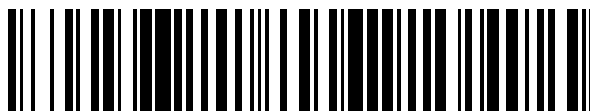


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 933 558**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014** **PCT/US2014/026872**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014** **WO14160507**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014** **E 14722439 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2022** **EP 2968461**

54 Título: **Proteínas de fusión que comprenden porciones de unión a PDGF y VEGF y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201361780914 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2023

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.0%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

PECHAN, PETER;
ARDINGER, JEFFERY;
RUBIN, HILLARD;
WADSWORTH, SAMUEL y
SCARIA, ABRAHAM

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 933 558 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 comprenden porciones de unión a PDGF y VEGF y métodos de uso de las mismas

REFERENCIA CRUZADA A LA SOLICITUD RELACIONADA

La presente solicitud reivindica el beneficio en virtud de la sección 119(e) del título 35 del USC de la solicitud de patente provisional de EE. UU. previa en tramitación junto con la presente N.º 61/780.914, presentada el 13 de marzo de 2013.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, en general, a proteínas de fusión que inhiben la vía de PDGF y la vía de VEGF, a composiciones de estas proteínas de fusión, así como a métodos de producción y uso de las mismas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La formación de nuevos vasos sanguíneos, causada por la producción en exceso de factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), es un componente clave de enfermedades como el crecimiento tumoral, la degeneración macular senil (DMS) y la retinopatía diabética proliferativa (RDP) (Connolly et al., J Clin Invest., 1989, 84(5):1470-8; Ferrara et al., Biochem Biophys Res Commun., 1989, 161(2):851-9; y Ferrara et al., NatMed., 1998, 4(3):336-40). La DMS húmeda es la forma más grave de la enfermedad de DMS que se caracteriza por la neovascularización anormal debajo de la retina y frecuentemente conduce a pérdida de visión permanente. El bloqueo de VEGF con anticuerpos, receptores de VEGF soluble, o la inhibición de la actividad de tirosina cinasas de receptores de VEGF, son estrategias que han mostrado resultados preclínicos y clínicos prometedores en la supresión de la neovascularización retiniana (Aiello et al., PNAS, 1995, 92:10457-10461 y Willet, et al., NatMed., 2004, 10:145-147). Sin embargo, datos clínicos recientes muestran que el nuevo tejido vascular no remite normalmente con la inhibición de VEGF sola, debido a que los pericitos, que interactúan con las células endoteliales y contribuyen al establecimiento de la barrera hematorretiniana, proporcionan señales de supervivencia a las células endoteliales neovasculares y, por lo tanto, hacen que sean resistentes a la retirada de VEGF (Benjamin et al., Development, 1998, 125(9):1591-8 y Patel S., Retina, 2009, 29(6 Suppl):S45-8). Además, la isoforma B del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-B) y el receptor beta de PDGF (PDGFRβ), encontrados en membranas retinianas proliferativas, tienen funciones importantes en el reclutamiento de pericitos para la estabilización de la vasculatura en desarrollo (Robbins et al., Invest Ophth Vis Sci., 1994, 35(10):3649-63; Lindahl et al., Development, 1997, 124:3943-3953; y Hellstrom et al., Development, 1999, 126:3047-3055).

La función de unión a VEGF de VEGFR1 (Flt-1) ha sido cartografiada en el segundo dominio extracelular (ECD) (Davis-Smyth et al., EMBO J., 1996, 15:4919-4927; Barleon et al., J Biol Chem., 1997, 272:10382-10388; Wiesmann et al., Cell, 1997, 91:695-704; y Davis-Smyth et al., J Biol Chem., 1998, 273:3216-3222). Una forma alternativamente cortada y empalmada que existe de forma natural del receptor de unión a VEGF de alta afinidad, VEGFR1 soluble (sFlt1), existe como una proteína secretada que funciona principalmente como un receptor señuelo (Shibuya et al., Oncogene, 1990, 5:519-524 y Kendall et al., PNAS, 1993, 90:10705-10709). Un receptor soluble, VEGF-Trap, manipulado para uso terapéutico, tiene el segundo dominio de VEGFR1 fusionado con el tercer dominio de VEGFR2 (KDR) y con la región Fc de IgG1 humana (Holash et al. 2002). Se mostró previamente que una región extracelular de PDGFRβ antagonizaba respuestas estimuladas por PDGF-B (Duan et al., J Biol Chem, 1991, 266(1):413-8 y Ueno et al., Science, 1991, 252(5007):844-8). Estudios con la quimera PDGFRβ-Fc demostraron que los ECD 1 a 3 de PDGFRβ humano son suficientes para la unión al ligando PDGF-B de alta afinidad (Heidaran et al., FASEB J., 1995, 9(1): 140-5 y Lokker et al., J Biol Chem, 1997, 272(52):33037-44). Un efecto de predimerización sobre la unión al ligando PDGF-B de alta afinidad también se describió cuando los ECD 1 a 3 de PDGFRβ se fusionaron con el dominio de glutatión S-transferasa (GST) (Leppänen et al., Biochemistry, 2000, 39(9):2370-5).

Los actuales tratamientos del ojo requieren inyecciones intravítreas mensuales durante años por un especialista en la retina. Por lo tanto, existe una necesidad de agentes terapéuticos mejorados y un enfoque para administrar dichos agentes terapéuticos a sitios, tales como el ojo.

El documento de patente US 2006/0234347 A1 se refiere a proteínas de receptores solubles multivalentes que se unen a más de un factor angiogénico. El documento de patente US 2011/0177074 A1 se refiere a antagonistas de PDGFRβ y VEGF-A, que incluyen neutralizar anticuerpos anti-PDGFRβ y anti-VEGF-A, así como a composiciones y métodos relacionados. El documento de patente CA 2831161 A1 se refiere a una proteína de fusión de un receptor de VEGF y receptor de FGF para inhibir la angiogénesis y a usos del mismo. El documento de patente WO 2009/105669 A2 se refiere a un antagonista de fusión de VEGF que comprende un receptor de VEGF fusionado con una molécula de cadena pesada de IgG. Ozawa et al. en: Proceedings of the 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 18-22 de abril de 2009; Denver, CO. Philadelphia (PA): Resumen 5609, se refiere a un gen de fusión novedoso de KDR (VEGFR II)-PDGFR-alfa en glioblastoma. El documento de patente CN 102311502 A se refiere a una proteína de fusión que puede inhibir simultáneamente PDGF y VEGF.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

La divulgación en el presente documento se refiere, entre otras cosas, a proteínas de fusión que inhiben la vía de PDGF y la vía de VEGF, a composiciones que comprenden estas proteínas de fusión y a composiciones que comprenden partículas víricas que comprenden un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión, así como a métodos de producción y uso de estas proteínas de fusión y partículas víricas para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, tal como una enfermedad ocular, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria, o cáncer.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión que comprende (a) una porción extracelular de un receptor de PDGF, (b) una porción extracelular de un receptor de VEGF y (c) un dominio de multimerización, en donde las proteínas de fusión se unen a un PDGF y un VEGF. Según la invención, la proteína de fusión está dispuesta de extremo N a extremo C en el siguiente orden: (a), (b) y (c). Según la invención, el receptor de PDGF es un PDGFR β . Según la invención, la porción extracelular de PDGFR comprende los dominios de tipo Ig D1-D3 de PDGFR. En algunas realizaciones en el presente documento, la porción extracelular de PDGFR comprende los dominios de tipo Ig D1-D4 de PDGFR. En algunas realizaciones en el presente documento, la porción extracelular de PDGFR comprende los dominios de tipo Ig D1-D5 de PDGFR. En algunas realizaciones en el presente documento, la porción extracelular de PDGFR comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o 3, o una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 85 % de identidad con SEQ ID NO: 1 o 3. Según la invención, la porción extracelular del receptor de VEGF consiste en el dominio de tipo Ig D2. En algunas realizaciones en el presente documento, la porción extracelular del receptor de VEGF consiste en un dominio de tipo Ig D2 de un VEGFR1 (FLT-1). En algunas realizaciones, la porción extracelular del receptor de VEGF comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad con SEQ ID NO: 4. Según la invención, la proteína de fusión comprende un péptido conector entre la porción extracelular de PDGFR y la porción extracelular del receptor de VEGF que comprende Ser₉ (SEQ ID NO: 49), y un conector entre el receptor de VEGF y el dominio de multimerización que comprende Gly₉ (SEQ ID NO: 47). Según la invención, el dominio de multimerización comprende una región Fc de un anticuerpo IgG1. En algunas realizaciones en el presente documento, la región Fc comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 % de identidad con SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones en el presente documento, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o 15, o una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 85 % de identidad con SEQ ID NO: 13 o 15. En algunas realizaciones en el presente documento, la proteína de fusión está en una forma multimérica. En algunas de las realizaciones en el presente documento, la proteína de fusión está en una forma dimérica.

Una proteína de fusión se puede producir cultivando una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica cualquiera de las proteínas de fusión desveladas en el presente documento en una condición tal que produce la proteína de fusión, y recuperando la proteína de fusión producida por la célula hospedadora.

En otro aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión dimérica que comprende dos proteínas de fusión, en donde cada proteína de fusión comprende cualquiera de las proteínas de fusión de la invención.

En otro aspecto más, la invención proporciona una composición que comprende cualquiera de las proteínas de fusión de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Aún en otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica cualquiera de las proteínas de fusión de la invención.

En algunos aspectos, la invención también proporciona una célula hospedadora que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las proteínas de fusión de la invención.

En algunos aspectos, la invención proporciona un método de producción de una proteína de fusión, que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica cualquiera de las proteínas de fusión de la invención en una condición que produce la proteína de fusión, y recuperar la proteína de fusión producida por la célula hospedadora. En realizaciones adicionales, la célula hospedadora es una célula de mamífero. En realizaciones adicionales, la célula hospedadora es una célula bacteriana. En realizaciones adicionales, la célula hospedadora es una célula de *Escherichia coli*.

Por consiguiente, la invención proporciona una proteína de fusión de la invención para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de la proteína de fusión al sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto tiene degeneración macular o retinopatía diabética proliferativa. En una realización adicional, la degeneración macular es degeneración macular senil húmeda o degeneración macular senil seca. En algunas realizaciones en el presente documento, la proteína de fusión se administra por inyección intravítrea al sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto tiene cáncer. En algunas realizaciones, el sujeto tiene artritis reumatoide, osteoartritis o asma. En algunas realizaciones, el sujeto tiene uveítis o neovascularización de la córnea.

En algunos aspectos, la invención proporciona un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las proteínas de fusión de la invención. En algunas realizaciones, el vector es un vector vírico. En una realización adicional, el vector vírico es un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV). En realizaciones adicionales, el vector de rAAV comprende una ITR de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh8R o AAVrh10.

En un aspecto, la invención también proporciona una partícula de rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica cualquiera de las proteínas de fusión de la invención. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende proteínas de la cápside de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh8R o AAVrh10. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende una ITR de un serotipo diferente del serotipo de la cápside. En una realización adicional, la ITR es una ITR de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh8, AAVrh8R o AAVrh10.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método de producción de una partícula de rAAV, que comprende (a) cultivar una célula hospedadora en una condición tal que se producen partículas de rAAV, en donde la célula hospedadora comprende (i) uno o más genes de encapsidación de AAV, en donde cada uno de dicho gen de encapsidación de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV; (ii) un pro-vector de rAAV que comprende un nucleótido que codifica cualquiera de las proteínas de fusión de la invención flanqueadas por al menos una ITR de AAV, y (iii) una función auxiliar de AAV; y (b) recuperar las partículas de rAAV producidas por la célula hospedadora. En una realización adicional, las partículas de rAAV se purifican.

La invención proporciona una partícula de rAAV de la invención para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de la partícula de rAAV al sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto tiene degeneración macular o retinopatía diabética proliferativa. En una realización adicional, la degeneración macular es degeneración macular senil húmeda o degeneración macular senil seca. En algunas realizaciones en el presente documento, la partícula de rAAV se administra por inyección intravítrea al sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto tiene cáncer. En algunas realizaciones, el sujeto tiene artritis reumatoide, osteoartritis o asma. En algunas realizaciones, el sujeto tiene uveítis o neovascularización de la córnea.

La memoria descriptiva se considera que es suficiente para permitir a un experto en la técnica poner en práctica la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra la generación de receptores PDGFR- β solubles truncados. A) Esquema de formas de dimerización acopladas a Fc de IgG1 de PDGFR- β Fc, PDGFR(D1-D5)9G-Fc, PDGFR(D1-D2)9G-Fc y PDGFR(D1-D3)9G-Fc así como las formas de receptor monomérico de PDGFR- β , PDGFR(D1-D4) y PDGFR(DG1-D5). Los bloques blancos indican secuencias de PDGFR- β , que incluyen los dominios extracelulares y el péptido señalizador (sp). Los bloques con sombreado diagonal representan conector de 9Gly y los bloques de puntos oscuros representan dominios CH2 y CH3 de la región Fc de IgG1 humana. B) Transferencias Western de sPDGFR- β monomérico y formas de receptor soluble de dimerización acoplado a Fc de IgG1 en condiciones reductoras (panel izquierdo) y no reductoras (panel derecho). La proteína se detectó con anticuerpo anti-PDGFR- β .

La **Figura 2** muestra un ensayo de unión volumétrico a PDGF BB de receptores PDGFR- β solubles truncados. A) Formas de receptores PDGFR- β solubles monoméricos PDGFR(D1-D4) y PDGFR(D1-D5) en comparación con la forma de dimerización acoplada a Fc de IgG1 de tamaño completo forman PDGFR(D1-D5)9G-Fc. B) Formas de receptores sPDGFR- β solubles acoplados a Fc de IgG1 diméricos PDGFR(D1-D2)9G-Fc y PDGFR(D1-D3)9G-Fc en comparación con la forma de dimerización acoplada a Fc de IgG1 PDGFR(D1-D5)9G-Fc. Volúmenes crecientes (μ l) de medio acondicionado (CM) que contiene receptores solubles (eje x) de transfecciones representativas se incubaron durante la noche con el ligando PDGF BB humano y la cantidad de ligando sin unir (eje y) se midió por ELISA. Los datos se expresaron como media \pm DE (n=3); todos los receptores fueron significativamente diferentes en afinidades de unión a PDGF por ANOVA bifactorial; prueba de Bonferroni; ***p<0,001.

La **Figura 3** es un esquema de proteínas híbridas VEGFR1/ PDGFR- β y PDGFR- β /VEGFR1, híbridos 1 a 4, y sus construcciones parentales PDGFR(D1-D5)9G-Fc, PDGFR(D1-D3)9G-Fc y sFLT01. Los bloques blancos indican secuencias de PDGFR- β , los bloques grises indican secuencias de VEGFR1 (Flt-1), que incluyen sus dominios extracelulares y péptidos señalizadores (sp). Los bloques con sombreado diagonal representan conectores de 9Gly o 9Ser y los bloques de puntos oscuros representan dominios CH2 y CH3 de la región Fc de IgG1 humana.

La **Figura 4** es una transferencia Western de proteínas híbridas VEGFR1/ PDGFR- β y PDGFR- β /VEGFR1, híbridos 1 a 4, en comparación con la forma de dimerización acoplada a Fc de IgG1 de tamaño completo PDGFR(D1-D5)9G-Fc (mostrada como (D1-D5)9G-Fc) en condiciones reductoras (panel izquierdo) y no reductoras (panel derecho). La proteína se detectó con anticuerpo anti-PDGFR- β y anticuerpo anti-Flt-1. Las muestras que contienen los híbridos 3 y 4 fueron duplicados de transfecciones individuales.

La **Figura 5** muestra gráficos que demuestran la inhibición de la proliferación inducida por VEGF e inducida por VEGF + PDGF- β de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) por proteína híbrida, híbridos 1 a 4. **A)** Ensayo de proliferación de HUVEC con VEGF solo: Se comparó el efecto inhibitor de 5 μ l de medio acondicionado (CM) que contenía receptores solubles sobre la proliferación de HUVEC en presencia de VEGF (10 ng/ml) solo. **B)** Ensayo de proliferación competitivo de HUVEC en presencia de VEGF (10 ng/ml) y PDGF (20 ng/ml): Se comparó el efecto inhibitor de 5 μ l de CM que contenía receptores solubles sobre la proliferación de HUVEC en presencia de ambos ligandos, VEGF y PDGF. Las muestras de tres transfecciones independientes (n=3) se evaluaron en un ensayo. Los datos se expresaron como media + DE. ANOVA unifactorial; prueba de Tukey; ***p<0,001 para la diferencia entre control positivo VEGF+ solo o VEGF+ en combinación con PDGF BB+ frente a otras muestras. Control = CM de EGFP; VEGF+ = CM de EGFP + 10 ng/ml de VEGF; BB+ Solo = CM de EGFP + 20 ng/ml; VEGF+BB+ = CM de EGFP + 10 ng/ml de VEGF + 20 ng/ml de PDGF BB.

La **Figura 6** muestra ensayos de unión volumétricos de proteínas híbridas. **A)** Ensayo de unión volumétrico de PDGF BB de proteínas híbridas 1 a 4 en comparación con PDGFR(D1-D5)9G-Fc. **B)** Ensayo de unión volumétrico de VEGF de proteínas híbridas 1 a 4 en comparación con sFLT01. Se incubaron volúmenes crecientes de medio acondicionado que contenía receptores solubles (eje x) de transfecciones representativas durante la noche con o ligandos PDGF BB humano o VEGF y se midió la cantidad de ligando sin unir (eje y) por ELISA por triplicado.

La **Figura 7** muestra ensayos de unión competitivos sin células de VEGF y PDGF de proteínas híbridas. **A)** Comparación del híbrido 3 (Híb. N.º 3), híbrido 4 (Híb. N.º 4) y PDGFR(D1-D3)9G-Fc en volúmenes crecientes de medio acondicionado (eje x) y la cantidad de ligando de PDGF no unido (eje y) como se mide por ELISA de PDGF BB. **B)** Comparación del híbrido 3 (Híb. N.º 3), híbrido 4 (Híb. N.º 4) y sFLT01 en volúmenes crecientes de medio acondicionado (eje x) y la cantidad del ligando de VEGF no unido (eje y) como se mide por ELISA de VEGF.

La **Figura 8** es un gráfico que muestra la eficacia *in vivo* de la administración intravítrea de AAV2.Híbrido 4 en un modelo de neovascularización coroidea (CNV) de ratón por láser. Se comparó el número de quemaduras sin neovascularización (NV) en el ojo tratado (izquierdo) con AAV2.Híbrido 4 (mostrado como Híbrido 4), AAV2.sFLT02 (mostrado como sFLT02), AAV2.PDGFR (mostrado como PDGFR) con el ojo contralateral no tratado (derecho; Intacto). Los datos de ambos ojos (n=20 ojos por tratamiento) se expresaron como el porcentaje de quemaduras sin CNV. La porción de PDGFR usada para la construcción de AAV2.PDGFR fue PDGFR(D1-D3)9G-Fc.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las realizaciones y descripciones que ya no se encuentran bajo el alcance de las reivindicaciones adjuntas se consideran simplemente ejemplos adecuados para el entendimiento de la invención y no son parte de la invención. La presente divulgación se refiere, entre otras cosas, a proteínas de fusión, y a composiciones de las mismas, que inhiben la vía de señalización del factor de crecimiento derivado del plasma (PDGF) y la vía de señalización del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Una proteína de fusión de la divulgación como se describe en el presente documento comprende una porción extracelular de un receptor de PDGF (PDGFR), una porción extracelular de un receptor de VEGF (VEGFR) y un dominio de multimerización, en donde la proteína de fusión se une a un PDGF y un VEGF para la inhibición de la actividad de PDGF y la actividad de VEGF, respectivamente. En el presente documento también se desvelan métodos para la producción de las proteínas de fusión, métodos de administración de las proteínas de fusión y métodos de uso de las proteínas de fusión en el tratamiento de enfermedades oculares, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias y/o cáncer.

I. Técnicas generales

Las técnicas y los procedimientos descritos o referenciados en el presente documento son, en general, bien entendidos y son empleadas comúnmente usando metodología convencional por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al., 4ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., 2003); la serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds., 1995); Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow y Lane, eds., 1988); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R.I. Freshney, 6ª ed., J. Wiley y Sons, 2010); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, Plenum Press, 1998); Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths y D.G. Newell, eds., J. Wiley y Sons, 1993-8); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1996); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., J. Wiley y Sons, 2002); Immunobiology (C.A. Janeway et al., 2004); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies

(M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 2011).

II. Definiciones

5 Un "vector," como se usa en el presente documento, se refiere a un plásmido o virus recombinante que comprende un ácido nucleico que se va a administrar en una célula hospedadora, ya sea *in vitro* o *in vivo*.

10 El término "polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por lo tanto, este término incluye, pero no se limita a, ADN o ARN monocatenario, bicatenario o de múltiples cadenas, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN, o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina, u otras bases de nucleótidos naturales, químicamente o bioquímicamente modificadas, no naturales o derivatizadas. El esqueleto del polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfato (como se pueden encontrar normalmente en ARN o ADN), o azúcar o grupos fosfato modificados o sustituidos. Alternativamente, el esqueleto del polinucleótido puede comprender un polímero de subunidades sintéticas, tales como fosforamidatos, y así puede ser un fosforamidato de oligodesoxinucleósido (P-NH₂) o un oligómero mixto de fosforamidato-fosfodiéster. Además, se puede obtener un polinucleótido bicatenario del producto de polinucleótido monocatenario de la síntesis química ya sea por síntesis de la hebra complementaria e hibridación de las cadenas en condiciones apropiadas, o por síntesis de la hebra complementaria *de novo* usando una ADN polimerasa con un cebador apropiado.

20 Un "vector vírico recombinante" se refiere a un vector de polinucleótido recombinante que comprende una o más secuencias heterólogas (es decir, secuencia del ácido nucleico no de origen vírico). En el caso de vectores de AAV recombinante, el ácido nucleico recombinante está flanqueado por al menos una, preferentemente dos, secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR).

25 Un "vector de AAV recombinante (vector de rAAV)" se refiere a un vector de polinucleótido que comprende una o más secuencias heterólogas (es decir, secuencia del ácido nucleico no de origen de AAV) que están flanqueadas por al menos una, preferentemente dos, secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV. Dichos vectores de rAAV pueden ser replicados y encapsidados en partículas víricas infecciosas cuando están presentes en una célula hospedadora que ha sido infectada con un virus auxiliar adecuado (o que está expresando funciones auxiliares adecuadas) y que está expresando productos del gen rep y cap de AAV (es decir, proteínas Rep y Cap de AAV). Cuando un vector de rAAV se incorpora en un polinucleótido más grande (por ejemplo, en un cromosoma o en otro vector, tal como un plásmido usado para clonación o transfección), entonces el vector de rAAV se puede denominar un "pro-vector" que puede ser "rescatado" por replicación y encapsidación en presencia de funciones de encapsidación de AAV y funciones auxiliares adecuadas. Un rAAV puede estar en cualquiera de varias formas, que incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, cromosomas artificiales lineales, complejo con lípidos, encapsulado dentro de liposomas y, lo más preferible, encapsidado en una partícula vírica, particularmente una partícula de AAV. Un vector de rAAV se puede encapsidar en una cápside de virus AAV para generar una "partícula de virus adenoasociado recombinante (partícula de rAAV)".

40 "Heterólogo" significa derivado de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la entidad con la que se compara o en la que se introduce o incorpora. Por ejemplo, un polinucleótido introducido por técnicas de ingeniería genética en un tipo de célula diferente es un polinucleótido heterólogo (y, cuando se expresa, puede codificar un polipéptido heterólogo). Similarmente, una secuencia celular (por ejemplo, un gen o porción del mismo) que se incorpora en un vector vírico es una secuencia heteróloga de nucleótidos con respecto al vector.

Una secuencia de "repeticiones terminales invertidas" o "ITR" es un término bien entendido en la técnica y se refiere a secuencias relativamente cortas encontradas en los extremos de los genomas víricos que están en orientación opuesta.

45 Una secuencia de "repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV", un término bien entendido en la técnica, es una secuencia de aproximadamente 145 nucleótidos que está presente en ambos extremos del genoma de AAV monocatenario nativo. Los 125 nucleótidos más externos de la ITR pueden estar presentes en cualquiera de dos orientaciones alternativas, que conducen a la heterogeneidad entre diferentes genomas de AAV y entre los dos extremos de un único genoma de AAV. Los 125 nucleótidos más externos también contienen varias regiones más cortas de autocomplementariedad, que permiten que ocurra el emparejamiento de bases intracatenario dentro de esta porción de la ITR.

Una "secuencia de resolución terminal" o "trs" es una secuencia en la región D de la ITR de AAV que se escinde por proteínas rep de AAV durante la replicación de ADN vírico. Una secuencia de resolución terminal mutante es resistente a la escisión por proteínas rep de AAV.

55 Los términos "partículas de genoma (gp)", "equivalentes de genoma" o "copias de genoma", como se usan en referencia a un título vírico, se refieren al número de viriones que contiene el genoma de ADN de AAV recombinante, independientemente de la infectividad o funcionalidad. El número de partículas de genoma en una preparación de vector particular se puede medir mediante procedimientos, tal como se describe en los ejemplos en el presente

documento, o por ejemplo, en Clark et al. (1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) Mol. Ther., 6:272-278.

Los términos "unidad de infección (iu)", "partícula infecciosa" o "unidad de replicación", como se usan en referencia a un título vírico, se refieren al número de partículas de vector de AAV recombinante infeccioso y competente en la replicación como se mide por el ensayo de centro infeccioso, también conocido como ensayo de centro de replicación, como se describe, por ejemplo, en McLaughlin et al. (1988) J. Virol., 62:1963-1973.

El término "unidad transductora (tu)", como se usa en referencia a un título vírico, se refiere al número de partículas de vector de AAV recombinante infeccioso que dan como resultado la producción de un producto de transgén funcional como se mide en ensayos funcionales, tal como se describe en Ejemplos en el presente documento o, por ejemplo, en Xiao et al. (1997) Exp. Neurobiol., 144:113-124; o en Fisher et al. (1996) J. Virol., 70:520-532 (ensayo LFU).

Un "virus auxiliar" para AAV se refiere a un virus que permite que el AAV (que es un parvovirus defectuoso) se replique y sea encapsidado por una célula hospedadora. Se han identificado varios de dichos virus auxiliares, que incluyen adenovirus, virus del herpes y poxvirus, tales como la variolovacuna. Los adenovirus engloban varios subgrupos diferentes, aunque el tipo 5 de adenovirus del subgrupo C (Ad5) es el más comúnmente usado. Se conocen numerosos adenovirus de origen de mamífero humano, no humano y aviar y están disponibles de depósitos tales como la ATCC. Los virus de la familia del herpes, que también están disponibles de depósitos tales como ATCC, incluyen, por ejemplo, virus del herpes simple (VHS), virus de Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus (CMV) y virus de la pseudorrabia (VPS).

Una "proteína de fusión" se refiere a una proteína que tiene dos o más porciones ligadas covalentemente juntas, donde cada una de las porciones deriva de diferentes proteínas.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a una secuencia de polipéptidos o del ácido nucleico de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos o nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos o nucleótidos en la secuencia de polipéptidos o del ácido nucleico de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento a efectos de determinar el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos o del ácido nucleico se puede lograr de diversas formas que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando programas de software informático públicamente disponibles, por ejemplo, los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1987), Sup. 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1, y que incluye el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Un programa de alineamiento preferido es ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, Pensilvania). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr el máximo alineamiento a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan. A efectos del presente documento, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que puede ser expresada alternativamente como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula del siguiente modo: 100 veces la fracción X/Y, donde X es el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias en ese alineamiento del programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que donde la longitud de secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A efectos del presente documento, el % de identidad de secuencia del ácido nucleico de una secuencia del ácido nucleico C dada con respecto a, con o contra una secuencia del ácido nucleico D dada (que puede expresarse alternativamente como una secuencia del ácido nucleico C dada que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia del ácido nucleico con respecto a, con o contra una secuencia del ácido nucleico D dada) se calcula del siguiente modo: 100 veces la fracción W/Z, donde W es el número de nucleótidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias en ese alineamiento de programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que donde la longitud de secuencia del ácido nucleico C no es igual a la longitud de secuencia del ácido nucleico D, el % de identidad de secuencia del ácido nucleico de C con respecto a D no será igual al % de identidad de secuencia del ácido nucleico de D con respecto a C.

Una molécula (por ejemplo, ácido nucleico o proteína) o célula "aislada" significa que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados, que incluyen resultados clínicos. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. En términos de un estado de enfermedad, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para mejorar, estabilizar o retrasar el desarrollo de una enfermedad.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En ciertas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas, reducción del grado de enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, que no empeora), prevención de la diseminación (es decir, metástasis) de la enfermedad, retraso o ralentizamiento de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y remisión (tanto parcial como total), tanto detectable como indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

Referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a ese valor o parámetro en sí. Por ejemplo, la descripción con referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X."

Como se usa en el presente documento, la forma en singular de los artículos "un", "una", "el" y "la" incluye referencias en plural, a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo, la expresión "una partícula de rAAV" incluye una o más partículas de rAAV.

III. Proteínas de fusión y componentes de las proteínas de fusión

Receptor del factor de crecimiento derivado del plasma (PDGF)

Los factores de crecimiento derivados del plasma (PDGF) intervienen en muchas actividades biológicas y participan en varias enfermedades, tales como la aterosclerosis, la glomerulonefritis, la reestenosis vascular tras la angioplastia y el cáncer. Existen al menos cuatro miembros de la familia de proteínas del factor de crecimiento derivado del plasma (PDGF) que regulan la vía de señalización de PDGF, específicamente PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C y PDGF-D. Estos cuatro PDGF se ensamblan en dímeros unidos por disulfuro por homo- o heterodimerización. Se han descrito hasta la fecha al menos cinco isoformas diméricas diferentes de PDGF e incluyen PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD y PDGF-AB, todas las cuales se unen a receptores de PDGF (PDGFR) para activar la vía de señalización de PDGF. Existen al menos dos PDGFR identificados, PDGFR- α y PDGFR- β . Cada PDGFR tiene una región extracelular, un dominio transmembranario y una región intracelular que tiene actividad intracelular de tirosina cinasas. Los PDGFR pueden dimerizar para formar los homodímeros PDGFR- α /PDGFR- α o PDGFR- β /PDGFR- β y el heterodímero PDGFR- α /PDGFR- β . Cada una de estas formas dimeras de PDGFR reconoce diferentes isoformas diméricas de PDGF. Por ejemplo, PDGFR- α /PDGFR- α reconoce los ligandos PDGF-AA, AB, BB y CC, PDGFR- α /PDGFR- β reconoce PDGF-AB, BB, CC y DD, y PDGFR- β /PDGFR- β reconoce PDGF-BB y DD. La mutagénesis por delección de los sitios de unión a PDGF-AA y -BB se ha cartografiado en los aminoácidos 1-314 de PDGFR- α , mientras que los sitios de unión a PDGF-BB se han cartografiado en los aminoácidos 1-315 de PDGFR- β . La región extracelular de estos PDGFR, que median en la unión a PDGF, contiene cinco dominios de tipo inmunoglobulina (Ig), cada uno de los cuales varía desde aproximadamente 88 hasta aproximadamente 114 aminoácidos de longitud. Véanse Lokker et al., J Biol Chem., 1997, 272(52):33037-44, Miyazawa et al., J Biol Chem., 1998, 273(39):25495-502; y Mahadevan et al., J Biol Chem., 1995, 270(46):27595-600.

La presente divulgación proporciona una porción extracelular de un receptor de PDGF que puede ser un componente de cualquier proteína de fusión desvelada en el presente documento. Por consiguiente, en un caso, la divulgación proporciona una porción extracelular de un PDGFR que incluye, pero no se limita a, PDGFR- α y PDGFR- β . En algunos de los casos en el presente documento, el PDGFR es de un mamífero, tal como un ser humano. Existen cinco dominios de tipo Ig numerados 1, 2, 3, 4 y 5 de extremo N a extremo C de una región extracelular de PDGFR. Como se usa en el presente documento, los términos "porción extracelular de un PDGFR" se refieren a uno o más de los cinco dominios de tipo Ig en la región extracelular de PDGFR. Por ejemplo, "una porción extracelular de un PDGFR" se refiere a uno o más de cualquiera de los cinco dominios de tipo Ig encontrados en la región extracelular de un PDGFR, tales como el dominio de tipo Ig D1, el dominio de tipo Ig D2, el dominio de tipo Ig D3, el dominio de tipo Ig D4 o el dominio de tipo Ig D5. Como se usa en el presente documento, términos tales como "dominio de tipo Ig D1" o "dominio extracelular (ECD) 1" de un PDGFR se refieren específicamente al primer dominio de tipo Ig encontrado en el extremo N de la región extracelular de PDGFR, "dominio de tipo Ig D2" o "ECD 1" de un PDGFR se refiere específicamente al segundo dominio de tipo Ig del extremo N de la región extracelular de PDGFR, etc. En cualquiera de los casos en el presente documento, una porción extracelular de un PDGFR comprende al menos un dominio de tipo Ig de uno o más PDGFR seleccionados del grupo que consiste en PDGFR- α y PDGFR- β . En algunas realizaciones, una porción extracelular de un PDGFR comprende al menos 3, 4, pero no más de 5 dominios de tipo Ig de un PDGFR (es decir, PDGFR- β). Una porción extracelular de un PDGFR puede comprender los dominios de tipo Ig D1 a D3, los dominios de tipo Ig D1 a D4, o los dominios de tipo Ig D1 a D5 de un PDGFR (es decir, PDGFR- β). En la presente invención, la porción extracelular comprende los dominios de tipo Ig D1-D3 de PDGFR β .

En el presente documento se contempla una porción extracelular que comprende cualquier combinación de los cinco dominios de tipo Ig de cada PDGFR. Por consiguiente, en un caso, la presente divulgación proporciona una porción extracelular de un PDGFR que comprende al menos un dominio de tipo Ig de dos PDGFR. En algunos casos, una porción extracelular de un PDGFR comprende al menos un dominio de tipo Ig de dos PDGFR seleccionados del grupo que consiste en PDGFR- α y PDGFR- β . Por ejemplo, una proteína de fusión como se describe en el presente documento puede comprender una porción extracelular de un PDGFR que comprende al menos un dominio de tipo Ig de PDGFR- α y al menos un dominio de tipo Ig de PDGFR- β . En algunos casos, una porción extracelular de un PDGFR

comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, pero no más de 10 dominios de tipo Ig de al menos dos o más PDGFR. En un caso adicional, una porción extracelular de un PDGFR comprende 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, o 1 a 2 dominios de tipo Ig de al menos dos o más PDGFR. Para una descripción adicional de dominios de tipo Ig que se pueden usar como parte de una porción extracelular de un PDGFR, véase la patente de EE. UU. número 5.686.572, el documento de patente WO2006113277 y Lokker et al., J Biol Chem. 1997, 272(52):33037-44.

En algunos casos, una porción extracelular de un PDGFR comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3. Por ejemplo, una porción extracelular de un PDGFR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 puede ser un componente de cualquier proteína de fusión desvelada en el presente documento. En algunos casos, una porción extracelular de un PDGFR comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y 8.

También se contemplan variantes de la secuencia de aminoácidos de cualquier porción extracelular de un PDGFR desvelado en el presente documento. Por ejemplo, se pueden mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de la porción extracelular de un PDGFR alterando la secuencia de aminoácidos que codifica la proteína. Las variantes de secuencias de aminoácidos de una porción extracelular de un PDGFR se pueden preparar introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia del ácido nucleico que codifica la proteína o introduciendo la modificación por síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, inserciones en y/o sustituciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la porción extracelular de un PDGFR. Se puede hacer cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción de aminoácidos final de la porción extracelular de un PDGFR, a condición de que la construcción final posea las características deseadas, tales como unión a una proteína de la familia de PDGF y/o inhibición de la activación de la vía de PDGF. Por consiguiente, en el presente documento se desvelan variantes de una porción extracelular de un PDGFR que puede ser un componente de cualquier proteína de fusión desvelada en el presente documento. En algunos casos, una porción extracelular de un PDGFR comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios de tipo Ig D1, D2, D3, D4 o D5 de un PDGFR- α (por ejemplo, PDGFR- α humano). En algunos casos, una porción extracelular de un PDGFR comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios de tipo Ig D1, D2, D3, D4 o D5 de un PDGFR- β (por ejemplo, PDGFR- β humano). En algunos casos, una porción extracelular de un PDGFR comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3. En algunos casos, una porción extracelular de un PDGFR comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y 8.

Sin desear quedar ligado a teoría, se contempla en el presente documento que una porción extracelular de un PDGFR inhibe la activación de la vía de PDGF uniéndose a una proteína de la familia de PDGF para bloquear su interacción con un PDGFR. Sin desear quedar ligado a teoría, también se contempla en el presente documento que una porción extracelular de un PDGFR se puede unir a un PDGFR para la inhibición negativa dominante de la vía de señalización de PDGF. En algunos casos, una porción extracelular de un PDGFR se une a la proteína de la familia de PDGF seleccionada del grupo que consiste en PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C y PDGF-D. En algunos casos, una porción extracelular de un PDGFR se une al dímero de la proteína de la familia de PDGF seleccionado del grupo que consiste en PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC y PDGF-DD. En algunos casos, una porción extracelular de un PDGFR se une al PDGFR seleccionado del grupo que consiste en PDGFR- α y PDGFR- β .

Una porción extracelular de un PDGFR puede o puede no comprender un péptido señalizador que sirve de una secuencia señalizadora de la secreción de la porción extracelular de un PDGFR de una célula hospedadora. El péptido señalizador puede estar unido operativamente a un ácido nucleico que codifica la proteína de interés (por ejemplo, una porción extracelular de un PDGFR). En algunas realizaciones, una porción extracelular de un PDGFR comprende un péptido señalizador. En algunas realizaciones, una porción extracelular de un PDGFR no comprende un péptido señalizador.

Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

Existen al menos cinco miembros de la familia de proteínas de VEGF que regulan la vía de señalización de VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento placentario (PlGF). Además, el corte y empalme alternativo de ARNm que codifica VEGF-A, VEGF-B y PlGF da como resultado la generación de múltiples isoformas de estas proteínas. Por ejemplo, el corte y empalme alternativo de VEGF-A da nueve isoformas diferentes que incluyen las isoformas VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆. La familia de proteínas de VEGF activa la vía de señalización de VEGF uniéndose a la región extracelular de receptores transmembranarios de VEGF. Existen al menos tres

receptores de VEGF identificados: VEGFR1 (también conocido como la tirosina cinasa 1 relacionada con fms (Flt-1)), VEGFR2 (también conocido como el receptor del dominio de inserción de cinasas (KDR)) y VEGFR3 (también conocido como la tirosina cinasa 4 de tipo fms (Flt-4)). Los VEGFR contienen cada uno una región extracelular que comprende siete dominios de tipo inmunoglobulina (Ig), un segmento de un único dominio transmembranario, un segmento de yuxtamembrana y un dominio de tirosina cinasa de proteína intracelular. Las regiones extracelulares de VEGFR se unen a diferentes miembros de la familia de proteínas de VEGF. Por ejemplo, VEGFR1 se une a VEGF-A, VEGF-B y PlGF; VEGFR2 se une a todas las isoformas de VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E; y VEGFR3 se une a VEGF-C y VEGF-D. Véase Roskoski, R et al., *Crit Rev Oncol Hematol.*, 2007, 62(3): 179-213, para una revisión de la señalización mediada por VEGF y VEGFR.

La presente divulgación proporciona una porción extracelular de un receptor de VEGF que puede ser un componente de cualquier proteína de fusión desvelada en el presente documento. Por consiguiente, en un caso, la divulgación proporciona una porción extracelular de un VEGFR que incluye, pero no se limita a, VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3. En algunos de los casos en el presente documento, el VEGFR es de un mamífero, tal como un ser humano. Existen siete dominios extracelulares de tipo Ig numerados 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 de extremo N a extremo C de una región extracelular de VEGFR. Como se usa en el presente documento, los términos "porción extracelular de un VEGFR" se refiere a uno o más de los siete dominios de tipo Ig en la región extracelular de VEGFR. Por ejemplo, "una porción extracelular de un VEGFR" se refiere a uno o más de cualquiera de los siete dominios de tipo Ig encontrados en la región extracelular de un VEGFR, tal como el dominio de tipo Ig D1, el dominio de tipo Ig D2, el dominio de tipo Ig D3, el dominio de tipo Ig D4, el dominio de tipo Ig D5, el dominio de tipo Ig D6 o el dominio de tipo Ig D7. Como se usa en el presente documento, términos tales como "dominio de tipo Ig D1" o "dominio extracelular (ECD) 1" de un VEGFR se refieren ambos específicamente al primer dominio de tipo Ig encontrado en el extremo N de la región extracelular de VEGFR, "dominio de tipo Ig D2" o "ECD 2" de un VEGFR se refieren ambos específicamente al segundo dominio de tipo Ig del extremo N de la región extracelular de VEGFR, etc. En la presente invención, la porción extracelular de un receptor de VEGF consiste en el dominio de tipo Ig D2. En cualquiera de los casos en el presente documento, una porción extracelular de un VEGFR comprende al menos un dominio de tipo Ig de uno o más VEGFR seleccionados del grupo que consiste en VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3. En algunos casos, una porción extracelular de un VEGFR comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, pero no más de 7 dominios de tipo Ig de un VEGFR (por ejemplo, VEGFR1). En algunos aspectos, una porción extracelular de un VEGFR comprende 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, o 1 a 2 dominios de tipo Ig de un VEGFR (por ejemplo, VEGFR1). Por ejemplo, una porción extracelular de un VEGFR puede comprender un dominio de tipo Ig D2 de un VEGFR1. Para una descripción adicional de dominios de tipo Ig que se pueden usar como parte de una porción extracelular de un VEGFR, véanse la patente de EE. UU. número 7.928.072, el documento de patente WO2006113277, Davis-Smyth, T., et al., *JBiol Chem*, 1998, 273:3216-3222, Holash, J., et al., *PNAS*, 2002, 99(17):11393-11398 y Pechan, P., et al., *Gene Ther*, 2009, 16:10-16.

En algunas realizaciones, una porción extracelular de un VEGFR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En algunos casos, una porción extracelular de un VEGFR comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5. Por ejemplo, una porción extracelular de un VEGFR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 puede ser un componente de cualquier proteína de fusión desvelada en el presente documento.

También se contemplan variantes de la secuencia de aminoácidos de cualquier porción extracelular de un VEGFR desvelado en el presente documento. Por ejemplo, se pueden mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de la porción extracelular de un VEGFR alterando la secuencia de aminoácidos que codifica la proteína. Las variantes de la secuencia aminoácidos de una porción extracelular de un VEGFR se pueden preparar introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína o introduciendo la modificación por síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones de, inserciones en y/o sustituciones dentro de la secuencia de aminoácidos de la porción extracelular de un VEGFR. Se puede hacer cualquier combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción de aminoácidos final de la porción extracelular de un VEGFR, a condición de que la construcción final posea las características deseadas, tales como la unión a una proteína de la familia de VEGF y/o inhibición de la activación de la vía VEGF. Por consiguiente, en el presente documento se desvelan variantes de una porción extracelular de un VEGFR que puede ser un componente de cualquier proteína de fusión desvelada en el presente documento. En algunos casos, una porción extracelular de un VEGFR comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios de tipo Ig D1, D2, D3, D4, D5, D6 o D7 de un VEGFR1 (por ejemplo, VEGFR1 humano). En algunos casos, una porción extracelular de un VEGFR comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios de tipo Ig D1, D2, D3, D4, D5, D6 o D7 de un VEGFR2 (por ejemplo, VEGFR2 humano). En algunas realizaciones, una porción extracelular de un VEGFR comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios de tipo Ig D1, D2, D3, D4,

D5, D6 o D7 de un VEGFR3 (por ejemplo, VEGFR3 humano). En algunos casos, una porción extracelular de un VEGFR comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y 5.

Sin desear quedar ligado a teoría, se contempla en el presente documento que una porción extracelular de un VEGFR inhibe la activación de la vía de VEGF uniéndose a una proteína de la familia de VEGF para bloquear su interacción con un VEGFR. Sin desear quedar ligado a teoría, también se contempla en el presente documento que una porción extracelular de un VEGFR se puede unir a un VEGFR para la inhibición negativa dominante de la vía de señalización de VEGF. En algunos casos, una porción extracelular de un VEGFR se une a la proteína de la familia de VEGF seleccionada del grupo que consiste en VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PIGF. En algunos casos, una porción extracelular de un VEGFR se une a VEGFR (por ejemplo, VEGFR1, VEGFR2 y/o VEGFR3).

Una porción extracelular de un VEGFR puede o puede no comprender un péptido señalizador que sirve de secuencia señalizadora de la secreción de la porción extracelular de un VEGFR de una célula hospedadora. Según la invención, una porción extracelular de un VEGFR no comprende un péptido señalizador.

Dominio de multimerización

La presente divulgación proporciona un dominio de multimerización (por ejemplo, una región Fc de un anticuerpo) que puede ser un componente de cualquier proteína de fusión desvelada en el presente documento. Los dominios de multimerización son las porciones de proteínas multiméricas que promueven la asociación de subunidades para formar, por ejemplo, dímeros, trímeros, tetrámeros, etc. Como se usa en el presente documento, el término "dominio de multimerización" se puede usar para referirse a un dominio de dimerización, un dominio de trimerización, un dominio de tetramerización, etc. Las proteínas de fusión que comprenden un dominio de multimerización pueden interactuar con otras proteínas de fusión que comprenden un dominio de multimerización para producir multímeros de proteínas de fusión (por ejemplo, dímeros de proteínas de fusión). Por ejemplo, una región Fc de IgG es un dominio de dimerización que se puede fusionar con una porción extracelular de un PDGFR o una porción extracelular de VEGFR como se desvela en el presente documento. Una proteína de fusión que comprende una porción extracelular de un PDGFR y una región Fc de IgG se puede dimerizar con otra proteína de fusión que comprende una región Fc de IgG para producir un dímero de proteína de fusión con multiespecificidad por al menos un PDGF. Se conocen en la técnica dominios de multimerización. Véase la patente de EE. UU. número 7.928.072 y el documento de patente WO2006/113277. Por ejemplo, una región Fc de una cadena pesada lambda de IgG1, tal como el dominio CH3 solo o ambos dominios CH2 y CH3, se puede usar como dominio de multimerización. En la presente invención, el dominio de multimerización comprende una región Fc de un anticuerpo IgG1. Como se usa en el presente documento, el término "región Fc" se usa para definir una región carboxiterminal de una cadena pesada de la inmunoglobulina que contiene al menos una porción de la región constante. El término incluye regiones Fc de la secuencia nativa y regiones Fc de variante. En una realización, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina carboxiterminal (Lys447) de la región Fc puede o puede no estar presente. Se conocen bien en la técnica las secuencias de aminoácidos que codifican inmunoglobulinas que comprenden regiones Fc. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada lambda de IgG1 se puede encontrar con el N.º de acceso de GenBank CAA75032. Una región Fc de una inmunoglobulina se puede obtener por escisión con la enzima papaína o por otros medios. En algunas realizaciones, la región Fc comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. También se puede usar el dominio de multimerización de un VEGF, tal como el dominio de multimerización de VEGF-A. VEGF-A está codificado por un ácido nucleico mostrado en N.º de acceso de GenBank NM003376. Por ejemplo, el dominio de multimerización de VEGF-A está codificado por el exón 3 de VEGF-A y se puede unir a cualquiera de los componentes de la proteína de fusión desvelados en el presente documento, tal como la porción extracelular de un PDGFR y/o la porción extracelular de un VEGFR.

En algunos casos, las variantes de la secuencia de aminoácidos de un dominio de multimerización se desvelan en el presente documento. Por ejemplo, se puede desear mejorar las propiedades biológicas (por ejemplo, propiedades de multimerización) del dominio de multimerización. Se pueden preparar variantes de secuencia de aminoácidos de un dominio de multimerización introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia del ácido nucleico que codifica la proteína o introduciendo la modificación por síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, inserciones en y/o sustituciones dentro de la secuencia de aminoácidos del dominio de multimerización. Se puede hacer cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción de aminoácidos final de la multimerización, a condición de que la construcción final posea las características deseadas, tales como formación de proteínas multiméricas. Por consiguiente, en el presente documento se desvelan variantes de un dominio de multimerización que puede ser un componente de cualquier proteína de fusión desvelada en el presente documento. En algunas realizaciones, una región Fc comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. Se conocen bien en la técnica las variantes de los dominios de multimerización. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE. UU. N.º 2012/0251531.

Conectores

Componentes de la proteína de fusión (por ejemplo, la porción extracelular de un PDGFR, la porción extracelular de un VEGFR, o el dominio de multimerización) se pueden unir por un resto conector, tal como un conector peptídico. Preferentemente, el conector aumenta la flexibilidad de los componentes de la proteína de fusión y no interfiere significativamente con la estructura de cada componente funcional dentro de la proteína de fusión. En algunos casos, el resto conector es un conector peptídico. En algunos casos, el conector peptídico comprende 2 a 100 aminoácidos. En algunos casos, el conector peptídico comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, pero no más de 100 aminoácidos. En algunos casos, el conector peptídico tiene entre 5 y 75, 5 y 50, 5 y 25, 5 y 20, 5 y 15, 5 y 10 o 5 y 9 aminoácidos de longitud. Los conectores a modo de ejemplo incluyen péptidos lineales que tienen al menos dos restos de aminoácidos, tales como Gly-Gly, Gly-Ala-Gly, Gly-Pro-Ala, Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 46). Los péptidos lineales adecuados incluyen poliglicina, poliserina, poliprolina, polialanina y oligopéptidos que consisten en restos de aminoácidos alanilo y/o serinilo y/o prolino y/o glicilo. En algunos casos, el conector peptídico comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Gly₉ (SEQ ID NO: 47), Glu₉ (SEQ ID NO: 48), Ser₉ (SEQ ID NO: 49), Gly₅-Cys-Pro₂-Cys (SEQ ID NO: 50), (Gly₄-Ser)₃ (SEQ ID NO: 51), Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn (SEQ ID NO: 52), Pro-Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn (SEQ ID NO: 53), Gly-Asp-Leu-Ile-Tyr-Arg-Asn-Gln-Lys (SEQ ID NO: 54) y Gly₉-Pro-Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn (SEQ ID NO: 55).

Los restos conectores también se pueden preparar a partir de otros polímeros, tales como polietilenglicol (no es parte de la invención). Dichos conectores pueden tener desde 10 hasta 1000, 10 hasta 500, 10 hasta 250, 10 hasta 100, o 10 hasta 50 unidades de monómeros de etilenglicol. Los polímeros adecuados deben ser de un tamaño similar al tamaño ocupado por el intervalo apropiado de restos de aminoácidos. Un polímero de tamaño típico proporcionaría una separación de desde aproximadamente 10-25 angstroms.

Los restos conectores se desvelan en Tarn, J.P., et al., J. of Immunol Methods, 1996, 196:17-32.

Los restos conectores se pueden usar para conectar cualquiera de los componentes de las proteínas de fusión desveladas en el presente documento. Por ejemplo, se puede usar un conector peptídico (por ejemplo, Gly₉ (SEQ ID NO: 47)) para conectar el extremo C de una porción extracelular de un PDGFR con el extremo N de una porción extracelular de un VEGFR y se puede usar además para conectar el extremo C de la porción extracelular de un VEGFR con el extremo N de un dominio de multimerización (por ejemplo, una región Fc de IgG1). En algunos casos, un conector se usa entre una porción extracelular de un PDGFR y un dominio de multimerización. En algunos casos, un conector se usa entre una porción extracelular de un VEGFR y un dominio de multimerización. En algunos casos, un conector se usa entre una porción extracelular de un PDGFR y una porción extracelular de un VEGFR. En algunos casos, la proteína de fusión comprende un conector entre una porción extracelular de un PDGFR y una región extracelular de un VEGFR, y un conector entre la región extracelular del VEGFR y un dominio de multimerización (por ejemplo, región Fc). En la presente invención, la proteína de fusión comprende un péptido conector entre la porción extracelular de PDGFR y la porción extracelular del VEGFR que comprende Ser₉ (SEQ ID NO: 49) y un conector entre la porción extracelular del VEGFR y el dominio de multimerización que comprende Gly₉ (SEQ ID NO: 47). En algunos casos, una proteína de fusión comprende al menos un conector, pero no más de cuatro conectores. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender (a) una porción extracelular de un PDGFR, (b) una porción extracelular de un VEGFR, (c) un dominio de multimerización (por ejemplo, una región Fc de IgG1), y al menos un conector desde el extremo N hasta el extremo C en un orden seleccionado del grupo que consiste en: (1) conector, a, conector, b, conector, c, conector; (2) a, conector, b, conector, c, conector; (3) conector, a, conector, b, conector, c; (4) a, conector, b, conector, c; (5) a, conector, b, c; y (6) a, b, conector, c. En otro ejemplo, una proteína de fusión puede comprender (a) una porción extracelular de un PDGFR, (b) un dominio de multimerización (por ejemplo, una región Fc de IgG1), y al menos un conector desde el extremo N hasta el extremo C en un orden seleccionado del grupo que consiste en: (1) conector, a, conector, b, conector; (2) conector, a, conector, b; (3) a, b, conector; (4) a, conector, b; (5) conector, b, conector, a, conector; (6) conector, b, conector, a; (7) b, a, conector; y (8) b, conector, a.

Proteínas de fusión

En el presente documento se desvelan proteínas de fusión que tienen especificidades de unión por al menos dos componentes de unión diferentes (por ejemplo, PDGF y VEGF). En la presente invención, la proteína de fusión se une a un PDGF y un VEGF. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende una primera especificidad de unión por una proteína de la familia de PDGF (por ejemplo, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C o PDGF-D) y una segunda especificidad de unión por un VEGF (por ejemplo, VEGF-A VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D o P1GF). En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende una primera especificidad de unión por un dímero de proteína de la familia de PDGF (por ejemplo, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC o PDGF-DD) y una segunda especificidad de unión por un VEGF (por ejemplo, VEGF-A VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D o P1GF). En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende una primera especificidad de unión por un PDGF de mamífero (por ejemplo, humano) y una segunda especificidad de unión por un VEGF de mamífero (por ejemplo, humano). En algunas realizaciones, la proteína de fusión se une al mismo componente de la vía de PDGF que uno cualquiera de los dímeros PDGFR- β /PDGFR- β o PDGFR- α /PDGFR- β . En algunos casos, una proteína de fusión comprende al menos una porción extracelular de un PDGFR de cualquiera de los PDGFR descritos en el presente documento. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender al menos una porción extracelular de PDGFR- α y al menos una porción extracelular de PDGFR- β . En otro ejemplo, una proteína de fusión puede comprender dos porciones extracelulares de PDGFR- β , tales como el dominio de tipo Ig D1-D3 y el dominio de tipo Ig D1-D5. En algunos casos, una proteína de fusión comprende una porción extracelular de un PDGFR que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y 3. En algunos casos, una proteína de fusión se une al mismo componente de la vía de VEGF que cualquiera de los VEGFR descritos en el presente documento. En algunos casos, una proteína de fusión se une al mismo componente de la vía de VEGF que uno cualquiera de VEGFR1, VEGFR2 o VEGFR3. En algunos casos, una proteína de fusión comprende al menos una porción extracelular de un VEGFR de cualquiera de los VEGFR descritos en el presente documento. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender al menos una porción extracelular de VEGFR1 y al menos una porción extracelular de VEGFR2. En otro ejemplo, una proteína de fusión puede comprender dos porciones extracelulares de VEGFR1, tales como el dominio de tipo Ig D2 y el dominio de tipo Ig D1-D3. En algunos casos, una proteína de fusión comprende una porción extracelular de un VEGFR que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y 5. Cualquiera de las proteínas de fusión desveladas en el presente documento que comprenda una porción extracelular de un PDGFR y una porción extracelular de un VEGFR comprende además un dominio de multimerización. El dominio de multimerización es una región Fc de IgG1. En algunas realizaciones, la región Fc comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunos casos, la proteína de fusión que comprende una porción extracelular de un PDGFR, una porción extracelular de VEGFR y un dominio de multimerización inhibe las vías de señalización de PDGF y VEGF (por ejemplo, inhibición de PDGF y actividad de VEGF). Cualquiera de las proteínas de fusión desveladas en el presente documento que comprende una porción extracelular de un PDGFR, una porción extracelular de VEGFR y un dominio de multimerización comprende además un conector. El conector comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Gly₉ (SEQ ID NO: 47) y Ser₉ (SEQ ID NO 49). En algunos casos, la porción extracelular de un PDGFR comprende una porción extracelular de un PDGFR de mamífero (por ejemplo, humano). En algunos casos, la porción extracelular de un VEGFR comprende una porción extracelular de un VEGFR de mamífero (por ejemplo, humano). En algunos casos, una proteína de fusión comprende una porción extracelular de un PDGFR humano (por ejemplo, PDGFR- β humano) y una porción extracelular de un VEGFR humano (por ejemplo, VEGFR1 humano).

En un caso, la divulgación proporciona una proteína de fusión que comprende: a) una porción extracelular de un PDGFR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7 u 8; b) una porción extracelular de un VEGFR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o 5; y c) un dominio de multimerización que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende: a) una porción extracelular de un PDGFR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; b) una porción extracelular de un VEGFR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y c) un dominio de multimerización que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende: a) una porción extracelular de un PDGFR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; b) una porción extracelular de un VEGFR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y c) un dominio de multimerización que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En el presente documento se desvelan proteínas de fusión que comprenden una porción extracelular de un PDGFR, una porción extracelular de un VEGFR y un dominio de multimerización en un orden específico. En algunos casos, la proteína de fusión comprende (a) una porción extracelular de un PDGFR, (b) una porción extracelular de un VEGFR, y (c) una región Fc dispuesta desde el extremo N hasta el extremo C en un orden de a, b, c. En algunos de los casos, una porción extracelular de un PDGFR comprende los dominios de tipo Ig D1-D3 de un PDGFR (por ejemplo, PDGFR- β). En algunos casos, una porción extracelular de un PDGFR comprende los dominios de tipo Ig D1-D4 de un PDGFR (por ejemplo, PDGFR- β). En algunos casos, una porción extracelular de un PDGFR comprende los dominios de tipo Ig D1-D5 de un PDGFR (por ejemplo, PDGFR- β). Una porción extracelular de un VEGFR consiste en el dominio de tipo Ig D2 de un VEGFR (por ejemplo, VEGFR1). Según la invención, un dominio de multimerización comprende la región Fc de un anticuerpo IgG1.

En algunos casos, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En otras realizaciones, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En todavía otros

casos, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En aún otras realizaciones, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

También se contemplan proteínas de fusión que comprenden al menos dos o más porciones extracelulares de un PDGFR, dos o más porciones extracelulares de un VEGFR, y/o dos o más dominios de multimerización. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender (a) una porción extracelular de un PDGFR, (b) una porción extracelular de un VEGFR, y (c) una región Fc dispuesta desde el extremo N hasta el extremo C en un orden de a, a, b, c o en un orden de a, b, b, c. Cualquier combinación de al menos una porción extracelular de un PDGFR, al menos una porción extracelular de un VEGFR y al menos un dominio de multimerización se desvela en el presente documento como si cada combinación se hubiera expuesto explícitamente en el presente documento.

También se contemplan proteínas de fusión que comprenden una porción extracelular de un PDGFR y un dominio de multimerización. En algunos casos, la proteína de fusión comprende (a) una porción extracelular de un PDGFR y (b) una región Fc dispuesta desde el extremo N hasta el extremo C en un orden de a y b. En algunos casos, la proteína de fusión comprende (a) una porción extracelular de un PDGFR y (b) una región Fc dispuesta desde el extremo N hasta el extremo C en un orden de b y a. En algunos casos, una porción extracelular de un PDGFR comprende los dominios de tipo Ig D1-D2 de un PDGFR (por ejemplo, PDGFR- β). En algunos casos, una porción extracelular de un PDGFR comprende los dominios de tipo Ig D1-D3 de un PDGFR (por ejemplo, PDGFR- β). En algunos casos, una porción extracelular de un PDGFR comprende los dominios de tipo Ig D1-D4 de un PDGFR (por ejemplo, PDGFR- β). En algunas realizaciones, una porción extracelular de un PDGFR comprende los dominios de tipo Ig D1-D5 de un PDGFR (por ejemplo, PDGFR- β). Según la invención, un dominio de multimerización comprende la región Fc de un anticuerpo IgG1. Cualquier combinación de al menos una porción extracelular de un PDGFR y al menos un dominio de multimerización se desvela en el presente documento como si cada combinación se hubiera expuesto explícitamente en el presente documento.

En algunos casos, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En algunos casos, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

Las proteínas de fusión descritas en la presente divulgación pueden comprender formas modificadas de la porción extracelular de un PDGFR, la porción extracelular de un VEGFR y/o el dominio de multimerización. Por ejemplo, los componentes de la proteína de fusión pueden tener modificaciones postraduccionales, que incluyen, por ejemplo, glucosilación, sialilación, acetilación y fosforilación.

En algunos casos, variantes de la secuencia de aminoácidos de las proteínas de fusión se desvelan en el presente documento. Por ejemplo, se puede desear mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas de la porción extracelular de un PDGFR, la porción extracelular de un VEGFR y/o el dominio de multimerización. Se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica la porción extracelular de un PDGFR, la porción extracelular de un VEGFR y/o el dominio de multimerización, o por introducción a través de la síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos de la porción extracelular de un PDGFR, la porción extracelular de un VEGFR y/o el dominio de multimerización. Se puede hacer cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, a condición de que la construcción final posea las características deseadas (por ejemplo, unión a un PDGF, unión a un VEGF, inhibición de la activación de una vía de PDGF, formación de multímeros y/o inhibición de la activación de una vía de VEGF). En algunos casos, la proteína de fusión comprende al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión que comprende cualquier porción extracelular de un PDGFR, porción extracelular de un VEGFR y/o dominio de multimerización como se desvela en el presente documento. En algunos casos, una variante de proteína de fusión comprende al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12-15. En algunos casos, una variante de proteína de fusión comprende al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9-11.

Las sustituciones de restos de aminoácidos desveladas en el presente documento también incluyen sustituciones conservativas. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 que sigue bajo el encabezado de "Sustituciones conservativas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir más cambios sustanciales, denominados "Sustituciones a modo de ejemplo" en la Tabla 1, o como se describe adicionalmente a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, se pueden introducir y cribar los productos. Las sustituciones de aminoácidos como se muestran en la Tabla 1 o como se describen a continuación en referencia a las clases de aminoácidos se pueden introducir en cualquiera de las proteínas de fusión

o componentes de proteína (por ejemplo, porción extracelular de un PDGFR, porción extracelular de un VEGFR, dominio de multimerización, etc.) desvelados en el presente documento.

Tabla 1. Posibles sustituciones de aminoácidos

Resto original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones conservativas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

5 Modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas de las proteínas o polipéptidos se llevan a cabo seleccionando sustituciones que se diferencian significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los aminoácidos se pueden agrupar según propiedades comunes de la cadena lateral:

- 10
- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
 - (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
 - (3) ácidos: Asp, Glu;
 - (4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe;

(7) hidrófobos grandes: Norleucina, Met, Val, Leu, Ile.

Las sustituciones no conservativas conllevan el intercambio de un miembro de uno de estos restos por otra clase.

5 Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones de la proteína de fusión que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis con barrido de alanina", como se describe por Cunningham y Wells en Science, 1989, 244:1081-1085. Aquí, un resto o grupo de restos diana se identifica (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituye por un aminoácido neutro o negativamente cargado (lo más preferentemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el componente de unión
10 diana. Las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan entonces introduciendo variantes adicionales u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, mientras que el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación en sí no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza mutagénesis con barrido de ala o al azar en el codón o región diana y las variantes de polipéptido
15 de fusión expresadas se criban para la actividad deseada.

Cualquier resto de cisteína que no participe en el mantenimiento de la conformación apropiada de las proteínas de fusión o componentes de la proteína (por ejemplo, porción extracelular de un PDGFR, porción extracelular de un VEGFR, dominio de multimerización, etc.) también se pueden sustituir, en general, con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir la reticulación aberrante. En cambio, el (los) enlace(s) de cisteína se
20 pueden añadir a la proteína de fusión o a los componentes de la proteína (por ejemplo, porción extracelular de un PDGFR, porción extracelular de un VEGFR, dominio de multimerización, etc.) para mejorar su estabilidad.

En otros casos, las proteínas o péptidos de la divulgación pueden comprender uno o más aminoácidos que no existen de forma natural o modificados. Un "resto de aminoácido que no existe de forma natural" se refiere a un resto, distinto de los restos de aminoácidos que existen de forma natural enumerados anteriormente, que es capaz de unirse
25 covalentemente a resto(s) de aminoácidos adyacente(s) en una cadena de polipéptidos. Los aminoácidos no naturales incluyen, pero no se limitan a, homo-lisina, homo-arginina, homo-serina, ácido azetidincarboxílico, ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido aminopropiónico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, *terc*-butilglicina, ácido 2,4-diaminoisobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilasparagina, homoprolina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilalanina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, N-metilpentilglicina, N-metilvalina, naftalanina, norvalina, norleucina, ornitina, citrulina, pentilglicina, ácido pipercolico y tioprolina. Los aminoácidos modificados incluyen aminoácidos naturales y no naturales que están bloqueados químicamente, reversible o irreversiblemente, o modificados en su grupo amino aminoterminal o sus grupos de cadena lateral, como,
35 por ejemplo, D- y L-aminoácidos N-metilados, grupos funcionales de cadena lateral que están modificados químicamente con otro grupo funcional. Por ejemplo, los aminoácidos modificados incluyen sulfóxido de metionina; metionina sulfona; (éster beta-metílico de) ácido aspártico, un aminoácido modificado de ácido aspártico; N-etilglicina, un aminoácido modificado de glicina; o alanina carboxamida y un aminoácido modificado de alanina. Se conocen en la técnica aminoácidos no naturales y modificados adicionales, y métodos de su incorporación en las proteínas y
40 péptidos (véase, por ejemplo, Sandberg et al., (1998) J. Med. Chem. 41: 2481-91; Xie y Schultz (2005) Curr. Opin. Chem. Biol. 9: 548-554; Hodgson y Sanderson (2004) Chem. Soc. Rev. 33: 422-430.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- ("N") y/o carboxi- ("C") terminales que varían en longitud desde un resto hasta cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen una proteína de fusión con un resto metionilo aminoterminal o la proteína de fusión fusionada con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de proteína de fusión incluyen la fusión con el extremo N o C de la proteína de fusión con un polipéptido que
45 permite la formación de multímeros de proteína.

La presente divulgación proporciona un péptido señalizador, también denominado en el presente documento una secuencia señalizadora, que puede ser un componente de cualquier proteína de fusión desvelada en el presente
50 documento. Por ejemplo, una proteína de fusión que comprende una porción extracelular de un PDGFR, una porción extracelular de un VEGFR y un dominio de multimerización puede comprender además un péptido heterólogo, preferentemente una secuencia señalizadora u otro péptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína de fusión madura. La secuencia señalizadora heteróloga seleccionada preferentemente es una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señalizadora) por células hospedadoras eucariotas. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan secuencias señalizadoras nativas de mamífero, la secuencia señalizadora eucariota (es decir, de mamífero) está sustituida por una secuencia señalizadora procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en secuencias conductoras de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o genes de enterotoxina II estables al calor. Para la secreción de levadura, la secuencia señalizadora nativa se puede sustituir por, por ejemplo, el conductor de invertasa de levadura, conductor de factor (incluyendo conductores de
55

factores de *Sacaromyces* y *Kluyveromyces*), o conductor de fosfatasa ácida, el conductor de glucoamilasa de *C. albicans* o la señal descrita en documento de patente WO 90/13646. En la expresión en células de mamífero, están disponibles secuencias señalizadoras de mamífero, así como conductores secretorios virales, por ejemplo, la señal gD del virus del herpes simple. Un péptido señalizador puede ser completamente escindido de la proteína de fusión a medida que se produce de células hospedadoras o puede ser parcialmente escindido. Una población mixta de proteínas de fusión se puede producir a partir de una célula hospedadora, en donde las proteínas de fusión comprenden una secuencia señalizadora completamente escindida (por ejemplo, sin secuencia señalizadora), una secuencia señalizadora parcialmente escindida (por ejemplo, porción de la secuencia señal) y/o una secuencia señalizadora no escindida (por ejemplo, secuencia señalizadora completa). Por ejemplo, una proteína de fusión que comprende además un péptido señalizador en el extremo N puede ser escindido en el extremo N por uno cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 restos de aminoácidos. En algunas realizaciones, cualquier proteína de fusión de la invención comprende un péptido señalizador para la secreción de proteína de una célula. En algunas realizaciones, alguna proteína de fusión de la invención no comprende un péptido señalizador para la secreción de proteína de una célula.

La presente invención proporciona una proteína de fusión dimérica que comprende dos proteínas de fusión, en donde cada proteína de fusión comprende cualquier proteína de fusión de la invención. En una realización, la proteína de fusión dimérica comprende dos proteínas de fusión idénticas. En otra realización, la proteína de fusión dimérica comprende dos proteínas de fusión diferentes. Las proteínas de fusión desveladas en el presente documento pueden formar multímeros de dos o más proteínas de fusión. Los multímeros (por ejemplo, dímeros, trímeros, tetrámeros, etc.) se pueden formar a partir de proteínas de fusión idénticas (por ejemplo, homomultímero) o formar proteínas de fusión heterólogas (por ejemplo, heteromultímeros). En otro caso, la proteína de fusión multimérica comprende al menos una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12-15, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12-15. En otro caso, la proteína de fusión multimérica comprende al menos una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9-11, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9-11. En un caso, la proteína de fusión se recupera como un multímero de proteína fusión de una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica dicha proteína de fusión. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión están glucosiladas. Por ejemplo, la proteína de fusión puede ser glucosilada después de ser liberada de una célula hospedadora en la porción extracelular de un PDGFR, la porción extracelular de un VEGFR y/o el dominio de multimerización.

En el presente documento también se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden ser adecuadas para una variedad de modos de administración descritos en el presente documento, que incluyen, por ejemplo, administración sistémica o localizada. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de colirios, disoluciones inyectables, o en una forma adecuada para inhalación (ya sea a través de la boca o la nariz) o administración por vía oral. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable son adecuadas para administración al ser humano. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable son adecuadas para inyección intravítrea o administración tópica al ojo. Dichos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceite, que incluyen los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y similares. También se pueden emplear soluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa, polietilenglicol (PEG) y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. La composición farmacéutica puede comprender además componentes adicionales, por ejemplo, conservantes, tampones, agentes de tonicidad, antioxidantes y estabilizadores, agentes humectantes o clarificantes no iónicos, agentes que aumentan la viscosidad y similares. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden envasar en dosis unitarias únicas o en formas multidosis. Las composiciones se formulan, en general, como disolución estéril y sustancialmente isotónica. Las composiciones también se pueden formular para tener valores osmóticos que son compatibles con el humor acuoso del ojo y los tejidos oftálmicos. Dichos valores osmóticos estarán, en general, en el intervalo de desde aproximadamente 200 hasta aproximadamente 400 miliosmoles por kilogramo de agua ("mOsm/kg"), pero preferentemente serán de aproximadamente 300 mOsm/kg. Se considera que la retina tiene un valor osmótico de ~283 mOsm/kg.

IV. Ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras

Ácidos nucleicos

En el presente documento se desvelan ácidos nucleicos aislados que codifican cualquiera de los componentes de proteínas de fusión desveladas en el presente documento, tales como una porción extracelular de un PDGFR, y porción extracelular de un VEGFR, y un dominio de multimerización. Los ácidos nucleicos que codifican PDGFR de mamífero se han descrito para ambos tipos de receptores, PDGFR- α y PDGFR- β . Las secuencias del ácido nucleico a modo de ejemplo se pueden encontrar en, pero no se limitan a, Yarden et al., Nature, 1986, 323:226-232; Matsui et al., Science, 1989, 243: 800-803; la solicitud de patente de EE. UU. N.º de serie 07/771.829 que es una continuación de la solicitud de patente de EE. UU. N.º de serie 07/309.332, ahora abandonada, la patente de EE. UU. número

5.686.572 y el documento de patente WO2006/113277. El ARNm que codifica PDGFR- α y PDGFR- β humanos se puede encontrar en los N.^o de acceso de Genbank NM_006206.4 y NM_002609.3, respectivamente. En algunos casos, un ácido nucleico aislado codifica una porción extracelular de un PDGFR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3. En algunos casos, un ácido nucleico aislado codifica una porción extracelular de un PDGFR que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-3. En algunos casos, el ácido nucleico aislado que codifica una porción extracelular de un PDGFR se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16 y 17. En el presente documento también se desvelan ácidos nucleicos aislados que codifican una porción extracelular de un VEGFR. Los ácidos nucleicos que codifican VEGFR de mamífero se han descrito para todos los tipos de receptor. Las secuencias del ácido nucleico a modo de ejemplo se pueden encontrar en, pero no se limitan a, la patente de EE. UU. número 7.928.072 y el documento de patente WO2006/113277. El ARNm que codifica VEGFR1 y VEGFR2 humanos se puede encontrar en los N.^o de acceso de Genbank NM_001159920.1 y NM_002253.2, respectivamente. El ARNm que codifica VEGFR3 humano se puede encontrar en los N.^o de acceso de Genbank NM_002020.7 y NM_182925.4. En algunos casos, un ácido nucleico aislado codifica una porción extracelular de un VEGFR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y 5. En algunos casos, un ácido nucleico aislado codifica una porción extracelular de un VEGFR que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y 5. En el presente documento también se desvelan ácidos nucleicos aislados que codifican un dominio de multimerización (por ejemplo, región Fc). En algunos casos, un ácido nucleico aislado codifica un dominio de multimerización que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunos casos, un ácido nucleico aislado codifica un dominio de multimerización que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6.

También se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican una proteína de fusión de la invención. En algunos casos, un ácido nucleico aislado codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12-15. En algunos casos, un ácido nucleico aislado codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9-11. En algunos casos, un ácido nucleico aislado codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12-15. En algunos casos, un ácido nucleico aislado codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9-11. En algunos casos, un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de fusión comprende la secuencia del ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21-24. En algunos casos, un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de fusión comprende la secuencia del ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18-20.

Una secuencia del ácido nucleico aislada que codifica una proteína de fusión o un componente de una proteína de fusión (por ejemplo, la porción extracelular de un PDGFR, la porción extracelular de un VEGFR o el dominio de multimerización) puede incluir además una secuencia del ácido nucleico que codifica un conector. En algunos casos, un ácido nucleico codifica un conector seleccionado del grupo que consiste en Gly₉ (SEQ ID NO: 47), G1u₉ (SEQ ID NO: 48), Ser₉ (SEQ ID NO: 49), Gly₅-Cys-Pro₂-Cys (SEQ ID NO: 50), (Gly₄-Ser)₃ (SEQ ID NO: 51), Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn (SEQ ID NO: 52), Pro-Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn (SEQ ID NO: 53), Gly-Asp-Leu-Ile-Tyr-Arg-Asn-Gln-Lys (SEQ ID NO: 54) y Gly₉-Pro-Ser-Cys-Val-Pro-Leu-Met-Arg-Cys-Gly-Gly-Cys-Cys-Asn (SEQ ID NO: 55).

Los ácidos nucleicos aislados pueden incluir además una secuencia que codifica un péptido señalizador que sirve de secuencia señalizadora para secretar la proteína de fusión de las células hospedadoras. En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado no comprende una secuencia que codifica un péptido señalizador.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una proteína de fusión o un componente de una proteína de fusión (por ejemplo, la porción extracelular de un PDGFR, la porción extracelular de un VEGFR, o el dominio de multimerización) pueden estar en forma de ARN, tal como ARNm, ARNnh, ARNt o cualquier otra forma, o en forma de ADN, que incluye, pero no se limita a, ADNc y ADN genómico obtenido clonando o producido sintéticamente, o cualquier combinación de los mismos. El ADN puede ser tricatenario, bicatenario o monocatenario, o cualquier combinación de los mismos. Cualquier porción de al menos una cadena del ADN o ARN puede ser la cadena codificante, también conocida como la cadena codificante, o puede ser la cadena no codificante, también denominada

la cadena no codificante. Los ácidos nucleicos aislados se pueden obtener de fuentes biológicas usando cualquier número de metodologías de clonación conocidas por los expertos en la técnica. Los ácidos nucleicos aislados también se pueden preparar por síntesis química directa por métodos conocidos. Los ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión o componente de proteína de fusión (por ejemplo, la porción extracelular de un PDGFR, la porción extracelular de un VEGFR o el dominio de multimerización) se pueden preparar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, aislamiento de una fuente natural o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete de una variante previamente preparada o una versión no de variante de la proteína de fusión o componente de proteína de fusión. Véanse *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook et al., 4ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012) y *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, et al. eds., 2003).

Vectores

La presente divulgación contempla el uso de un vehículo de administración del ácido nucleico para la introducción de una o más secuencias del ácido nucleico que codifican una proteína de fusión o componente de la proteína de fusión en una célula para la expresión de dicha proteína. Los ejemplos de vehículos de administración del ácido nucleico son liposomas, polímeros biocompatibles, que incluyen polímeros naturales y polímeros sintéticos; lipoproteínas; polipéptidos; polisacáridos; lipopolisacáridos; envolturas víricas artificiales; partículas metálicas; y bacterias, virus, tales como baculovirus, adenovirus y retrovirus, bacteriófago, cósmido, plásmido, vectores fúngicos y otros vehículos de recombinación normalmente usados en la técnica que se han descrito para la expresión en una variedad de hospedadores eucariotas y procariotas. En algunas realizaciones, el vehículo de administración del ácido nucleico es un vector de expresión, tal como un plásmido. El vector puede incluir cualquier elemento para establecer una función convencional de un vector de expresión, por ejemplo, un promotor, elemento de unión al ribosoma, terminador, potenciador, marcador de selección y origen de replicación. El promotor puede ser un promotor constitutivo, inducible o represible. Los promotores a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), la LTR del RSV, la LTR del MoMLV, el promotor de la fosfoglicerato cinasa-1 (PGK), un promotor del virus simio 40 (SV40) y un promotor CK6, un promotor de transtirretina (TTR), un promotor TK, un promotor sensible a la tetraciclina (TRE), un promotor HBV, un promotor hAAT, un promotor LSP, promotores quiméricos específicos del hígado (LSP), el promotor E2F, el promotor de la telomerasa (hTERT); el potenciador del citomegalovirus/beta-actina de pollo/promotor de β -globina de conejo (promotor CAG; Niwa et al., *Gene*, 1991, 108(2): 193-9) y el promotor del factor de elongación 1-alfa (EF1-alfa) (Kim et al., *Gene*, 1990, 91(2):217-23 y Guo et al., *Gene Ther.*, 1996, 3(9):802-10). Se conocen en la técnica varios vectores de expresión capaces de administrar ácidos nucleicos a una célula (por ejemplo, célula bacteriana, célula de levadura, célula de planta o célula de mamífero) y se pueden usar en el presente documento para la producción de una proteína de fusión o componente de la proteína de fusión en la célula. Por ejemplo, se puede usar *E. coli* para producir una proteína de fusión si se transforma con un plásmido, tal como pBR322 (Mandel et al., *J. Mol. Biol.*, 1970, 53:154), manipulado para comprender un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión. Las proteínas de fusión expresadas o los componentes de la proteína de fusión se pueden recoger de las células y purificar según técnicas convencionales conocidas en la técnica y como se describen en el presente documento.

Células hospedadoras

En el presente documento se proporcionan células hospedadoras que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de la invención. Los ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión o componentes de la proteína de fusión (por ejemplo, una porción extracelular de un PDGFR, una porción extracelular de un VEGFR y/o un dominio de multimerización) se pueden proporcionar a una célula diana mediante cualquier medio conocido en la técnica. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica una proteína de interés (por ejemplo, una proteína de fusión) está en un vector vírico y el vector se ha encapsidado, entonces los viriones se pueden usar para infectar células. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica una proteína de interés (por ejemplo, una proteína de fusión) está en un vector de expresión, tal como un plásmido. Los procedimientos de transfección o transformación que son apropiados para las células particulares se pueden usar para introducir un ácido nucleico que codifica una proteína de interés (por ejemplo, proteína de fusión) en una célula diana. Las formulaciones que utilizan polímeros, liposomas o nanoesferas se pueden usar para la administración de ácidos nucleicos que codifican una proteína de interés (por ejemplo, una proteína de fusión). Las células que se pueden transformar o transfectar con construcciones recombinantes según la invención pueden ser cualesquiera que sean convenientes para un experto en la técnica. Los tipos de células a modo de ejemplo que se pueden usar incluyen bacterias, levadura, hongos, células de insecto, planta y de mamífero. Las células de mamífero a modo de ejemplo que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, fibroblastos, hepatocitos, células endoteliales, células madre, células hematopoyéticas, células epiteliales, miocitos, células neuronales y queratinocitos. Estirpes celulares de mamífero a modo de ejemplo adicionales que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, células COS, células VERO, células HeLa, células de ovario de hámster chino (CHO), células 293, células NSO, células SP20, células de fibroblasto 3T3, células W138, células BHK, células HEPG2, células DUX y células MDCK. Estas células se pueden usar para producir y recoger la proteína de interés. En algunos casos, se pueden proporcionar células transformadas o transfectadas a una célula u hospedador de mamífero. Células adecuadas para la administración a una célula u hospedador de mamífero incluyen cualquier tipo de célula de mamífero de cualquier órgano, tumor o estirpe celular. Por ejemplo, se pueden usar células humanas, murinas, de cabra, ovinas, bovinas, de

perro, gato y porcinas. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula bacteriana. En realizaciones adicionales, la célula hospedadora es una célula de *E. coli*.

El término "célula hospedadora" incluye una célula que ha sido o puede ser un receptor para un vector(es) de la presente invención y la descendencia de la misma. La descendencia puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en genómica del complemento de ADN total) a la célula parental original debido a mutación natural, accidental o deliberada. Las células hospedadoras son preferentemente células eucariotas, preferentemente células de mamífero, lo más preferentemente células humanas. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es una célula bacteriana. En realizaciones adicionales, la célula hospedadora es una célula de *E. coli*.

V. Métodos de producción proteínas de fusión y componentes de la proteína de fusión

En el presente documento se desvelan métodos de producción de proteínas de fusión o componentes de la proteína de fusión (por ejemplo, una porción extracelular de un PDGFR, una porción extracelular de un VEGFR y/o un dominio de multimerización). En algunos aspectos, se proporciona un método de producción de cualquier proteína de fusión de la invención que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica cualquiera de las proteínas de fusión de la invención en una condición tal que produce la proteína de fusión, y recuperar la proteína de fusión producida por la célula hospedadora. En algunos casos, un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 18-24.

(1) Cultivo de las células hospedadoras

Las células usadas para producir las proteínas de fusión o componentes de la proteína de fusión (por ejemplo, una porción extracelular de un PDGFR, una porción extracelular de un VEGFR y/o un dominio de multimerización) de la divulgación se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen FIO de Ham (Sigma), medio esencial mínimo (MEM, Sigma), RPMI 1640 (Sigma), medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma) y caldo de Luria (LB). Además, se puede usar cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem, 102:255 (1980), las patentes de EE. UU. N.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; publicaciones WIPO N.º WO 90/03430; documento de patente WO 87/00195; o la patente de EE. UU. Re. 30.985 como medio de cultivo para las células. Un medio dado se complementa, en general, según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), DHFR, sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos, oligoelementos y glucosa, o una fuente equivalente de energía. También se puede incluir cualquier otro suplemento necesario en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las previamente usadas con la célula seleccionada para la expresión, y serán evidentes para un experto en la técnica. Para el crecimiento en *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida oscila desde aproximadamente 20 °C hasta aproximadamente 39 °C, más preferentemente desde aproximadamente 25 °C hasta aproximadamente 37 °C, incluso más preferentemente a aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varíe desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo hospedador. Para *E. coli*, el pH es preferentemente desde aproximadamente 6,8 hasta aproximadamente 7,4, y más preferentemente aproximadamente 7,0. Si un promotor inducible se usa en el vector de expresión, la expresión de proteínas se induce en condiciones adecuadas para la activación del promotor. Por ejemplo, si se usa un promotor PhoA para controlar la transcripción, las células hospedadoras transformadas se pueden cultivar en un medio limitante de fosfato para la inducción. Se puede usar una variedad de otros inductores, según la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica.

(2) Purificación de proteínas de fusión o componentes de la proteína de fusión

Cuando se usan técnicas recombinantes, las proteínas de fusión o los componentes de la proteína de fusión (por ejemplo, una porción extracelular de un PDGFR, una porción extracelular de un VEGFR y/o un dominio de multimerización) descritos en el presente documento se pueden producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretar directamente en el medio. Si los polipéptidos se producen intracelularmente, como primera etapa, la recuperación de proteína implica normalmente alterar la célula, en general, por métodos tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez se han alterado las células, se retiran los residuos de las partículas de las células hospedadoras o de los fragmentos lisados, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Si los polipéptidos son secretados en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión, en general, se filtran primero y se concentran usando un filtro de concentración de proteína comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de la proteasa, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes casuales.

Las composiciones de proteínas de fusión o componentes de la proteína de fusión (por ejemplo, una porción extracelular de un PDGFR, una porción extracelular de un VEGFR y/o un dominio de multimerización) preparadas a partir de dichas células se pueden purificar usando, por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad. En algunas realizaciones, se usa proteína A o proteína G como un ligando de

afinidad para su uso en la cromatografía de afinidad. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier región Fc de la inmunoglobulina que está presente en las proteínas de fusión (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983). En algunas realizaciones, la proteína A se usa como un ligando de afinidad para aislar y purificar las proteínas de fusión o los componentes de la proteína de fusión (por ejemplo, una porción extracelular de un PDGFR, una porción extracelular de un VEGFR y/o un dominio de multimerización) como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se usa proteína G como un ligando de afinidad para aislar y purificar las proteínas de fusión o los componentes de la proteína de fusión (por ejemplo, una porción extracelular de un PDGFR, una porción extracelular de un VEGFR y/o un dominio de multimerización) como se describe en el presente documento. La matriz a la que se une el ligando de afinidad es casi siempre agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estireno-divinil)benceno, permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, heparina, SEPHAROSE™, o resinas de intercambio aniónico o catiónico (tales como una columna de ácido poliaspártico), así como cromatoenfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo de las proteínas de fusión o los componentes de la proteína de fusión (por ejemplo, una porción extracelular de un PDGFR, una porción extracelular de un VEGFR y/o un dominio de multimerización) a recuperar. En algunas realizaciones, la proteína de fusión recuperada es sustancialmente pura. En una realización adicional, la proteína de fusión recuperada es al menos cualquiera de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de pureza. Tras cualquier etapa o etapas preliminares de purificación, la mezcla que comprende las proteínas de fusión o componentes de la proteína de fusión (por ejemplo, una porción extracelular de un PDGFR, una porción extracelular de un VEGFR y/o un dominio de multimerización) de interés y contaminantes se puede someter a cromatografía de interacción hidrófoba a bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, realizada preferentemente a bajas concentraciones de sales (por ejemplo, sal desde aproximadamente 0-0,25 M).

En general, las diversas metodologías para preparar las proteínas de fusión o los componentes de la proteína de fusión (por ejemplo, una porción extracelular de un PDGFR, una porción extracelular de un VEGFR y/o un dominio de multimerización) para su uso en investigación, ensayo y aplicaciones clínicas están bien establecidas en la técnica, de acuerdo con las metodologías anteriormente descritas y/o según se consideren apropiadas por un experto en la técnica para proteínas de fusión particulares o componentes de la proteína de fusión de interés.

(3) Actividades biológicas de proteínas de fusión o componentes de la proteína de fusión

Las proteínas se pueden purificar e identificar usando métodos comúnmente conocidos, tales como fraccionamiento sobre columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una columna de resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; cromatoenfoque; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; resinas hidrófobas de afinidad, afinidad por ligando usando un componente de unión adecuado inmovilizado sobre una matriz, centrifugación, ELISA, BIAcore, ensayo de transferencia Western, secuenciación de aminoácidos y del ácido nucleico, y actividad biológica.

Las proteínas de fusión o los componentes de la proteína de fusión desvelados en el presente documento se pueden caracterizar o evaluar para actividades biológicas que incluyen, pero no se limitan a, afinidad por un componente de unión diana (por ejemplo, una proteína de la familia PDGF y/o VEGF), unión competitiva (por ejemplo, bloqueo de componente de unión diana a PDGFR o VEGFR), actividad inhibitoria (por ejemplo, inhibición de la activación de la vía de PDGF o VEGF), inhibición de la proliferación celular, inhibición del crecimiento tumoral e inhibición de la angiogénesis (por ejemplo, neovascularización coroidea). En algunos casos, las proteínas de fusión o los componentes de la proteína de fusión desvelados en el presente documento se pueden evaluar para actividad biológica *in vivo* o *in vitro*. En cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento, el ensayo se realiza a una temperatura de 4 °C, 20-28 °C (por ejemplo, 25 °C) o 37 °C.

Las proteínas de fusión o los componentes de la proteína de fusión desvelados en el presente documento se pueden evaluar para su afinidad por un componente de unión, tal como una proteína de la familia de PDGF (por ejemplo, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C o PDGF-D), un dímero de una proteína de la familia de PDGF (por ejemplo, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC o PDGF-DD) o una proteína de la familia de VEGF (por ejemplo, VEGF-A VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D o P1GF). Se conocen en la técnica muchos métodos de evaluación de la afinidad de unión y se pueden usar para identificar las afinidades de unión de proteínas de fusión o componentes de la proteína de fusión por un componente de unión. Las afinidades de unión se pueden expresar como valores de la constante de disociación (Kd) o valores de la concentración eficaz al 50 % (CE50). Se conocen bien en la técnica las técnicas para determinar las afinidades de unión (por ejemplo, valores de Kd), tales como enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) y BIAcore. Véanse Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Publications, NY (1988); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, (2009); Altschuh et al., *Biochem.*, 31:6298 (1992); y el método de BIAcore desvelado por Pharmacia Biosensor. Por ejemplo, las afinidades de unión de las proteínas de fusión por un componente de unión se pueden determinar usando ELISA. En algunos casos, la unión de las proteínas de fusión a PDGF-BB se ensaya usando ELISA. En este ensayo a modo de ejemplo, las proteínas de fusión secretadas se diluyeron sucesivamente, se mezclaron con ligando PDGF-BB humano a una concentración final de 20 pM y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente en una plataforma de agitador orbital. Después de

la incubación, la cantidad de PDGF-BB no unido se mide por una ELISA específico de PDGF humano (DuoSet para PDGF-BB humano, producto N.º DY220, R&D Systems). La significación estadística en afinidades de unión se analiza usando Prism 5.0d (GraphPad Software, Inc) y se calculó usando la prueba de ANOVA bifactorial, seguida de la corrección de Bonferroni. En un ejemplo adicional, la unión de una proteína de fusión a una proteína de la familia de VEGF se ensaya usando ELISA. En un ensayo a modo de ejemplo, las proteínas de fusión secretadas se diluyen sucesivamente, se mezclan con VEGF humano a una concentración final de 20 pM y se incuban durante la noche a temperatura ambiente en una plataforma de agitador orbital. La cantidad de VEGF no unido se mide entonces por un ELISA específico de VEGF humano (kit de ELISA Quantikine para VEGF humano, Cat. N.º DVE00, R&D Systems).

En cualquiera de las realizaciones en el presente documento, una proteína de fusión tiene una CE50 de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, desde 10^{-8} M hasta 10^{-13} M , por ejemplo, desde 10^{-9} M hasta 10^{-13} M) para la inhibición de una actividad (por ejemplo, inhibición de la actividad de PDGF y/o actividad de VEGF). En cualquiera de las realizaciones en el presente documento, una proteína de fusión tiene una Kd para un componente de unión (por ejemplo, PDGF y/o VEGF) inferior a aproximadamente cualquiera de aproximadamente 1,0 mM, 500 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM , 900 nM, 800 nM, 700 nM, 600 nM, 500 nM, 400 nM, 350 nM, 300 nM, 250 nM, 200 nM, 150 nM, 100 nM, 95 nM, 90 nM, 85 nM, 80 nM, 75 nM, 70 nM, 65 nM, 60 nM, 55 nM, 50 nM, 45 nM, 40 nM, 35 nM, 30 nM, 25 nM, 20 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 600 pM, 500 pM, 400 pM, 300 pM, 200 pM, 100 pM, 50 pM, 25 pM, 12,5 pM, 6,25 pM, 5 pM, 4 pM o 3 pM, incluidos, que incluye cualquier valor entre estos números. En algunos casos, las variantes de proteína de fusión descritas en el presente documento se unen a un componente de unión con una afinidad mayor en comparación con la unión de una proteína de fusión no mutante descrita en el presente documento. En algunos casos, la variante de proteína de fusión se une a un componente de unión con al menos cualquiera de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o 10.000, incluidos, que incluye cualquier valor entre estos números, mayor afinidad en comparación con la unión del componente de unión por una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9-15.

En algunos casos, las proteínas de fusión desveladas en el presente documento se pueden evaluar para actividades antiproliferativas, tales como reducción de la proliferación celular. Muchos métodos para evaluar las propiedades antiproliferativas para una proteína de fusión se conocen en la técnica. En un ensayo a modo de ejemplo, se pueden usar células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) para demostrar la inhibición de la proliferación celular dependiente de VEGF y/o dependiente de PDGF por una proteína de fusión descrita en el presente documento. En este ensayo, la proteína de fusión se aplica a HUVEC en presencia de VEGF y/o PDGF y se mide la proliferación celular. Por ejemplo, se siembran HUVEC (HUVEC- Cambrex Bio Science Walkersville, Inc) en una placa de 96 pocillos a una densidad de 2.000 células/pocillo en medio 199 (Invitrogen) complementado con 5 % de suero bovino fetal (Invitrogen) y se deposita durante la noche. Después de la incubación, los medios se sustituyen por medio 199 (Invitrogen) complementado con 5 % de suero bovino fetal (Invitrogen) que contiene un volumen igual (5 μl) de cultivo celular recogido y ligando hVEGF-165 recombinante solo a una concentración final de 10 ng/ml (R&D Systems, Cat. N.º 293-VE), o en combinación con ligando PDGF-BB a una concentración final de 20 ng/ml (R&D Systems, Cat. N.º 220-BB) en un volumen final de 100 μl por pocillo. Las células se incuban a 37 °C en 5 % de CO_2 durante tres a cuatro días. Se añade Cell Titer 96 AQueous One Solution Reagent (Promega, Cat. N.º G3580) a 20 μl /pocillo y se toma la absorbancia a 490 nm cuatro horas después para determinar la inhibición de la proliferación celular por la proteína de fusión. En algunos casos, se miden las propiedades antiangiogénicas para una proteína de fusión usando técnicas bien conocidas en la técnica. En un ensayo a modo de ejemplo, se usa un modelo animal de degeneración macular senil húmeda para ensayar la inhibición de la neovascularización en el ojo por la proteína de fusión. En este ensayo, los ojos de ratones adultos normales se tratan con una inyección intravítrea única de una proteína de fusión o una partícula de rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión en el ojo izquierdo (OS) en el día de estudio 0 mientras que el ojo derecho (OD) se deja intacto al tratamiento. Se induce la CNV en ambos ojos usando un láser (por ejemplo, 3 quemaduras dispuestas por ojo. Potencia 200 mW, lugar de 50 μm , 100 ms) en el día de estudio 28. Los ratones se perfunden con FITC-dextrano y se sacrifican en el día de estudio 42. Los ojos se recogen, se fijan en 10 % de formol neutro tamponado y posteriormente se preparan montajes planos coroides para examinar el grado de neovascularización. El número de quemaduras sin CNV en el ojo tratado (OS) se compara con el ojo contralateral (OD) para determinar la eficacia de la proteína de fusión. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 5.

VI. Partículas víricas y métodos de producción de partículas víricas

En el presente documento también se desvelan partículas víricas que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión descrita en el presente documento. Los vectores víricos se pueden usar para la administración de un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión o componente de la proteína de fusión para la expresión de la proteína en una célula diana dentro de un tejido diana particular (por ejemplo, un tejido enfermo). Se conocen muchas especies de virus, y se han estudiado muchas para los fines de administración de ácidos nucleicos a células diana. El ácido nucleico exógeno se puede insertar en un vector, tal como adenovirus, adenovirus parcialmente delecionado, adenovirus completamente delecionado, virus adenoasociado (AAV), retrovirus, lentivirus, etc., para la administración a una célula. En algunos casos, la célula está en un individuo y el virus se administra por una vía intravenosa, intramuscular, intraportal u otra vía de administración. Los vectores víricos más comúnmente usados incluyen los derivados de adenovirus, virus adenoasociados (AAV) y retrovirus, que incluyen lentivirus, tales como el virus de la

inmunodeficiencia humana (VIH). Para vectores víricos a modo de ejemplo, véase la patente de EE. UU. N.º 7.928.072 y el documento de patente WO2006/113277.

En algunas realizaciones, la partícula vírica es una partícula de AAV recombinante que comprende un ácido nucleico que comprende una o dos ITR de AAV y una secuencia que codifica una proteína de fusión de la invención flanqueada por una o dos ITR. El ácido nucleico está encapsidado en la partícula de AAV. La partícula de AAV también comprende proteínas de la cápside. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende componentes operativamente unidos en la dirección de transcripción, secuencias de control que incluyen secuencias de iniciación y terminación de la transcripción, y la(s) secuencia(s) codificante(s) de la proteína de interés (por ejemplo, ácido nucleico que codifica una proteína de fusión). Estos componentes están flanqueados en el extremo 5' y 3' por secuencias funcionales de ITR de AAV. Por "secuencias funcionales de ITR de AAV" se indica que las secuencias de ITR funcionan como se prevé para el rescate, la replicación y la encapsidación del virión de AAV. Véanse Davidson et al., PNAS, 2000, 97(7):3428-32; Passini et al., J. Virol., 2003, 77(12):7034-40; y Pechan et al., Gene Ther., 2009, 16:10-16. Para poner en práctica algunos aspectos de la invención, los vectores recombinantes comprenden al menos todas las secuencias de AAV esenciales para la encapsidación y las estructuras físicas para la infección por el rAAV. Las ITR de AAV para su uso en los vectores de la invención no necesitan tener una secuencia de nucleótidos no mutante (por ejemplo, como se describe en Kotin, Hum. Gene Ther., 1994, 5:793-801), y se pueden alterar por la inserción, delección o sustitución de nucleótidos o las ITR de AAV pueden derivar de cualquiera de varios serotipos de AAV. Actualmente se conocen más de 40 serotipos de AAV, y siguen identificándose nuevos serotipos y variantes de serotipos existentes. Véanse Gao et al., PNAS, 2002, 99(18): 11854-6; Gao et al., PNAS, 2003, 100(10):6081-6; y Bossis et al., J. Virol., 2003, 77(12):6799-810. El uso de cualquier serotipo de AAV se considera dentro del alcance de la presente invención. En algunas realizaciones, un vector de rAAV es un vector derivado de un serotipo de AAV, que incluye sin limitación, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.8, AAVrh8R, AAVrh.10, AAV11 o AAV12. En algunas realizaciones, el ácido nucleico en el AAV comprende una ITR de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.8, AAVrh8R, AAVrh.10, AAV11 o AAV12. En algunos casos, un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12-15 está flanqueado por al menos una ITR de AAV. En algunos casos, el ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21-24. En realizaciones adicionales, la partícula de rAAV comprende proteínas de la cápside de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.8, AAVrh8R, AAVrh.10, AAV11 o AAV12. En realizaciones adicionales, la partícula de rAAV comprende proteínas de la cápside de un serotipo de AAV de los clados A-F (Gao, et al. J. Virol. 2004, 78(12):6381).

Se usan diferentes serotipos de AAV para optimizar la transducción de células diana particulares o para dirigirse a tipos específicos de células dentro de un tejido diana particular (por ejemplo, un tejido enfermo). Una partícula de rAAV puede comprender proteínas víricas y ácidos nucleicos víricos del mismo serotipo o un serotipo mixto. Por ejemplo, una partícula de rAAV puede comprender proteínas de la cápside de AAV2 y al menos una ITR de AAV2 o puede comprender proteínas de la cápside de AAV2 y al menos una ITR de AAV1. En otro ejemplo, una partícula de rAAV puede comprender proteínas de la cápside de AAV1 y al menos una ITR de AAV2. En otro ejemplo más, una partícula de rAAV puede comprender proteínas de la cápside de tanto AAV1 como AAV2, y comprender además al menos una ITR de AAV2. Cualquier combinación de serotipos de AAV para la producción de una partícula de rAAV se desvela en el presente documento como si cada combinación se hubiera expuesto explícitamente en el presente documento.

En algunos aspectos, la invención proporciona partículas víricas que comprenden un genoma auto-complementante recombinante. Las partículas víricas de AAV con genomas auto-complementantes y métodos de uso de genomas de AAV auto-complementantes se describen en las patentes de EE. UU. N.º 6.596.535; 7.125.717; 7.765.583; 7.785.888; 7.790.154; 7.846.729; 8.093.054; y 8.361.457; y Wang Z., et al., (2003) Gene Ther 10:2105-2111. Un rAAV que comprende un genoma auto-complementante formará rápidamente una molécula de ADN bicatenario en virtud de sus secuencias parcialmente complementantes (por ejemplo, hebras codificantes y no codificantes complementantes de un transgén). En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula vírica de AAV que comprende un genoma de AAV, en donde el genoma de rAAV comprende una primera secuencia de polinucleótidos (por ejemplo, una hebra codificante de la proteína de fusión) y una segunda secuencia de polinucleótidos heteróloga (por ejemplo, una hebra no codificante o antisentido de la proteína de fusión) en donde la primera secuencia de polinucleótidos heteróloga puede formar pares de bases intracatenarios con la segunda secuencia de polinucleótidos a lo largo de la mayoría o toda su longitud. En algunos casos, la primera secuencia de polinucleótidos heteróloga y una segunda secuencia de polinucleótidos heteróloga se unen por una secuencia que facilita el apareamiento de bases intracatenario; por ejemplo, una estructura de horquilla ADN. Las estructuras de horquilla se conocen en la técnica, por ejemplo, en moléculas de ARNip. En algunos casos, la primera secuencia de polinucleótidos heteróloga y una segunda secuencia de polinucleótidos heteróloga se unen por una ITR mutada (por ejemplo, la ITR derecha). En algunos casos, la ITR comprende la secuencia de polinucleótidos 5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACT GAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCACGCCGGGCTTTGCCCGGGCG-3' (SEQ ID NO: 41). La ITR mutada comprende una delección de la región D que comprende la secuencia de resolución terminal. Como resultado, con la replicación de un genoma vírico de AAV, las proteínas rep no se escindirán del genoma vírico en la ITR mutada y, como tales, un genoma vírico recombinante que comprende lo siguiente en el orden 5' a 3' se encapsidará en una cápside vírica: una ITR de AAV, la primera secuencia de polinucleótidos heteróloga que incluye secuencias reguladoras, la ITR de AAV mutada, el segundo polinucleótido heterólogo en orientación inversa al primer polinucleótido heterólogo y una tercera ITR de AAV. En algunos casos, la divulgación proporciona partículas víricas

de AAV que comprenden un genoma vírico recombinante que comprende una ITR de AAV2 funcional, una primera secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína de fusión, una ITR de AAV2 mutada que comprende una delección de la región D y que carece de una secuencia de resolución terminal funcional, una segunda secuencia de polinucleótidos que comprende la secuencia complementaria a la secuencia que codifica la proteína de fusión de la primera secuencia de polinucleótidos y una ITR de AAV2 funcional.

Las partículas de rAAV se pueden producir usando métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 6.566.118, 6.989.264, 6.995.006. En la práctica de la invención, las células hospedadoras para producir partículas de rAAV incluyen células de mamífero, células de insecto, células vegetales, microorganismos y levadura. Las células hospedadoras también pueden ser células de encapsidación en las que los genes rep y cap de AAV se mantienen establemente en la célula hospedadora o células productoras en las que el genoma del vector de AAV se mantiene establemente. Las células de encapsidación y productoras a modo de ejemplo derivan de células 293, A549 o HeLa. Los vectores de AAV se purifican y formulan usando técnicas convencionales conocidas en la técnica.

En algunos aspectos, se proporciona un método de producción de cualquier partícula de rAAV de la invención en el presente documento que comprende (a) cultivar una célula hospedadora en una condición tal que se producen las partículas de rAAV, en donde la célula hospedadora comprende (i) uno o más genes de encapsidación de AAV, en donde cada dicho gen de encapsidación de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV; (ii) un pro-vector de rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica cualquier proteína de fusión de la invención flanqueada por al menos una ITR de AAV, y (iii) una función auxiliar de AAV; y (b) recuperar las partículas de rAAV producidas por la célula hospedadora. En algunos casos, un ácido nucleico codifica una proteína de fusión seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12-15. En algunas realizaciones, dicha al menos una ITR de AAV se selecciona del grupo que consiste en ITR de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.8, AAVrh8R y AAVrh.10. En algunas realizaciones, dicha proteína de encapsidación se selecciona del grupo que consiste en proteína de la cápside de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.8, AAVrh8R, AAVrh10, AAV10, AAV11, AAV12 y similares. En realizaciones adicionales, la partícula de rAAV comprende proteínas de la cápside de un serotipo de AAV de los clados A-F. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una cápside de AAV9 y un genoma auto-complementante recombinante que comprende ITR de AAV2, una ITR de AAV2 mutante y un transgén que codifica una proteína de fusión. En una realización adicional, las partículas de rAAV se purifican. El término "purificado", como se usa en el presente documento, incluye una preparación de partículas de rAAV que carece de al menos algunos de los otros componentes que también pueden estar presentes donde ocurren naturalmente las partículas de rAAV o se preparan inicialmente a partir de ellas. Por lo tanto, por ejemplo, se pueden preparar partículas de rAAV aisladas usando una técnica de purificación para enriquecerlas de una mezcla fuente, tal como un lisado de cultivo o sobrenadante de cultivo de producción. El enriquecimiento se puede medir en una variedad de formas, tales como, por ejemplo, por la proporción de partículas resistentes a DNasa (DRP) o copias de genoma (gc) presentes en una disolución, o por infectividad, o se puede medir en relación con una segunda sustancia, posiblemente interferente o presente en la mezcla fuente, tal como contaminantes, que incluyen contaminantes de cultivo de producción o contaminantes en el proceso, que incluyen virus auxiliares, componentes de medios y similares.

En el presente documento también se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una partícula de rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden ser adecuadas para una variedad de modos de administración descritos en el presente documento, que incluyen, por ejemplo, administración sistémica o localizada. Una composición farmacéutica de un rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión descrita en el presente documento se puede introducir por vía sistémica, por ejemplo, por inyección intravenosa, por catéter, véase la patente de EE. UU. N.º 5.328.470, o por inyección estereotáctica, Chen et al., 1994, PNAS, 91: 3054-3057. Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de colirios, disoluciones inyectables, o en una forma adecuada para inhalación o administración por vía oral. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden un rAAV descrito en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable son adecuadas para administración a seres humanos. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden un rAAV descrito en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable son adecuadas para inyección intravítrea o administración tópica al ojo. Dichos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceite, que incluyen los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y similares. También se pueden emplear soluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa, polietilenglicol (PEG) y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. La composición farmacéutica puede comprender además componentes adicionales, por ejemplo conservantes, tampones, agentes de tonicidad, antioxidantes y estabilizadores, agentes humectantes o clarificantes no iónicos, agentes que aumentan la viscosidad y similares. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden envasar en dosis unitarias únicas o en formas multidosis. Las composiciones también se pueden formular para tener valores osmóticos que son compatibles con el humor acuoso del ojo y los tejidos oftálmicos. Dichos valores osmóticos estarán, en general, en el intervalo de desde aproximadamente 200 hasta aproximadamente 400 mOsm/kg, pero preferentemente serán de aproximadamente 300 mOsm/kg. Las disoluciones oftálmicas útiles para almacenar y/o suministrar vectores de expresión o vectores víricos se han desvelado, por ejemplo, en el documento de patente WO03077796A2.

VII. Proteínas de fusión y partícula vírica para su uso en métodos de tratamiento

Los métodos de la presente divulgación usan cualquier proteína de fusión desvelada en el presente documento. En algunos casos, la proteína de fusión se une a una proteína PDGF o una proteína VEGF. En algunos casos, la proteína de fusión se une a una proteína PDGFR y a una proteína VEGFR. Las proteínas de fusión descritas en el presente documento pueden tener una o más de las siguientes características: (a) se unen a una o más proteínas de la familia de PDGF, tales como PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C o PDGF-D; (b) se unen a una o más proteínas de la familia de VEGF, tales como VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D o PIGF; (c) bloquean la unión de una proteína de la familia PDGF a un receptor de PDGF; (d) bloquean la unión de una proteína de la familia de VEGF a un receptor de VEGF; (e) inhiben la activación de la vía de señalización de PDGF y/o la vía de señalización de VEGF; (f) son adecuadas para tratar y/o prevenir una enfermedad, tal como una enfermedad ocular, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria, o cáncer. Las actividades de las proteínas de fusión se pueden medir *in vitro* y/o *in vivo*.

La presente divulgación proporciona proteínas de fusión para su uso en métodos de tratamiento de una enfermedad (tal como una enfermedad ocular, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmunitaria, o cáncer) administrando una cantidad eficaz de cualquier proteína de fusión descrita en el presente documento a un individuo. En la presente invención, se proporciona una proteína de fusión de la invención para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de la proteína de fusión al sujeto. En algunas realizaciones, el método de tratamiento de una enfermedad comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende la proteína de fusión a un individuo. En algunas realizaciones, el método de tratamiento de una enfermedad comprende administrar una cantidad eficaz de un rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión a un individuo. En algunas realizaciones, el método de tratamiento o prevención de uno o más aspectos o síntomas de una enfermedad comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende la proteína de fusión a un individuo. En algunas realizaciones, el método de tratamiento o prevención de uno o más aspectos o síntomas de una enfermedad comprende administrar una cantidad eficaz de un rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión a un individuo.

Los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para el tratamiento de una variedad de enfermedades, que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad inflamatoria, enfermedad ocular, enfermedad autoinmunitaria, o cáncer. En algunas realizaciones, la enfermedad que se va a tratar incluye, pero no se limita a, artritis reumatoide, artritis inflamatoria, osteoartritis, cáncer, degeneración macular senil (DMS) (tal como DMS húmeda o DMS seca), enfermedad ocular caracterizada por neovascularización (tal como neovascularización coroidea), uveítis (tal como uveítis anterior o uveítis posterior), retinitis pigmentosa y retinopatía diabética.

En ciertas realizaciones, los métodos y las composiciones se pueden usar para tratar una enfermedad autoinmunitaria. En algunas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide, esclerosis múltiple o lupus eritematoso sistémico. La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmunitaria crónica que conduce a inflamación de las articulaciones. Aunque la AR afecta principalmente a las articulaciones sinoviales, puede afectar a los tejidos y órganos circundantes. La patología de la AR implica un proceso inflamatorio que puede conducir a la destrucción de cartílago y a la anquilosis (fusión) de articulaciones. Otras manifestaciones patológicas de la AR incluyen vasculitis (inflamación de los vasos sanguíneos), que puede afectar a casi cualquier sistema de órganos y puede causar complicaciones adicionales, que incluyen polineuropatía, ulceración cutánea e infarto visceral. Las manifestaciones pleuropulmonares incluyen pleuritis, fibrosis intersticial, síndrome de Caplan, nódulos pleuropulmonares, neumonitis, enfermedad pulmonar reumatoide y arteritis. Otras manifestaciones incluyen el desarrollo de nódulos reumatoides inflamatorios en una variedad de estructuras periarticulares, tales como amplias superficies, así como en la pleura y la meninges. La debilidad y la atrofia del músculo esquelético son comunes.

En ciertas realizaciones, los métodos y las composiciones se pueden usar para tratar una enfermedad inflamatoria. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria es artritis inflamatoria, osteoartritis, psoriasis, inflamación crónica, enfermedad del intestino irritable, inflamación del pulmón o asma. La artritis inflamatoria se refiere a inflamación de las articulaciones que puede resultar de una enfermedad autoinmunitaria, tal como, por ejemplo, espondilitis anquilosante, artritis idiopática juvenil, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, artritis psoriásica, artritis reactiva, esclerodermia, síndrome de Sjogren, enfermedad de Still y lupus eritematoso sistémico. La artritis inflamatoria también puede ser causada por ciertos tipos de bacterias (tales como con la artritis reactiva) o por depósitos de estructuras cristalinas en las articulaciones (tales como con la gota y la pseudogota). Los síntomas característicos de la artritis inflamatoria son dolor e hinchazón de una o más articulaciones, que pueden estar más calientes que las otras articulaciones. La rigidez de las articulaciones tras una inactividad prolongada (tal como por la mañana o después de estar sentado durante un tiempo) es un síntoma muy común. Los pacientes con artritis inflamatoria normalmente tienen múltiples enfermedades de las articulaciones. La osteoartritis, también conocida como artritis degenerativa o enfermedad degenerativa de las articulaciones, es un grupo de anomalías mecánicas que implican la degradación de las articulaciones, que incluyen cartílago articular y hueso subcondral. Los síntomas pueden incluir dolor articular, dolor con la palpación, rigidez, inmovilización, y algunas veces un derrame (es decir, la presencia de elevado líquido intrarticular). Una variedad de causas, por ejemplo, hereditarias, del desarrollo, metabólicas, relacionadas con la obesidad y mecánicas, pueden iniciar procesos que conducen a la pérdida de cartílago. Como los productos de degradación del cartílago se liberan en el espacio sinovial, las células que revisten la articulación intentan retirarlos. Se pueden formar nuevas excrecencias óseas, o "espolones". Frecuentemente, cuando el hueso está menos protegido por el cartílago, el hueso se puede exponer y dañar. Estos cambios óseos, en combinación con la inflamación de la articulación, causan dolor. Como resultado de la disminución del movimiento secundario al dolor, los músculos regionales se pueden atrofiar, y los ligamentos se pueden volver más laxos.

La angiogénesis persistente y no regulada ocurre en una multiplicidad de estados de enfermedad, tales como el cáncer. En el cáncer, las células se dividen y crecen incontrolablemente, formando tumores malignos, que vascularizan e invaden partes del cuerpo cercanas. El cáncer también se puede diseminar (metastatizar) a partes más distantes del cuerpo a través del sistema linfático o la circulación sanguínea. Las causas del cáncer pueden ser medioambientales (debido a la exposición a sustancias químicas, radiación o debido al estilo de vida), hereditarias o infecciosas. En algunas realizaciones, los métodos y las composiciones se pueden usar para tratar cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de hígado, cáncer de las vías urinarias (por ejemplo, cáncer de vejiga), cáncer de riñón, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer endometrial, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer de tiroides, cáncer de piel (por ejemplo, melanoma), cánceres hematopoyéticos de linaje linfóide o mieloide, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma nasofaríngeo (CNF), glioblastoma, teratocarcinoma, neuroblastoma, adenocarcinoma, cánceres de origen mesenquimatoso, tales como un fibrosarcoma o rhabdomyosarcoma, sarcoma de tejido blando y carcinoma, coriocarcinoma, hepatoblastoma, sarcoma de Kaposi o tumor de Wilms.

Otras enfermedades que están asociadas con la angiogénesis se pueden tratar con los métodos y las composiciones desvelados en el presente documento. Estas enfermedades incluyen aterosclerosis, fibroplasia retrolental, hiperplasias tiroideas (incluyendo enfermedad de Graves), síndrome nefrótico, preeclampsia, ascitis, derrame pericárdico (tal como asociado a pericarditis) y derrame pleural.

En algunas realizaciones, los métodos y las composiciones se pueden usar para tratar una enfermedad ocular. En algunas realizaciones, la enfermedad ocular es DMS, tal como DMS húmeda o DMS seca, uveítis, retinitis pigmentosa, glaucoma neovascular, retinopatía diabética, y otras enfermedades oculares que implican un proceso inflamatorio local. En algunas realizaciones, la enfermedad ocular se caracteriza por neovascularización, tal como neovascularización coroidea. En algunas realizaciones, la enfermedad ocular es un resultado de trasplante de córnea. La invención se refiere a tratar o prevenir uno o más aspectos o síntomas de una enfermedad ocular que incluye, pero no se limita a, formación de drusas oculares, inflamación en el ojo o tejido del ojo, y pérdida de visión. En ciertas realizaciones, las composiciones y los métodos se pueden usar para detectar y/o tratar uveítis, es decir, inflamación de la úvea, la capa media del ojo debajo de la esclerótica. Se estima que la uveítis es responsable de aproximadamente el 10 %-20 % de la ceguera en los Estados Unidos. La úvea se divide tradicionalmente en 3 áreas, desde la parte delantera a la trasera, el iris, el cuerpo ciliar y la coroides. Las funciones principales de la úvea son la nutrición y el intercambio de gases, la absorción de luz y la secreción del humor acuoso por los procesos ciliares. La uveítis está asociada normalmente a la exposición a toxinas, infección y/o trastornos autoinmunitarios. Sin embargo, en muchos casos, la causa es desconocida. La uveítis puede afectar a uno o a ambos ojos. Los síntomas se pueden desarrollar rápidamente y pueden incluir visión borrosa, manchas oscuras volantes en el campo de visión, dolor de ojos, rojez de los ojos y sensibilidad a la luz. La forma más común de la uveítis es la uveítis anterior, o iritis, que implica la inflamación del iris. Pars plana se refiere a la inflamación de la úvea en el centro del ojo, es decir, entre el iris y la coroides. La uveítis posterior afecta a la parte posterior del ojo, es decir, a la coroides. La inflamación asociada a la uveítis posterior también puede afectar a la retina (retinitis) o a los vasos sanguíneos en la parte posterior del ojo (vasculitis).

En ciertas realizaciones, los métodos y las composiciones se pueden usar para tratar retinitis pigmentosa (RP). La RP es una enfermedad ocular hereditaria que es causada por anomalías de los fotorreceptores (bastones y conos) o el epitelio pigmentario retiniano de la retina. La enfermedad puede conducir a pérdida progresiva de la visión y frecuentemente a ceguera. Los síntomas de la RP incluyen disminución de la visión por la noche o con poca luz, pérdida de la visión lateral (periférica) y, en casos avanzados, pérdida de visión central. El diagnóstico de la RP se basa en la documentación de la pérdida progresiva en función de las células fotorreceptoras por pruebas del campo visual y electrorretinografía. Se conoce que al menos 35 lugares genéticos provocan la "retinitis pigmentosa no sindrómica" (es decir, la RP que no es el resultado de otra enfermedad o parte de un síndrome más amplio).

En ciertas realizaciones, los métodos y las composiciones se pueden usar para tratar retinopatía diabética. La retinopatía diabética se refiere al daño a la retina causado por las complicaciones de la diabetes. Específicamente, las paredes vasculares se comprometen por hiperglucemia, cambiando la formación de la barrera hematorretiniana y haciendo que los vasos sanguíneos retinianos sean más permeables. Los vasos sanguíneos dañados derraman líquido y lípidos en la mácula, lo que hace que se hinche la mácula (es decir, edema macular), que nubla la vista. A medida que progresa la enfermedad, entra en una etapa proliferativa, en la que los vasos sanguíneos crecen a lo largo de la retina y en el humor vítreo que llena el ojo. Estos vasos sanguíneos pueden sangrar, nublar la vista y, por ejemplo, destruir la retina, provocar desprendimiento de retina, o provocar glaucoma neovascular.

En ciertas realizaciones, los métodos y las composiciones se pueden usar para tratar degeneración macular senil (DMS). La DMS se caracteriza por una pérdida progresiva de la visión central que ocurre como resultado del daño a las células fotorreceptoras en un área de la retina denominada la mácula. La DMS se ha clasificado ampliamente en dos estados clínicos: una forma húmeda y una forma seca, representando la forma seca hasta el 80-90 % de los casos totales. La DMS seca se caracteriza por la formación de drusas maculares, acumulaciones amarillas o blancas minúsculas de material extracelular que se forma entre la membrana de Bruch y el epitelio pigmentario de la retina del ojo. La DMS húmeda, que representa aproximadamente el 90 % de la pérdidas de visión graves, está asociada con neovascularización, en donde los vasos sanguíneos crecen desde la coroides debajo de la retina, y con la fuga de estos nuevos vasos. La acumulación de sangre y líquido puede causar el desprendimiento de retina, seguido de la

rápida degeneración de los fotorreceptores y la pérdida de visión en cualquier forma de DMS. En general, se acepta que la forma húmeda de la DMS va precedida de y surge a partir de la forma seca.

En el presente documento se desvelan métodos de administración de una cantidad eficaz de una proteína de fusión a un sujeto. La proteína de fusión se puede administrar a un sujeto en una composición. La proteína de fusión también se puede administrar a un sujeto por un rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión. En el presente documento se contemplan composiciones que comprenden la proteína de fusión o el rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión.

Las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar a un individuo por cualquier vía, que incluye, pero no se limita a, intravenosa (por ejemplo, por bombas de infusión), intraperitoneal, intraocular, intrarterial, intrapulmonar, oral, inhalación, intravascular, intramuscular, intratraqueal, subcutánea, intraocular, intratecal, transdérmica, transpleural, intrarterial, tópica, inhalacional (por ejemplo, como nieblas de sprays), mucosa (tal como por la mucosa nasal), subcutánea, transdérmica, gastrointestinal, intrarticular, intracisternal, intraventricular, intracraneal, intrauretral, intrahepática e intratumoral. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía intravascular, tal como por vía intravenosa (IV) o por vía intrarterial. En algunas realizaciones, las composiciones se administran directamente en las arterias. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía sistémica (por ejemplo, por inyección intravenosa). En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía local (por ejemplo, por inyección intrarterial o intraocular).

En algunas realizaciones, las composiciones se administran directamente al ojo o al tejido del ojo. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía tópica al ojo, por ejemplo, en colirios. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por inyección al ojo (inyección intraocular) o a los tejidos asociados al ojo. Las composiciones se pueden administrar, por ejemplo, por inyección intraocular, inyección periocular, inyección subretiniana, inyección intravítrea, inyección transeptal, inyección subescleral, inyección intracoroidea, inyección intracameral, inyección subconjuntiva, inyección subtenoniana, inyección retrobulbar, inyección peribulbar, o administración yuxtaescleral posterior. Estos métodos se conocen en la técnica. Por ejemplo, para una descripción de vías periorbitales a modo de ejemplo para la administración de fármaco retiniano, véase Raghava et al., Expert Opin. Drug Deliv., 2004, 1(1):99-114. Las composiciones se pueden administrar, por ejemplo, al humor vítreo, acuoso, esclerótica, conjuntiva, el área entre la esclerótica y la conjuntiva, los tejidos coroides de la retina, la mácula, u otra área en o próxima al ojo de un individuo. Las composiciones también se pueden administrar al individuo como un implante. Los implantes preferidos son formulaciones biocompatibles y/o biodegradables de liberación sostenida que liberan gradualmente los compuestos durante un período de tiempo. Los implantes oculares para la administración de fármaco se conocen bien en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º 5.501.856, 5.476.511 y 6.331.313. Las composiciones también se pueden administrar al individuo usando iontoforesis, que incluye, pero no se limita a, los métodos iontoforéticos descritos en la patentes de EE. UU. N.º 4.454.151 y las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2003/0181531 y 2004/ 0058313.

La cantidad eficaz óptima de las composiciones se puede determinar empíricamente y dependerá del tipo y la gravedad de la enfermedad, la vía de administración, la progresión de la enfermedad y la salud, la masa y el área corporal del individuo. Dichas determinaciones están dentro de la experiencia de un experto en la técnica. Por ejemplo, cuando se administra por vía intraocular, la cantidad de un rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión descrita en el presente documento se puede administrar a un individuo como un título resistente a partículas de DNasa (drps) de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{14} drps por dosis. En algunas realizaciones, la cantidad de un rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión se puede administrar a un individuo a aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{13} , aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} , aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^{11} , aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{10} , aproximadamente 10^9 a aproximadamente 10^{10} , aproximadamente 10^{10} a aproximadamente 10^{11} , o aproximadamente 10^{11} a aproximadamente 10^{12} drps por dosis.

Las composiciones que comprenden una proteína de fusión se pueden administrar en una dosis única diaria, o la dosis diaria total se puede administrar en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día. Las composiciones que comprenden una proteína de fusión también se pueden administrar seis veces a la semana, cinco veces a la semana, cuatro veces a la semana, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada seis meses, una vez cada nueve meses, o una vez al año. Las composiciones que comprenden un rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión se pueden administrar menos frecuentemente, por ejemplo, una vez cada tres meses, cada cuatro meses, una vez cada cinco meses, una vez cada seis meses, una vez cada siete meses, una vez cada ocho meses, una vez cada nueve meses, una vez cada diez meses, una vez cada once meses, o una vez al año. En algunas realizaciones, una dosis única de una composición que comprende un rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión descrita en el presente documento se administra una vez al año. Las composiciones también se pueden administrar en una formulación de liberación sostenida, tal como en un implante que libera gradualmente la composición para su uso durante un período de tiempo, y que permite que la composición se administre menos frecuentemente, tal como una vez al mes, una vez cada 2-6 meses, una vez al año, o incluso una administración única. Los dispositivos de liberación sostenida (tales como pellas, nanopartículas, micropartículas, nanoesferas, microesferas y similares) se pueden administrar por inyección o implantados

quirúrgicamente en diversas localizaciones en el ojo o tejido asociado al ojo, tal como intraocular, intravítrea, subretiniana, periocular, subconjuntiva o subtenoniana.

Las composiciones de la invención (por ejemplo, una proteína de fusión o un rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión) se pueden usar tanto solas como en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, las composiciones de la invención se pueden administrar solas o en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos por tener un efecto beneficioso sobre la degeneración macular senil (DMS), fijación de retina o tejido retiniano dañado. Los agentes terapéuticos a modo de ejemplo incluyen inhibidores del complemento, antiangiogénicos, agentes anti-VEGF (que incluyen, pero no se limitan a, Macugen (pegaptanib sodio), Eylea (VEGF Trap-Eye) y anticuerpo anti-VEGF, tal como Lucentis® o Avastin®, y agentes anti-PDGF (tal como Fostiva™). Las composiciones de la invención se pueden administrar en combinación con suplementos nutricionales que se ha mostrado que son beneficiosos en la reducción del riesgo de degeneración macular que progresa hacia estados avanzados, por ejemplo, vitamina C, vitamina E, beta-caroteno, óxido de cinc y cobre. Otros cofactores útiles incluyen cofactores que alivian síntomas, que incluye antisépticos, antibióticos, antivíricos y antifúngicos, y analgésicos y anestésicos. En algunas realizaciones, se proporciona una combinación como una administración simultánea, en donde una proteína de fusión o un rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión y al menos un agente terapéutico se administran juntos en la misma composición o se administran simultáneamente en diferentes composiciones. En algunas realizaciones, se proporciona una combinación como una administración separada, en donde la administración de una proteína de fusión o un rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión puede ocurrir antes de, simultáneamente y/o tras la administración de al menos un agente terapéutico. El intervalo entre la administración secuencial puede ser en términos de al menos (o, alternativamente, menos de) minutos, horas o días.

Las composiciones descritas en el presente documento también se pueden usar junto con otras terapias para la DMS, tales como terapia fotodinámica. La terapia fotodinámica implica la administración intravenosa de Visudyne (verteporfin), después de que luz de una longitud de onda específica se aplique a los vasos sanguíneos anormales. La luz activa el Visudyne y destruye los vasos. Alternativamente, las composiciones descritas en el presente documento se pueden usar junto con terapia con láser, que implica el uso de un haz de láser de alta energía para destruir vasos sanguíneos anormales debajo de la mácula.

VIII. Artículos de fabricación y kits

También se desvelan kits o artículos de fabricación que comprenden las composiciones descritas en el presente documento (por ejemplo, proteínas de fusión o partículas de rAAV) en envase adecuado. El envase adecuado para las composiciones (tales como composiciones oftálmicas) descritas en el presente documento se conoce en la técnica, e incluye, por ejemplo, viales (tales como viales precintados), recipientes, ampollas, botellas, frascos, envase flexible (por ejemplo, bolsas precintadas de Mylar o de plástico), y similares. Estos artículos de fabricación se pueden esterilizar además y/o cerrar herméticamente.

La presente divulgación también proporciona kits que comprenden las composiciones descritas en el presente documento y pueden comprender además instrucciones sobre los métodos de uso de la composición, tal como usos descritos en el presente documento. Los kits descritos en el presente documento pueden incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para realizar cualquier método descrito en el presente documento. Por ejemplo, en algunos casos, el kit comprende una proteína de fusión descrita en el presente documento y/o un rAAV que codifica una proteína de fusión descrita en el presente documento, un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para inyección intraocular, y uno o más de: un tampón, un diluyente, un filtro, una aguja, una jeringa y un prospecto con instrucciones para realizar la inyección intraocular.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Producción de proteínas de fusión sPDGFR-P/Fc.

El ectodominio del receptor de PDGF-beta (PDGFR-β) contiene 5 dominios extracelulares (ECD) numerados 1 a 5 del extremo N al extremo C de la proteína. Se usó el ectodominio de PDGFR-β de longitud completa para generar varias proteínas monoméricas y dimericas truncadas PDGFR-β solubles (PDGFR-β) (Fig. 1A).

Se prepararon dos construcciones monoméricas PDGFR-β que contenían un péptido señalizador (SP) PDGFR-β en el extremo N del ectodominio de PDGFR-β de longitud completa, PDGFR(D1-D5) (SEQ ID NO: 7), o en el extremo N de un ectodominio de PDGFR-β que contenía los cuatro primeros ECD, PDGFR(D1-D4) (SEQ ID NO: 8). Se produjeron tres construcciones dimericas de PDGFR-β fusionando los cinco, tres primeros, o tres primeros dominios del ectodominio (ECD) de PDGFR-β con el extremo N del fragmento de la cadena pesada de la inmunoglobulina G1 humana (Fc de IgG1) por un conector peptídico que consistía en nueve restos de glicina (9Gly) y se denominaron PDGFR(D1-D5)9G-Fc (SEQ ID NO: 9), PDGFR(D1-D3)9G-Fc (SEQ ID NO: 10) y PDGFR(D1-D2)9G-Fc (SEQ ID NO: 11), respectivamente. Similar a las construcciones monoméricas, todas las construcciones dimericas contuvieron un SP en el extremo N de los ectodominios de PDGFR-β de longitud completa o truncados fusionados. Para la construcción de PDGFR(D1-D2)9G-Fc, el plásmido pCMV6-XL5-PDGFRB (Cat. N.º SC309979; Origene,

Rockville, MD) se usó como molde junto con cebadores que introdujeron los sitios de restricción SpeI (PDGFRBPR6SpeI F: 5'- GACTAGTATGCGGCTTCCGGGTG (SEQ ID NO: 25) y AgeI (PDGFRBPR7AgeI R: 5'- ACCGGTGGATGACACCTGGAGTCTG (SEQ ID NO: 26) en el molde. La amplificación de los productos de PCR se logró con los siguientes parámetros de ciclado: 1 ciclo a 50 °C durante 2 min, 1 ciclo a 95 °C durante 10 min; 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 60 s. El producto de PCR se insertó en el plásmido pCR-Blunt II-TOPO usando el kit de clonación TOPO (Invitrogen) y la secuencia del inserto del producto de PCR se verificó por secuenciación antes de la subclonación en los sitios SpeI y AgeI del plásmido pCMV/K-D2-9Gly-Fc (véase Pechan P., et al. Gene Ther. (2009), 16:10-16, para una descripción de pCMV/K-D2-9Gly-Fc) para generar el plásmido pCMV-PDGFR-S-(D1-D2)-9Gly-Fc con el marco de lectura abierto de PDGFR(D1-D2)9G-Fc (SEQ ID NO: 20) bajo el control del promotor del CMV y la secuencia de poliadenilación de SV40. Para la construcción de PDGFR(D1-D5)9G-Fc, el plásmido pCMV6-XL5-PDGFRB (Cat. N.º SC309979; Origene, Rockville, MD) se usó como molde junto con cebadores que introdujeron los sitios de restricción AccI (PDGFRB-PR1-Acc F: 5'-CTATGTCTACAGACTCCAGGTGTC (SEQ ID NO: 27) y AgeI (D5-PR9-AgeI-Rev R: 5'-ACCGGTAAAGGGCAAGGAGTGTGGC (SEQ ID NO: 28) en el molde. La amplificación de los productos de PCR se logró con los siguientes parámetros de ciclado: 1 ciclo a 50 °C durante 2 min, 1 ciclo a 95 °C durante 10 min; 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 60 s. El producto de PCR se insertó entonces en el plásmido pCR-Blunt II-TOPO usando el kit de clonación TOPO (Invitrogen) y la secuencia del inserto del producto de PCR en el pTOPO-PDGFRB (D3-D5) se verificó por secuenciación. El fragmento SpeI-AccI de 622 pares de bases (pb) del plásmido pCMV-PDGFR-S-(D1-D2)-9Gly-Fc se insertó en sitios SpeI y AccI del plásmido pTOPO-PDGFRB (D3-5) para generar el plásmido pTOPO-PDGFR(D1-D5). El fragmento SpeI-AgeI de 1.596 pb del plásmido pTOPO-PDGFR(D1-D5) se insertó entonces en los sitios SpeI y AgeI del plásmido pCMV-PDGFR-S-(D1-D2)-9Gly-Fc para generar el plásmido pCMV-PDGFR-(D1-D5)-9Gly-Fc con el marco de lectura abierto de PDGFR(D1-D5)9G-Fc (SEQ ID NO: 18) bajo el control del promotor del CMV y la secuencia de poliadenilación del SV40. Para la construcción de PDGFR(D1-D3)9G-Fc, el plásmido pCMV-PDGFR (D1-5)9G-Fc se usó como molde junto con cebadores que introdujeron los sitios de restricción SpeI (PDGF02 F: 5'-CCTCCACCGGTGTAGCCGCTCTCAACCACGGT (SEQ ID NO: 29) y AgeI (PDGF03 R: 5'-CCCGGGACTAGTATGCGGCTTCCGGGTG (SEQ ID NO: 30) en la plantilla. La amplificación del producto de PCR se logró con los siguientes parámetros de ciclado: 1 ciclo a 95 °C durante 1 min; 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min. El producto de PCR se insertó en los sitios SpeI y AgeI del plásmido pCMV-PDGFR (D1-5)9G-Fc para completar el marco de lectura abierto de PDGFR (D1-3)9G-Fc (SEQ ID NO: 19). Para la construcción de PDGFR(D1-D5), el fragmento AgeI-EagI de 5307 pb del plásmido pCMV-sPDGFR(D1-D5)-9G-Fc se unió con un fragmento de oligonucleótido hibridado que consistía en los oligonucleótidos D5-SV40 F: CCGGTTAGGGA (SEQ ID NO: 31) y D5-SV40 B-2: GGCCTCCCTAA (SEQ ID NO: 32) para generar el plásmido pCMVPDGFRB (D1-D5) con el marco de lectura abierto de PDGFR(D1-D5) (SEQ ID NO: 16) bajo el control del promotor del CMV y la secuencia de poliadenilación del SV40. Para la construcción PDGFR(D1-D4), se unió un fragmento BbvCI-EagI de 4924 pb del plásmido pCMV-sPDGFR(D1-D5)-9G-Fc con un fragmento de oligonucleótido hibridado que consistía en los oligonucleótidos D4-SV40 F : TGAGGTCCAGCTCTCCTTCCAGCTACAGATCAATGTCCCTGTCCGAGTGCTGGAG TAGC (SEQ ID NO: 33) y D4-SV40 B: GGCCGCTACTCCAGCACTCGGACAGGGACATTGATCTGTAGCTGGAAGGAGAGC TGGACC (SEQ ID NO: 34) para generar el plásmido pCMV-PDGFRB (D1-D4) con el marco de lectura abierto de PDGFR(D1-D4) (SEQ ID NO: 17) bajo el control del promotor del CMV y la secuencia de poliadenilación del SV40.

Los pesos moleculares predichos para las proteínas maduras, excluyendo la región del SP, fueron 56,2 kDa para PDGFR(D1-D5) y 43,6 kDa para PDGFR(D1-D4). Los pesos moleculares predichos para las proteínas maduras como monómeros, que excluyen la región de SP, fueron 82,7 kDa para PDGFR(D1-D5)9G-Fc, 46,7 kDa para PDGFR(D1-D2)9G-Fc y 58,2 kDa para PDGFR(D1-D3)9G-Fc. Los plásmidos que codifican estas construcciones de proteína se usaron para la transfección de células 293. El medio del que se recogieron las células 72 horas después de la transfección y el medio acondicionado (CM) en bruto se usó para el análisis de las proteínas secretadas PDGFR(D1-D5), PDGFR(D1-D4), PDGFR(D1-D5)9G-Fc, PDGFR(D1-D2)9G-Fc y PDGFR(D1-D3)9G-Fc. La producción de los homodímeros de proteína PDGFR(D1-D5)9G-Fc, PDGFR(D1-D2)9G-Fc y PDGFR(D1-D3)9G-Fc por células transfectadas con sus construcciones respectivas se confirmó por análisis de transferencia Western. Brevemente, las proteínas secretadas purificadas de medio de cultivo celular se cargaron en geles reductores o no reductores de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). También se cargó la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) purificada de medio de cultivo celular de células transfectadas con una construcción de EGFP sobre los geles y se usó como control. Después de separar las proteínas sobre los geles de SDS-PAGE (NuPAGE Novex 4-12 % de Bis-Tris, Invitrogen), las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se sondaron con un anticuerpo biotinilado anti-PDGFR-β humano de cabra (R&D Systems), seguido de marcado con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (R&D Systems) y se reveló con reactivo de quimioluminiscencia (ThermoScientific Pierce) antes de la obtención de imágenes. La movilidad de las proteínas PDGFR(D1-D5)9G-Fc, PDGFR(D1-D2)9G-Fc y PDGFR(D1-D3)9G-Fc cambió en condiciones reductoras y no reductoras, mientras que la movilidad de las proteínas monoméricas PDGFR(D1-D5) y PDGFR(D1-D4) siguió invariable, que indica que las proteínas de fusión PDGFR-β/Fc formaron homodímeros (Fig. 1B).

La afinidad de unión relativa entre el ligando PDGF BB y las proteínas monoméricas y dimericas PDGFR-β se determinó usando un sistema de ensayo de unión a PDGF volumétrico sin células (Fig. 2). Para la producción de proteínas monoméricas y dimericas PDGFR-β, se transfectaron células 293 con plásmidos que codificaban proteínas PDGFR(D1-D5), PDGFR(D1-D4), PDGFR(D1-D5)9G-Fc, PDGFR(D1-D2)9G-Fc o PDGFR(D1-D3)9G-Fc y el medio

de cultivo celular se recogió 72 horas después de la transfección. La presencia de proteínas monoméricas y dimericas PDGFR- β secretadas se confirmó por ELISA y análisis de transferencia Western antes del análisis de afinidad de unión. Las proteínas secretadas se diluyeron sucesivamente, se mezclaron con ligando PDGF BB humano (concentración final 20 pM) y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente en una plataforma de agitador orbital. La cantidad de PDGF BB no unido se midió entonces por un ELISA específico de PDGF humano (Human PDGF-BB DuoSet, producto N.º DY220, R&D Systems). La significación estadística en afinidades de unión se analizó usando Prism 5.0d (GraphPad Software, Inc) y se calculó usando la prueba de ANOVA bifactorial, seguido de la corrección de Bonferroni. El análisis de afinidad de unión mostró que la proteína monomérica PDGFR(D1-D4) se unió a PDGF con afinidad significativamente mayor ($***p<0,001$) que la proteína monomérica PDGFR(D1-D5) que contuvo los 5 ECD (Fig. 2A). Sin embargo, la proteína PDGFR(D1-D5)9G-Fc dimérica de longitud completa, que sirvió de control positivo para la unión de PDGF, fue un ligante de PDGF significativamente mejor ($***p<0,001$) que tanto PDGFR(D1-D4) como PDGFR(D1-D5) monomérico (Fig. 2A). De tres construcciones dimericas de PDGFR- β acopladas a Fc de IgG1, la construcción con los tres primeros ECD, PDGFR(D1-D3)9G-Fc, fue un ligante de PDGF significativamente mejor ($***p<0,001$) que la proteína PDGFR(D1-D5)9G-Fc de tamaño completo, mientras que la construcción con los dos primeros ECD, PDGFR(D1-D2)9G-Fc, no mostró afinidad de unión a PDGF (Fig. 2B).

Ejemplo 2: Generación de proteínas híbridas VEGFR1/ PDGFR- β y PDGFR- β /VEGFR-1.

El ectodominio del receptor de Flt-1 (VEGFR-1) contiene 7 dominios extracelulares (ECD) numerados 1 a 7 del extremo N al extremo C de la proteína. Para bloquear tanto los ligandos PDGF BB como VEGF, se generaron proteínas de fusión que comprendían ECD de PDGFR- β y VEGFR1 y se denominaron proteínas híbridas (Fig. 3).

Se usó una proteína de unión a VEGF previamente generada, sFLT01, que consiste en ECD 2 de VEGFR1 humano unido a un fragmento de la cadena pesada de la inmunoglobulina G1 humana (Fc de IgG1) para generar construcciones de ADN que codificaban las proteínas híbridas VEGFR1/ PDGFR- β o PDGFR- β /VEGFR1. Véase Pechan P., et al. Gene Ther. (2009), 16:10-16, para una descripción de la proteína sFLT01. Se construyó el híbrido 1 de VEGFR1/ PDGFR- β (SEQ ID NO: 12) uniendo un fragmento de sFLT01 que contenía el péptido señalizador (SP) de VEGFR1 y el ECD 2 de VEGFR1 con el extremo N de PDGFR- β ECD 1-5 por un conector peptídico que consistía en nueve restos de serina (9Ser) que se unió además a Fc de IgG1 por un conector peptídico que consistía en nueve restos de glicina (9Gly). El híbrido 2 de PDGFR- β /VEGFR1 (SEQ ID NO: 13) se construyó uniendo PDGFR- β ECD 1-5 y el SP de PDGFR- β con el extremo N de ECD 2 de VEGFR1 por un conector peptídico de 9Ser que se unió además a Fc de IgG1 por un conector peptídico de 9Gly. El híbrido 3 de VEGFR1/ PDGFR- β (SEQ ID NO: 14) y el híbrido 4 de PDGFR- β /VEGFR1 (SEQ ID NO: 15) tuvieron composiciones similares a los híbridos 1 y 2, respectivamente, con la excepción que se usó PDGFR- β ECD 1-3 en lugar de PDGFR- β ECD 1-5. Para la construcción del híbrido 1 de VEGFR1/PDGFR- β , se insertó un fragmento SpeI-XhoI de 372 pb Kozak-SP-D2-9Ser que codificaba un péptido señalizador VEGFR1 fusionado con un dominio D2 de VEGFR1 que comprendía un conector de 9-Serina (9Ser) (SEQ ID NO: 35) en sitios SpeI y XhoI del plásmido pTOPO-PDGFR(D1-D5) para generar el plásmido pTOPO-(D2-9Ser)-PDGFR(D1-D5). El fragmento SpeI-AgeI del plásmido pTOPO-(D2-9Ser)-PDGFR(D1-D5) se insertó en sitios SpeI-AgeI del plásmido pCMV-PDGFR-(D1-D5)-9Gly-Fc para crear pCMV-F(D2-9S)-P(D1-D5)-9G-Fc o pCMV-Híbrido 1 con el marco de lectura abierto del híbrido 1 de VEGFR1/PDGFR- β (SEQ ID NO: 21) bajo el control de promotor del CMV y secuencia de poliadenilación del SV40. Para la construcción del híbrido 2 de PDGFR- β /VEGFR1, un fragmento BstBI-BmgXI de 678 pb que contenía ADN sintético (GenScript) (SEQ ID NO: 36) se unió con el fragmento BstBI-BmgXI de 5626 pb del plásmido pCMV-sPDGFR(D1-D5)-9G-Fc para crear pCMV-P(D1-D5)-9S-F(D2)-9G-Fc o pCMV-Híbrido 2 con un marco de lectura abierto del híbrido 2 de PDGFR- β /VEGFR-1 (SEQ ID NO: 22) bajo el control de promotor del CMV y secuencia de poliadenilación del SV40. Para la construcción del híbrido 3 de VEGFR1/PDGFR- β , un fragmento de BmgBI-PshAI de 452 pb que contenía el ADN sintético (GenScript) (SEQ ID NO: 37) se unió con el fragmento BmgBI-PshAI de 5334 pb del plásmido pCMV-P(D1-D5)-9S-F(D2)-9G-Fc o pCMV-Híbrido 2 para crear pCMV-F(D2-9S)-P(D1-D3)-9G-Fc o pCMV-Híbrido 3 con el marco de lectura abierto del híbrido 3 de VEGFR1/PDGFR- β (SEQ ID NO: 23) bajo el control del promotor del CMV y la secuencia de poliadenilación del SV40. Para la construcción del híbrido 4 de PDGFR- β /VEGFR1, un fragmento de BmgBI-PshAI de 758 pb que contenía ADN sintético (GenScript) (SEQ ID NO: 38) se unió con el fragmento BmgBI-PshAI de 5021 pb del plásmido pCMV-P(D1-D5)-9S-F(D2)-9G-Fc o pCMV-Híbrido 2 para crear pCMV-P(D1-D3)-9S-F(D2)-9G-Fc o pCMV-Híbrido 4 con el marco de lectura abierto del híbrido 4 de PDGFR- β /VEGFR1 (SEQ ID NO: 24) bajo el control de promotor del CMV y secuencia de poliadenilación del SV40.

La producción de los homodímeros de proteína el híbrido 1, el híbrido 2, el híbrido 3 y el híbrido 4 por células transfectadas con sus construcciones respectivas se confirmó por análisis de transferencia Western. Brevemente, las proteínas secretadas del medio de cultivo celular se cargaron en geles reductores o no reductores de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). La proteína PDGFR(D1-D5)9G-Fc también se cargó sobre los geles y se usó como control. Después de separar las proteínas sobre los geles de SDS-PAGE (NuPAGE Novex 4-12 % de Bis-Tris, Invitrogen), las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se sondaron con un anticuerpo biotinilado anti-PDGFR- β humano de cabra (R&D Systems), seguido de marcado con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (R&D Systems) y se revelaron con reactivo de quimioluminiscencia (ThermoScientific Pierce) antes de la obtención de imágenes. La movilidad de proteína de los híbridos 1, 2, 3 y 4 en condiciones no reductoras en comparación con condiciones reductoras confirmó que las proteínas híbridas dimerizaron (Fig. 4). PDGFR(D1-D5)9G-Fc y los híbridos 1 y 2, que contienen todos cinco ECD de PDGFR- β ,

mostraron dos bandas positivas para PDGFR en condiciones reductoras, lo que indica una posible escisión proteolítica de estas proteínas en el área del quinto ECD de PDGFR- β (Fig. 4, panel izquierdo). Los híbridos 3 y 4, que solo contienen los tres primeros ECD de PDGFR- β , no parecen escindirse, lo que indica que no contienen el sitio de escisión proteolítica observado en los híbridos 1 y 2 (Fig. 4, panel izquierdo).

5 Ejemplo 3: Inhibición de la proliferación de HUVEC por proteínas híbridas PDGFR- β /VEGFR1.

Se probaron las proteínas híbridas PDGFR- β / VEGFR1 para su capacidad para inhibir la proliferación inducida por VEGF y/o PDGFR- β de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). Para la producción de proteínas híbridas, se transfectaron células 293 con construcciones que codificaban el híbrido 1, híbrido 2, híbrido 3 o híbrido 4 y el medio de cultivo celular que contenía las proteínas híbridas secretadas se recogió 72 horas después de la transfección. El cultivo celular recogido se aplicó a HUVEC en presencia de ligando de VEGF. Se sembraron HUVEC (HUVEC- Cambrex Bio Science Walkersville, Inc) en una placa de 96 pocillos a una densidad de 2.000 células/pocillo en medio 199 (Invitrogen) complementado con 5 % de suero bovino fetal (Invitrogen) y sedimentaron durante la noche. Después de la incubación, el medio se sustituyó con medio 199 (Invitrogen) complementado con 5 % de suero bovino fetal (Invitrogen) que contenía un volumen igual (5 μ l) de cultivo celular recogido generado de tres transfecciones independientes de receptor o control junto con ligando de hVEGF-165 recombinante solo a una concentración final de 10 ng/ml (R&D Systems, Cat. N.º 293-VE), o en combinación con ligando de PDGF-BB a una concentración final de 20 ng/ml (R&D Systems, Cat. N.º 220-BB) en un volumen final de 100 μ l por pocillo. Los controles negativos consistieron en un volumen igual (5 μ l) de cultivo celular recogido de células transfectadas con una construcción de EGFP en un volumen final de 100 μ l por pocillo. Los controles positivos incluyeron cultivo celular recogido de un volumen igual (5 μ l) de células transfectadas con una construcción de EGFP en presencia de ligando de VEGF o ligando de VEGF y PDGF BB en 100 μ l de volumen final por pocillo. Las células se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂ durante tres a cuatro días. Se añadió Cell Titer 96 AQueous One Solution Reagent (Promega, Cat. N.º G3580) a 20 μ l/pocillo y se tomó la absorbancia a 490 nm cuatro horas después. En el ensayo de proliferación de HUVEC dependiente de VEGF, el híbrido 2, el híbrido 3 y el híbrido 4 bloquearon significativamente la proliferación de HUVEC con los híbridos 2 y 4 que tenían una potencia similar a sFLT01 (Fig. 5A). En comparación con los híbridos 2, 3 y 4, el híbrido 1 no bloqueó la proliferación de HUVEC inducida por VEGF y tuvo niveles similares de actividad antiproliferativa a la proteína la PDGFR(D1-D5)9G-Fc que carece de ECD de VEGFR1 (Fig. 5A). La escisión proteolítica de la secuencia de Fc de IgG1 dimerizante en el híbrido 1 eliminó probablemente su capacidad de unión a VEGF, debido a que la dimerización es un factor limitante para la unión de VEGF mediada por VEGFR1 D2 cuando otros ECD no están presentes (Pechan P., et al. Gene Ther. (2009), 16:10-16). En el híbrido 2, sin embargo, la escisión proteolítica separó la molécula en unidades que contenían ECD de PDGFR- β y sFLT01 que todavía fueron capaces de unirse a VEGF (Fig. 5A). Las proteínas híbridas PDGFR- β /VEGFR1 recogidas también se probaron en un ensayo de proliferación competitiva de HUVEC. En este ensayo, el cultivo celular recogido se aplicó a HUVEC en presencia de tanto el ligando de VEGF como el ligando de PDGF BB como se ha descrito anteriormente. Los resultados de este ensayo fueron similares al ensayo previo en el que el híbrido 2 y el híbrido 4 bloquearon significativamente la proliferación de HUVEC con los híbridos 2 y 4 que tienen una potencia similar a sFLT01 (Fig. 5B). El híbrido 1 tampoco bloqueó la proliferación de HUVEC en presencia de ambos ligandos. A diferencia del último ensayo, el híbrido 3 tuvo menor potencia antiproliferativa en presencia de ambos ligandos y fue comparable a la actividad de la proteína PDGFR(D1-D5)9G-Fc que carece de ECD de VEGFR1 (Fig. 5B). La significación estadística para ambos ensayos de proliferación de HUVEC se analizó usando Prism 5.0d (GraphPad Software Inc) y se calculó usando la prueba de ANOVA unifactorial, seguida de la prueba de Tukey.

Ejemplo 4: Afinidades de unión para proteínas híbridas PDGFR- β /VEGFR1.

Se determinaron las afinidades de unión relativas entre tanto los ligandos VEGF y PDGF BB como las proteínas híbridas PDGFR- β /VEGFR1 usando un sistema de ensayo de unión de PDGF o VEGF volumétrico sin células (Fig. 6). Para la producción de proteínas híbridas PDGFR- β /VEGFR1, se transfectaron células 293 con plásmidos que codificaban el híbrido 1, híbrido 2, híbrido 3 o híbrido 4. Las células también se transfectaron con plásmidos que codificaban proteínas PDGFR(D1-D5)9G-Fc o sFLT01 para su uso como controles de unión. El medio de cultivo celular se recogió 72 horas después de la transfección y la presencia de proteínas secretadas se confirmó por ELISA y análisis de transferencia Western antes del análisis de afinidad de unión. Las proteínas secretadas se diluyeron sucesivamente, se mezclaron con el ligando VEGFR1 humano (concentración final 20 pM) o el ligando PDGF BB humano (concentración final 80 pM) y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente en una plataforma de agitador orbital. La cantidad de PDGF BB no unido se midió entonces por un ELISA específico de VEGF humano (kit de ELISA Quantikine para VEGF humano, Cat. N.º DVE00, R&D Systems) o un ELISA específico de PDGF humano (Human PDGF-BB DuoSet, R&D Systems). La comparación de los cuatro híbridos en el ensayo de unión de VEGF mostró que el híbrido 1 era el ligante de VEGF más débil (Fig. 6A). La comparación de unión a VEGF del híbrido 3, híbrido 4 y sFLT01 en medio acondicionado recogido de tres transfecciones individuales en un ensayo mostró que el híbrido 4 se unió a VEGF similarmente a sFLT01 y fue un ligante de VEGF más fuerte que el híbrido 3 (Fig. 6A). La comparación de los cuatro híbridos en el ensayo de unión a PDGF demostró que el híbrido 1 también era el ligante de PDGF más débil, mientras que el híbrido 4 demostró la mejor unión de los cuatro híbridos (Fig. 6B). Se realizaron ensayos de unión competitiva sin células de VEGF y PDGF usando medio acondicionado recogido de células 293 transfectadas con construcciones que codificaban el híbrido 3, el híbrido 4, proteínas PDGFR(D1-D3)9G-Fc o sFLT01. El medio de cultivo celular se recogió 72 horas después de la transfección y la presencia de proteínas

secretadas se confirmó por ELISA y análisis de transferencia Western antes del análisis de afinidad de unión. Las proteínas secretadas se diluyeron sucesivamente, se mezclaron con tanto ligando PDGF BB humano (concentración final 20 pM) como ligando VEGFR1 humano (concentración final 20 pM) y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente en una plataforma de agitador orbital. La cantidad de ligandos PDGF-BB y VEGF no unidos se midió posteriormente por un ELISA específico de VEGF humano (kit de ELISA Quantikine para VEGF humano, Cat. N.º DVE00, R&D Systems) o un ELISA específico de PDGF humano (Human PDGF-BB DuoSet, R&D Systems). La comparación del híbrido 3 y el híbrido 4 con el control de unión de PDGF BB (PDGFR(D1-D3)9G-Fc) y el control de unión de VEGF (sFLT01) mostró que el híbrido 3 y el híbrido 4 se unieron ambos a los ligandos PDGF BB (Fig. 7A) y VEGF (Fig. 7B), demostrando el híbrido 4 una mayor afinidad de unión por ambos ligandos. La comparación de la unión de PDGF usando medio de cultivo celular de células que expresan el híbrido 3, el híbrido 4, PDGFR(D1-D5)9G-Fc o PDGFR(D1-D3)9G-Fc demostró que el híbrido 4 tenía una afinidad similar por el mejor ligante de PDGF, PDGFR(D1-D3)9G-Fc (Fig. 7A), mientras que PDGFR(D1-D5)9G-Fc fue un ligante de PDGF significativamente más débil que todos los híbridos 1 a 4 (Fig. 6B) o PDGFR(D1-D3)9G-Fc (Fig. 2B).

Ejemplo 5: Inhibición de la CNV inducida por láser en ratones por proteínas híbridas PDGFR-β/VEGFR1.

Los vectores de virus adenoasociado (AAV) son herramientas atractivas para la administración génica intraocular debido a su naturaleza no patógena, toxicidad mínima e inmunogenicidad, su capacidad para transducir células no divisoras y sus posibilidades de una expresión de por vida de una proteína terapéutica (Ali et al. 1996; Ali et al. 1997; Ali et al., 1998; Lai et al. 2005).

Para la administración medida por virus adenoasociado del híbrido 4, el promotor del CMV se sustituyó por un intrón/potenciador de CMV del promotor de beta-actina de pollo y se insertó el casete de expresión que comprendía el promotor y el fragmento que codificaba el híbrido 4 en los sitios RsrII y MluI de un vector plasmídico previrico pAAVSP70. Véase Ziegler et al. Mol Ther., 2004; 9: 231-240. El tamaño total del genoma del AAV resultante en el plásmido sp70.BR/híbrido 4 fue 4,6 kb. El vector recombinante AAV2.Híbrido 4 se produjo por transfección triple de células 293 usando plásmidos auxiliares p5rep-D-CMVcap y pHelper (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.), y se purificó según el protocolo de fabricación usando un gradiente de etapa de iodixanol y la columna HiTrap Heparin (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EE. UU.) en un sistema ÄKTA FPLC (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ). Véase Vincent et al., J Virol., 1997; 71: 1897-1905. La preparación vírica AAV2.Híbrido 4 tuvo un título de 2,2E12 drps (partículas resistentes a DNasa) por ml. Los títulos víricos se determinaron usando un ensayo de PCR en tiempo real TaqMan (ABI Prism 7700; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). AAV2.sFLT02 se construyó como se describe previamente en la patente de EE. UU. número 7.928.072 usando un ácido nucleico (SEQ ID NO: 40) que codifica la proteína VEGFR1 D2-9Gly-CH3 (SEQ ID NO: 39). AAV2.Híbrido 4, AAV2.sFLT02, o AAV2.PDGFR (PDGFR = PDGFR(D1-D3)9G-Fc) se administró por administración intravítrea en un modelo de neovascularización coroidea (CNV) de ratón por láser para evaluar la eficacia *in vivo* del híbrido 4 en la inhibición de CNV. Brevemente, los ojos de ratones C57BL/6 adultos normales se trataron con una inyección intravítrea única de 1 E9 drps de AAV2.Híbrido 4, AAV2.sFLT02 o AAV2.PDGFR en el ojo izquierdo (OS) en el día de estudio 0 mientras que el ojo derecho (OD) se dejó intacto al tratamiento. La CNV se indujo en ambos ojos usando un láser (3 quemaduras dispuestas por ojo. Potencia 200 mW, lugar de 50 µm, 100 ms) en el día de estudio 28. Los ratones se perfundieron con 5 mg/ml de 2,0 x 10⁶ de peso molecular de FITC-dextrano y se sacrificaron en el día de estudio 42. Los ojos se recogieron, se fijaron en 10 % de formol tamponado neutro y posteriormente se prepararon en montajes planos coroides preparados para examinar el grado de neovascularización. El número de quemaduras sin CNV en el ojo tratado (OS) se comparó con el ojo contralateral (OD). El análisis de la eficacia *in vivo* demostró que una única inyección intravítrea de AAV2.Híbrido 4 fue más eficaz que AAV2.sFLT02 en la inhibición de la neovascularización retiniana (Fig. 8). Además, AAV2.PDGFR no inhibió la neovascularización retiniana en el modelo de CNV murina inducida por láser (Fig. 8).

SECUENCIAS

Secuencia de aminoácidos de la región extracelular D1-D3 de PDGFR

LVVTPPGPELVLVNSSTFVLTCSGSAPVWVERMSQEPPQEMAKAQDGTFFSVLTLTN
LTGLDTGEYFCTHNSRGLTDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPC
RVTDLPQLVVTLEHKKGDVALPVPYDHQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYYV
YRLQVSSINVSNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFETYPRKESGRLVEPVTD
FLDMPYHIRSILHIPS AELEDSGTYT CNVTESVNDHQDEKAINITVVESGY (SEQ ID
NO:1)

Secuencia de aminoácidos de la región extracelular D1-D4 de PDGFR

LVVTPPGPELVNLVSSTFVLTCSGSAPVWVERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTN
 LTGLDTGEYFCTHNSRGLTDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPC
 RVTDPQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYV
 YRLQVSSINVSNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFEWTPRKESGRLVEPVT
 FLLDMPYHIRSILHIPS AELEDSGT YTCNVTESVNDHQDEKAINITV VESGYVRLG
 GTLQFAELHRSRTLQVVFEAYPPPTVLWFKDNRTLGDSSAGEIALSTRNVSETRYVSE
 LTLVRVKVAEAGHYTMRAFHEDA EVQLSFQLQINVPVRVLE (SEQ ID NO:2)

Secuencia de aminoácidos de la región extracelular D1-D5 de PDGFR

LVVTPPGPELVNLVSSTFVLTCSGSAPVWVERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTN
 LTGLDTGEYFCTHNSRGLTDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPC
 RVTDPQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYV
 YRLQVSSINVSNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFEWTPRKESGRLVEPVT
 FLLDMPYHIRSILHIPS AELEDSGT YTCNVTESVNDHQDEKAINITV VESGYVRLG
 GTLQFAELHRSRTLQVVFEAYPPPTVLWFKDNRTLGDSSAGEIALSTRNVSETRYVSE
 LTLVRVKVAEAGHYTMRAFHEDA EVQLSFQLQINVPVRVLELSESHPDSEGT VRCR
 GRGMPQPNIIWSACRDLKRCPRELPPTLLGNSSEEEESQLETNVTYWEEEQEFVSTL
 RLQHVDRPLSVRCTLRNAVGQDTQEIVVPHSLPFK (SEQ ID NO:3)

Secuencia de aminoácidos de la región extracelular D2 de VEGFR1

RPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFI
 5 SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYTHRQT (SEQ ID NO:4)

Secuencia de aminoácidos de la región extracelular D1-D3 de VEGFR1

PELSLKGTQHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGKQF
 CSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIIYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIIHM
 TEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEA
 TVNGHLYKTNLYTHRQTNTIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTW
 SYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVN
 TSVHIYDK (SEQ ID NO:5)

Secuencia de aminoácidos de la región Fc de IgG1

PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
 FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLS
 LSPGK (SEQ ID NO:6)

10 Secuencia de aminoácidos de PDGFR(D1-D5) con péptido secretor (subrayado)

MRLPGAMPALALKGELLLLLLLLLLEPQISQGLVVTTPGPELVNLVSSTFVLTCGSA
 PVVWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERK
 RLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTDQPQLVVTLEHKKGDVALPVPYD
 HQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDA YYVYRLQVSSINVSNAVQTVVRQGENIT
 LMCIVIGNEVVNFEWYTPRKESGRLVEPVTDFFLDMPYHIRSILHIPSAELEDSTYTC
 NVTESVNDHQDEKAINITVVESGYVRLLGEVGTQLQFAELHRSRTLQVVFEAYPPPTV
 LWFKDNRTLGDSSAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVRVKVAEAGHYTMRAFHEDAE
 VQLSFQLQINVPVRVLELSESHPDSEGTQVRCRGRGMPQPNIIWSACRDLKRCPRELP
 PTLGNSSEESQLETNVTYWEEEQEFVVSTLRLQHVDRLSVRCTLRNAVGQDTQ
 EVIVVPHSLPFK (SEQ ID NO:7)

Secuencia de aminoácidos de PDGFR(D1-D4) con péptido secretor (subrayado)

MRLPGAMPALALKGELLLLLLLLLLEPQISQGLVVTTPGPELVNLVSSTFVLTCGSA
 PVVWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERK
 RLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTDQPQLVVTLEHKKGDVALPVPYD
 HQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDA YYVYRLQVSSINVSNAVQTVVRQGENIT
 LMCIVIGNEVVNFEWYTPRKESGRLVEPVTDFFLDMPYHIRSILHIPSAELEDSTYTC
 NVTESVNDHQDEKAINITVVESGYVRLLGEVGTQLQFAELHRSRTLQVVFEAYPPPTV
 LWFKDNRTLGDSSAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVRVKVAEAGHYTMRAFHEDAE
 VQLSFQLQINVPVRVLE (SEQ ID NO:8)

5 Secuencia de aminoácidos de PDGFR(D1-D5)9G-Fc con péptido secretor (subrayado)

MRLPGAMPALALKGELLLLLLLLLLEPQISQGLVVTTPGPELVNLVSSTFVLTCGSA
 PVVWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERK
 RLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTDQPQLVVTLEHKKGDVALPVPYD
 HQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDA YYVYRLQVSSINVSNAVQTVVRQGENIT
 LMCIVIGNEVVNFEWYTPRKESGRLVEPVTDFFLDMPYHIRSILHIPSAELEDSTYTC
 NVTESVNDHQDEKAINITVVESGYVRLLGEVGTQLQFAELHRSRTLQVVFEAYPPPTV
 LWFKDNRTLGDSSAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVRVKVAEAGHYTMRAFHEDAE
 VQLSFQLQINVPVRVLELSESHPDSEGTQVRCRGRGMPQPNIIWSACRDLKRCPRELP
 PTLGNSSEESQLETNVTYWEEEQEFVVSTLRLQHVDRLSVRCTLRNAVGQDTQ
 EVIVVPHSLPFKGGGGGGGGGPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:9)

Secuencia de aminoácidos de PDGFR(D1-D3)9G-Fc con péptido secretor (subrayado)

MRLPGAMPALALKGELLLLSLLLLLLEPQISQGLVVTPPGPELVLNVSTFVLTCSGSA
 PVVWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERK
 RLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTDQPQLVVTLEHKKGDAVALPVPYD
 HQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVSSINVSNAVQTVVRQGENIT
 LMCIVIGNEVVNFEWYTPRKESGRLVEPVTDFLLDMPYHIRSILHIPS AELEDSGTYTC
 NVTESVNDHQDEKAINITVVESGYGGGGGGGGGPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:10)

Secuencia de aminoácidos de PDGFR(D1-D2)9G-Fc con péptido secretor (subrayado)

MRLPGAMPALALKGELLLLSLLLLLLEPQISQGLVVTPPGPELVLNVSTFVLTCSGSA
 PVVWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERK
 RLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTDQPQLVVTLEHKKGDAVALPVPYD
 HQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVSSGGGGGGGGGPKSCDKTHT
 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID NO:11)

5 Secuencia de aminoácidos del híbrido 1

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSNITV
 TLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQT
 SSSSSSSSSQISQGLVVTPPGPELVLNVSTFVLTCSGSAPVVWERMSQEPPQEMAKA
 QDGTFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEE
 LFIFLTEITEITIPCRVTDQPQLVVTLEHKKGDAVALPVPYDHQRGFFGIFEDRSYICKTTIG
 DREVDSDAYYVYRLQVSSINVSNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFEWYTPR
 KESGRLVEPVTDFLLDMPYHIRSILHIPS AELEDSGTYTCNVTESVNDHQDEKAINITV
 VESGYVRLLGEVGTQLQFAELHRSRTLQVVFEAYPPPTVLWFKDNRTLGDSSAGEIAL
 STRNVSETRYVSELTLVRVKVAEAGHYTMRAFHEDA EVQLSFQLQINVPVRVLELSE
 SHPDSGEQTVRCRGRGMPQPNIIWSACRDLKRCPRELPPTLLGNSSEEEESQLETNVTY
 WEEEQEFEVVSTLRLQHVDRLPSVRCTLRNAVQDQTQEVIVVPHSLPFTGGGGGGG
 GGPCKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPGK (SEQ ID NO:12)

Secuencia de aminoácidos del híbrido 2

MRLPGAMPALALKGELLLLLLLLLLEPQISQGLVVTTPPGPELVNLVSSTFVLTCSGSA
 PVVWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERK
 RLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTDQPQLVVTLEHKKGDVALPVPYD
 HQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVSSINVSNAVQTVVRQGENIT
 LMCIVIGNEVVNFEWITYPRKESGRLVEPVTDFFLDMPYHIRSILHIPSAELEDSTYTC
 NVTESVNDHQDEKAINITVVESGYVRLLEGEVGTQFAELHRSRTLQVVFEAYPPPTV
 LWFKDNRTLGDSSAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVRVKVAEAGHYTMRAFHEDAE
 VQLSFQLQINVPVRVLESESHPDSEGTQVRCRGRGMPQPNIIWSACRDLKRCPRELP
 PTLGNSSEEEESQLETNVTYWEEEQEFEVVSTLRLQHVDRLSVRCTLRNAVGQDTQ
 EVIVVPHSLPFSSSSSSSSSRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPL
 DTLIPDGKRIIWDNRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQTGGGGGG
 GGGPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)

Secuencia de aminoácidos del híbrido 3

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITV
 TLKKFPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQT
 SSSSSSSSSQISQGLVVTTPPGPELVNLVSSTFVLTCSGSAPVVWERMSQEPPQEMAKA
 QDGTFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEE
 LFIFLTEITEITIPCRVTDQPQLVVTLEHKKGDVALPVPYDHQRGFFGIFEDRSYICKTTIG
 DREVDSDAYYVYRLQVSSINVSNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFEWITYPR
 KESGRLVEPVTDFFLDMPYHIRSILHIPSAELEDSTYTCNVTESVNDHQDEKAINITV
 VESGYTGGGGGGGGGGPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
 GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:14)

5 Secuencia de aminoácidos del híbrido 4

MRLPGAMPALALKGELLLLLLLLLLEPQISQGLVVTPPGPELVLNVSSTFVLTCGSA
PVVWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERK
RLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTDPLVVTLEKKGDVALPVPYD
HQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVSSINVSNAVQTVVRQGENIT
LMCIVIGNEVVNFEWYTPRKESGRLVEPVTDFLLDMPYHIRSILHIPSAELEDSTYTC
NVTESVNDHQDEKAINITVVESGYSSSSSSSSSRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCR
VTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDNRKGFISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTN
YLTHRQTGGGGGGGGGGPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:15)

Marco de lectura abierto de PDGFR(D1-D5)

ATGCGGCTTCCGGGTGCGATGCCAGCTCTGGCCCTCAAAGGCGAGCTGCTGTTGC
TGTCTCTCCTGTTACTTCTGGAACACAGATCTCTCAGGGCCTGGTCGTCACACCC
CCGGGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTCTCCAGCACCTTCGTTCTGACCTGCTCGG
GTTACAGCTCCGGTGGTGTGGGAACGGATGTCCCAGGAGCCCCACAGGAAATGG
CCAAGGCCCAGGATGGCACCTTCTCCAGCGTGCTCACACTGACCAACCTCACTGG
GCTAGACACGGGAGAATACTTTTGCACCCACAATGACTCCCGTGGACTGGAGAC
CGATGAGCGGAAACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTCCTC
CCTAATGATGCCGAGGAACTATTCATCTTTCTCACGGAAATAACTGAGATCACCA
TTCCATGCCGAGTAACAGACCCACAGCTGGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAG
GGGACGTTGCACTGCCTGTCCCCTATGATCACCAACGTGGCTTTTTTGGTATCTTT
GAGGACAGAAGCTACATCTGCAAAACCACTTGGGGACAGGGAGGTGGATTCT
GATGCCTACTATGTCTACAGACTCCAGGTGTATCCATCAACGTCTCTGTGAACG
CAGTGCAGACTGTGGTCCGCCAGGGTGAGAACATCACCTCATGTGCATTGTGAT
CGGGAATGAGGTGGTCAACTTCGAGTGGACATACCCCCGCAAAGAAAGTGGGCG
GCTGGTGGAGCCGGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT
ATCCTGCACATCCCCAGTGCCGAGTTAGAAGACTCGGGGACCTACACCTGCAAT
GTGACGGAGAGTGTGAATGACCATCAGGATGAAAAGGCCATCAACATCACCGTG
GTTGAGAGCGGCTACGTGCGGCTCCTGGGAGAGGTGGGCACACTACAATTTGCT
GAGCTGCATCGGAGCCGGACACTGCAGGTAGTGTTCGAGGCCTACCCACCGCCC
ACTGTCCTGTGGTTCAAAGACAACCGCACCTGGGCGACTCCAGCGCTGGCGAA
ATCGCCCTGTCCACGCGCAACGTGTCCGAGACCCGGTATGTGTCAGAGCTGACA
CTGGTTTCGCGTGAAGGTGGCAGAGGCTGGCCACTACACCATGCGGGCCTTCCATG
AGGATGCTGAGGTCCAGCTCTCCTTCCAGCTACAGATCAATGTCCCTGTCCGAGT
GCTGGAGCTAAGTGAGAGCCACCCTGACAGTGGGGAACAGACAGTCCGCTGTCTG
TGGCCGGGGCATGCCCCAGCCGAACATCATCTGGTCTGCCTGCAGAGACCTCAA
AAGGTGTCCACGTGAGCTGCCGCCACGCTGCTGGGGAACAGTTCCGAAGAGGA
GAGCCAGCTGGAGACTAACGTGACGTACTGGGAGGAGGAGCAGGAGTTTGAGGT
GGTGAGCACACTGCGTCTGCAGCACGTGGATCGGCCACTGTCGGTGCCTGTCAC
GCTGCGCAACGCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGGCACACTC
CTTGCCCTTTTAA (SEQ ID NO:16)

Marco de lectura abierto de PDGFR(D1-D4)

ATGCGGCTTCCGGGTGCGATGCCAGCTCTGGCCCTCAAAGGCGAGCTGCTGTTGC
 TGTCTCTCCTGTTACTTCTGGAACCACAGATCTCTCAGGGCCTGGTCGTCACACCC
 CCGGGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTCTCCAGCACCTTCGTTCTGACCTGCTCGG
 GTTCAGCTCCGGTGGTGTGGGAACGGATGTCCCAGGAGCCCCACAGGAAATGG
 CCAAGGCCAGGATGGCACCTTCTCCAGCGTGCTCACACTGACCAACCTCACTGG
 GCTAGACACGGGAGAATACTTTTGCACCCACAATGACTCCCGTGGACTGGAGAC
 CGATGAGCGGAAACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTCCTC
 CCTAATGATGCCGAGGAACTATTCATCTTTCTCACGGAAATAACTGAGATCACCA
 TTCCATGCCGAGTAACAGACCCACAGCTGGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAG
 GGGACGTTGCACTGCCTGTCCCCTATGATCACCAACGTGGCTTTTTTGGTATCTTT
 GAGGACAGAAGCTACATCTGCAAAACCACTTGGGGACAGGGAGGTGGATTCT
 GATGCCTACTATGTCTACAGACTCCAGGTGTATCCATCAACGTCTCTGTGAACG
 CAGTGCAGACTGTGGTCCGCCAGGGTGAGAACATCACCTCATGTGCATTGTGAT
 CGGGAATGAGGTGGTCAACTTCGAGTGGACATAACCCCGCAAAGAAAGTGGGCG
 GCTGGTGGAGCCGGTGACTGACTTCCTCTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCC
 ATCCTGCACATCCCCAGTGCCGAGTTAGAAGACTCGGGGACCTACACCTGCAAT
 GTGACGGAGAGTGTGAATGACCATCAGGATGAAAAGGCCATCAACATCACCGTG
 GTTGAGAGCGGCTACGTGCGGCTCCTGGGAGAGGTGGGCACACTACAATTTGCT
 GAGCTGCATCGGAGCCGGACACTGCAGGTAGTGTTCGAGGCCTACCCACCGCCC
 ACTGTCCTGTGGTTCAAAGACAACCGCACCTTGGGCGACTCCAGCGCTGGCGAA
 ATCGCCCTGTCCACGCGCAACGTGTTCGGAGACCCGGTATGTGTCAGAGCTGACA
 CTGGTTTCGCGTGAAGGTGGCAGAGGCTGGCCACTACACCATGCGGGCCTTCCATG
 AGGATGCTGAGGTCCAGCTCTCCTTCCAGCTACAGATCAATGTCCCTGTCCGAGT
 GCTGGAGTAG (SEQ ID NO:17)

Marco de lectura abierto de PDGFR(D1-D5)9G-Fc

ATGCGGCTTCCGGGTGCGATGCCAGCTCTGGCCCTCAAAGGCGAGCTGCTGTTGC
 TGTCTCTCCTGTTACTTCTGGAACCACAGATCTCTCAGGGCCTGGTCGTCACACCC
 CCGGGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTCTCCAGCACCTTCGTTCTGACCTGCTCGG
 GTTCAGCTCCGGTGGTGTGGGAACGGATGTCCCAGGAGCCCCACAGGAAATGG

CCAAGGCCAGGATGGCACCTTCTCCAGCGTGCTCACACTGACCAACCTCACTGG
 GCTAGACACGGGAGAATACTTTTGCACCCACAATGACTCCCGTGGACTGGAGAC
 CGATGAGCGGAAACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTCCTC
 CCTAATGATGCCGAGGAACTATTCATCTTTCTCACGGAAATAACTGAGATCACCA
 TTCCATGCCGAGTAACAGACCCACAGCTGGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAG
 GGGACGTTGCACTGCCTGTCCCCTATGATCACCAACGTGGCTTTTTTGGTATCTTT
 GAGGACAGAAGCTACATCTGCAAAACCACCATTTGGGGACAGGGAGGTGGATTCT
 GATGCCTACTATGTCTACAGACTCCAGGTGTCATCCATCAACGTCTCTGTGAACG
 CAGTGCAGACTGTGGTCCGCCAGGGTGAGAACATCACCCCTCATGTGCATTGTGAT
 CGGGAATGAGGTGGTCAACTTCGAGTGGACATACCCCCGCAAAGAAAGTGGGCG
 GCTGGTGGAGCCGGTGACTGACTTCCTCTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCC
 ATCCTGCACATCCCCAGTGCCGAGTTAGAAGACTCGGGGACCTACACCTGCAAT
 GTGACGGAGAGTGTGAATGACCATCAGGATGAAAAGGCCATCAACATCACCGTG
 GTTGAGAGCGGCTACGTGCGGCTCCTGGGAGAGGTGGGCACACTACAATTTGCT
 GAGCTGCATCGGAGCCGGACACTGCAGGTAGTGTTCGAGGCCTACCCACCGCCC
 ACTGTCCTGTGGTTCAAAGACAACCGCACCCCTGGGCGACTCCAGCGCTGGCGAA
 ATCGCCCTGTCCACGCGCAACGTGTGGAGACCCGGTATGTGTCAGAGCTGACA
 CTGGTTTCGCGTGAAGGTGGCAGAGGCTGGCCACTACACCATGCGGGCCTTCCATG
 AGGATGCTGAGGTCCAGCTCTCCTTCCAGCTACAGATCAATGTCCCTGTCCGAGT
 GCTGGAGCTAAGTGAGAGCCACCCTGACAGTGGGGAACAGACAGTCCGCTGTCTG
 TGGCCGGGGCATGCCCCAGCCGAACATCATCTGGTCTGCCTGCAGAGACCTCAA
 AAGGTGTCCACGTGAGCTGCCGCCCACGCTGCTGGGGAACAGTTCCGAAGAGGA
 GAGCCAGCTGGAGACTAACGTGACGTACTGGGAGGAGGAGCAGGAGTTTGAGGT
 GGTGAGCACACTGCGTCTGCAGCACGTGGATCGGCCACTGTCCGTGCGCTGCAC
 GCTGCGCAACGCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGCCACACTC
 CTTGCCCTTTACCGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTCCTAAATCTTGTGAC
 AAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA
 GTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG
 AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA
 ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
 AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG
 ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAG
 CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG
 TGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGA
 CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
 ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
 GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG
 GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
 GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG (SEQ ID NO:18)

ATGCGGCTTCCGGGTGCGATGCCAGCTCTGGCCCTCAAAGGCGAGCTGCTGTTGC
 TGTCTCTCCTGTTACTTCTGGAACCACAGATCTCTCAGGGCCTGGTCGTCACACCC
 CCGGGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTCTCCAGCACCTTCGTTCTGACCTGCTCGG
 GTTCAGCTCCGGTGGTGTGGGAACGGATGTCCCAGGAGCCCCACAGGAAATGG
 CCAAGGCCCAGGATGGCACCTTCTCCAGCGTGCTCACACTGACCAACCTCACTGG
 GCTAGACACGGGAGAATACTTTTGCACCCACAATGACTCCCGTGGACTGGAGAC
 CGATGAGCGGAAACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTCCTC
 CCTAATGATGCCGAGGAACTATTCATCTTTCTCACGGAAATAACTGAGATCACCA
 TTCCATGCCGAGTAACAGACCCACAGCTGGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAG
 GGGACGTTGCACTGCCTGTCCCCTATGATCACCAACGTGGCTTTTTTGGTATCTTT
 GAGGACAGAAGCTACATCTGCAAAACCACCATTTGGGGACAGGGAGGTGGATTCT
 GATGCCTACTATGTCTACAGACTCCAGGTGTCAATCAACGTCTCTGTGAACG
 CAGTGCAGACTGTGGTCCGCCAGGGTGAGAACATCACCTCATGTGCATTGTGAT
 CGGGAATGAGGTGGTCAACTTCGAGTGGACATACCCCCGCAAAGAAAGTGGGCG
 GCTGGTGGAGCCGGTGACTGACTTCCTCTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCC
 ATCCTGCACATCCCCAGTGCCGAGTTAGAAGACTCGGGGACCTACACCTGCAAT
 GTGACGGAGAGTGTGAATGACCATCAGGATGAAAAGGCCATCAACATCACCGTG
 GTTGAGAGCGGCTACACCGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGCTAAATCT
 TGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCGGGGGA
 CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA
 CCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA
 AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC
 GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGC
 ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC
 TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
 CACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA
 GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
 GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC
 CGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA
 GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
 ACCGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG (SEQ ID NO:19)

Marco de lectura abierto de PDGFR(D1-D2)9G-Fc

ATGCGGCTTCCGGGTGCGATGCCAGCTCTGGCCCTCAAAGGCGAGCTGCTGTTGC
 TGTCTCTCCTGTTACTTCTGGAACCACAGATCTCTCAGGGCCTGGTCGTCACACCC
 CCGGGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTCTCCAGCACCTTCGTTCTGACCTGCTCGG
 GTTCAGCTCCGGTGGTGTGGGAACGGATGTCCCAGGAGCCCCACAGGAAATGG
 CCAAGGCCCAGGATGGCACCTTCTCCAGCGTGCTCACACTGACCAACCTCACTGG
 GCTAGACACGGGAGAATACTTTTGCACCCACAATGACTCCCGTGGACTGGAGAC
 CGATGAGCGGAAACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTCCTC
 CCTAATGATGCCGAGGAACTATTCATCTTTCTCACGGAATAAAGTGAATCACCA
 TTCCATGCCGAGTAACAGACCCACAGCTGGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAG
 GGGACGTTGCACTGCCTGTCCCCTATGATCACCAACGTGGCTTTTTTGGTATCTTT
 GAGGACAGAAGCTACATCTGCAAAACCACCATTTGGGGACAGGGAGGTGGATTCT
 GATGCCTACTATGTCTACAGACTCCAGGTGTCTATCCACCGGTGGAGGTGGAGGTG
 GAGGTGGAGGTCTCTAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAG
 CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGA
 CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
 AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
 AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC
 AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG
 CTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG
 ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACC
 ACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCG
 TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
 AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATA
 G (SEQ ID NO:20)

Marco de lectura abierto del híbrido 1

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGC
TTCTCACAGGATCTGGTAGACCTTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAAT
TATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTACGTCACCT
AACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAA
AACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACA
AAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGA
CAAACATATCTCACACATCGACAAACCTCGAGTTCAGCTCCTCTTCCTCAAGCCA
GATCTCTCAGGGCCTGGTCGTACACCCCCGGGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTC
TCCAGCACCTTCGTTCTGACCTGCTCGGGTTCAGCTCCGGTGGTGTGGGAACGGA
TGTCCCAGGAGCCCCACAGGAAATGGCCAAGGCCAGGATGGCACCTTCTCCA
GCGTGCTCACACTGACCAACCTCACTGGGCTAGACACGGGAGAATACTTTTGCAC
CCACAATGACTCCCGTGGACTGGAGACCGATGAGCGGAAACGGCTCTACATCTTT
GTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTCTCTCCCTAATGATGCCGAGGAACTATTCATCT
TTCTCACGGAAATAACTGAGATCACCATTCCATGCCGAGTAACAGACCCACAGCT
GGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAGGGGACGTTGCACTGCCTGTCCCCTATGA
TCACCAACGTGGCTTTTTTGGTATCTTTGAGGACAGAAGCTACATCTGCAAAACC
ACCATTGGGGACAGGGAGGTGGATTCTGATGCCTACTATGTCTACAGACTCCAGG
TGTCATCCATCAACGTCTCTGTGAACGCAGTGCAGACTGTGGTCCGCCAGGGTGA
GAACATCACCTCATGTGCATTGTGATCGGGAATGAGGTGGTCAACTTCGAGTGG
ACATACCCCCGCAAAGAAAGTGGGCGGCTGGTGGAGCCGGTGACTGACTTCCTC
TTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCCATCCTGCACATCCCCAGTGCCGAGTTAG
AAGACTCGGGGACCTACACCTGCAATGTGACGGAGAGTGTGAATGACCATCAGG
ATGAAAAGGCCATCAACATCACCGTGGTTGAGAGCGGCTACGTGCGGCTCCTGG
GAGAGGTGGGCACACTACAATTTGCTGAGCTGCATCGGAGCCGGACACTGCAGG
TAGTGTTTCGAGGCCTACCCACCGCCCACTGTCCTGTGGTTCAAAGACAACCGCAC
CCTGGGCGACTCCAGCGCTGGCGAAATCGCCCTGTCCACGCGCAACGTGTCGGA
GACCCGGTATGTGTCAGAGCTGACACTGGTTTCGCGTGAAGGTGGCAGAGGCTGG
CCACTACACCATGCGGGCCTTCCATGAGGATGCTGAGGTCCAGCTCTCCTTCCAG
CTACAGATCAATGTCCCTGTCCGAGTGCTGGAGCTAAGTGAGAGCCACCCTGACA
GTGGGGAACAGACAGTCCGCTGTCGTGGCCGGGGCATGCCCCAGCCGAACATCA
TCTGGTCTGCCTGCAGAGACCTCAAAGGTGTCCACGTGAGCTGCCGCCACGCT
GCTGGGGAACAGTTCGGAAGAGGAGAGCCAGCTGGAGACTAACGTGACGTACTG
GGAGGAGGAGCAGGAGTTTGAGGTGGTGAGCACACTGCGTCTGCAGCACGTGGA

TCGGCCACTGTCGGTGCGCTGCACGCTGCGCAACGCTGTGGGCCAGGACACGCA
 GGAGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTTGCCCTTTACCGGTGGAGGTGGAGGTGGA
 GGTGGAGGTCCTAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCA
 CCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACA
 CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA
 CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
 TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAG
 CGTCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
 GGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA
 AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCT
 GACCAAGAACCAGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA
 CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCA
 CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGT
 GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA
 GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG
 (SEQ ID NO:21)

Marco de lectura abierto del híbrido 2

ATGCGGCTTCCGGGTGCGATGCCAGCTCTGGCCCTCAAAGGCGAGCTGCTGTTGC
 TGTCTCTCCTGTTACTTCTGGAACACAGATCTCTCAGGGCCTGGTCGTCACACCC
 CCGGGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTCTCCAGCACCTTCGTTCTGACCTGCTCGG
 GTTCAGCTCCGGTGGTGTGGGAACGGATGTCCCAGGAGCCCCACAGGAAATGG
 CCAAGGCCCAGGATGGCACCTTCTCCAGCGTGCTCACACTGACCAACCTCACTGG
 GCTAGACACGGGAGAATACTTTTGCACCCACAATGACTCCCGTGGACTGGAGAC
 CGATGAGCGGAAACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTCCTC
 CCTAATGATGCCGAGGAACCTATTCATCTTTCTCACGGAAATAACTGAGATCACCA
 TTCCATGCCGAGTAACAGACCCACAGCTGGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAG
 GGGACGTTGCACTGCCTGTCCCCTATGATCACCAACGTGGCTTTTTTGGTATCTTT
 GAGGACAGAAGCTACATCTGCAAAACCACCATTTGGGGACAGGAGGTGGATTCT
 GATGCCTACTATGTCTACAGACTCCAGGTGTCATCCATCAACGTCTCTGTGAACG
 CAGTGCAGACTGTGGTCCGCCAGGGTGAGAACATCACCTCATGTGCATTGTGAT
 CGGGAATGAGGTGGTCAACTTCGAGTGGACATAACCCCGCAAAGAAAGTGGGCG
 GCTGGTGGAGCCGGTGAAGTCTTCTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCC
 ATCCTGCACATCCCCAGTGCCGAGTTAGAAGACTCGGGGACCTACACCTGCAAT

GTGACGGAGAGTGTGAATGACCATCAGGATGAAAAGGCCATCAACATCACCGTG
 GTTGAGAGCGGCTACGTGCGGCTCCTGGGAGAGGTGGGCACACTACAATTTGCT
 GAGCTGCATCGGAGCCGGACACTGCAGGTAGTGTTCGAGGCCCTACCCACCGCCC
 ACTGTCCTGTGGTTCAAAGACAACCGCACCCCTGGGCGACTCCAGCGCTGGCGAA
 ATCGCCCTGTCCACGCGCAACGTGTGCGGAGACCCGGTATGTGTCAGAGCTGACA
 CTGGTTCGCGTGAAGGTGGCAGAGGCTGGCCACTACACCATGCGGGCCCTTCCATG
 AGGATGCTGAGGTCCAGCTCTCCTTCCAGCTACAGATCAATGTCCCTGTCCGAGT
 GCTGGAGCTAAGTGAGAGCCACCCTGACAGTGGGGAACAGACAGTCCGCTGTGCG
 TGGCCGGGGCATGCCCCAGCCGAACATCATCTGGTCTGCCTGCAGAGACCTCAA
 AAGGTGTCCACGTGAGCTGCCGCCACGCTGCTGGGGAACAGTTCCGAAGAGGA
 GAGCCAGCTGGAGACTAACGTGACGTACTGGGAGGAGGAGCAGGAGTTTGAGGT
 GGTGAGCACACTGCGTCTGCAGCACGTGGATCGGCCACTGTGCGGTGCGCTGCAC
 GCTGCGCAACGCTGTGGGCCAGGACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGCCACACTC
 CTTGCCCTTTAGTTCCAGCTCCTCTTCTCAAGCTCGCCTTTCGTAGAGATGTACA
 GTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCT
 GCCGGGTTACGTACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACAC
 TTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATA
 TCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAAT
 GGGCATTGTGATAAGACAACTATCTCACACATCGACAAACCGGTGGAGGTGGA
 GGTGGAGGTGGAGGTCCTAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC
 CCAGCACCTGAACCTCGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCTTCCCAACCA
 AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT
 GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT
 GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT
 GGTGAGCGTCTCACCGTCTGACACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA
 GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGA
 TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC
 AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA
 GACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC
 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
 CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
 AATAG (SEQ ID NO:22)

Marco de lectura abierto del híbrido 3

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGC
 TTCTCACAGGATCTGGTAGACCTTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAAT
 TATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTACGTCACCT
 AACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAA
 AACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACA
 AAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGA
 CAAACTATCTCACACATCGACAAACCTCGAGTTCAGCTCCTCTTCTCAAGCCA
 GATCTCTCAGGGCCTGGTCGTACACCCCCGGGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTC
 TCCAGCACCTTCGTTCTGACCTGCTCGGGTTCAGCTCCGGTGGTGTGGGAACGGA
 TGTCCCAGGAGCCCCACAGGAAATGGCCAAGGCCAGGATGGCACCTTCTCCA
 GCGTGCTCACACTGACCAACCTCACTGGGCTAGACACGGGAGAATACTTTTGCAC
 CCACAATGACTCCCGTGGACTGGAGACCGATGAGCGGAAACGGCTCTACATCTTT
 GTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTCTCTCCCTAATGATGCCGAGGAACTATTCATCT
 TTCTCACGGAAATAACTGAGATCACCATTCCATGCCGAGTAACAGACCCACAGCT
 GGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAGGGGACGTTGCACTGCCTGTCCCCTATGA
 TCACCAACGTGGCTTTTTTGGTATCTTTGAGGACAGAAGCTACATCTGCAAAACC
 ACCATTGGGGACAGGGAGGTGGATTCTGATGCCTACTATGTCTACAGACTCCAGG
 TGTCATCCATCAACGTCTCTGTGAACGCAGTGCAGACTGTGGTCCGCCAGGGTGA
 GAACATCACCTCATGTGCATTGTGATCGGGAATGAGGTGGTCAACTTCGAGTGG
 ACATACCCCCGCAAAGAAAGTGGGCGGCTGGTGGAGCCGGTGACTGACTTCCTC
 TTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCCATCCTGCACATCCCCAGTGCCGAGTTAG
 AAGACTCGGGGACCTACACCTGCAATGTGACGGAGAGTGTGAATGACCATCAGG
 ATGAAAAGGCCATCAACATCACCGTGGTTGAGAGCGGCTACACCGGTGGAGGTG
 GAGGTGGAGGTGGAGGTCCTAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGT
 GCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACC
 CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGGA
 CGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
 GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC
 GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT
 ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCT
 CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC
 GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT
 ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
 ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA
 GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT
 GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG
 GGTAATAG (SEQ ID NO:23)

ATGCGGCTTCCGGGTGCGATGCCAGCTCTGGCCCTCAAAGGCGAGCTGCTGTTGC
TGTCTCTCCTGTTACTTCTGGAACCACAGATCTCTCAGGGCCTGGTCGTCACACCC
CCGGGGCCAGAGCTTGTCTCAATGTCTCCAGCACCTTCGTTCTGACCTGCTCGG
GTTTACGCTCCGGTGGTGTGGGAACGGATGTCCCAGGAGCCCCACAGGAAATGG
CCAAGGCCCAGGATGGCACCTTCTCCAGCGTGCTCACACTGACCAACCTCACTGG
GCTAGACACGGGAGAATACTTTTGCACCCACAATGACTCCCGTGGACTGGAGAC
CGATGAGCGGAAACGGCTCTACATCTTTGTGCCAGATCCCACCGTGGGCTTCCTC
CCTAATGATGCCGAGGAACTATTCATCTTTCTCACGGAAATAACTGAGATCACCA
TTCCATGCCGAGTAACAGACCCACAGCTGGTGGTGACACTGCACGAGAAGAAAG
GGGACGTTGCACTGCCTGTCCCCTATGATCACCAACGTGGCTTTTTTGGTATCTTT
GAGGACAGAAGCTACATCTGCAAAACCACCATTTGGGGACAGGGAGGTGGATTCT
GATGCCTACTATGTCTACAGACTCCAGGTGTTCATCCATCAACGTCTCTGTGAACG
CAGTGCAGACTGTGGTCCGCCAGGGTGAGAACATCACCTCATGTGCATTGTGAT
CGGGAATGAGGTGGTCAACTTCGAGTGGACATACCCCCGCAAAGAAAGTGGGCG
GCTGGTGGAGCCGGTGACTGACTTCCTCTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCC
ATCCTGCACATCCCCAGTGCCGAGTTAGAAGACTCGGGGACCTACACCTGCAAT
GTGACGGAGAGTGTGAATGACCATCAGGATGAAAAGGCCATCAACATCACCGTG
GTTGAGAGCGGCTACAGTTCAGCTCCTCTTCCTCAAGCTCGAGACCTTTCGTAG
AGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCG
TCATTCCCTGCCGGGTACGTACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCA
CTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAGGGC
TTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCA
ACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAACCGGT
GGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTCTTAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGC
CCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC
CAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGG
TGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC
ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA
AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA
CCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
CATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG
GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA
ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG
TCTCCGGGTAAATAG (SEQ ID NO:24)

GACTAGTATGCGGCTTCCGGGTG (SEQ ID NO: 25)

Cebador del ácido nucleico PDGFRBPR7Agel R

ACCGGTGGATGACACCTGGAGTCTG (SEQ ID NO: 26)

Cebador del ácido nucleico PDGFRB-PR1-Acc F

5 CTATGTCTACAGACTCCAGGTGTC (SEQ ID NO: 27)

Cebador del ácido nucleico D5-PR9-Agel-Rev R

ACCGGTAAAGGGCAAGGAGTGTGGC (SEQ ID NO: 28)

Cebador del ácido nucleico PDGF02 F

CCTCCACCGGTGTAGCCGCTCTCAACCACGGT (SEQ ID NO: 29)

10 Cebador del ácido nucleico PDGF03 R

CCCGGGACTAGTATGCGGCTTCCGGGTG (SEQ ID NO: 30)

Cebador del ácido nucleico D5-SV40 F

CCGGTTAGGGA (SEQ ID NO: 31)

Cebador del ácido nucleico D5-SV40 B-2

15 GGCTCCCTAA (SEQ ID NO: 32)

Cebador del ácido nucleico D4-SV40 F

TGAGGTCCAGCTCTCCTTCCAGCTACAGATCAATGTCCCTGTCCGAGTGCTGGAG
TAGC (SEQ ID NO:33)

Cebador del ácido nucleico D4-SV40 B

GGCCGCTACTCCAGCACTCGGACAGGGACATTGATCTGTAGCTGGAAGGAGAGC
TGGACC (SEQ ID NO:34)

20 Fragmento de ácido nucleico sintético de Kozak-SP-D2-9Ser

ACTAGTGGCGGCCGCCACCATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGCTGTG
CGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATCTGGTAGACCTTTCGTAGAGATG
TACAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATT
CCCTGCCGGGTTACGTCACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTG
ACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCA
TCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAG
TCAATGGGCATTTGTATAAGACAACTATCTCACACATCGACAAACCTCGAGTTC
CAGCTCCTCTTCCTCAAGCCAGATCT (SEQ ID NO:35)

Fragmento de ácido nucleico sintético de D2-2220-2908

CCACGCTGCTGGGGAACAGTTCCGAAGAGGAGAGCCAGCTGGAGACTAACGTGA
CGTACTGGGAGGAGGAGCAGGAGTTTGAGGTGGTGAGCACACTGCGTCTGCAGC
ACGTGGATCGGCCACTGTCTGGTGGCTGCACGCTGCGCAACGCTGTGGGCCAGG
ACACGCAGGAGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTTGCCCTTTAGTTCCAGCTCCTC
TTCCTCAAGCTCGAGACCTTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATA
CACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTACGTCACCTAACA
TCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACG
CATAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGA
AATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAA
CTATCTCACACATCGACAAACCGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTCCTAA
ATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG (SEQ ID NO:36)

Fragmento de ácido nucleico sintético de D3-Fc

GACTGTGGTCCGCCAGGGTGAGAACATCACCCCTCATGTGCATTGTGATCGGGAAT
GAGGTGGTCAACTTCGAGTGGACATACCCCCGCAAAGAAAGTGGGCGGCTGGTG
GAGCCGGTGACTGACTTCCTCTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCCATCCTGC
ACATCCCCAGTGCCGAGTTAGAAGACTCGGGGACCTACACCTGCAATGTGACGG
AGAGTGTGAATGACCATCAGGATGAAAAGGCCATCAACATCACCGTGCTTGAGA
GCGGCTACACCGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTCCTAAATCTTGTGACA
AAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAG
TCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG (SEQ ID NO:37)

Fragmento de ácido nucleico sintético de D3-F(D2)

GACTGTGGTCCGCCAGGGTGAGAACATCACCTCATGTGCATTGTGATCGGGAAT
GAGGTGGTCAACTTCGAGTGGACATACCCCCGCAAAGAAAGTGGGCGGCTGGTG
GAGCCGGTGACTGACTTCCTCTTGGATATGCCTTACCACATCCGCTCCATCCTGC
ACATCCCCAGTGCCGAGTTAGAAGACTCGGGGACCTACACCTGCAATGTGACGG
AGAGTGTGAATGACCATCAGGATGAAAAGGCCATCAACATCACCGTGGTTGAGA
GCGGCTACAGTTCAGCTCCTCTTCCTCAAGCTCGAGACCTTTCGTAGAGATGTA
CAGTGAAATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCC
CTGCCGGGTTACGTACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGAC
ACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATC
ATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTC
AATGGGCATTTGTATAAGACAACTATCTCACACATCGACAAACCGGTGGAGGT
GGAGGTGGAGGTGGAGGTCCTAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCG
TGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCTAAAAC
CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG
ACGTG (SEQ ID NO:38)

Secuencia de aminoácidos de sFLT02 (D2-9Gly-CH3)

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTSGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITV
TLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNLYLTHRQT
GGGGGGGGGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK (SEQ ID NO:39)

Marco de lectura abierto de sFLT02 (D2-9Gly-CH3)

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGC
TTCTCACAGGATCTGGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAAT
TATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTTACGTACCT
AACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAA
AACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACA
AAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGA
CAAACCTATCTCACACATCGACAAACCGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGTC
AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA
AGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTC
CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA
GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT
GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG (SEQ ID
NO:40)

CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCC
CACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCG (SEQ ID NO:41)

Secuencia de aminoácidos del híbrido 1 sin péptido secretor

RPFVEMYSEIPEIIHMTREGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII
SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTSSSSSSSSSQISQGLVVTPPGPELVLN
VSSTFVLTCSGSAPVVWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTNLTGLDTGEYFCTH
NDSRGLETDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTDLPQLVVTLHE
KKGDVALPVPYDHQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYVYRLQVSSINVSVN
AVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFEWYTPRKESGRLVEPVTDFLLDMPYHIRSILH
IPSAELEDSTYTCNVTESVNDHQDEKAINITVVESGYVRLGEGVTLQFAELHRSRT
LQVVFEAYPPPTVLWFKDNRTLGDSSAGEIALSTRNVSETRYVSELTLVRVKVAEAG
HYTMRAFHEDA EVQLSFQLQINVPVRVLELSESHPDSEGTVRRCRGRGMPQPNIIWS
ACRDLKRCPRELPPTLLGNSSEEEESQLETNVTYWEEEQEFVVSTLRLQHVDRLPSVR
CTLRNAVVGQDTQEVIVVPHSLPFTGGGGGGGGGPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:42)

5 Secuencia de aminoácidos del híbrido 2 sin péptido secretor

LVVTPPGPELVLNVSSTFVLTCSGSAPVVWERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLTN
LTGLDTGEYFCTHNSRGLETDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPC
RVTDLPQLVVTLHEKKGDVALPVPYDHQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVDSDAYYV
YRLQVSSINVSNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFEWYTPRKESGRLVEPVTDF
LLDMPYHIRSILHPSAELEDSTYTCNVTESVNDHQDEKAINITVVESGYVRLGEGV
GTLQFAELHRSRTLQVVFEAYPPPTVLWFKDNRTLGDSSAGEIALSTRNVSETRYVSE
LTLVRVKVAEAGHYTMRAFHEDA EVQLSFQLQINVPVRVLELSESHPDSEGTVRRCR
GRGMPQPNIIWSACRDLKRCPRELPPTLLGNSSEEEESQLETNVTYWEEEQEFVVSTL
RLQHVDRLPSVRCTLRNAVVGQDTQEVIVVPHSLPFTSSSSSSSSSRPFVEMYSEIPEIIH
MTREGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIGLLTCEA
TVNGHLYKTNYLTHRQTGGGGGGGGGPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:43)

Secuencia de aminoácidos del híbrido 3 sin péptido secretor

RPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII
 SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTSSSSSSSSSQISQGLVVTTPGPPELVLN
 VSSTFVLTCSGSAPVWVERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLNLTLGLDTGEYFCTH
 NDSRGLETDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPCRVTDQPQLVVTLHE
 KKGDV ALPVPYDHQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVSDAYYVYRLQVSSINVSVN
 AVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFETYPRKESGRLVEPVTDFLLDMPYHIRSILH
 IPSAELEDSGTYTTCNVTESVNDHQDEKAINITVVESGYTGGGGGGGGGPKSCDKTHT
 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
 PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID NO:44)

Secuencia de aminoácidos del híbrido 4 sin péptido secretor

LVVTTPGPPELVLNVSSTFVLTCSGSAPVWVERMSQEPPQEMAKAQDGTFSVLTLNL
 TLGLDTGEYFCTHNSRGLETDERKRLYIFVPDPTVGFLPNDAEELFIFLTEITEITIPC
 RVTDPQLVVTLHEKKGDV ALPVPYDHQRGFFGIFEDRSYICKTTIGDREVSDAYYV
 YRLQVSSINVSNAVQTVVRQGENITLMCIVIGNEVVNFETYPRKESGRLVEPVTD
 FLLDMPYHIRSILHIPSAELEDSGTYTTCNVTESVNDHQDEKAINITVVESGYSSSSSSSS
 SRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGF
 IISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTGGGGGGGGGPKSCDKTHTCPPCP
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
 NO:45)

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> > PECHAN, PETER ARDINGER, JEFFERY RUBIN, HILLARD WADSWORTH, SAMUEL SCARIA, ABRAHAM

<120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN QUE COMPRENDEN PORCIONES DE UNIÓN A PDGF Y VEGF Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS

10

<130> 159792009540

<140> Aún no asignada

<141> Simultáneamente con la presente

15

<150> US 61/780.914

ES 2 933 558 T3

<151> 13-03-2013

<160> 55

5 <170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 283

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

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

```

15

<210> 2

<211> 389

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 2

```

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

```

<210> 3

10

<211> 499

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser
 1          5          10          15
Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg
 20          25          30
Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Gly Thr
 35          40          45
Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly
 50          55          60
Glu Tyr Phe Cys Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Thr Asp Glu
 65          70          75          80
Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu
 85          90          95
Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu
100          105          110
Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu
115          120          125
His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln
130          135          140
Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr
145          150          155          160
Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg
165          170          175
Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val
180          185          190
Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn
195          200          205
Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg
210          215          220
Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile
225          230          235          240
Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr
245          250          255
Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys
260          265          270
Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Val Arg Leu Leu Gly
275          280          285
Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu Leu His Arg Ser Arg Thr Leu
290          295          300
Gln Val Val Phe Glu Ala Tyr Pro Pro Pro Thr Val Leu Trp Phe Lys
305          310          315          320
Asp Asn Arg Thr Leu Gly Asp Ser Ser Ala Gly Glu Ile Ala Leu Ser
325          330          335
Thr Arg Asn Val Ser Glu Thr Arg Tyr Val Ser Glu Leu Thr Leu Val
340          345          350
Arg Val Lys Val Ala Glu Ala Gly His Tyr Thr Met Arg Ala Phe His
355          360          365
Glu Asp Ala Glu Val Gln Leu Ser Phe Gln Leu Gln Ile Asn Val Pro
370          375          380
Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Glu Ser His Pro Asp Ser Gly Glu Gln
385          390          395          400
Thr Val Arg Cys Arg Gly Arg Gly Met Pro Gln Pro Asn Ile Ile Trp
405          410          415
Ser Ala Cys Arg Asp Leu Lys Arg Cys Pro Arg Glu Leu Pro Pro Thr
420          425          430
Leu Leu Gly Asn Ser Ser Glu Glu Glu Ser Gln Leu Glu Thr Asn Val
435          440          445
Thr Tyr Trp Glu Glu Glu Gln Glu Phe Glu Val Val Ser Thr Leu Arg
450          455          460
Leu Gln His Val Asp Arg Pro Leu Ser Val Arg Cys Thr Leu Arg Asn
465          470          475          480
Ala Val Gly Gln Asp Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu
485          490          495
Pro Phe Lys

```

ES 2 933 558 T3

<210> 4

<211> 94

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

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

10

<210> 5

<211> 300

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 5

ES 2 933 558 T3

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

<210> 6

5 <211> 231

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

10

ES 2 933 558 T3

```

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

```

<210> 7

<211> 531

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

```

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

```

10

ES 2 933 558 T3

				85				90				95				
Glu	Tyr	Phe	Cys	Thr	His	Asn	Asp	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu	Thr	Asp	Glu	
				100					105					110		
Arg	Lys	Arg	Leu	Tyr	Ile	Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Thr	Val	Gly	Phe	Leu	
				115					120					125		
Pro	Asn	Asp	Ala	Glu	Glu	Leu	Phe	Ile	Phe	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Glu	
				130					135					140		
Ile	Thr	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Asp	Pro	Gln	Leu	Val	Val	Thr	Leu	
145					150					155					160	
His	Glu	Lys	Lys	Gly	Asp	Val	Ala	Leu	Pro	Val	Pro	Tyr	Asp	His	Gln	
				165					170					175		
Arg	Gly	Phe	Phe	Gly	Ile	Phe	Glu	Asp	Arg	Ser	Tyr	Ile	Cys	Lys	Thr	
				180					185					190		
Thr	Ile	Gly	Asp	Arg	Glu	Val	Asp	Ser	Asp	Ala	Tyr	Tyr	Val	Tyr	Arg	
				195					200					205		
Leu	Gln	Val	Ser	Ser	Ile	Asn	Val	Ser	Val	Asn	Ala	Val	Gln	Thr	Val	
				210					215					220		
Val	Arg	Gln	Gly	Glu	Asn	Ile	Thr	Leu	Met	Cys	Ile	Val	Ile	Gly	Asn	
225					230					235					240	
Glu	Val	Val	Asn	Phe	Glu	Trp	Thr	Tyr	Pro	Arg	Lys	Glu	Ser	Gly	Arg	
				245					250					255		
Leu	Val	Glu	Pro	Val	Thr	Asp	Phe	Leu	Leu	Asp	Met	Pro	Tyr	His	Ile	
				260					265					270		
Arg	Ser	Ile	Leu	His	Ile	Pro	Ser	Ala	Glu	Leu	Glu	Asp	Ser	Gly	Thr	
				275					280					285		
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Thr	Glu	Ser	Val	Asn	Asp	His	Gln	Asp	Glu	Lys	
				290					295					300		
Ala	Ile	Asn	Ile	Thr	Val	Val	Glu	Ser	Gly	Tyr	Val	Arg	Leu	Leu	Gly	
305					310					315					320	
Glu	Val	Gly	Thr	Leu	Gln	Phe	Ala	Glu	Leu	His	Arg	Ser	Arg	Thr	Leu	
				325					330					335		
Gln	Val	Val	Phe	Glu	Ala	Tyr	Pro	Pro	Pro	Thr	Val	Leu	Trp	Phe	Lys	
				340					345					350		
Asp	Asn	Arg	Thr	Leu	Gly	Asp	Ser	Ser	Ala	Gly	Glu	Ile	Ala	Leu	Ser	
				355					360					365		
Thr	Arg	Asn	Val	Ser	Glu	Thr	Arg	Tyr	Val	Ser	Glu	Leu	Thr	Leu	Val	
				370					375					380		
Arg	Val	Lys	Val	Ala	Glu	Ala	Gly	His	Tyr	Thr	Met	Arg	Ala	Phe	His	
385					390					395					400	
Glu	Asp	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Ser	Phe	Gln	Leu	Gln	Ile	Asn	Val	Pro	
				405					410					415		
Val	Arg	Val	Leu	Glu	Leu	Ser	Glu	Ser	His	Pro	Asp	Ser	Gly	Glu	Gln	
				420					425					430		
Thr	Val	Arg	Cys	Arg	Gly	Arg	Gly	Met	Pro	Gln	Pro	Asn	Ile	Ile	Trp	
				435					440					445		
Ser	Ala	Cys	Arg	Asp	Leu	Lys	Arg	Cys	Pro	Arg	Glu	Leu	Pro	Pro	Thr	
				450					455					460		
Leu	Leu	Gly	Asn	Ser	Ser	Glu	Glu	Glu	Ser	Gln	Leu	Glu	Thr	Asn	Val	
465					470					475					480	
Thr	Tyr	Trp	Glu	Glu	Glu	Gln	Glu	Phe	Glu	Val	Val	Ser	Thr	Leu	Arg	
				485					490					495		
Leu	Gln	His	Val	Asp	Arg											

<210> 8

$\langle 211 \rangle$ 421

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

$\langle 400 \rangle$ 8

```

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

```

<210> 9

5 <211> 771

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 9

```

Met Arg Leu Pro Gly Ala Met Pro Ala Leu Ala Leu Lys Gly Glu Leu
 1      5      10      15
Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Leu Glu Pro Gln Ile Ser Gln Gly
 20      25      30
Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser
 35      40      45
Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg
 50      55      60
Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Gly Thr
 65      70      75      80
Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly
 85      90      95
Glu Tyr Phe Cys Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Thr Asp Glu
 100     105     110
Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu
 115     120     125
Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu
 130     135     140
Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu
 145     150     155     160
His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln
 165     170     175
Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr
 180     185     190
Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg
 195     200     205
Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val
 210     215     220
Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn
 225     230     235     240
Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg
 245     250     255
Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile
 260     265     270
Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr
 275     280     285
Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys
 290     295     300
Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Val Arg Leu Leu Gly
 305     310     315     320
Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu Leu His Arg Ser Arg Thr Leu
 325     330     335
Gln Val Val Phe Glu Ala Tyr Pro Pro Pro Thr Val Leu Trp Phe Lys
 340     345     350
Asp Asn Arg Thr Leu Gly Asp Ser Ser Ala Gly Glu Ile Ala Leu Ser
 355     360     365
Thr Arg Asn Val Ser Glu Thr Arg Tyr Val Ser Glu Leu Thr Leu Val
 370     375     380
Arg Val Lys Val Ala Glu Ala Gly His Tyr Thr Met Arg Ala Phe His
 385     390     395     400
Glu Asp Ala Glu Val Gln Leu Ser Phe Gln Leu Gln Ile Asn Val Pro
 405     410     415
Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Glu Ser His Pro Asp Ser Gly Glu Gln
 420     425     430
Thr Val Arg Cys Arg Gly Arg Gly Met Pro Gln Pro Asn Ile Ile Trp
 435     440     445
Ser Ala Cys Arg Asp Leu Lys Arg Cys Pro Arg Glu Leu Pro Pro Thr
 450     455     460
Leu Leu Gly Asn Ser Ser Glu Glu Glu Ser Gln Leu Glu Thr Asn Val
 465     470     475     480
Thr Tyr Trp Glu Glu Glu Gln Glu Phe Glu Val Val Ser Thr Leu Arg

```

ES 2 933 558 T3

485							490							495		
Leu	Gln	His	Val	Asp	Arg	Pro	Leu	Ser	Val	Arg	Cys	Thr	Leu	Arg	Asn	
			500				505						510			
Ala	Val	Gly	Gln	Asp	Thr	Gln	Glu	Val	Ile	Val	Val	Pro	His	Ser	Leu	
			515				520						525			
Pro	Phe	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Pro	Lys	Ser	Cys	
			530	535						540						
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	
545				550			555						560			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
			565				570						575			
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
			580				585						590			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
			595	600						605						
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
			610	615						620						
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	
625				630			635						640			
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	
			645				650						655			
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	
			660				665						670			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	
			675	680						685						
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	
			690	695						700						
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	
705				710			715						720			
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	
			725				730						735			
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	
			740	745						750						
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
			755	760						765						
Pro	Gly	Lys														
			770													

$\langle 210 \rangle$ 10

<211> 555

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Construcción sintética

10

<400> 10

```

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

Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu
130      135      140
Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu
145      150      155      160
His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln
      165      170      175
Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr
      180      185      190
Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg
      195      200      205
Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val
210      215      220
Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn
225      230      235      240
Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg
      245      250      255
Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile
260      265      270
Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr
275      280      285
Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys
290      295      300
Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Gly Gly Gly Gly
305      310      315      320
Gly Gly Gly Gly Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
      325      330      335
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
340      345      350
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
355      360      365
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
370      375      380
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
385      390      395      400
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
      405      410      415
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
420      425      430
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
435      440      445
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
450      455      460
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
465      470      475      480
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
      485      490      495
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
500      505      510
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
515      520      525
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
530      535      540
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
545      550      555

```

	<210> 11
	<211> 453
	<212> PRT
5	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Construcción sintética
10	<400> 11

ES 2 933 558 T3

Met	Arg	Leu	Pro	Gly	Ala	Met	Pro	Ala	Leu	Ala	Leu	Lys	Gly	Glu	Leu
1				5					10					15	
Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Glu	Pro	Gln	Ile	Ser	Gln	Gly
			20					25					30		
Leu	Val	Val	Thr	Pro	Pro	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Leu	Asn	Val	Ser	Ser
		35					40					45			
Thr	Phe	Val	Leu	Thr	Cys	Ser	Gly	Ser	Ala	Pro	Val	Val	Trp	Glu	Arg
50					55					60					
Met	Ser	Gln	Glu	Pro	Pro	Gln	Glu	Met	Ala	Lys	Ala	Gln	Asp	Gly	Thr
65					70					75					80
Phe	Ser	Ser	Val	Leu	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp	Thr	Gly
				85					90					95	
Glu	Tyr	Phe	Cys	Thr	His	Asn	Asp	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu	Thr	Asp	Glu
			100					105					110		
Arg	Lys	Arg	Leu	Tyr	Ile	Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Thr	Val	Gly	Phe	Leu
			115				120					125			
Pro	Asn	Asp	Ala	Glu	Glu	Leu	Phe	Ile	Phe	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Glu
130						135					140				
Ile	Thr	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Asp	Pro	Gln	Leu	Val	Val	Thr	Leu
145				150						155					160
His	Glu	Lys	Lys	Gly	Asp	Val	Ala	Leu	Pro	Val	Pro	Tyr	Asp	His	Gln
				165					170					175	
Arg	Gly	Phe	Phe	Gly	Ile	Phe	Glu	Asp	Arg	Ser	Tyr	Ile	Cys	Lys	Thr
		180					185						190		
Thr	Ile	Gly	Asp	Arg	Glu	Val	Asp	Ser	Asp	Ala	Tyr	Tyr	Val	Tyr	Arg
		195					200					205			
Leu	Gln	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Pro	Lys
210					215						220				
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
225				230						235					240
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
				245					250					255	
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
			260					265					270		
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
		275					280					285			
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
290					295						300				
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
305					310					315					320
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
				325					330					335	
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
			340					345					350		
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln
		355					360					365			
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
370						375					380				
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
385					390					395					400
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
				405					410					415	
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser
			420					425					430		
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser
		435					440					445			
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys											
450															

<210> 12

<211> 871

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 12

```

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1      5      10      15
Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser
 20      25      30
Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile
 35      40      45
Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe
 50      55      60
Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser
 65      70      75      80
Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu
 85      90      95
Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr
 100      105      110
Leu Thr His Arg Gln Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gln
 115      120      125
Ile Ser Gln Gly Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu
 130      135      140
Asn Val Ser Ser Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val
 145      150      155      160
Val Trp Glu Arg Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala
 165      170      175
Gln Asp Gly Thr Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly
 180      185      190
Leu Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu
 195      200      205
Glu Thr Asp Glu Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr
 210      215      220
Val Gly Phe Leu Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr
 225      230      235      240
Glu Ile Thr Glu Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu
 245      250      255
Val Val Thr Leu His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro
 260      265      270
Tyr Asp His Gln Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr
 275      280      285
Ile Cys Lys Thr Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr
 290      295      300
Tyr Val Tyr Arg Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala
 305      310      315      320
Val Gln Thr Val Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile
 325      330      335
Val Ile Gly Asn Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys
 340      345      350
Glu Ser Gly Arg Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met
 355      360      365
Pro Tyr His Ile Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu
 370      375      380
Asp Ser Gly Thr Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His
 385      390      395      400
Gln Asp Glu Lys Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Val
 405      410      415
Arg Leu Leu Gly Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu Leu His Arg
 420      425      430
Ser Arg Thr Leu Gln Val Val Phe Glu Ala Tyr Pro Pro Pro Thr Val
 435      440      445
Leu Trp Phe Lys Asp Asn Arg Thr Leu Gly Asp Ser Ser Ala Gly Glu

```

450		455		460
Ile Ala Leu Ser Thr Arg	Asn Val Ser Glu Thr Arg Tyr Val Ser Glu			
465	470	475	480	
Leu Thr Leu Val Arg Val Lys Val Ala Glu Ala Gly His Tyr Thr Met				
	485	490	495	
Arg Ala Phe His Glu Asp Ala Glu Val Gln Leu Ser Phe Gln Leu Gln				
	500	505	510	
Ile Asn Val Pro Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Glu Ser His Pro Asp				
	515	520	525	
Ser Gly Glu Gln Thr Val Arg Cys Arg Gly Arg Gly Met Pro Gln Pro				
	530	535	540	
Asn Ile Ile Trp Ser Ala Cys Arg Asp Leu Lys Arg Cys Pro Arg Glu				
545	550	555	560	
Leu Pro Pro Thr Leu Glu Gly Asn Ser Ser Glu Glu Glu Ser Gln Leu				
	565	570	575	
Glu Thr Asn Val Thr Tyr Trp Glu Glu Glu Gln Glu Phe Glu Val Val				
	580	585	590	
Ser Thr Leu Arg Leu Gln His Val Asp Arg Pro Leu Ser Val Arg Cys				
	595	600	605	
Thr Leu Arg Asn Ala Val Gly Gln Asp Thr Gln Glu Val Ile Val Val				
	610	615	620	
Pro His Ser Leu Pro Phe Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly				
625	630	635	640	
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro				
	645	650	655	
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys				
	660	665	670	
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val				
	675	680	685	
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp				
	690	695	700	
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr				
705	710	715	720	
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp				
	725	730	735	
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu				
	740	745	750	
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg				
	755	760	765	
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys				
	770	775	780	
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp				
785	790	795	800	
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys				
	805	810	815	
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser				
	820	825	830	
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser				
	835	840	845	
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser				
	850	855	860	
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys				
865	870			

<210> 13

<211> 873

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 13

```

Met Arg Leu Pro Gly Ala Met Pro Ala Leu Ala Leu Lys Gly Glu Leu
 1      5      10      15
Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Leu Glu Pro Gln Ile Ser Gln Gly
      20      25      30
Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser
      35      40      45
Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg
 50      55      60
Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Gly Thr
65      70      75      80
Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly
      85      90      95
Glu Tyr Phe Cys Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Thr Asp Glu
      100      105      110
Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu
      115      120      125
Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu
      130      135      140
Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu
145      150      155      160
His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln
      165      170      175
Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr
      180      185      190
Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg
      195      200      205
Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val
      210      215      220
Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn
225      230      235      240
Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg
      245      250      255
Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile
      260      265      270
Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr
      275      280      285
Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys
      290      295      300
Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Val Arg Leu Leu Gly
305      310      315      320
Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu Leu His Arg Ser Arg Thr Leu
      325      330      335
Gln Val Val Phe Glu Ala Tyr Pro Pro Pro Thr Val Leu Trp Phe Lys
      340      345      350
Asp Asn Arg Thr Leu Gly Asp Ser Ser Ala Gly Glu Ile Ala Leu Ser
      355      360      365
Thr Arg Asn Val Ser Glu Thr Arg Tyr Val Ser Glu Leu Thr Leu Val
      370      375      380
Arg Val Lys Val Ala Glu Ala Gly His Tyr Thr Met Arg Ala Phe His
385      390      395      400
Glu Asp Ala Glu Val Gln Leu Ser Phe Gln Leu Gln Ile Asn Val Pro
      405      410      415
Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Glu Ser His Pro Asp Ser Gly Glu Gln
      420      425      430
Thr Val Arg Cys Arg Gly Arg Gly Met Pro Gln Pro Asn Ile Ile Trp
      435      440      445
Ser Ala Cys Arg Asp Leu Lys Arg Cys Pro Arg Glu Leu Pro Pro Thr
      450      455      460
Leu Leu Gly Asn Ser Ser Glu Glu Glu Ser Gln Leu Glu Thr Asn Val
465      470      475      480
Thr Tyr Trp Glu Glu Gln Glu Phe Glu Val Val Ser Thr Leu Arg
      485      490      495
Leu Gln His Val Asp Arg Pro Leu Ser Val Arg Cys Thr Leu Arg Asn

```

ES 2 933 558 T3

				500						505				510		
Ala	Val	Gly	Gln	Asp	Thr	Gln	Glu	Val	Ile	Val	Val	Pro	His	Ser	Leu	
		515					520					525				
Pro	Phe	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Arg	Pro	Phe	Val	Glu	
	530					535					540					
Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Ile	Ile	His	Met	Thr	Glu	Gly	Arg	Glu	
545					550					555					560	
Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	Val	Thr	Leu	
				565					570						575	
Lys	Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	Ile	Ile	
			580					585						590		
Trp	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe	Ile	Ile	Ser	Asn	Ala	Thr	Tyr	Lys	Glu	
		595					600					605				
Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	His	Leu	Tyr	Lys	
	610					615					620					
Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	His	Arg	Gln	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	
625					630					635					640	
Gly	Gly	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
				645					650					655		
Ala	Pro	Glu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys		
			660				665							670		
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
		675					680					685				
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	
		690				695					700					
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
705					710					715					720	
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
				725					730					735		
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
			740					745						750		
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
		755					760					765				
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	
		770				775					780					
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
785					790					795					800	
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
			805						810					815		
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
			820					825						830		
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	
		835					840					845				

<210> 14

<211> 656

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Construcción sintética

10

<400> 14

ES 2 933 558 T3

Met	Val	Ser	Tyr	Trp	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Leu	Ser
1				5				10						15	
Cys	Leu	Leu	Leu	Thr	Gly	Ser	Gly	Arg	Pro	Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser
			20					25					30		
Glu	Ile	Pro	Glu	Ile	Ile	His	Met	Thr	Glu	Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Ile
		35					40					45			
Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Phe
	50					55					60				
Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	Ile	Ile	Trp	Asp	Ser
65					70					75				80	
Arg	Lys	Gly	Phe	Ile	Ile	Ser	Asn	Ala	Thr	Tyr	Lys	Glu	Ile	Gly	Leu
				85					90					95	
Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	His	Leu	Tyr	Lys	Thr	Asn	Tyr
			100					105						110	
Leu	Thr	His	Arg	Gln	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Gln
		115					120							125	
Ile	Ser	Gln	Gly	Leu	Val	Val	Thr	Pro	Pro	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Leu
		130					135				140				
Asn	Val	Ser	Ser	Thr	Phe	Val	Leu	Thr	Cys	Ser	Gly	Ser	Ala	Pro	Val
145					150					155					160
Val	Trp	Glu	Arg	Met	Ser	Gln	Glu	Pro	Pro	Gln	Glu	Met	Ala	Lys	Ala
				165					170					175	
Gln	Asp	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Val	Leu	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr	Gly
			180					185					190		
Leu	Asp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Phe	Cys	Thr	His	Asn	Asp	Ser	Arg	Gly	Leu
	195						200					205			
Glu	Thr	Asp	Glu	Arg	Lys	Arg	Leu	Tyr	Ile	Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Thr
	210				215						220				
Val	Gly	Phe	Leu	Pro	Asn	Asp	Ala	Glu	Glu	Leu	Phe	Ile	Phe	Leu	Thr
225					230					235					240
Glu	Ile	Thr	Glu	Ile	Thr	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Asp	Pro	Gln	Leu
				245					250					255	
Val	Val	Thr	Leu	His	Glu	Lys	Lys	Gly	Asp	Val	Ala	Leu	Pro	Val	Pro
			260					265					270		
Tyr	Asp	His	Gln	Arg	Gly	Phe	Phe	Gly	Ile	Phe	Glu	Asp	Arg	Ser	Tyr
		275					280					285			
Ile	Cys	Lys	Thr	Thr	Ile	Gly	Asp	Arg	Glu	Val	Asp	Ser	Asp	Ala	Tyr
	290					295					300				
Tyr	Val	Tyr	Arg	Leu	Gln	Val	Ser	Ser	Ile	Asn	Val	Ser	Val	Asn	Ala
305					310					315					320
Val	Gln	Thr	Val	Val	Arg	Gln	Gly	Glu	Asn	Ile	Thr	Leu	Met	Cys	Ile
				325					330					335	
Val	Ile	Gly	Asn	Glu	Val	Val	Asn	Phe	Glu	Trp	Thr	Tyr	Pro	Arg	Lys
			340					345					350		
Glu	Ser	Gly	Arg	Leu	Val	Glu	Pro	Val	Thr	Asp	Phe	Leu	Leu	Asp	Met
		355					360					365			
Pro	Tyr	His	Ile	Arg	Ser	Ile	Leu	His	Ile	Pro	Ser	Ala	Glu	Leu	Glu
	370					375					380				
Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Thr	Glu	Ser	Val	Asn	Asp	His
385					390					395					400
Gln	Asp	Glu	Lys	Ala	Ile	Asn	Ile	Thr	Val	Val	Glu	Ser	Gly	Tyr	Thr
				405					410					415	
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
			420					425					430		
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
		435					440					445			
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
	450					455					460				
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
465					470					475					480
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
				485					490					495	
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
			500					505					510		
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
		515					520					525			
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
	530					535					540				
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu

ES 2 933 558 T3

545					550					555				560
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
				565					570					575
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
			580					585					590	
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
			595				600					605		Asp
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
	610					615					620			Ser
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
625					630					635				640
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
				645					650					655

<210> 15

<211> 658

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 15

ES 2 933 558 T3

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

ES 2 933 558 T3

Ser Ser Ser Ser Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu
325 330 335
Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val
340 345 350
Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr
355 360 365
Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe
370 375 380
Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu
385 390 395 400
Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg
405 410 415
Gln Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Lys Ser Cys Asp
420 425 430
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
435 440 445
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
450 455 460
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
465 470 475 480
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
485 490 495
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
500 505 510
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
515 520 525
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
530 535 540
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
545 550 555 560
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
565 570 575
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
580 585 590
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
595 600 605
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
610 615 620
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
625 630 635 640
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
645 650 655
Gly Lys

<210> 16

<211> 1593

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 16

atgaggcttc	cggtgagat	gccagctctg	gccctcaaag	gcgagctgct	gttgctgtct	60
ctcctgttac	ttctggaacc	acagatctct	cagggccttg	tcgtcacacc	cccggggcca	120
gagcttgcc	tcaatgtctc	cagcaccttc	gttctgacct	gctcgggttc	agctccggtg	180
gtgtgggaac	ggatgtccca	ggagccccc	caggaaatgg	ccaaggccca	ggatggcacc	240
ttctccagcg	tgctcacact	gaccaacctc	actgggctag	acacgggaga	atacttttgc	300
accacaatg	actcccgctg	actggagacc	gatgagcgga	aacggctcta	catctttgtg	360
ccagatccca	ccgtgggctt	cctcccta	gatgccgagg	aactattcat	ctttctcacg	420
gaaataactg	agatcaccat	tccatgccga	gtaacagacc	cacagctggt	ggtgacactg	480
cacgagaaga	aaggggacgt	tgactgcct	gtcccctatg	atcaccaacg	tggctttttt	540
ggtatctttg	aggacagaag	ctacatctgc	aaaaccacca	ttggggacag	ggaggtggat	600
tctgatgcct	actatgtcta	cagactccag	gtgtcatcca	tcaacgtctc	tgtgaacgca	660
gtgcagactg	tggtccgcca	gggtgagaac	atcacctca	tgtgcattgt	gatcggaat	720

10

ES 2 933 558 T3

gaggtggtca	acttcgagtg	gacatacccc	cgcaaagaaa	gtgggaggct	ggtggagccg	780
gtgactgact	tcctcttggg	tatgccttac	cacatccgct	ccatcctgca	catccccagt	840
gccgagttag	aagactcggg	gacctacacc	tgcaatgtga	cggagagtgt	gaatgaccat	900
caggatgaaa	aggccatcaa	catcacctgt	gttgagagcg	gctacgtgcg	gctcctggga	960
gaggtgggca	cactacaatt	tgctgagctg	catcggagcc	ggacactgca	ggtagtggtc	1020
gaggcctacc	caccgcccac	tgtcctgtgg	ttcaaagaca	accgcaccct	gggcgactcc	1080
agcgctggcg	aaatcgccct	gtccacgcgc	aacgtgtcgg	agaccgggta	tgtgtcagag	1140
ctgacactgg	ttcgctgaa	ggtggcagag	gctggccact	acaccatgcg	ggccttccat	1200
gaggatgctg	aggtccagct	ctccttccag	ctacagatca	atgtccctgt	ccgagtgtctg	1260
gagctaagtg	agagccaccc	tgacagtggg	gaacagacag	tccgctgtcg	tggccggggc	1320
atgccccagc	cgaacatcat	ctgggtctgcc	tgacagagacc	tcaaaagggtg	tccacgtgag	1380
ctgccgccca	cgctgctggg	gaacagttcc	gaagaggaga	gccagctgga	gactaacgtg	1440
acgtactggg	aggaggagca	ggagtttgag	gtggtgagca	cactgcgtct	gcagcacgtg	1500
gatcgccac	tgtcggtgcg	ctgcacgtctg	cgcaacgctg	tgggccagga	cacgcaggag	1560
gtcatcgtgg	tgccacactc	cttgcccttt	taa			1593

<210> 17

<211> 1266

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 17

atcggtgcttc	cggtgctgat	gccagctctg	gccctcaaag	gcgagctgct	gttgcgtgtct	60
ctcctgttac	ttctggaacc	acagatctct	cagggcctgg	tcgtcacacc	cccggggcca	120
gagcttgctc	tcaatgtctc	cagcaccttc	gttctgacct	gctcgggttc	agctccggtg	180
gtgtgggaac	ggatgtccca	ggagccccca	caggaaatgg	ccaaggccca	ggatggcacc	240
ttctccagcg	tgctcacact	gaccaacctc	actgggctag	acacgggaga	atacttttgc	300
accacaatg	actcccgtgg	actggagacc	gatgagcgga	aacggctcta	catctttgtg	360
ccagatccca	ccgtgggctt	cctccctaata	gatgccgagg	aactattcat	ctttctcacg	420
gaaataactg	agatcaccat	tccatgccga	gtaacagacc	cacagctggg	ggtgacactg	480
cacgagaaga	aaggggacgt	tgcaactgct	gtcccttatg	atcaccaacg	tggctttttt	540
ggtatctttg	aggacagaag	ctacatctgc	aaaaccacca	ttggggacag	ggaggtggat	600
tctgatgcct	actatgtcta	cagactccag	gtgtcatcca	tcaacgtctc	tgtgaacgca	660
gtgcagactg	tggtccgcca	gggtgagaac	atcacctca	tgtgcattgt	gatcggaat	720
gaggtggtca	acttcgagtg	gacatacccc	cgcaaagaaa	gtgggaggct	ggtggagccg	780
gtgactgact	tcctcttggg	tatgccttac	cacatccgct	ccatcctgca	catccccagt	840
gccgagttag	aagactcggg	gacctacacc	tgcaatgtga	cggagagtgt	gaatgaccat	900
caggatgaaa	aggccatcaa	catcacctgt	gttgagagcg	gctacgtgcg	gctcctggga	960
gaggtgggca	cactacaatt	tgctgagctg	catcggagcc	ggacactgca	ggtagtggtc	1020
gaggcctacc	caccgcccac	tgtcctgtgg	ttcaaagaca	accgcaccct	gggcgactcc	1080
agcgctggcg	aaatcgccct	gtccacgcgc	aacgtgtcgg	agaccgggta	tgtgtcagag	1140
ctgacactgg	ttcgctgaa	ggtggcagag	gctggccact	acaccatgcg	ggccttccat	1200
gaggatgctg	aggtccagct	ctccttccag	ctacagatca	atgtccctgt	ccgagtgtctg	1260
gagtag						1266

10

<210> 18

<211> 2316

<212> ADN

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 18

atgcggttcc	cggtgtcgat	gccagctctg	gccctcaaag	gcgagctgct	gttgctgtct	60
ctcctgttac	ttctggaacc	acagatctct	cagggcctgg	tcgtcacacc	ccgggggcca	120
gagcttgtcc	tcaatgtctc	cagcaccttc	gttctgacct	gctcgggttc	agctccggtg	180
gtgtgggaac	ggatgtccca	ggagccccc	caggaaatgg	ccaaggccca	ggatggcacc	240
ttctccagcg	tgctcacact	gaccaacctc	actgggctag	acacgggaga	atacttttgc	300
acccacaatg	actcccggtg	actggagacc	gatgagcgga	aacggctcta	catctttgtg	360
ccagatccca	ccgtgggctt	cctcccta	gatgccgagg	aactattcat	ctttctcacg	420
gaaataactg	agatcaccat	tccatgccga	gtaacagacc	cacagctggt	ggtgacactg	480
cacgagaaga	aaggggacgt	tgcactgcct	gtccctatg	atcaccaacg	tggctttttt	540
ggatatctttg	aggacagaag	ctacatctgc	aaaaccacca	ttggggacag	ggaggtggat	600
tctgatgcct	actatgtcta	cagactccag	gtgtcatcca	tcaacgtctc	tgtgaacgca	660
gtgcagactg	tggtccgcca	gggtgagaac	atcacctcca	tgtgcattgt	gatcgggaat	720
gaggtgtgca	acttcgagtg	gacatacccc	cgcaaagaaa	gtgggcggtc	ggtggagccg	780
gtgactgact	tcctcttgga	tatgccttac	cacatccgct	ccatcctgca	catccccagt	840
gccgagttag	aagactcggg	gacctacacc	tgcaatgtga	cggagagtg	gaatgaccat	900
caggatgaaa	aggccatcaa	catcaccgtg	gttgagagcg	gctacgtg	gctcctggga	960
gaggtgggca	cactacaatt	tgctgagctg	catcggagcc	ggacactgca	ggtagtgttc	1020
gaggcctacc	caccgcccac	tgctcctgtg	ttcaaagaca	accgcaccct	gggcgactcc	1080
agcgctggcg	aaatcgccct	gtccacgcgc	aacgtgtcgg	agacccggt	tgtgtcagag	1140
ctgacactgg	ttcgctgaa	ggtggcagag	gctggccact	acaccatg	ggccttccat	1200
gaggatgtcg	aggtccagct	ctccttccag	ctacagatca	atgtccctgt	ccgagtgtcg	1260
gagctaagtg	agagccaccc	tgacagtggg	gaacagacag	tccgctgtcg	tggccggggc	1320
atgccccagc	cgaacatcat	ctggtctgcc	tgacagagacc	tcaaaagggt	tccacgtgag	1380
ctgccgccca	cgctgctggg	gaacagtcc	gaagaggaga	gccagctgga	gactaacgtg	1440
acgtactggg	aggaggagca	ggagtgtgag	gtggtgagca	cactgcgtct	gcagcacgtg	1500
gatcgccac	tgctcggtgcg	ctgcacgctg	cgcaacgctg	tgggccagga	cacgcaggag	1560
gtcatcgtgg	tgccacactc	cttgcccttt	accggtggag	gtggagggtg	aggtggaggt	1620
cctaaatctt	gtgacaaaac	tcacacatgc	ccaccgtgcc	cagcacctga	actcctgggg	1680
ggaccgtcag	tcttctctt	cccccaaaa	cccaaggaca	ccctcatgat	ctcccgacc	1740
cctgaggtca	catgcgtggg	ggtggacgtg	agccacgaag	accctgaggt	caagttcaac	1800
tggtacgtgg	acggcgtgga	ggtgcataat	gccaaagaca	agccgcggga	ggagcagtag	1860
aacagcacgt	accgtgtggg	cagcgtcctc	accgtcctgc	accaggactg	gctgaatggc	1920
aaggagtaca	agtccaagg	ctccaacaaa	gccctcccag	cccccatcga	gaaaaccatc	1980
tccaaagcca	aagggcagcc	ccgagaacca	cagggtgtaca	ccctgcccc	atcccggtg	2040
gagctgacca	agaaccaggt	cagcctgacc	tgctgtgtca	aaggcttcta	tcccagcgac	2100
atcgccgtgg	agtgggagag	caatgggcag	ccggagaaca	actacaagac	cacgcctccc	2160
gtgctggact	ccgacggctc	cttcttctc	tacagcaagc	tcaccgtgga	caagagcagg	2220
tggcagcagg	ggaacgtctt	ctcatgctcc	gtgatgcatg	aggctctgca	caaccactac	2280
acgcagaaga	gcctctccct	gtctccgggt	aaatag			2316

5

<210> 19

<211> 1671

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 19

15

ES 2 933 558 T3

atgcggtctc	cggtgtcgat	gccagctctg	gccctcaaag	gcgagctgct	gttgctgtct	60
ctcctgttac	ttctggaacc	acagatctct	cagggccttg	tcgtcacacc	cccggggcca	120
gagcttgtcc	tcaatgtctc	cagcaccttc	gttctgacct	gctcgggttc	agctccggtg	180
gtgtgggaac	ggatgtccca	ggagccccc	caggaaatgg	ccaaggccca	ggatggcacc	240
ttctccagcg	tgctcacact	gaccaacctc	actgggctag	acacgggaga	atacttttgc	300
accacaatg	actcccggtg	actggagacc	gatgagcgga	aacggctcta	catctttgtg	360
ccagatccca	ccgtgggctt	cctcccta	gatgccgagg	aactattcat	ctttctcacg	420
gaaataactg	agatcaccat	tccatgccga	gtaacagacc	cacagctggt	ggtgacactg	480
cacgagaaga	aaggggacgt	tgcactgcct	gtcccctatg	atcaccaacg	tggctttttt	540
ggtatctttg	aggacagaag	ctacatctgc	aaaaccacca	ttggggacag	ggaggtggat	600
tctgatgcct	actatgtcta	cagactccag	gtgtcatcca	tcaacgtctc	tgtgaacgca	660
gtgcagactg	tggtccgcca	gggtgagaac	atcacccctc	tgtgcattgt	gatcgggaat	720
gaggtgggtc	acttcgagtg	gacatacccc	cgcaaagaaa	gtgggcggtc	ggtggagccg	780
gtgactgact	tcctcttgga	tatgccttac	cacatccgct	ccatcctgca	catccccagt	840
gccgagttag	aagactcggg	gacctacacc	tgcaatgtga	cggagagtg	gaatgaccat	900
caggatgaaa	aggccatcaa	catcacctg	gttgagagcg	gctacaccgg	tggaggtgga	960
ggtggaggtg	gaggtcctaa	atcttgtgac	aaaactcaca	catgccacc	gtgccagca	1020
cctgaactcc	tggggggacc	gtcagtcctc	ctcttcccc	caaaccacaa	ggacacctc	1080
atgatctccc	ggacccctga	ggtcacatgc	gtggtggtgg	acgtgagcca	cgaagaccct	1140
gaggtcaagt	tcaactggta	cgtggacggc	gtggaggtgc	ataatgccaa	gacaaagccg	1200
cgggaggagc	agtacaacag	cacgtaccgt	gtggtcagcg	tcctcaccgt	cctgcaccag	1260
gactggctga	atggcaagga	gtacaagtgc	aaggtctcca	acaaagccct	cccagcccc	1320
atcgagaaaa	ccatctccaa	agccaaagg	cagccccgag	aaccacaggt	gtacacctg	1380
ccccatccc	gggatgagct	gaccaagaac	caggtcagcc	tgacctgcct	ggtcaaaggc	1440
ttctatccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	gagagcaatg	ggcagccgga	gaacaactac	1500
aagaccacgc	ctcccgtgct	ggactccgac	ggctccttct	tcctctacag	caagctcacc	1560
gtggacaaga	gcaggtggca	gcaggggaac	gtcttctcat	gctccgtgat	gcatgaggtc	1620
ctgcacaacc	actacacgca	gaagagcctc	tcctgtctc	cgggtaaata	g	1671

<210> 20

5 <211> 1365

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 20

ES 2 933 558 T3

atgcggtctc	cggtgctgat	gccagctctg	gccctcaaag	gcgagctgct	gttgctgtct	60
ctcctgttac	ttctggaacc	acagatctct	cagggcctgg	tcgtcacacc	cccggggcca	120
gagcttggtc	tcaatgtctc	cagcaccttc	gttctgacct	gctcgggttc	agctccggtg	180
gtgtgggaac	ggatgtccca	ggagcccca	caggaaatgg	ccaaggccca	ggatggcacc	240
ttctccagcg	tgctcacact	gaccaacctc	actgggctag	acacgggaga	atacttttgc	300
accacaaatg	actcccggtg	actggagacc	gatgagcgga	aacggctcta	catctttgtg	360
ccagatccca	ccgtgggctt	cctcccta	gatgccgagg	aactattcat	ctttctcacg	420
gaaataactg	agatcaccat	tccatgccga	gtaacagacc	cacagctggt	ggtgacactg	480
cacgagaaga	aaggggacgt	tgcactgcct	gtcccctatg	atcaccaacg	tggctttttt	540
ggtatctttg	aggacagaag	ctacatctgc	aaaaccacca	ttggggacag	ggaggtggat	600
tctgatgcct	actatgtcta	cagactccag	gtgtcatcca	ccggtggagg	tggaggtgga	660
ggtggaggtc	ctaaatcttg	tgacaaaact	cacacatgcc	cacogtgccc	agcacctgaa	720
ctcctggggg	gaccgtcagt	cttcctcttc	cccccaaac	ccaaggacac	cctcatgatc	780
tcccggaacc	ctgaggtcac	atgogtggtg	gtggacgtga	gccacgaaga	ccctgaggtc	840
aagttcaact	ggtacgtgga	cgccgtggag	gtgcataatg	ccaagacaaa	gcccggggag	900
gagcagtaca	acagcacgta	ccgtgtggtc	agcgtcctca	ccgtcctgca	ccaggactgg	960
ctgaatggca	aggagtacaa	gtgcaaggtc	tccaacaaag	ccctcccagc	ccccatcgag	1020
aaaaccatct	ccaaagccaa	agggcagccc	cgagaaccac	aggtgtacac	cctgccccca	1080
tcccgggatg	agctgaccaa	gaaccaggtc	agcctgacct	gcctggtcaa	aggcttctat	1140
cccagcgaca	tcgccgtgga	gtgggagagc	aatgggcagc	cggagaacaa	ctacaagacc	1200
acgcctcccg	tgctggactc	cgacggctcc	ttcttcctct	acagcaagct	caccgtggac	1260
aagagcaggt	ggcagcaggg	gaacgtcttc	tcatgctccg	tgatgcatga	ggctctgcac	1320
aaccactaca	cgcagaagag	cctctccctg	tctccgggta	aatag		1365

<210> 21

<211> 2616

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 21

atggtcagct	actgggacac	cggggtcctg	ctgtgcgcgc	tgctcagctg	tctgcttctc	60
acaggatctg	gtagaccttt	cgtagagatg	tacagtga	tccccgaaat	tatacacatg	120
actgaaggaa	gggagctcgt	cattccctgc	cggttacgt	caccta	actgttact	180
ttaaaaaagt	ttccacttga	cactttgatc	cctgatggaa	aacgcataat	ctgggacagt	240
agaaagggtc	tcatcatatc	aaatgcaacg	tacaaagaaa	tagggcttct	gacctgtgaa	300
gcaacagtca	atgggcattt	gtataagaca	aactatctca	cacatcgaca	aacctcgagt	360
tccagctcct	cttcctcaag	ccagatctct	cagggcctgg	tcgtcacacc	cccggggcca	420
gagcttggtc	tcaatgtctc	cagcaccttc	gttctgacct	gctcgggttc	agctccggtg	480
gtgtgggaac	ggatgtccca	ggagcccca	caggaaatgg	ccaaggccca	ggatggcacc	540
ttctccagcg	tgctcacact	gaccaacctc	actgggctag	acacgggaga	atacttttgc	600
accacacaatg	actcccggtg	actggagacc	gatgagcgga	aacggctcta	catctttgtg	660
ccagatccca	ccgtgggctt	cctcccta	gatgccgagg	aactattcat	ctttctcacg	720
gaaataactg	agatcaccat	tccatgccga	gtaacagacc	cacagctggt	ggtgacactg	780
cacgagaaga	aaggggacgt	tgcactgcct	gtcccctatg	atcaccaacg	tggctttttt	840
ggtatctttg	aggacagaag	ctacatctgc	aaaaccacca	ttggggacag	ggaggtggat	900

ES 2 933 558 T3

tctgatgcct	actatgtcta	cagactccag	gtgtcatcca	tcaacgtctc	tgtgaacgca	960
gtgcagactg	tgggccgcca	gggtgagaac	atcacccctca	tgtgcattgt	gatcggggaat	1020
gaggtggtca	acttcgagtg	gacatacccc	cgcaaagaaa	gtgggcggt	ggtggagccg	1080
gtgactgact	tcctcttgga	tatgccttac	cacatccgct	ccatcctgca	catccccagt	1140
gccgagttag	aagactcggg	gacctacacc	tgcaatgtga	cggagagtg	gaatgaccat	1200
caggatgaaa	aggccatcaa	catcacctg	gttgagagcg	gctacgtg	gctcctggga	1260
gaggtgggca	cactacaatt	tgctgagctg	catcggagcc	ggacactgca	ggtagtgttc	1320
gaggcctacc	caccgcccac	tgtcctgtg	ttcaaagaca	accgcaccct	gggcgactcc	1380
agcgctggcg	aaatcgccct	gtccacgcgc	aacgtgtcgg	agacccggta	tgtgtcagag	1440
ctgacactgg	ttcgcgtaga	ggtggcagag	gctggccact	acacccatgcg	ggccttccat	1500
gaggatgctg	aggtccagct	ctccttccag	ctacagatca	atgtccctgt	ccgagtgtg	1560
gagctaagt	agagccaccc	tgacagtggg	gaacagacag	tccgctgtcg	tggccggggc	1620
atgccccagc	cgaacatcat	ctggtctgcc	tgacagagcc	tcaaaagggt	tccacgtgag	1680
ctgccgcca	cgctgctggg	gaacagttcc	gaagaggaga	gccagctgga	gactaacgtg	1740
acgtactggg	aggaggagca	ggagtgtgag	gtggtgagca	cactgcgtct	gcagcacgtg	1800
gatcgccac	tgtcgtg	ctgcacgtg	cgcaacgtg	tgggccagga	cacgcaggag	1860
gtcatcgtg	tgccacactc	cttgcccttt	accggtggag	gtggaggtg	aggtggaggt	1920
cctaaatctt	gtgacaaaac	tcacacatgc	ccaccgtgcc	cagcacctga	actcctgggg	1980
ggaccgtcag	tcttcctctt	cccccaaaa	cccaaggaca	ccctcatgat	ctcccggacc	2040
cctgaggtca	catgcgtggt	ggtggacgtg	agccacgaag	accctgaggt	caagtccaac	2100
tggtagctg	acggcgtgga	ggtgcataat	gccaagacaa	agccgcggga	ggagcagtac	2160
aacagcacgt	accgtgtggt	cagcgtcctc	accgtcctgc	accaggactg	gctgaatggc	2220
aaggagtaca	agtcaaggt	ctccaacaaa	gccctcccag	cccccatcga	gaaaaccatc	2280
tccaaagcca	aagggcagcc	ccgagaacca	caggtgtaca	ccctgcccc	atcccgggat	2340
gagctgacca	agaaccaggt	cagcctgacc	tgctggtca	aaggcttcta	tcccagcgac	2400
atcgccgtg	agtgggagag	caatgggcag	ccggagaaca	actacaagac	cacgcctccc	2460
gtgctggact	ccgacggctc	cttcttcctc	tacagcaagc	tcaccgtgga	caagagcagg	2520
tggcagcagg	ggaacgtctt	ctcatgctcc	gtgatgcag	aggctctgca	caaccactac	2580
acgcagaaga	gcctctccct	gtctccgggt	aaatag			2616

<210> 22

<211> 2619

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 22

ES 2 933 558 T3

atgcggtctc	cggtgctgat	gccagctctg	gccctcaaag	gcgagctgct	gttgctgtct	60
ctcctgttac	ttctggaacc	acagatctct	cagggcctgg	tcgtcacacc	cccggggcca	120
gagcttggtc	tcaatgtctc	cagcaccttc	gttctgacct	gctcgggttc	agctccggtg	180
gtgtgggaac	ggatgtccca	ggagccccc	caggaaatgg	ccaaggccca	ggatggcacc	240
ttctccagcg	tgctcacact	gaccaacctc	actgggctag	acacgggaga	atacttttgc	300
accacaaatg	actcccggtg	actggagacc	gatgagcggg	aacggctcta	catctttgtg	360
ccagatccca	ccgtgggctt	cctcccta	gatgccgagg	aactattcat	ctttctcacg	420
gaaataactg	agatcaccat	tccatgccga	gtaacagacc	cacagctggt	ggtgacactg	480
cacgagaaga	aaggggacgt	tgcactgcct	gtccctatg	atcaccaacg	tggctttttt	540
ggtatctttg	aggacagaag	ctacatctgc	aaaaccacca	ttggggacag	ggaggtggat	600
tctgatgcct	actatgtcta	cagactccag	gtgtcatcca	tcaacgtctc	tgtgaacgca	660
gtgcagactg	tgggtccgca	gggtgagaac	atcacccctc	tgtgcattgt	gatcgggaat	720
gaggtggtca	acttcgagtg	gacatacccc	cgcaaagaaa	gtgggcggct	ggtggagccg	780
gtgactgact	tcctcttgga	tatgccttac	cacatccgct	ccatcctgca	catccccagt	840
gccgagttag	aagactcggg	gacctacacc	tgcaatgtga	cggagagtgt	gaatgaccat	900
caggatgaaa	aggccatcaa	catcacctgt	gttgagagcg	gctacgtgcg	gctcctggga	960
gaggtgggca	cactacaatt	tgctgagctg	catcggagcc	ggacactgca	ggtagtgttc	1020
gaggcctacc	caccgcccac	tgctcgtggt	ttcaaagaca	accgcaccct	gggcgactcc	1080
agcgctggcg	aaatcgccct	gtccacgcgc	aacgtgtcgg	agaccgggta	tgtgtcagag	1140
ctgacactgg	ttcgctgaa	ggtggcagag	gctggccact	acaccatgcg	ggccttccat	1200
gaggtgctg	aggtccagct	ctccttccag	ctacagatca	atgtccctgt	ccgagtgtctg	1260
gagctaagtg	agagccaccc	tgacagtggg	gaacagacag	tcgctgtcg	tggccggggc	1320
atgccccagc	cgaacatcat	ctggtctgcc	tgacagagacc	tcaaaaggtg	tccacgtgag	1380
ctgccgccca	cgctgctggg	gaacagttcc	gaagaggaga	gccagctgga	gactaacgtg	1440
acgtactggg	aggaggagca	ggagtttgag	gtggtgagca	cactgctgtc	gcagcacgtg	1500
gatcgccac	tgctcggtgcg	ctgcacgctg	cgcaacgctg	tgggccagga	cacgcaggag	1560
gtcatcgtgg	tgccacactc	cttgcccttt	agttccagct	cctcttcctc	aagctcgctc	1620
ttcgtagaga	tgtacagtga	aatccccgaa	attatacaca	tgactgaagg	aaggagctc	1680
gtcattccct	gccgggttac	gtcaccta	atcactgtta	ctttaaaaa	gtttccactt	1740
gacactttga	tcctgatgg	aaaacgcata	atctgggaca	gtagaaagg	cttcatcata	1800
tcaaatgcaa	cgtacaaa	aatagggtct	ctgacctgtg	aagcaacagt	caatgggcat	1860
ttgtataaga	caaactatct	cacacatcga	caaaccgggtg	gaggtggagg	tggaggtgga	1920
ggtcctaaat	cttgtgacaa	aactcacaca	tgcccaccgt	gccagcacc	tgaactcctg	1980
gggggaccgt	cagtcttctc	cttcccccca	aaacccaagg	acaccctcat	gatctcccgg	2040
accctgagg	tcacatgcgt	ggtggtggac	gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagttc	2100
aactggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcat	aatgccaaga	caaagccgcg	ggaggagcag	2160
tacaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcaccgtcc	tgaccagga	ctggctgaat	2220
ggcaaggagt	acaagtgcaa	ggtctccaac	aaagccctcc	cagcccccat	cgagaaaacc	2280
atctccaaag	ccaaagggca	gccccgagaa	ccacaggtgt	acaccctgcc	cccatcccgg	2340
gatgagctga	ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg	tcaaaggctt	ctatcccagc	2400
gacatcgccg	tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgcct	2460
ccggtgctgg	actccgacgg	ctccttcttc	ctctacagca	agctcaccgt	ggacaagagc	2520
aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc	atgaggctct	gcacaaccac	2580
tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccg	ggtaaatag			2619

<210> 23

5 <211> 1971

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 23

ES 2 933 558 T3

atgggtcagct	actgggacac	cggggtcctg	ctgtgcgcgc	tgctcagctg	tctgcttctc	60
acaggatctg	gtagaccttt	cgtagagatg	tacagtgaat	tccccgaaat	tatacacatg	120
actgaaggaa	gggagctcgt	cattccctgc	cggtttacgt	cacctaacat	cactgttact	180
ttaaaaaagt	ttccacttga	cactttgatc	cctgatggaa	aacgcataat	ctgggacagt	240
agaaaaggct	tcatcatatc	aaatgcaacg	tacaaagaaa	tagggcttct	gacctgtgaa	300
gcaacagtca	atgggcattt	gtataagaca	aactatctca	cacatcgaca	aacctcgagt	360
tccagctcct	cttcctcaag	ccagatctct	cagggcctgg	tcgtcacacc	cccggggcca	420
gagcttgtcc	tcaatgtctc	cagcaccttc	gttctgacct	gctcgggttc	agctccggtg	480
gtgtgggaac	ggatgtccca	ggagccccc	caggaaatgg	ccaaggccca	ggatggcacc	540
ttctccagcg	tgctcacact	gaccaacctc	actgggctag	acacgggaga	atacttttgc	600
accacaaatg	actcccggtg	actggagacc	gatgagcgga	aacggctcta	catctttgtg	660
ccagatccca	ccgtgggctt	cctcccta	gatgccgagg	aactattcat	ctttctcacg	720
gaaataactg	agatcaccat	tccatgccga	gtaacagacc	cacagctggt	ggtgacactg	780
cacgagaaga	aaggggacgt	tgcaactgct	gtccctatg	atcaccaacg	tggctttttt	840
ggtatctttg	aggacagaag	ctacatctgc	aaaaccacca	ttggggacag	ggaggtggat	900
tctgatgcct	actatgtcta	cagactccag	gtgtcatcca	tcaacgtctc	tgtgaacgca	960
gtgcagactg	tggtccgcca	gggtgagaac	atcacctca	tgtgcattgt	gatcggaat	1020
gaggtggtca	acttcgagtg	gacatacccc	cgcaaagaaa	gtgggcggt	ggtggagccg	1080
gtctactact	tctcttggga	tatgccttac	cacatccgct	ccatcctgca	catcccagat	1140
gccgagttag	aagactcggg	gacctacacc	tgcaatgtga	cggagagtgt	gaatgaccat	1200
caggatgaaa	aggccatcaa	catcacctgt	gttgagagcg	gctacaccgg	tggaggtgga	1260
ggtggaggtg	gaggtcctaa	atcttgtgac	aaaactcaca	catgccacc	gtgccagca	1320
cctgaactcc	tggggggacc	gtcagtcctc	ctcttcccc	caaaacccaa	ggacaccctc	1380
atgatctccc	ggaccctga	ggtcacatgc	gtggtggtgg	acgtgagcca	cgaagaccct	1440
gaggtcaagt	tcaactggta	cgtggacggc	gtggaggtgc	ataatgccaa	gacaaagccg	1500
cgaggaggagc	agtacaacag	cacgtaccgt	gtggtcagcg	tcctcaccgt	cctgcaccag	1560
gactggctga	atggcaagga	gtacaagtgc	aaggtctcca	acaaagccct	cccagccccc	1620
atcgagaaaa	ccatctccaa	agccaaagg	cagccccgag	aaccacaggt	gtacaccctg	1680
cccccatccc	gggatgagct	gaccaagaac	caggtcagcc	tgacctgcct	ggtcaaaggc	1740
ttctatccca	gcgacatcgc	cgtggagtg	gagagcaatg	ggcagccgga	gaacaactac	1800
aagaccacgc	ctcccgtgct	ggactccgac	ggctccttct	tcctctacag	caagctcacc	1860
gtggacaaga	gcaggtggca	gcaggggaac	gtcttctcat	gctccgtgat	gcatgaggtc	1920
ctgcacaacc	actacacgca	gaagagcctc	tcctgtctc	cgggtaata	g	1971

<210> 24

<211> 1977

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 24

ES 2 933 558 T3

atgaggcttc	cggtgagat	gccagctctg	gccctcaaag	gcgagctgct	gttgctgtct	60
ctcctgttac	ttctggaacc	acagatctct	cagggcctgg	tcgtcacacc	cccggggcca	120
gagcttgctc	tcaatgtctc	cagcaccttc	gttctgacct	gctcgggttc	agctccggtg	180
gtgtgggaac	ggatgtccca	ggagcccca	caggaaatgg	ccaaggcca	ggatggcacc	240
ttctccagcg	tgctcacact	gaccaacctc	actgggctag	acacgggaga	atacttttgc	300
accacaaatg	actcccgtgg	actggagacc	gatgagcgga	aacggctcta	catctttgtg	360
ccagatccca	ccgtgggctt	cctcccta	gatgccgagg	aactattcat	ctttctcacg	420
gaaataactg	agatcaccat	tccatgccga	gtaacagacc	cacagctggt	ggtgacactg	480
cacgagaaga	aaggggacgt	tgcactgcct	gtcccctatg	atcaccaacg	tggctttttt	540
ggtatctttg	aggacagaag	ctacatctgc	aaaaccacca	ttggggacag	ggaggtggat	600
tctgatgcct	actatgtcta	cagactccag	gtgtcatcca	tcaacgtctc	tgtgaacgca	660
gtgcagactg	tggtccgcca	gggtgagaac	atcacccctca	tgtgcattgt	gatcgggaat	720
gaggtggtca	acttcgagtg	gacatacccc	cgcaaagaaa	gtgggaggct	ggtggagccg	780
gtgactgact	tcctcttga	tatgccttac	cacatccgct	ccatcctgca	catccccagt	840
gccgagttag	aagactcggg	gacctacacc	tgcaatgtga	cggagagtgt	gaatgaccat	900
caggatgaaa	aggccatcaa	catcacctg	gttgagagcg	gctacagttc	cagctcctct	960
tcctcaagct	cgagaccttt	cgtagagatg	tacagtga	tccccgaaat	tatacacatg	1020
actgaaggaa	gggagctcgt	cattccctgc	cgggttacgt	cacctaacat	caactgttact	1080
ttaaaaaagt	ttccacttga	cactttgatc	cctgatggaa	aacgcataat	ctgggacagt	1140
agaaagggtc	tcatcatatc	aaatgcaacg	tacaaagaaa	tagggcttct	gacctgtgaa	1200
gcaacagtca	atgggcattt	gtataagaca	aactatctca	cacatcgaca	aaccggtgga	1260
ggtggagggtg	gaggtggagg	tcctaaatct	tgtgacaaaa	ctcacacatg	cccaccgtgc	1320
ccagcacctg	aactcctggg	gggaccgtca	gtcttcctct	ttcccccaaa	acccaaggac	1380
accctcatga	tctcccgga	ccctgaggtc	acatgcgtgg	tggtggacgt	gagccacgaa	1440
gacctgagg	tcaagttcaa	ctggtacgtg	gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	1500
aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg	taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	1560
caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtac	aagtgcgaag	tctccaacaa	agccctccca	1620
gcccccatcg	agaaaaccat	ctccaaagcc	aaagggcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	1680
accctgcccc	catcccgga	tgagctgacc	aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	1740
aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	gagtgaggga	gcaatgggca	gccggagaa	1800
aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	tccgacggct	ccttcttcct	ctacagcaag	1860
ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	gggaacgtct	tctcatgtct	cgtgatgcac	1920
gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag	agcctctccc	tgtctccggg	taaatag	1977

<210> 25

<211> 23

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 25

gactagtatg cggttccgg ggtg 23

<210> 26

15 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Construcción sintética

<400> 26
accggtggat gacacctgga gtctg 25

5 <210> 27
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

 <400> 27
 ctatgtctac agactccagg tgct 24

15 <210> 28
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

 <400> 28

25 accggtaaag ggcaaggagt gtggc 25

 <210> 29
 <211> 32
 <212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Construcción sintética

35 <400> 29
 cctccaccgg ttagccgct ctaaccacg gt 32

<210> 30
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 30
 10 cccgggacta gtatgcggct tccgggtg 28
 <210> 31
 <211> 11
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 20 <400> 31
 ccggttaggg a 11
 <210> 32
 <211> 11
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 30 <400> 32
 ggcttccta a 11
 <210> 33
 35 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

	<220>	
	<223> Construcción sintética	
5	<400> 33	
	tgagggtccag ctctccttcc agctacagat caatgtccct gtccgagtgc tggagtagc 59	
	<210> 34	
	<211> 60	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
15	<400> 34	
	ggccgctact ccagcactcg gacagggaca ttgatctgta gctggaagga gagctggacc 60	
	<210> 35	
20	<211> 407	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Construcción sintética	
	<400> 35	
	actagtggcg gccgccacca tggtcagcta ctgggacacc ggggtcctgc tgtgcgcgct 60	
	gctcagctgt ctgcttctca caggatctgg tagaccttc gtagagatgt acagtgaaat 120	
	ccccgaaatt atacacatga ctgaaggaag ggagctcgtc attccctgcc gggttacgtc 180	
	acctaacatc actgttactt taaaaaagtt tccacttgac actttgatcc ctgatggaaa 240	
	acgcataatc tgggacagta gaaagggctt catcatatca aatgcaacgt acaaagaaat 300	
	agggcttctg acctgtgaag caacagtcaa tgggcatttg tataagacaa actatctcac 360	
	acatcgacaa acctcgagtt ccagctcctc ttcctcaagc cagatct 407	
30	<210> 36	
	<211> 689	
	<212> ADN	

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<400> 36

ccacgctgct	ggggaacagt	tccgaagagg	agagccagct	ggagactaac	gtgacgtact	60
gggaggagga	gcaggagttt	gaggtggtga	gcacactgcg	tctgcagcac	gtggatcggc	120
cactgtcggg	gcgctgcacg	ctgcgcaacg	ctgtgggcca	ggacacgcag	gaggtcatcg	180
tggtgccaca	ctccttgccc	tttagttcca	gctcctcttc	ctcaagctcg	agacctttcg	240
tagagatgta	cagtgaatc	cccgaatata	tacacatgac	tgaagggaag	gagctcgtca	300
ttccctgccg	ggttacgtca	cctaaccatca	ctgttacttt	aaaaaagttt	ccacttgaca	360
ctttgatccc	tgatggaaaa	cgcataatct	gggacagtag	aaagggcttc	atcatatcaa	420
atgcaacgta	caaagaaata	gggttctctga	cctgtgaagc	aacagtcaat	gggcatttgt	480
ataagacaaa	ctatctcaca	catcgacaaa	ccggtggagg	tggaggtgga	ggtggaggtc	540
ctaaatcttg	tgacaaaact	cacacatgcc	caccgtgccc	agcacctgaa	ctcctggggg	600
gaccgtcagt	cttcctcttc	cccccaaac	ccaaggacac	cctcatgatc	tcccggaccc	660
ctgaggtcac	atgcgtggtg	gtggacgtg				689

10

<210> 37

<211> 460

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 37

20

gactgtggtc	cgccagggtg	agaacatcac	cctcatgtgc	attgtgatcg	ggaatgaggt	60
ggtcaacttc	gagtggacat	acccccgcaa	agaaagtggg	cggtggtgg	agccggtgac	120
tgacttcctc	ttggatatgc	cttaccacat	ccgctccatc	ctgcacatcc	ccagtgccga	180
gttagaagac	tcggggacct	acacctgcaa	tgtgacggag	agtgtgaatg	accatcagga	240
tgaaaaggcc	atcaacatca	ccgtggttga	gagcggctac	accggtggag	gtggaggtgg	300
agggtggaggt	cctaaatctt	gtgacaaaac	tcacacatgc	ccaccgtgcc	cagcacctga	360
actcctgggg	ggaccgtcag	tcttcctctt	ccccccaaa	cccaaggaca	ccctcatgat	420
ctcccggacc	cctgaggtca	catgcgtggt	ggtggacgtg			460

<210> 38

<211> 766

25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 38

5 gactgtggtc cgccaggggtg agaacatcac cctcatgtgc attgtgatcg ggaatgaggt 60
 ggtcaacttc gagtggacat acccccgcaa agaaagtggg cggctgggtg agccggtgac 120
 tgacttcctc ttggatatgc cttaccacat ccgctccatc ctgcacatcc ccagtgccga 180
 gttagaagac tcggggacct acacctgcaa tgtgacggag agtgtgaatg accatcagga 240
 tgaaaaggcc atcaacatca ccgtggttga gagcggctac agttccagct cctcttcctc 300
 aagctcgaga cctttcgtag agatgtacag tgaaatcccc gaaattatac acatgactga 360
 aggaaggag ctcgtcattc cctgccgggt tacgtcacct aacatcactg ttactttaa 420
 aaagtttcca cttgacactt tgatccctga tggaaaacgc ataactctgg acagtagaaa 480
 gggcttcatc atatcaaag caacgtacaa agaaataggg cttctgacct gtgaagcaac 540
 agtcaatggg catttgtata agacaaacta tctcacacat cgacaaaccg gtggaggtgg 600
 aggtggaggt ggaggtccta aatcttgtga caaaactcac acatgccac cgtgccagc 660
 acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct 720
 catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtg 766

<210> 39

<211> 233

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15 <400> 39

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

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

<210> 40

<211> 702

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 40

atgggtcagct	actgggacac	cggggtcctg	ctgtgcgcgc	tgctcagctg	tctgcttctc	60
acaggatctg	gtagaccttt	cgtagagatg	tacagtgaat	tccccgaaat	tatacacatg	120
actgaaggaa	gggagctcgt	cattccctgc	cgggttacgt	cacctaacat	cactgttact	180
ttaaaaaagt	ttccacttga	cactttgatc	cctgatggaa	aacgcataat	ctgggacagt	240
agaaagggct	tcatcatatc	aaatgcaacg	tacaaagaaa	tagggcttct	gacctgtgaa	300
gcaacagtca	atgggcattt	gtataagaca	aactatctca	cacatcgaca	aaccggtgga	360
gggtggagggtg	gaggtggagg	tcagccccga	gaaccacagg	tgtacaccct	gcccccatcc	420
cgggatgagc	tgaccaagaa	ccagggtcagc	ctgacctgcc	tggtcaaagg	cttctatccc	480
agcgacatcg	ccgtggagtg	ggagagcaat	gggcagccgg	agaacaacta	caagaccacg	540
cctcccgtgc	tgactccga	cggtccttct	ttcctctaca	gcaagctcac	cgtggacaag	600
agcaggtggc	agcaggggaa	cgtcttctca	tgctccgtga	tgcatgaggc	tctgcacaa	660
cactacacgc	agaagagcct	ctccctgtct	cgggttaaat	ag		702

15

<210> 41

<211> 78

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

ES 2 933 558 T3

<400> 41

```
cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccacgc 60
ccgggctttg cccgggcg                                     78
```

5

<210> 42

<211> 847

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 42

15

ES 2 933 558 T3

Arg	Pro	Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Ile	Ile	His	Met
1				5				10						15	
Thr	Glu	Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	Asn
			20					25					30		
Ile	Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	Asp
		35					40					45			
Gly	Lys	Arg	Ile	Ile	Trp	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe	Ile	Ile	Ser	Asn
	50					55					60				
Ala	Thr	Tyr	Lys	Glu	Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	Asn
65					70					75					80
Gly	His	Leu	Tyr	Lys	Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	His	Arg	Gln	Thr	Ser	Ser
				85					90					95	
Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Gln	Ile	Ser	Gln	Gly	Leu	Val	Val	Thr
			100					105					110		
Pro	Pro	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Leu	Asn	Val	Ser	Ser	Thr	Phe	Val	Leu
		115					120					125			
Thr	Cys	Ser	Gly	Ser	Ala	Pro	Val	Val	Trp	Glu	Arg	Met	Ser	Gln	Glu
	130					135						140			
Pro	Pro	Gln	Glu	Met	Ala	Lys	Ala	Gln	Asp	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Val
145					150					155					160
Leu	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Phe	Cys
				165				170						175	
Thr	His	Asn	Asp	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu	Thr	Asp	Glu	Arg	Lys	Arg	Leu
			180					185					190		
Tyr	Ile	Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Thr	Val	Gly	Phe	Leu	Pro	Asn	Asp	Ala
		195					200					205			
Glu	Glu	Leu	Phe	Ile	Phe	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Glu	Ile	Thr	Ile	Pro
	210					215					220				
Cys	Arg	Val	Thr	Asp	Pro	Gln	Leu	Val	Val	Thr	Leu	His	Glu	Lys	Lys
225					230					235					240
Gly	Asp	Val	Ala	Leu	Pro	Val	Pro	Tyr	Asp	His	Gln	Arg	Gly	Phe	Phe
				245					250					255	
Gly	Ile	Phe	Glu	Asp	Arg	Ser	Tyr	Ile	Cys	Lys	Thr	Thr	Ile	Gly	Asp
		260						265					270		
Arg	Glu	Val	Asp	Ser	Asp	Ala	Tyr	Tyr	Val	Tyr	Arg	Leu	Gln	Val	Ser
		275					280					285			
Ser	Ile	Asn	Val	Ser	Val	Asn	Ala	Val	Gln	Thr	Val	Val	Arg	Gln	Gly
	290					295					300				
Glu	Asn	Ile	Thr	Leu	Met	Cys	Ile	Val	Ile	Gly	Asn	Glu	Val	Val	Asn
305					310					315					320
Phe	Glu	Trp	Thr	Tyr	Pro	Arg	Lys	Glu	Ser	Gly	Arg	Leu	Val	Glu	Pro
			325					330						335	
Val	Thr	Asp	Phe	Leu	Leu	Asp	Met	Pro	Tyr	His	Ile	Arg	Ser	Ile	Leu
			340					345					350		
His	Ile	Pro	Ser	Ala	Glu	Leu	Glu	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn
		355					360					365			
Val	Thr	Glu	Ser	Val	Asn	Asp	His	Gln	Asp	Glu	Lys	Ala	Ile	Asn	Ile
	370					375					380				
Thr	Val	Val	Glu	Ser	Gly	Tyr	Val	Arg	Leu	Leu	Gly	Glu	Val	Gly	Thr
385					390					395					400
Leu	Gln	Phe	Ala	Glu	Leu	His	Arg	Ser	Arg	Thr	Leu	Gln	Val	Val	Phe
			405						410					415	
Glu	Ala	Tyr	Pro	Pro	Thr	Val	Leu	Trp	Phe	Lys	Asp	Asn	Arg	Thr	
			420				425					430			
Leu	Gly	Asp	Ser	Ser	Ala	Gly	Glu	Ile	Ala	Leu	Ser	Thr	Arg	Asn	Val
	435					440						445			
Ser	Glu	Thr	Arg	Tyr	Val	Ser	Glu	Leu	Thr	Leu	Val	Arg	Val	Lys	Val
	450					455				460					
Ala	Glu	Ala	Gly	His	Tyr	Thr	Met	Arg	Ala	Phe	His	Glu	Asp	Ala	Glu
465					470					475					480
Val	Gln	Leu	Ser	Phe	Gln	Leu	Gln	Ile	Asn	Val	Pro	Val	Arg	Val	Leu

ES 2 933 558 T3

			485					490					495				
Glu	Leu	Ser	Glu	Ser	His	Pro	Asp	Ser	Gly	Glu	Gln	Thr	Val	Arg	Cys		
			500					505					510				
Arg	Gly	Arg	Gly	Met	Pro	Gln	Pro	Asn	Ile	Ile	Trp	Ser	Ala	Cys	Arg		
			515					520					525				
Asp	Leu	Lys	Arg	Cys	Pro	Arg	Glu	Leu	Pro	Pro	Thr	Leu	Leu	Gly	Asn		
			530					535					540				
Ser	Ser	Glu	Glu	Glu	Ser	Gln	Leu	Glu	Thr	Asn	Val	Thr	Tyr	Trp	Glu		
			545					550					555				
Glu	Glu	Gln	Glu	Phe	Glu	Val	Val	Ser	Thr	Leu	Arg	Leu	Gln	His	Val		
			565					570					575				
Asp	Arg	Pro	Leu	Ser	Val	Arg	Cys	Thr	Leu	Arg	Asn	Ala	Val	Gly	Gln		
			580					585					590				
Asp	Thr	Gln	Glu	Val	Ile	Val	Val	Pro	His	Ser	Leu	Pro	Phe	Thr	Gly		
			595					600					605				
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His		
			610					615					620				
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val		
			625					630					635				
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr		
			645					650					655				
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu		
			660					665					670				
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys		
			675					680					685				
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser		
			690					695					700				
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys		
			705					710					715				
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile		
			725					730					735				
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro		
			740					745					750				
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu		
			755					760					765				
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn		
			770					775					780				
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser		
			785					790					795				
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg		
			805					810					815				
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu		
			820					825					830				
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
			835					840					845				

<210> 43

<211> 841

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Construcción sintética

10

<400> 43

ES 2 933 558 T3

```

Leu Val Val Thr Pro Pro Gly Pro Glu Leu Val Leu Asn Val Ser Ser
 1          5          10          15
Thr Phe Val Leu Thr Cys Ser Gly Ser Ala Pro Val Val Trp Glu Arg
          20          25          30
Met Ser Gln Glu Pro Pro Gln Glu Met Ala Lys Ala Gln Asp Gly Thr
          35          40          45
Phe Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Asn Leu Thr Gly Leu Asp Thr Gly
 50          55          60

Glu Tyr Phe Cys Thr His Asn Asp Ser Arg Gly Leu Glu Thr Asp Glu
65          70          75          80
Arg Lys Arg Leu Tyr Ile Phe Val Pro Asp Pro Thr Val Gly Phe Leu
          85          90          95
Pro Asn Asp Ala Glu Glu Leu Phe Ile Phe Leu Thr Glu Ile Thr Glu
          100          105          110
Ile Thr Ile Pro Cys Arg Val Thr Asp Pro Gln Leu Val Val Thr Leu
          115          120          125
His Glu Lys Lys Gly Asp Val Ala Leu Pro Val Pro Tyr Asp His Gln
          130          135          140
Arg Gly Phe Phe Gly Ile Phe Glu Asp Arg Ser Tyr Ile Cys Lys Thr
145          150          155          160
Thr Ile Gly Asp Arg Glu Val Asp Ser Asp Ala Tyr Tyr Val Tyr Arg
          165          170          175
Leu Gln Val Ser Ser Ile Asn Val Ser Val Asn Ala Val Gln Thr Val
          180          185          190
Val Arg Gln Gly Glu Asn Ile Thr Leu Met Cys Ile Val Ile Gly Asn
          195          200          205
Glu Val Val Asn Phe Glu Trp Thr Tyr Pro Arg Lys Glu Ser Gly Arg
210          215          220
Leu Val Glu Pro Val Thr Asp Phe Leu Leu Asp Met Pro Tyr His Ile
225          230          235          240
Arg Ser Ile Leu His Ile Pro Ser Ala Glu Leu Glu Asp Ser Gly Thr
          245          250          255
Tyr Thr Cys Asn Val Thr Glu Ser Val Asn Asp His Gln Asp Glu Lys
260          265          270
Ala Ile Asn Ile Thr Val Val Glu Ser Gly Tyr Val Arg Leu Leu Gly
275          280          285
Glu Val Gly Thr Leu Gln Phe Ala Glu Leu His Arg Ser Arg Thr Leu
290          295          300
Gln Val Val Phe Glu Ala Tyr Pro Pro Pro Thr Val Leu Trp Phe Lys
305          310          315          320
Asp Asn Arg Thr Leu Gly Asp Ser Ser Ala Gly Glu Ile Ala Leu Ser
          325          330          335
Thr Arg Asn Val Ser Glu Thr Arg Tyr Val Ser Glu Leu Thr Leu Val
          340          345          350
Arg Val Lys Val Ala Glu Ala Gly His Tyr Thr Met Arg Ala Phe His
          355          360          365
Glu Asp Ala Glu Val Gln Leu Ser Phe Gln Leu Gln Ile Asn Val Pro
370          375          380
Val Arg Val Leu Glu Leu Ser Glu Ser His Pro Asp Ser Gly Glu Gln
385          390          395          400
Thr Val Arg Cys Arg Gly Arg Gly Met Pro Gln Pro Asn Ile Ile Trp
          405          410          415
Ser Ala Cys Arg Asp Leu Lys Arg Cys Pro Arg Glu Leu Pro Pro Thr
          420          425          430
Leu Leu Gly Asn Ser Ser Glu Glu Glu Ser Gln Leu Glu Thr Asn Val
          435          440          445
Thr Tyr Trp Glu Glu Glu Gln Glu Phe Glu Val Val Ser Thr Leu Arg
          450          455          460
Leu Gln His Val Asp Arg Pro Leu Ser Val Arg Cys Thr Leu Arg Asn
465          470          475          480
Ala Val Gly Gln Asp Thr Gln Glu Val Ile Val Val Pro His Ser Leu
          485          490          495
Pro Phe Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Arg Pro Phe Val Glu
          500          505          510
Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu
          515          520          525
Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu
          530          535          540
Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile
545          550          555          560
Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu

```

ES 2 933 558 T3

Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	His	Leu	Tyr	Lys
			580					585					590		
Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	His	Arg	Gln	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
		595					600					605			
Gly	Gly	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
	610					615					620				
Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
625					630					635					640
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
				645					650					655	
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
			660					665					670		
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
		675					680					685			
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
	690					695					700				
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
705					710					715					720
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
				725					730					735	
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu
			740					745					750		
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
		755					760					765			
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
	770					775					780				
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
785					790					795					800
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val
				805					810					815	
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln
			820					825					830		
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
		835					840								

<210> 44

<211> 632

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Construcción sintética

10

<400> 44

ES 2 933 558 T3

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

ES 2 933 558 T3

Pro	Pro	Gln	Glu	Met	Ala	Lys	Ala	Gln	Asp	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Val
145				150					155						160
Leu	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Thr	Gly	Leu	Asp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Phe	Cys
				165					170						175
Thr	His	Asn	Asp	Ser	Arg	Gly	Leu	Glu	Thr	Asp	Glu	Arg	Lys	Arg	Leu
			180						185					190	
Tyr	Ile	Phe	Val	Pro	Asp	Pro	Thr	Val	Gly	Phe	Leu	Pro	Asn	Asp	Ala
		195						200				205			
Glu	Glu	Leu	Phe	Ile	Phe	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Glu	Ile	Thr	Ile	Pro
	210					215					220				
Cys	Arg	Val	Thr	Asp	Pro	Gln	Leu	Val	Val	Thr	Leu	His	Glu	Lys	Lys
225					230					235					240
Gly	Asp	Val	Ala	Leu	Pro	Val	Pro	Tyr	Asp	His	Gln	Arg	Gly	Phe	Phe
			245						250					255	
Gly	Ile	Phe	Glu	Asp	Arg	Ser	Tyr	Ile	Cys	Lys	Thr	Thr	Ile	Gly	Asp
		260						265					270		
Arg	Glu	Val	Asp	Ser	Asp	Ala	Tyr	Tyr	Val	Tyr	Arg	Leu	Gln	Val	Ser
	275						280					285			
Ser	Ile	Asn	Val	Ser	Val	Asn	Ala	Val	Gln	Thr	Val	Val	Arg	Gln	Gly
	290					295					300				
Glu	Asn	Ile	Thr	Leu	Met	Cys	Ile	Val	Ile	Gly	Asn	Glu	Val	Val	Asn
305					310					315					320
Phe	Glu	Trp	Thr	Tyr	Pro	Arg	Lys	Glu	Ser	Gly	Arg	Leu	Val	Glu	Pro
			325						330					335	
Val	Thr	Asp	Phe	Leu	Leu	Asp	Met	Pro	Tyr	His	Ile	Arg	Ser	Ile	Leu
		340					345						350		
His	Ile	Pro	Ser	Ala	Glu	Leu	Glu	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn
	355						360					365			
Val	Thr	Glu	Ser	Val	Asn	Asp	His	Gln	Asp	Glu	Lys	Ala	Ile	Asn	Ile
	370					375					380				
Thr	Val	Val	Glu	Ser	Gly	Tyr	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
385					390					395					400
Gly	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
			405						410					415	
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro
		420						425					430		
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val
	435						440					445			
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
	450					455					460				
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln
465					470					475					480
Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
			485						490					495	
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala
		500						505					510		
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro
	515						520					525			
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr
	530					535					540				
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
545					550					555					560
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
			565						570					575	
Lys	Thr	Thr	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	
		580					585					590			
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe
	595						600					605			
Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys
	610					615					620				
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
625					630										

<210> 45

<211> 626

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 45

5

```

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

```

ES 2 933 558 T3

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
435 440 445
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
450 455 460
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
465 470 475 480
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
485 490 495
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
500 505 510
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
515 520 525
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
530 535 540
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
545 550 555 560
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
565 570 575
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
580 585 590
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
595 600 605
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
610 615 620
Gly Lys
625

<210> 46

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 46

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

15 <210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 47

ES 2 933 558 T3

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 48

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 48

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
1 5

15

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 49

25

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
1 5

<210> 50

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

35

ES 2 933 558 T3

<400> 50

Gly Gly Gly Gly Gly Cys Pro Pro Cys
1 5

5 <210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 51

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

15

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25 <400> 52

Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn
1 5 10

30 <210> 53

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Construcción sintética

ES 2 933 558 T3

<400> 53

Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn
1 5 10

5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 54

15

Gly Asp Leu Ile Tyr Arg Asn Gln Lys
1 5

<210> 55

<211> 23

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<400> 55

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
1 5 10 15
Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn
20

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende (a) una porción extracelular de un receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR β) que comprende los dominios de tipo Ig D1-D3 del PDGFR β , (b) una porción extracelular de un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y (c) un dominio de multimerización que comprende una región Fc de un anticuerpo IgG1, en donde la proteína de fusión se une a un PDGF y un VEGF, en donde la proteína de fusión está dispuesta de extremo N a extremo C en el siguiente orden: (a), (b) y (c), en donde la proteína de fusión comprende un péptido conector entre (a) y (b) que comprende Ser₉ (SEQ ID NO: 49), en donde la proteína de fusión comprende un conector entre (b) y (c) que comprende Gly₉ (SEQ ID NO: 47), y en donde la porción extracelular de un receptor de VEGF consiste en el dominio de tipo Ig D2.
2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde la porción extracelular de PDGFR comprende:
 - (a) dominios de tipo Ig D1-D5 de PDGFR β ;
 - (b) una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 85 % de identidad con SEQ ID NO: 1 o 3; o
 - (c) la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o 3.
3. La proteína de fusión de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la porción extracelular del receptor de VEGF comprende:
 - (a) una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 85 % de identidad con SEQ ID NO: 4; o
 - (b) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.
4. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el dominio de multimerización comprende:
 - (a) una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 85 % de identidad con SEQ ID NO: 6; o
 - (b) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
5. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, 15, 43 o 45 o una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 85 % de identidad con SEQ ID NO: 13, 15, 43 o 45.
6. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la proteína de fusión está en una forma dimérica o multimérica.
7. Una composición que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
9. Una célula hospedadora que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
10. Un método de producción de una proteína de fusión, que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en una condición que produce la proteína de fusión, y recuperar la proteína de fusión producida por la célula hospedadora.
11. Una proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de la proteína de fusión al sujeto.
12. La proteína de fusión para su uso según la reivindicación 11, en donde el sujeto tiene degeneración macular, degeneración macular senil húmeda, degeneración macular senil seca, retinopatía diabética proliferativa, cáncer, artritis reumatoide, osteoartritis, asma, uveítis o neovascularización de la córnea, y en donde la proteína de fusión se administra opcionalmente por inyección intravítrea al sujeto.
13. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
14. Una partícula de vector de virus recombinante adenoasociado (rAAV) que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
15. Un método de producción de una partícula de rAAV, que comprende:

- 5 (a) cultivar una célula hospedadora en una condición tal que se producen partículas de rAAV, en donde la célula hospedadora comprende (i) uno o más genes de encapsidación de AAV, en donde cada dicho gen de encapsidación de AAV codifica una proteína de replicación o encapsidación de AAV; (ii) un pro-vector de rAAV que comprende un nucleótido que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 flanqueada por al menos una ITR de AAV, y (iii) una función auxiliar de AAV; y
- (b) recuperar las partículas de rAAV producidas por la célula hospedadora.
16. Una partícula de rAAV de la reivindicación 14 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad en un sujeto, en donde el método comprende administrar una cantidad eficaz de la partícula de rAAV al sujeto.
- 10 17. La partícula de rAAV para su uso según la reivindicación 16, en donde el sujeto tiene degeneración macular, degeneración macular senil húmeda, degeneración macular senil seca, retinopatía diabética proliferativa, cáncer, artritis reumatoide, osteoartritis, asma, uveítis o neovascularización de la córnea, y en donde la partícula de rAAV se administra opcionalmente por inyección intravítrea al sujeto.

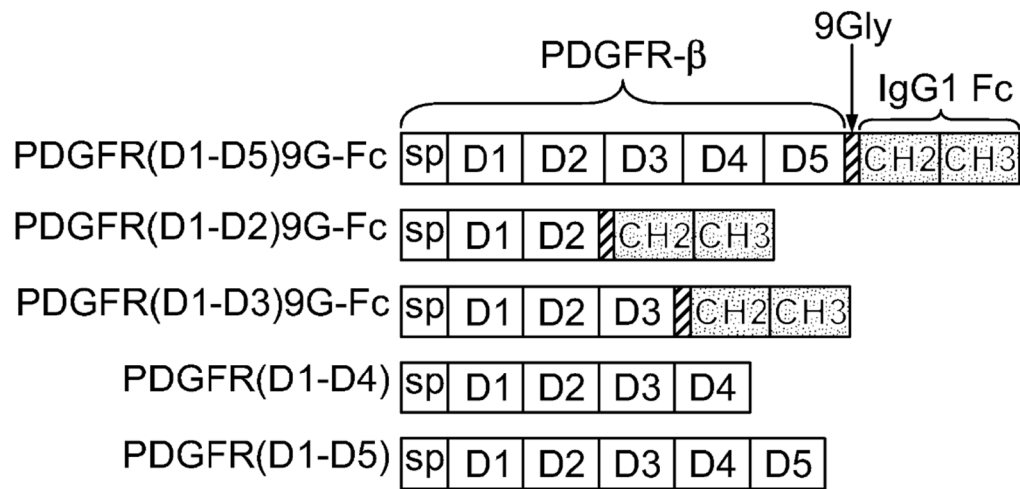


FIG. 1A

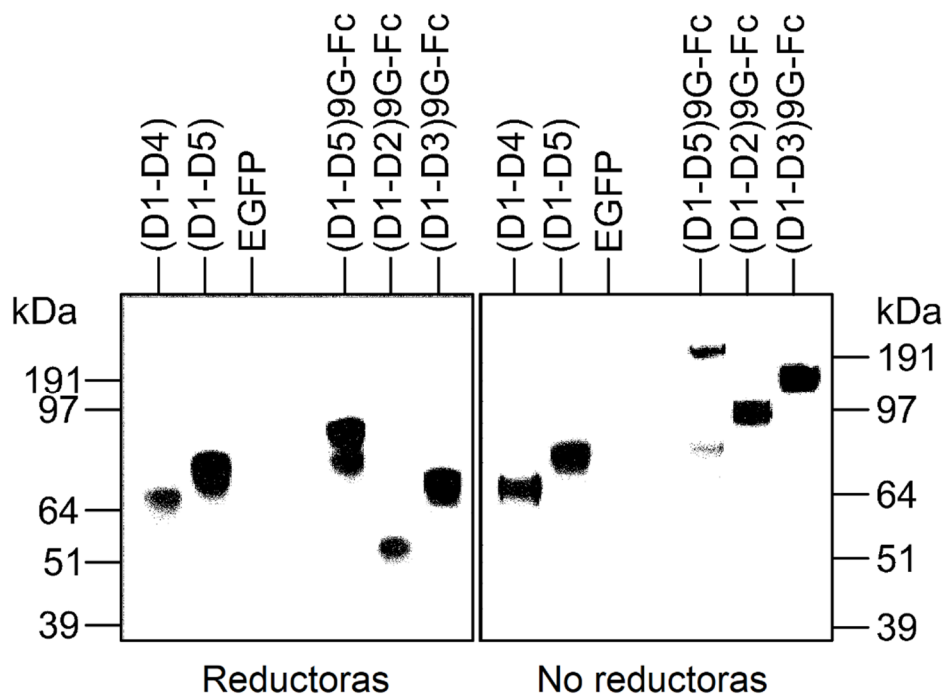
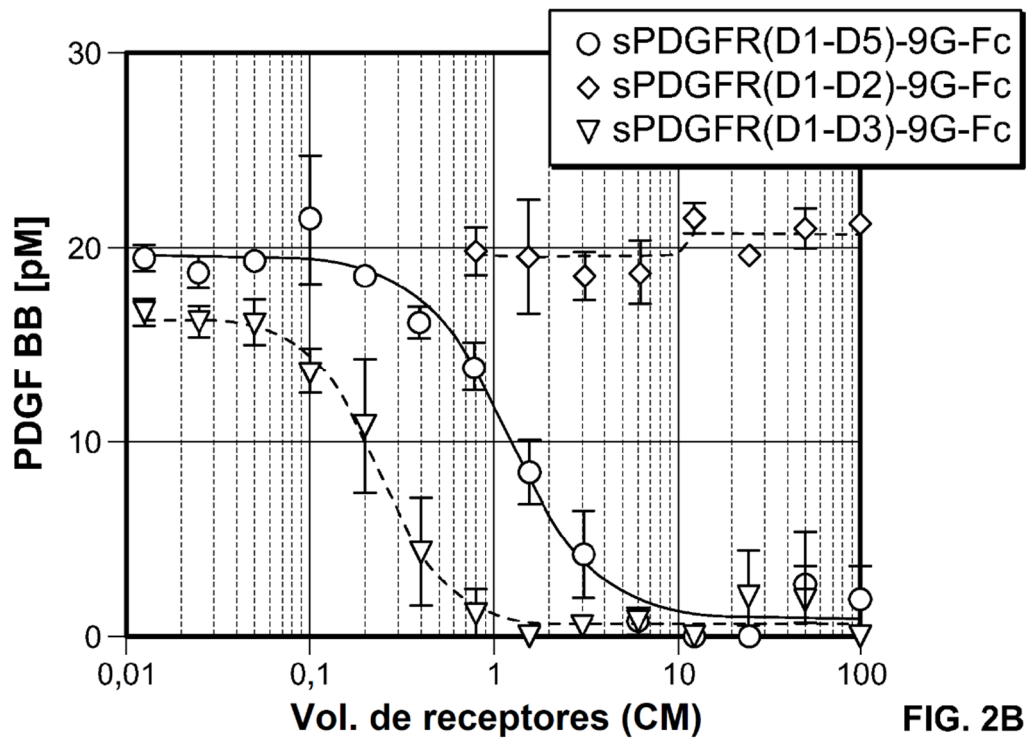
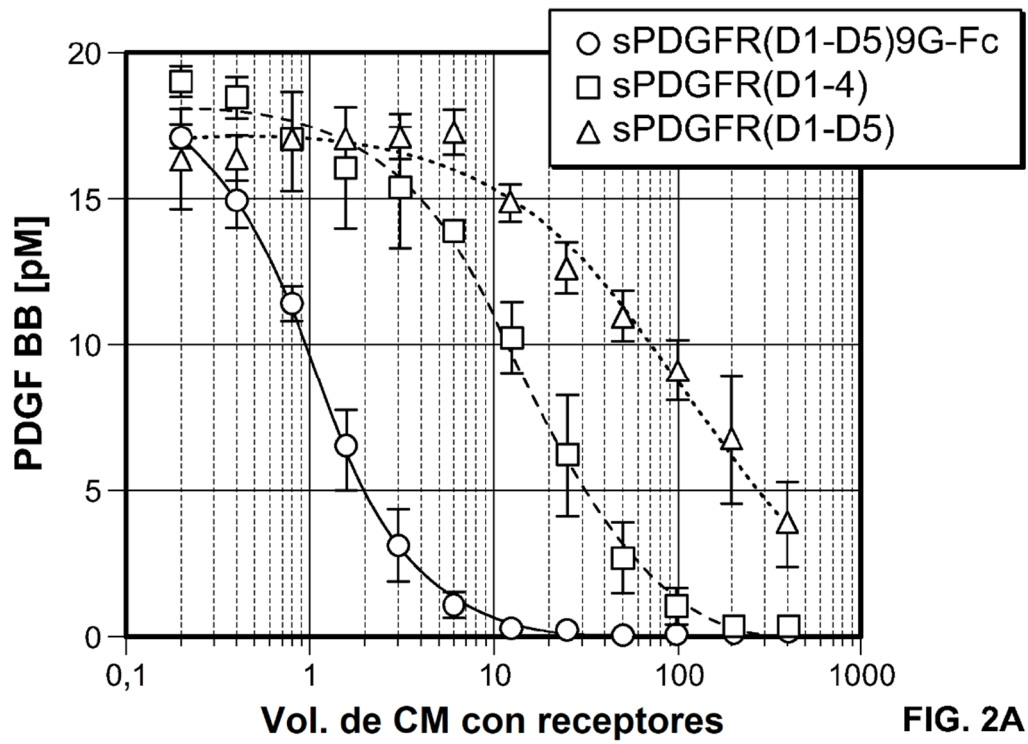


FIG. 1B



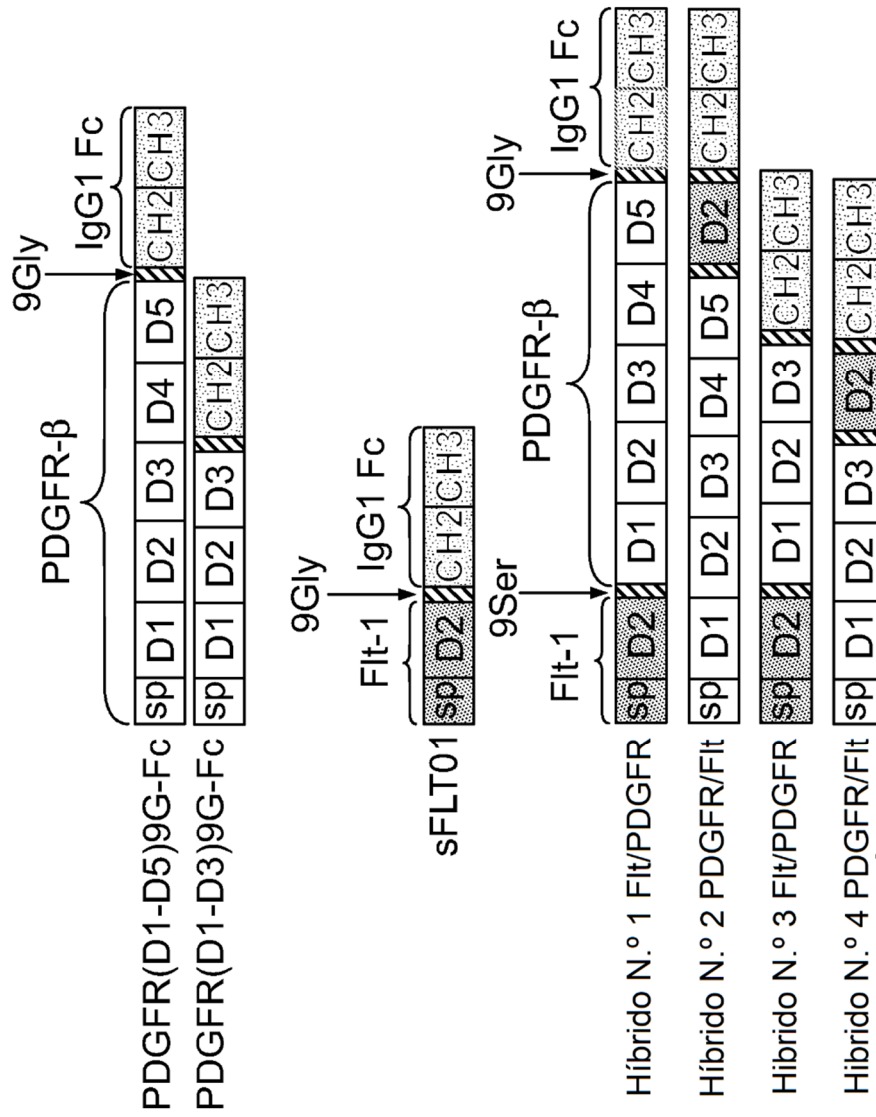


FIG. 3

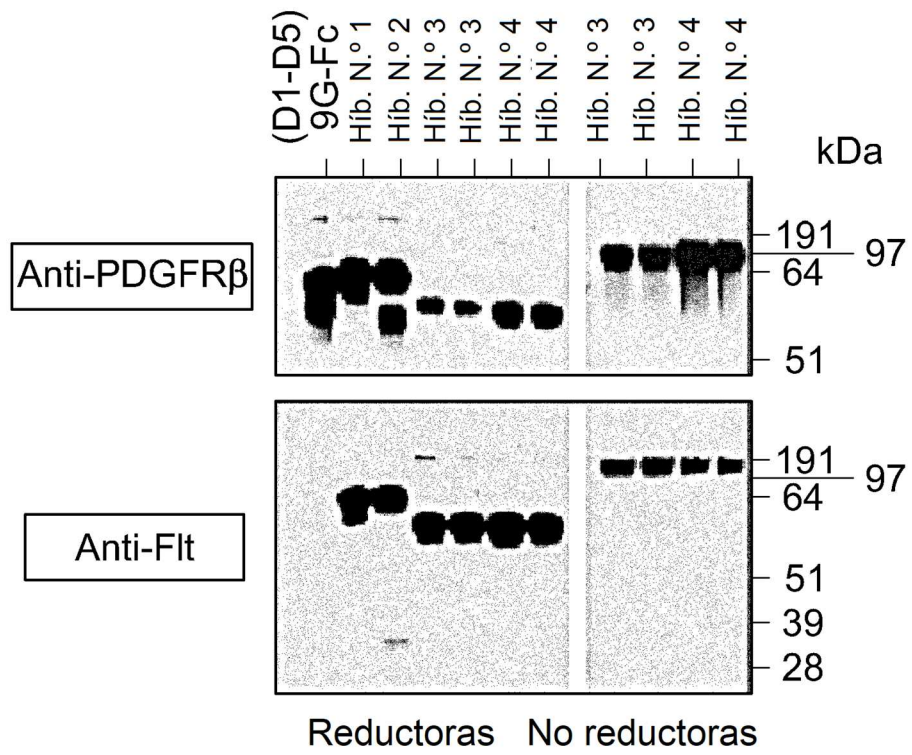
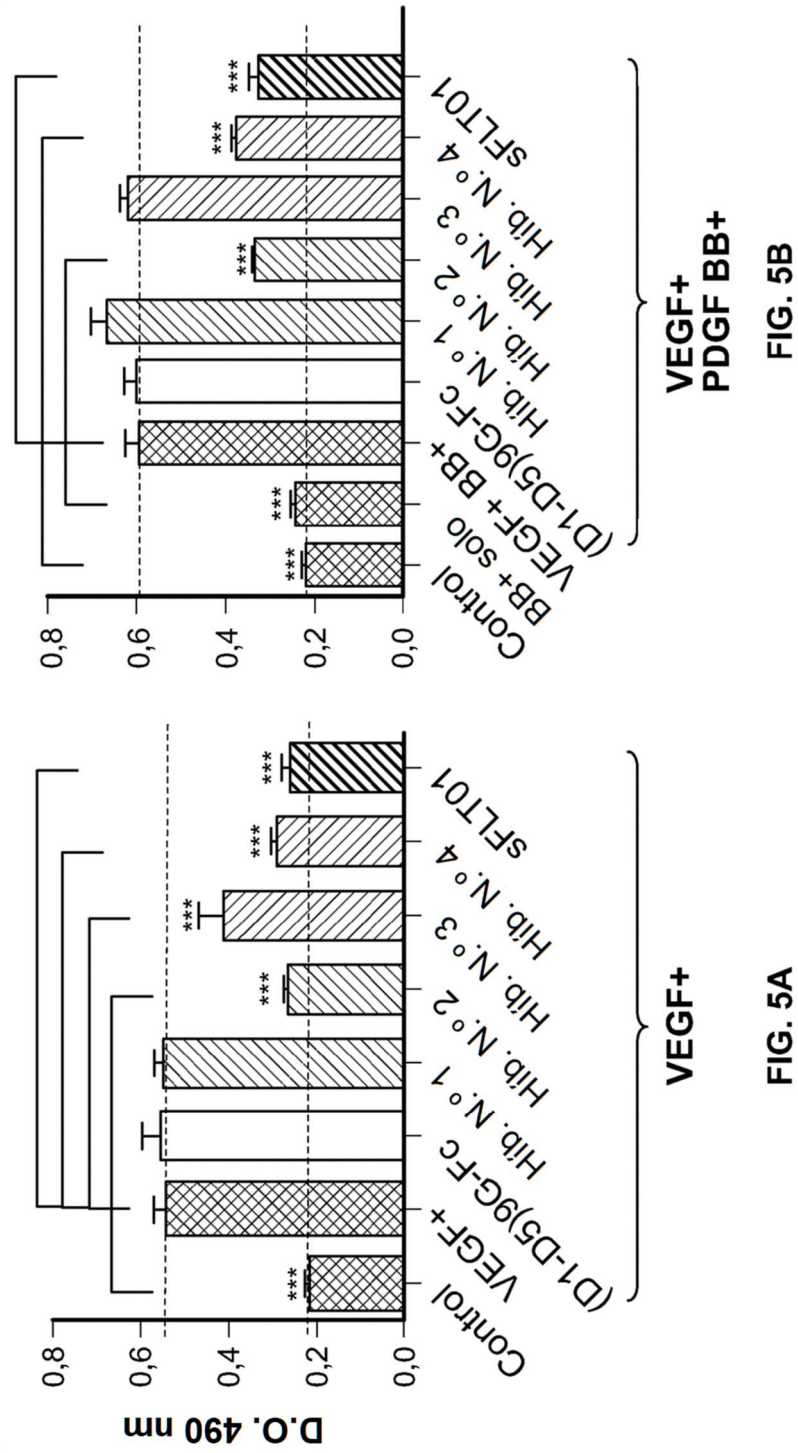


FIG. 4



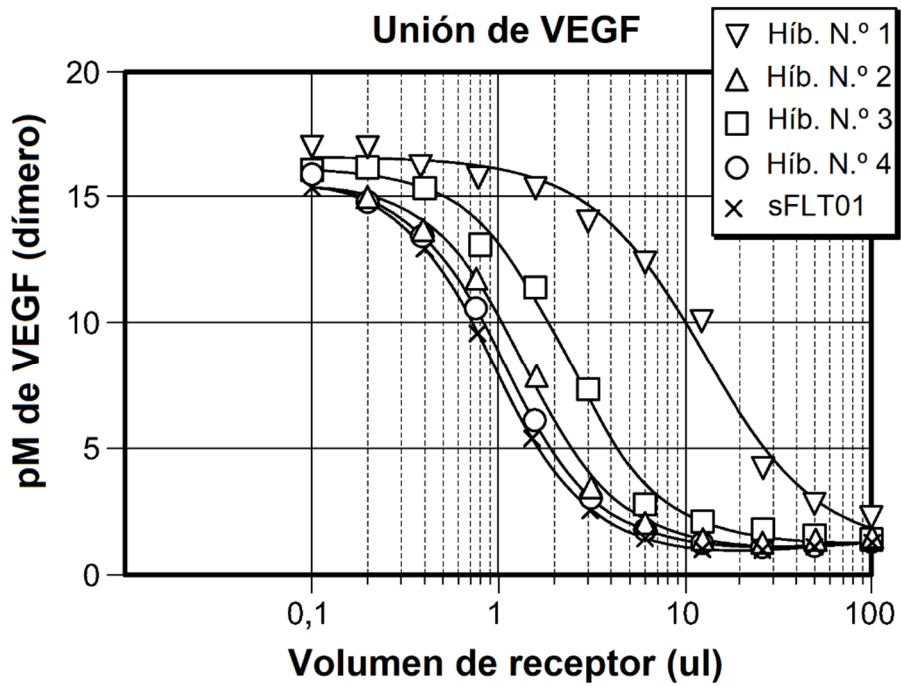


FIG. 6A

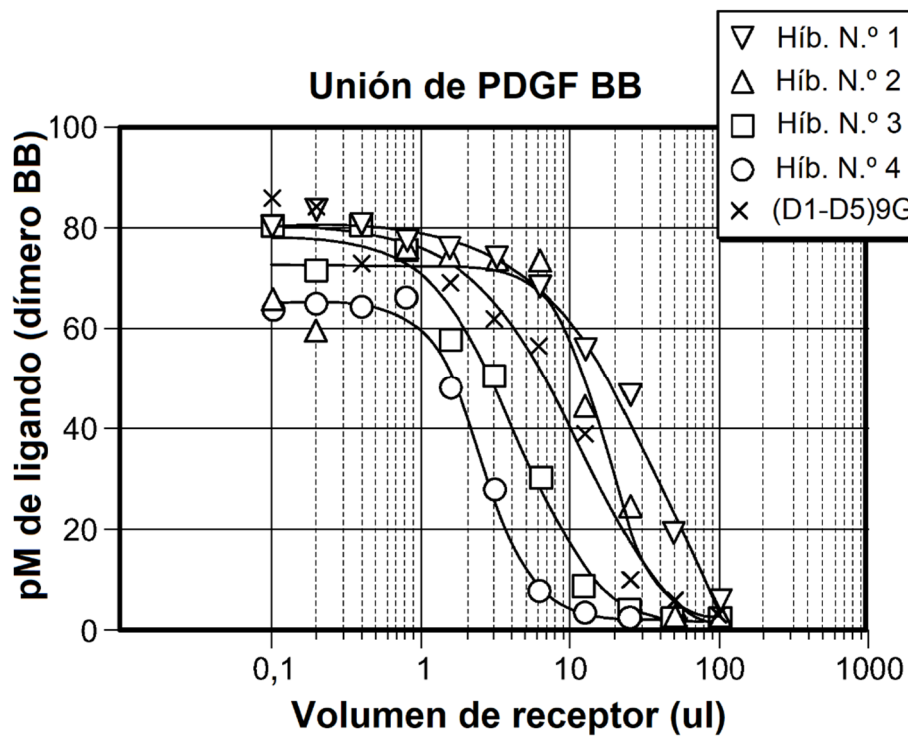


FIG. 6B

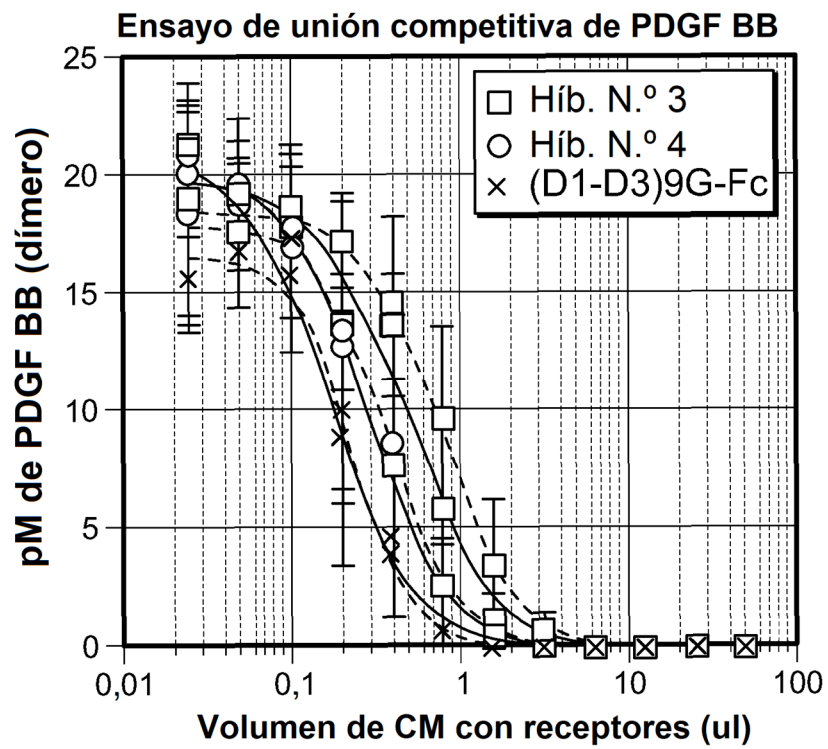


FIG. 7A

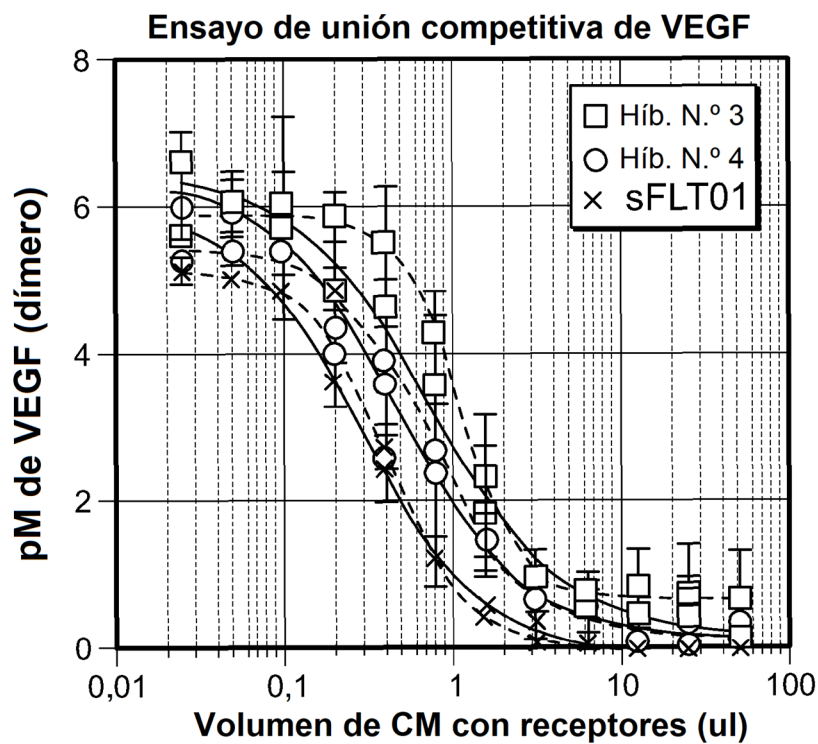


FIG. 7B

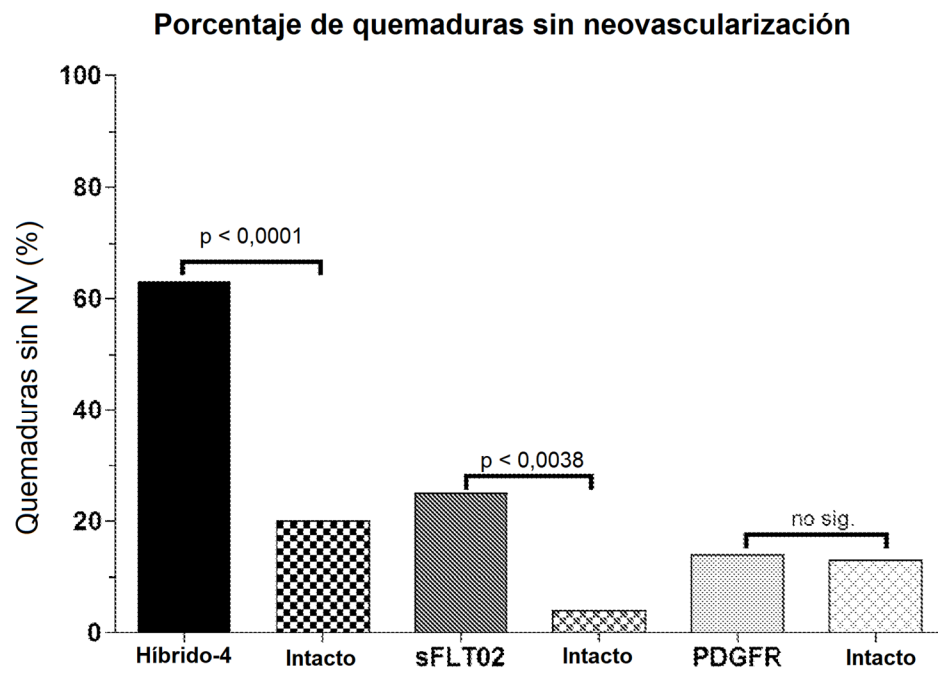


Figura 8