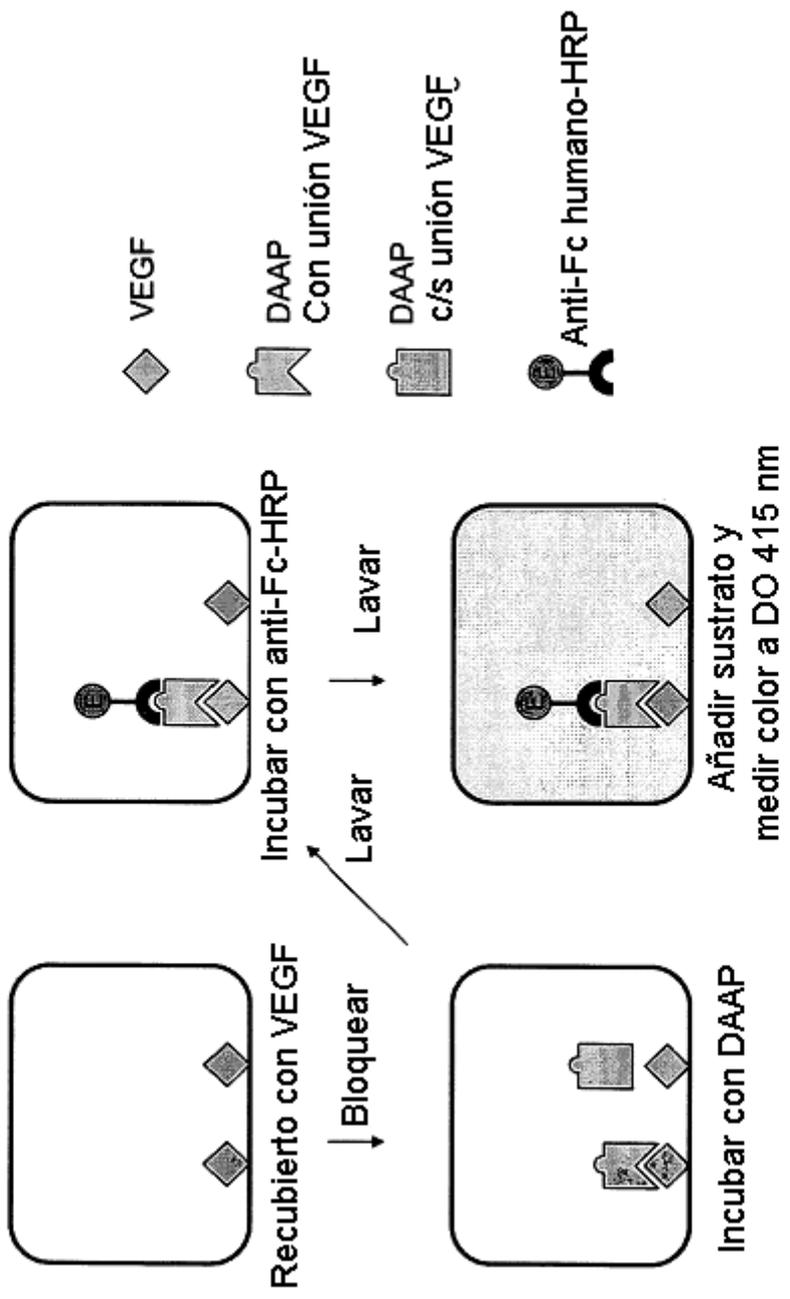


Figura 9

Ensayo de unión ELISA para DAAP a Ang2

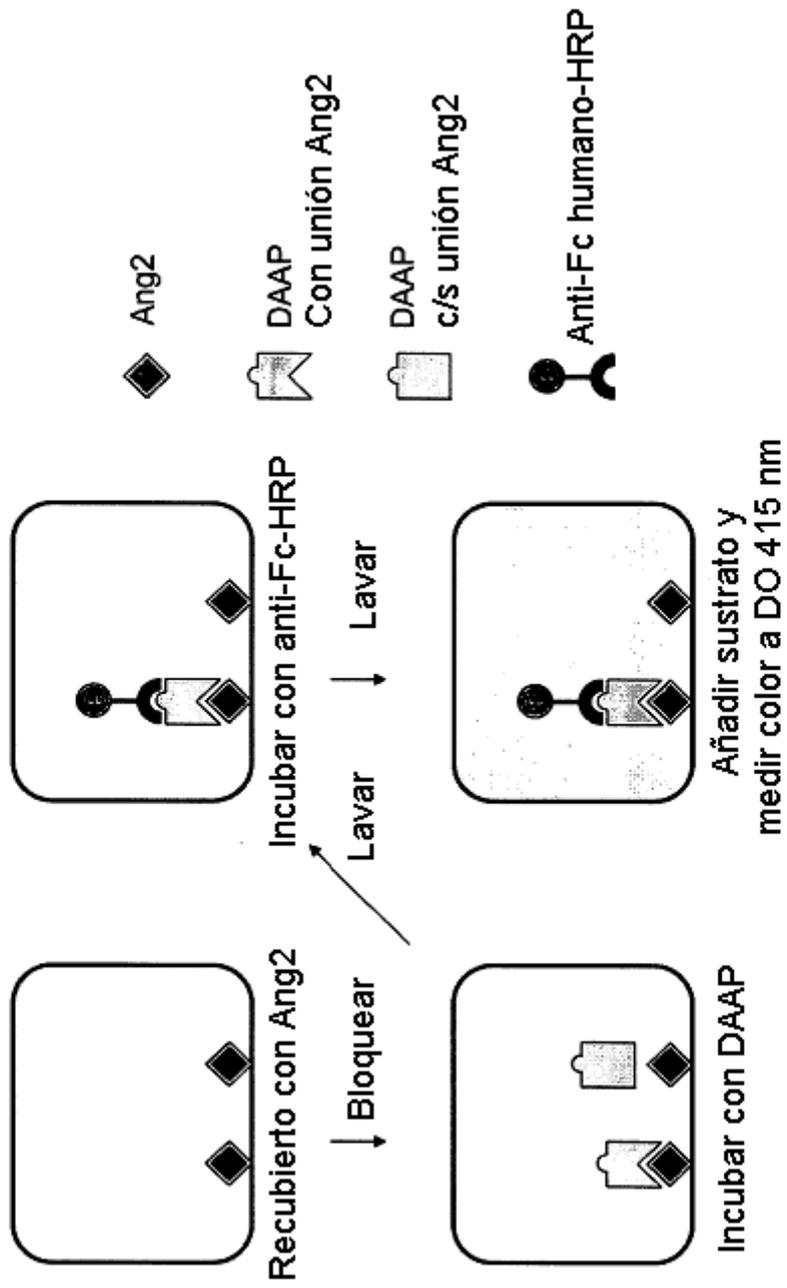


Figura 10

DAAP: Ensayo de unión ELISA para DAAP a VEGF-A y Ang2

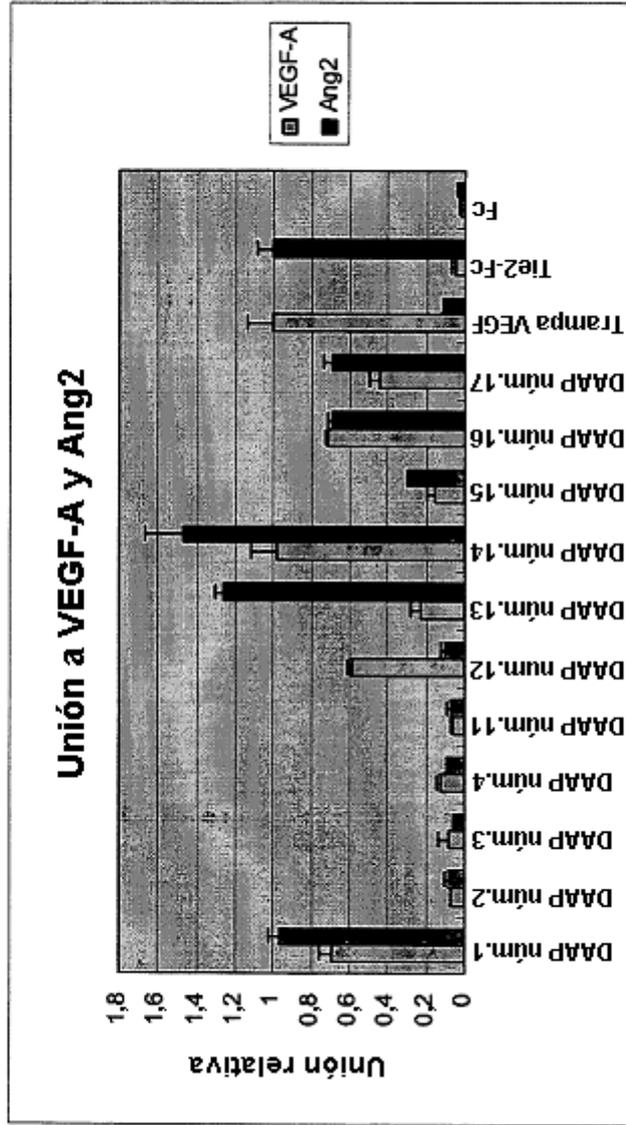


Figura 11

Ensayo de unión competitiva de DAAP a VEGF-A y ensayo de unión ELISA de Ang2

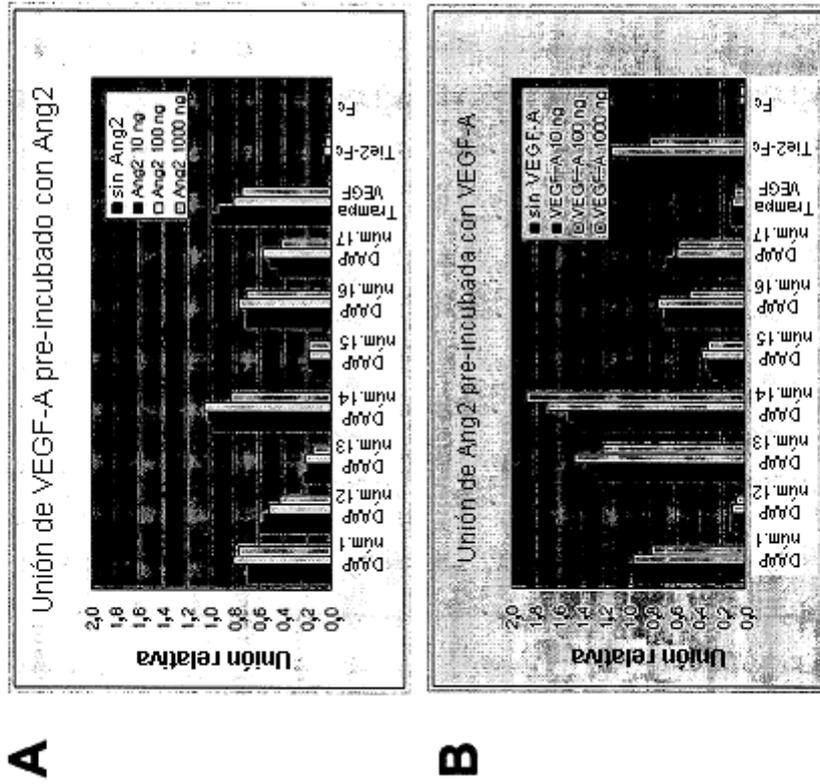
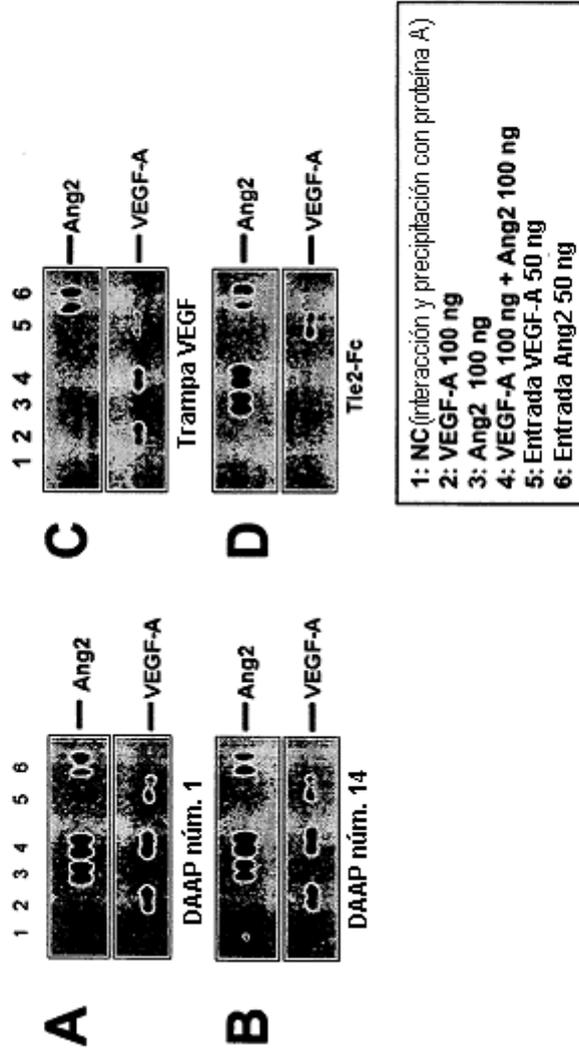


Figura 12:

Unión independiente de DAAP a VEGF-A y Ang2



DAAP susceptible de unión sincrónica de VEGF y angiopoyetina

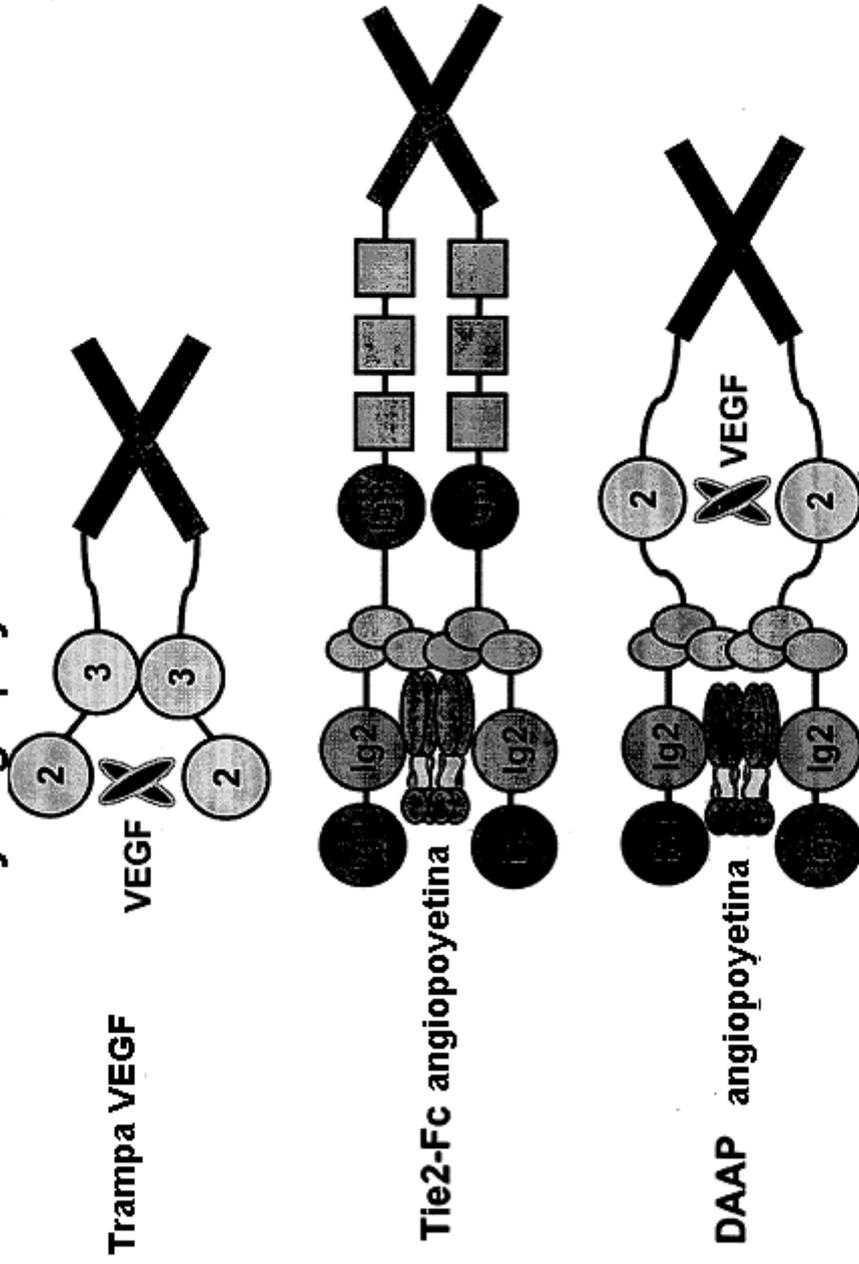


Figura 14

Generación y purificación de DAAP núm. 1

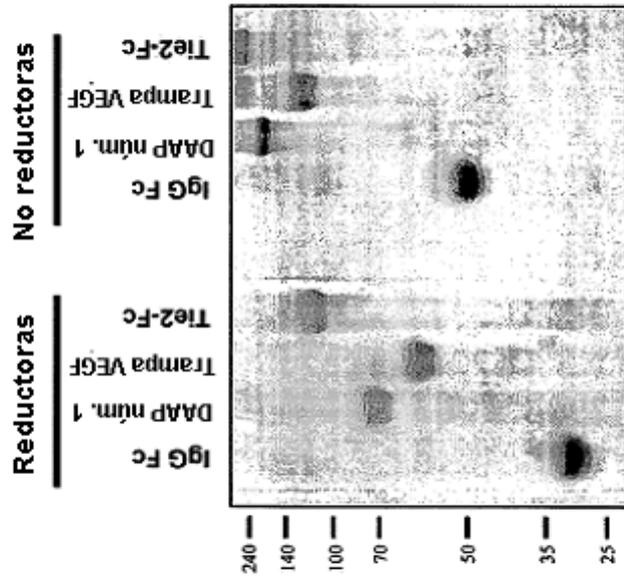


Figura 15

Ensayo de unión ELISA de DAAP núm. 1

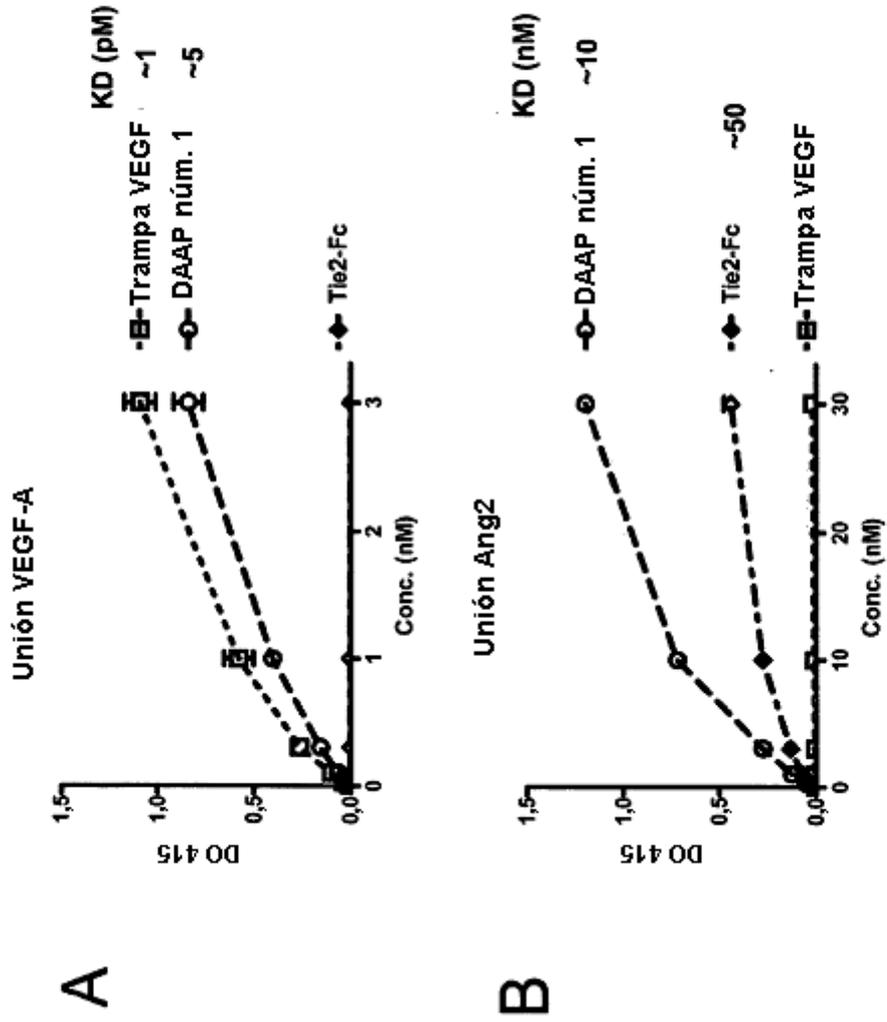


Figura 16

Unión simultánea de DAAP núm. 1 a VEGF-A y Ang2

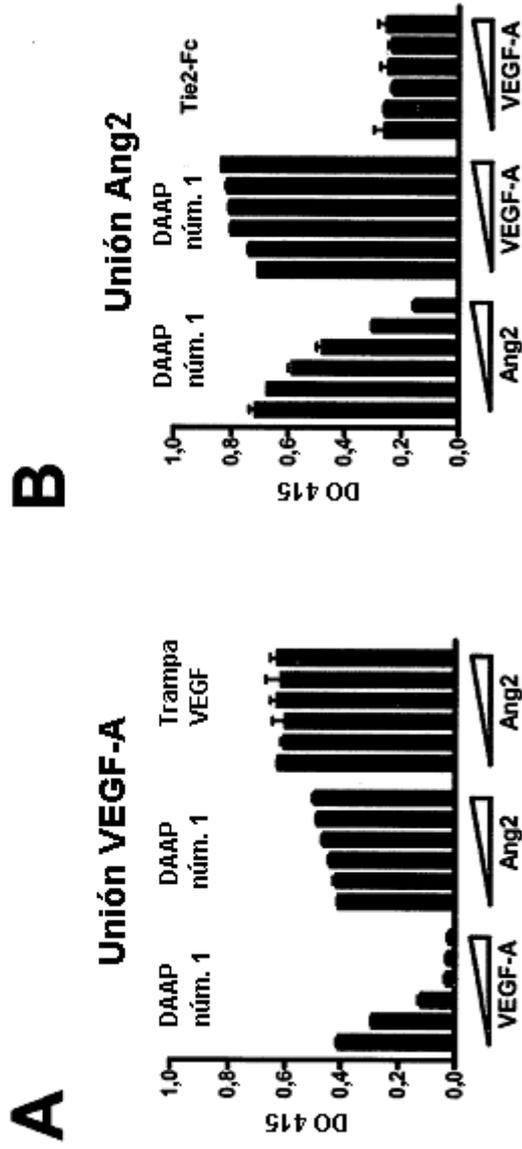


Figura 17

Ensayo de unión de interacción y precipitación in vitro

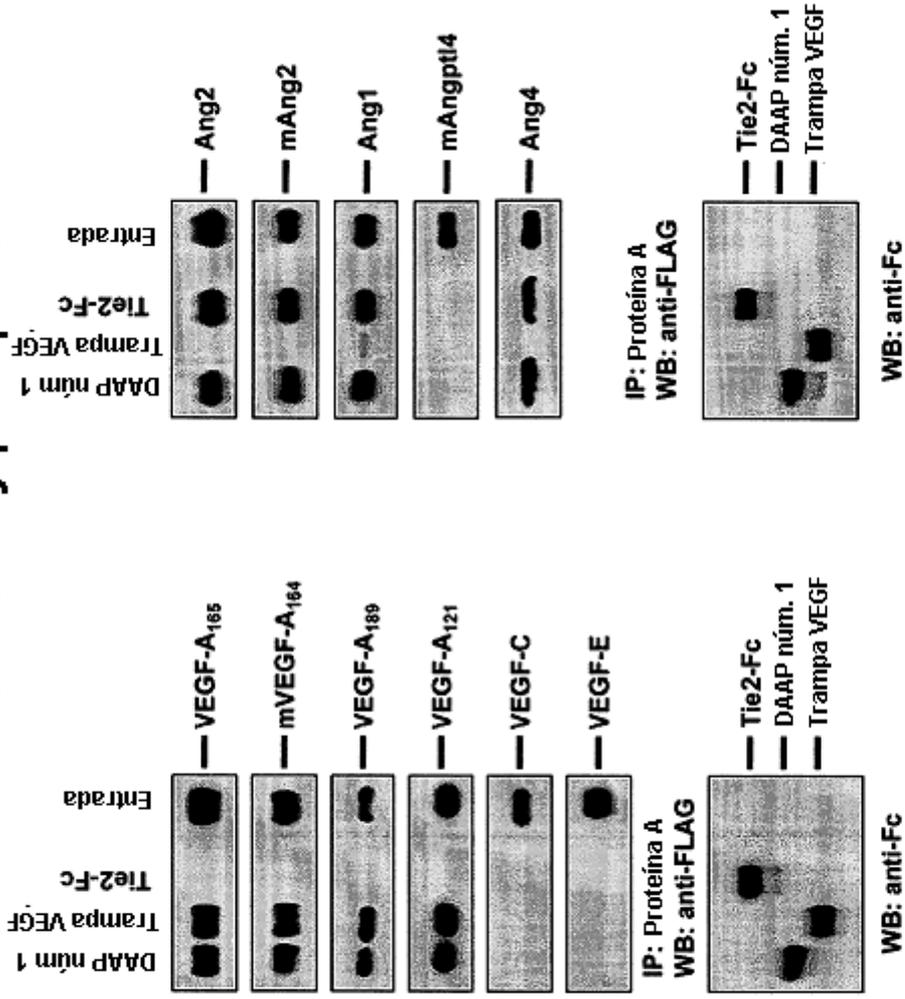


Figura 18

Valores pl teóricos de DAAP

	pl teórico
DAAP núm. 1	7,74
DAAP núm. 2	8,45
DAAP núm. 3	7,17
DAAP núm. 4	8,44
DAAP núm. 11	8,74
DAAP núm. 12	7,18
DAAP núm. 13	7,50
DAAP núm. 14	7,50
DAAP núm. 15	7,50
DAAP núm. 16	8,64
DAAP núm. 17	8,15
VEGFR1(2)	9,19
VEGFR1 (2-3)	9,64
Trampa VEGF	8,64
Tie2-Fc	6,39

Figura 19

Ensayo de unión MEC

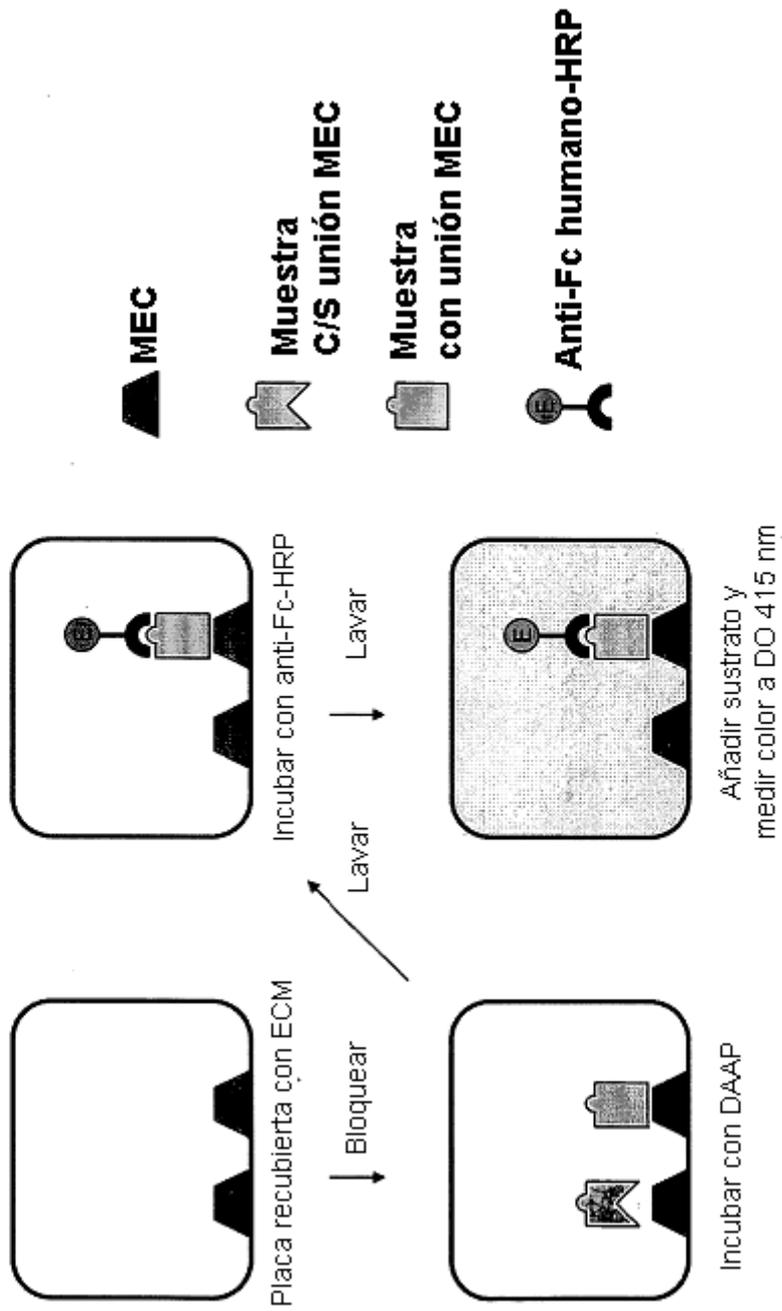


Figura 20

Ensayo unión MEC

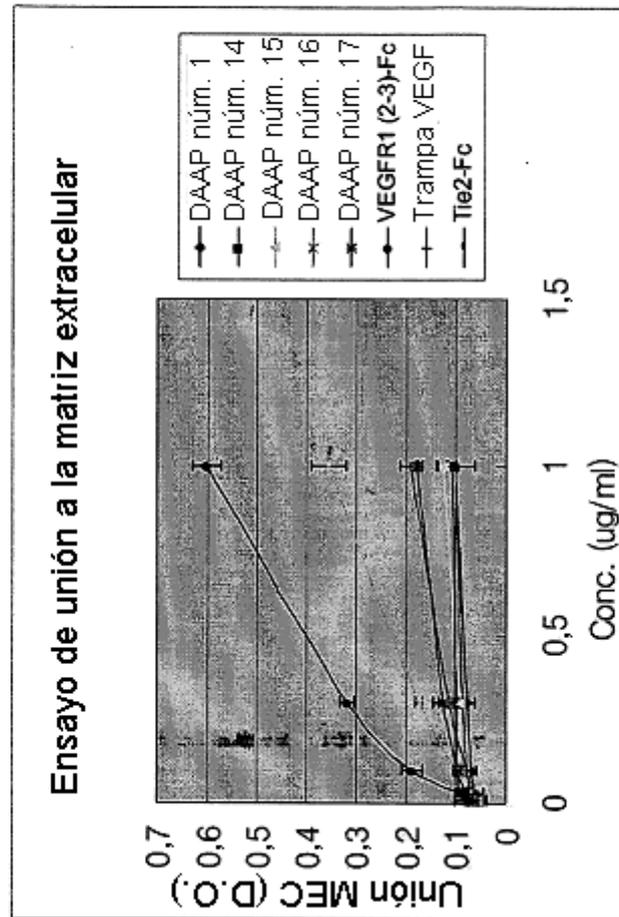


Figura 21

Ensayo de unión a la matriz extracelular

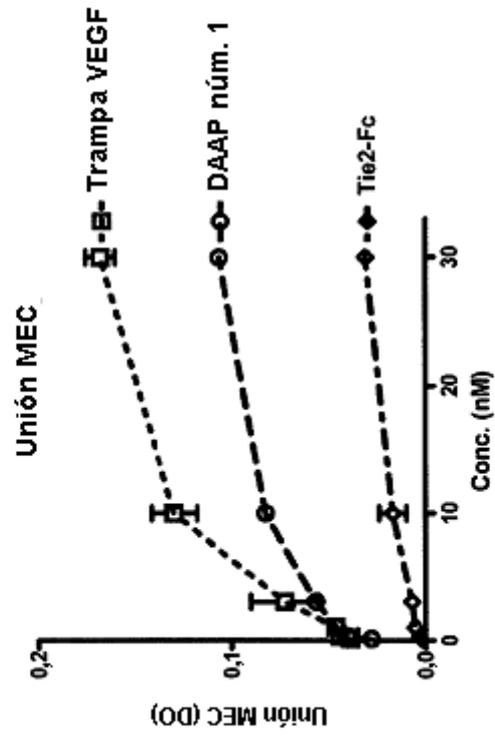


Figura 22

Análisis farmacocinético

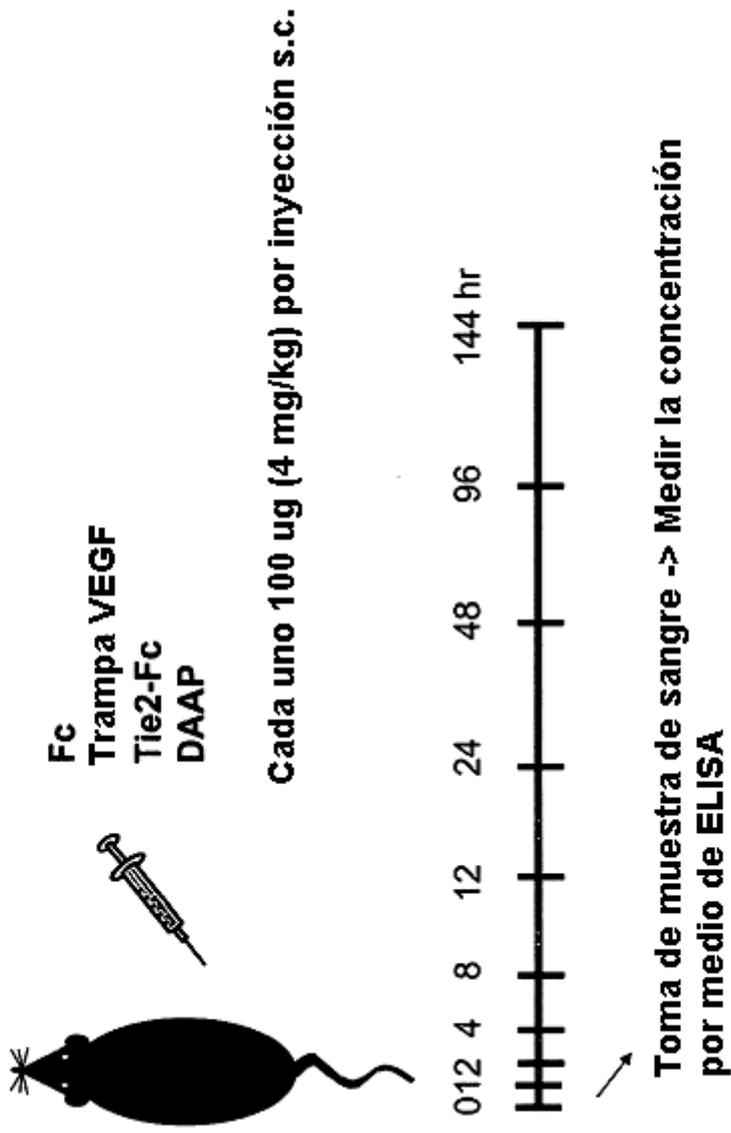


Figura 23

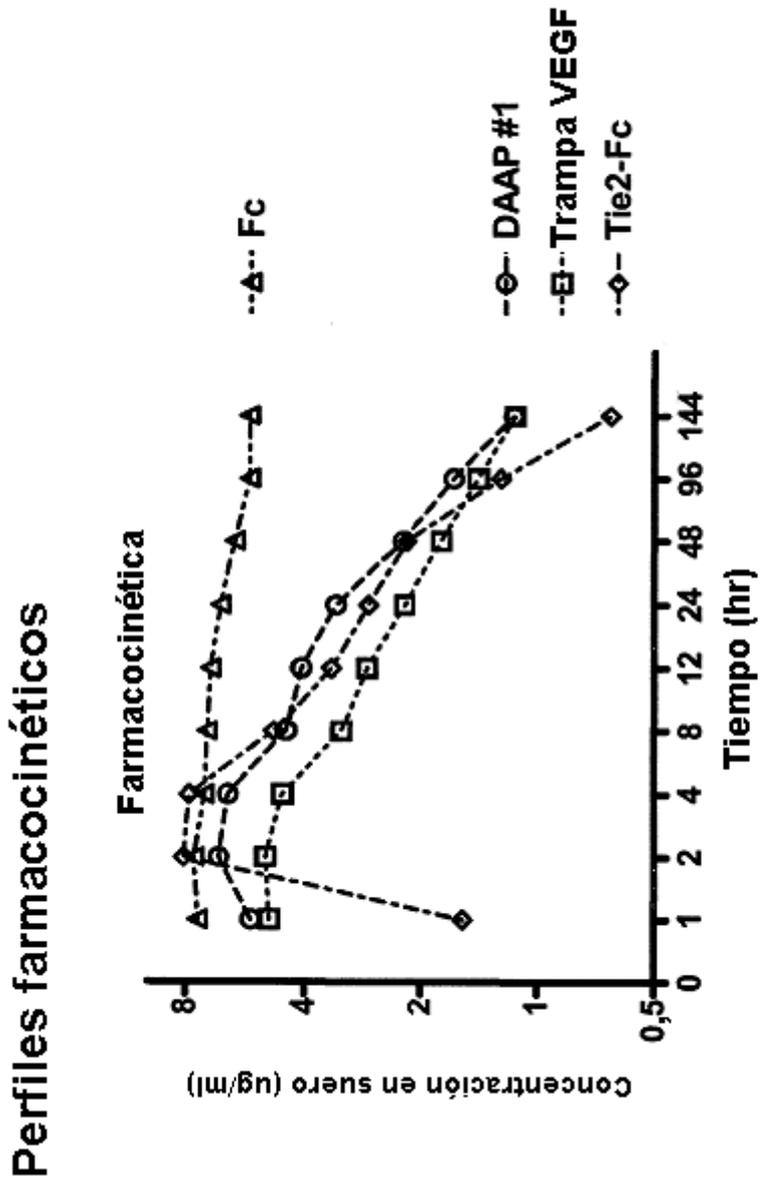


Figura 24

Efecto de DAAP núm. 1 sobre crecimiento tumoral LLC

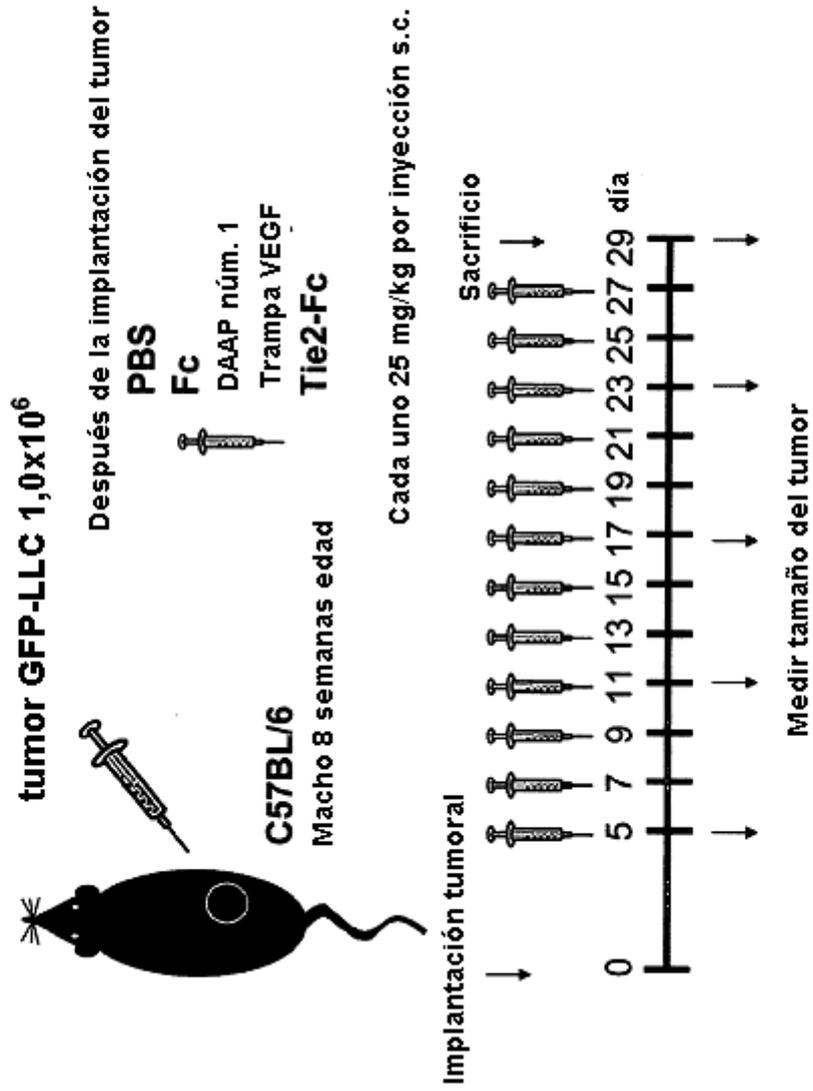


Figura 25

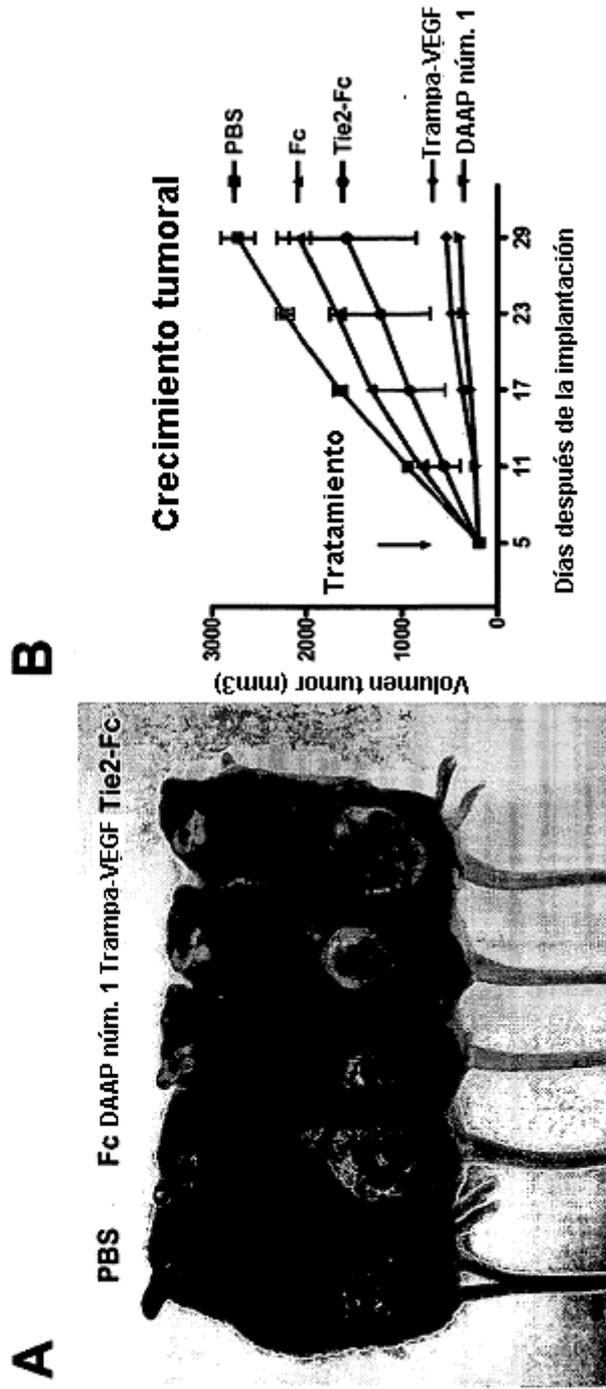


Figura 26

Efecto de Fc, Trampa VEGF y DAAP núm. 1 sobre vasos sanguíneos de tumores LLC

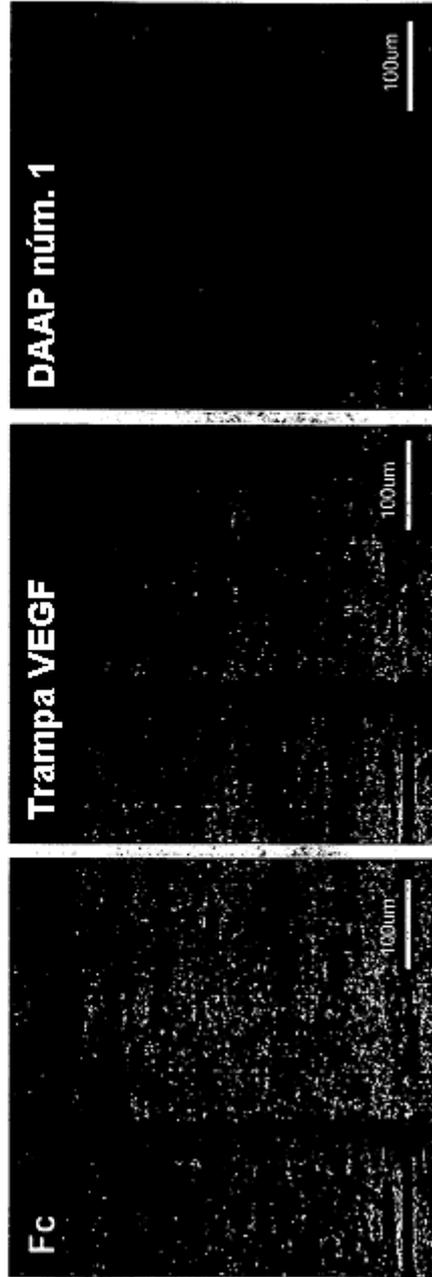


Figura 27

Efecto antiangiogénico sobre modelo de ROP

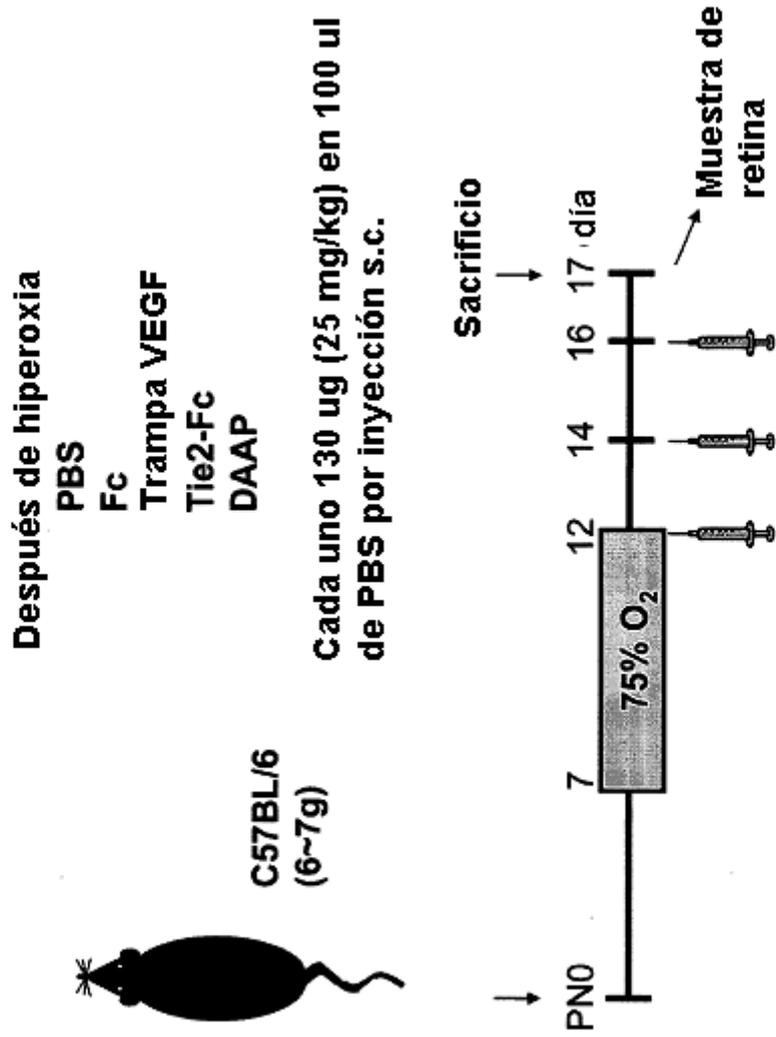


Figura 28

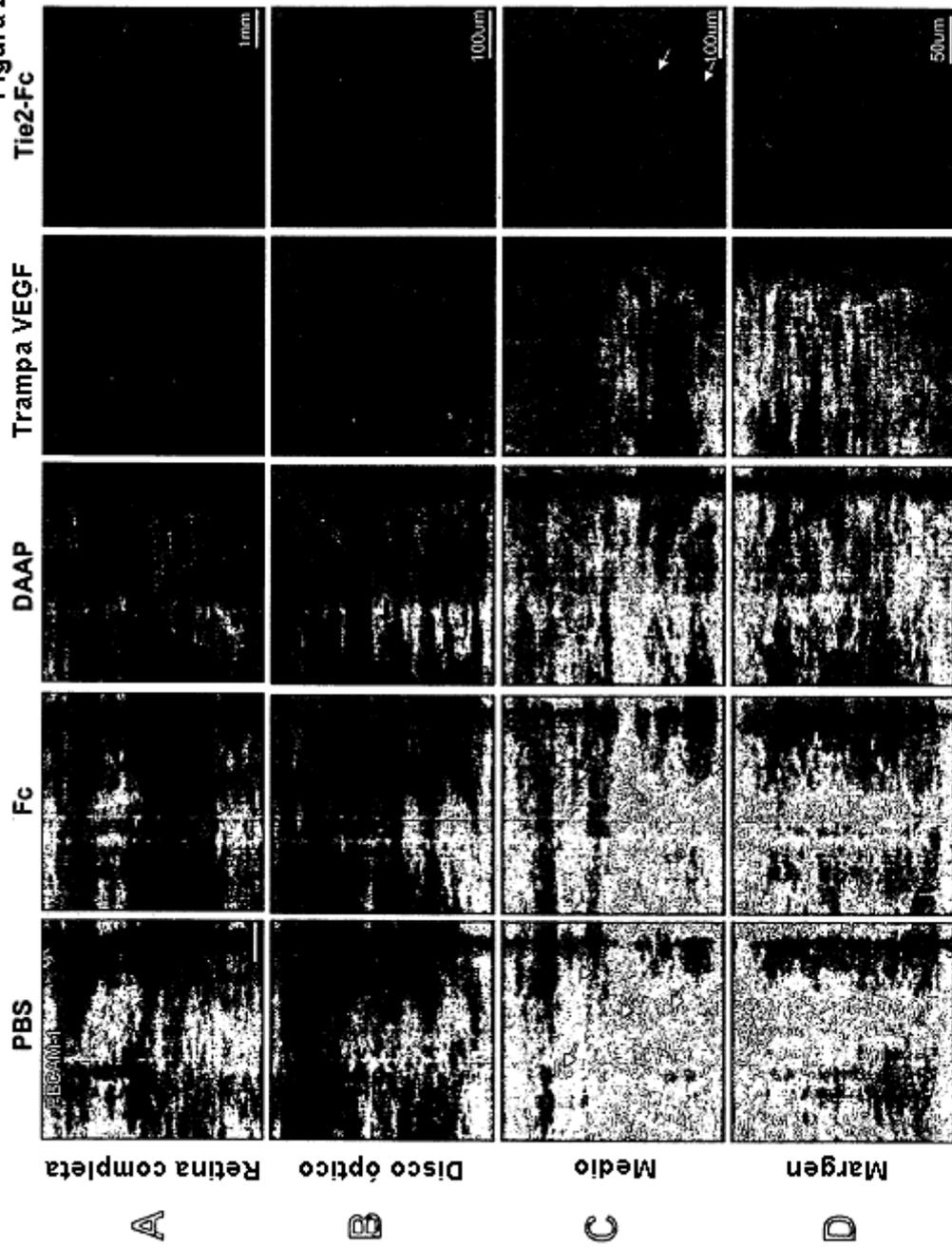


Figura 28

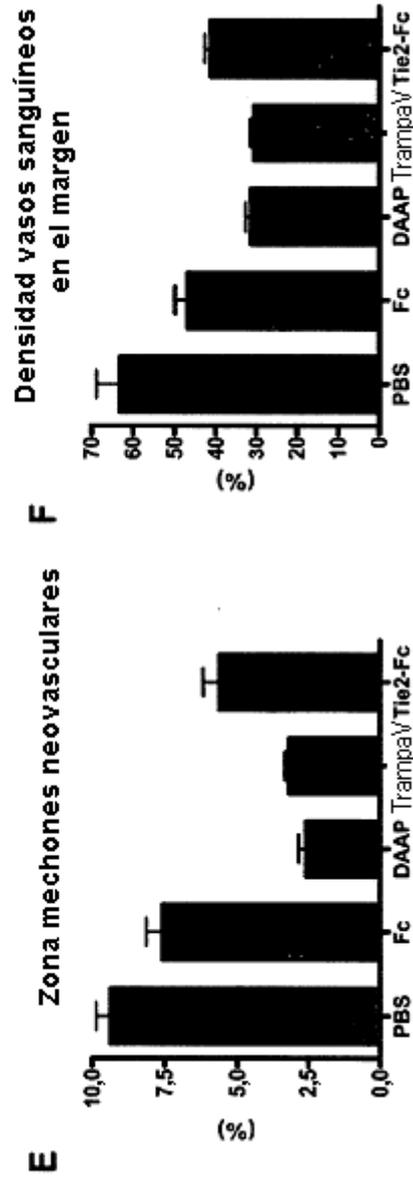
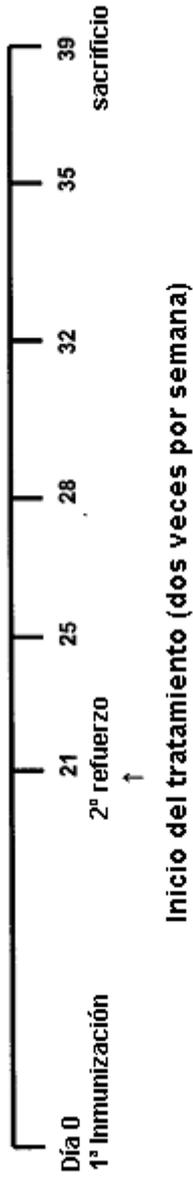


Figura 29

A

Generación de Modelo de artritis reumatoide inducida por Colágeno Tipo II



Sujetos: Control (n=5), Fc-proteína (n=5), Trampa VEGF (n=6), DAAP núm. 1 (n=6)

B

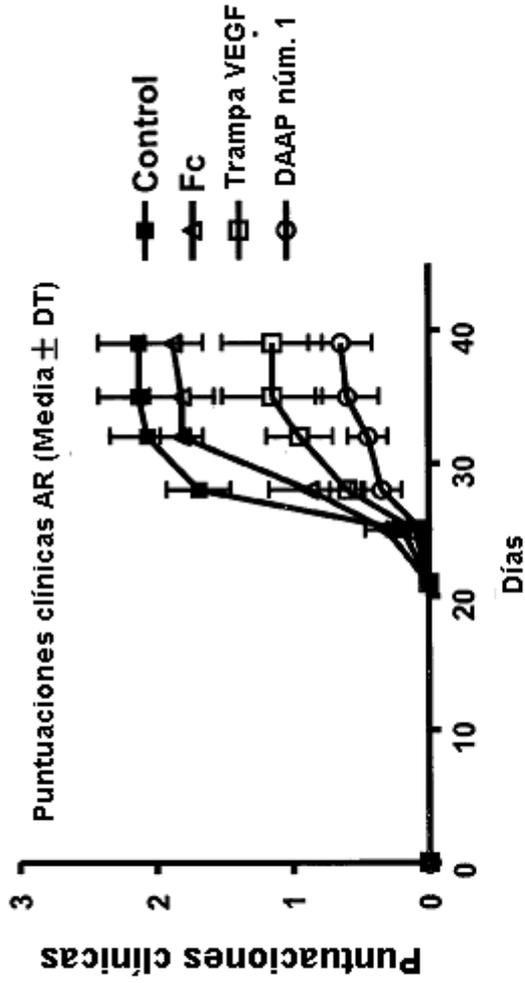
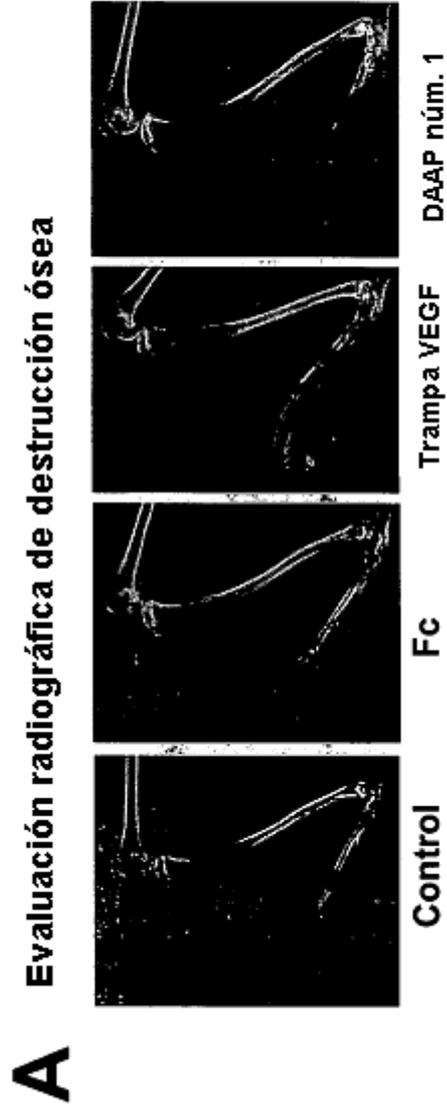


Figura 30



B Puntuaciones radiológicas (Media \pm ET)

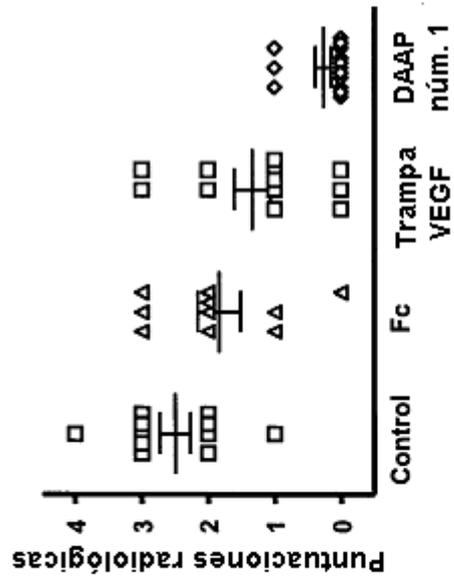


Figura 31

