



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 239 338**

⑤① Int. Cl.7: **C12N 15/12**, C12N 5/10
C07K 14/475, C07K 16/22
C12Q 1/68, G01N 33/574
A61K 31/70

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **96932771 .7**

⑧⑥ Fecha de presentación: **30.09.1996**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0853668**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **22.07.1998**

⑤④ Título: **Genes regulados y sus usos.**

③⑩ Prioridad: **29.09.1995 GB 9519928**
13.06.1996 GB 9612368

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2005

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2005

⑦③ Titular/es: **Universita Degli Studi di Siena**
55, Via Banchi di Sotto
53100 Siena, IT

⑦② Inventor/es: **Oliviero, Salvatore**

⑦④ Agente: **Díez de Rivera de Elzaburu, Alfonso**

ES 2 239 338 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).

ES 2 239 338 T3

DESCRIPCIÓN

Genes regulados y sus usos.

5 La presente invención se refiere a las secuencias de nucleótidos de los genes regulados por Fos, a las proteínas codificadas por las secuencias, a usos de las secuencias y proteínas codificadas, y a animales transgénicos que comprenden una o más de las secuencias.

10 El factor de transcripción AP-1 está implicado en una serie de procesos celulares, incluyendo la proliferación celular, diferenciación y función neuronal (véase Angel and Karin, 1991).

15 Se considera que AP-1 ejerce su efecto por unión a una secuencia de reconocimiento de ADN, conocida como el elemento de AP-1, encontrada en las regiones promotora y potenciadora de los genes. El elemento de AP-1 tiene la secuencia de consenso en TGA G/C TCA.

20 Se ha encontrado una serie de genes que contienen elementos de AP-1 en sus regiones reguladoras, incluyendo c-Jun (Angel y col., 1988), MCP-1 (Rolling y col., 1988), estromalisina (Kerr y col., 1988), colagenasa de tipo I (Schonthal y col., 1988) e interleuquina II (Farrar y col., 1989).

25 AP-1 está compuesta de complejos diméricos formados entre las proteínas Jun (c Jun, Jun-B y Jun D) y Fos (c-Fos, Fos B, Fra-1 y Fra2). Se ha encontrado que el componente Fos de AP-1 es el componente limitante de la actividad de AP-1 en células ciclotadoras (véase Kovary and Bravo, 1991).

30 c-Fos es un protooncogén nuclear que se ha implicado en una serie de sucesos celulares importantes, incluyendo la proliferación celular (Holt y col., 1986; Riabowol y col., 1988), diferenciación (Distel y col., 1987; Lord y col., 1993) y tumorigénesis (Curren y col., 1983; Miller y col., 1984; Ruther y col., 1989).

35 c-Fos codifica una proteína de 62 kDa que forma heterodímeros con c-Jun, formando un factor de transcripción AP-1 que se une al ADN en un elemento de AP-1 y estimula la transcripción.

40 Los productos génicos de Fos también pueden reprimir la expresión génica. Sassone y col. (1988) mostraron que c-Fos inhibe su propio promotor y Gius y col. (1990) y Hay y col. (1989) mostraron que c-Fos inhibe los genes de respuesta temprana Egr-1 y c-myc.

45 También se ha mostrado que los factores AP-1 inhiben la expresión del MHC de clase I y genes PEPCK (véase Gurney y col., 1992 y Howcroft y col., 1993).

50 Por lo tanto, se puede observar que los genes regulados por Fos son extremadamente importantes para la expresión correcta de los genes que conducen a cambios en el fenotipo celular. La importancia de los genes Fos se demostró claramente generando ratones deficientes en c-Fos (véase Hu y col., 1994). Los ratones deficientes en c-Fos eran viables, pero presentaban una variedad de defectos del desarrollo específicos del tejido, incluyendo osteoporosis, gametogénesis retardada y linfopenia y anomalías del comportamiento.

55 Los ratones deficientes en c-Fos se usaron para generar líneas celulares de fibroblastos, y se encontró que la expresión de dos genes era anormalmente baja. Los dos genes eran el de la estromalisina y la colagenasa de tipo I. Previamente se identificó que ambos genes tenían sitios AP-1 en sus secuencias reguladoras (véase Kerr y col., 1988, y Schonthal y col., 1988).

60 La estromalisina y colagenasa de tipo I se han implicado en el desarrollo tisular embrionario (Brenner y col., 1989), remodelación de tejido dañado (Hasty y col., 1990; Woessner and Gunja, 1991) y en el avance tumoral y de metástasis (Liotta and Stetler, 1990).

65 Superti-Furga y col., (1991), mostraron que la actividad de c-Fos se puede controlar hormonalmente mediante fusión de la proteína c-Fos de ratón al dominio de unión del ligando del receptor humano de estrógeno. Se encontró que la proteína de fusión estimulaba la transcripción dependiente de AP-1 de una forma estrictamente dependiente de la hormona. Usando la proteína de fusión, se encontró un gen regulado por AP-1, Fit-1. Se encontró que Fit-1 codificaba una proteína secretada o unida a membrana dependiendo del patrón de ajuste.

60 La presente invención se refiere a secuencias de nucleótidos que codifican dos nuevos genes regulados por Fos.

65 La presente invención proporciona una molécula de nucleótidos que codifica una proteína codificada por un gen regulado por Fos o uno de sus fragmentos, en el que dicha proteína o su fragmento es codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 ó 2, o uno de sus fragmentos, incluyendo variantes alélicas y variantes de especie de las secuencias de nucleótidos.

La expresión "molécula de nucleótidos" usada en esta memoria, se refiere a nucleótidos de cualquier longitud, sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. La expresión abarca tanto moléculas de doble como de una cadena. También incluye tipos conocidos de modificaciones, por ejemplo, marcadores que son conocidos en la técnica, me-

ES 2 239 338 T3

tilación, “grupos terminales”, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, modificaciones internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (p. ej., fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (p. ej., fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), las que contienen restos colgantes, tales como proteínas (incluyendo nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), las que contienen intercaladores (p. e., acridina, psoralén, etc.), las que contienen queladores (p. ej., metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), las que contienen alquilantes y las que contienen enlaces modificados (p. ej., ácidos nucleicos anómeros alfa, etc.).

La molécula de nucleótidos de la presente invención puede codificar la proteína de un gen regulado por Fos o uno de sus fragmentos.

El término “fragmento” usado en relación con las proteínas se refiere a fragmentos que tienen suficiente longitud para ser únicos para la proteína actualmente reivindicada (p. ej., 10, 15, 20 ó 25 aminoácidos consecutivos de longitud). Preferiblemente, los fragmentos de proteína son capaces de provocar al menos parte de una actividad de la proteína completa. Los fragmentos particularmente preferidos comprenden una región conservada de un gen que se ha encontrado que es homólogo con una serie de otros genes. Se considera que dichas regiones conservadas tienen una función específica.

Las secuencias de nucleótidos mostradas en las Figuras 1 y 2, como la mayoría de las secuencias de nucleótidos naturales, tendrán una serie de formas distintas, tales como variantes alélicas y variantes de especie. Dichas variantes y cualesquiera otras formas naturales de las secuencias de nucleótidos de la presente invención también se considera que forman parte de la presente invención. Dichas variantes deben tener una homología de secuencia de al menos 60%, preferiblemente 80%, y más preferiblemente 90%, con las secuencias mostradas en la figura 1 ó 2 o sus fragmentos.

La presente invención también se refiere a la molécula de nucleótidos de la presente invención, en la que se altera la proteína o uno de sus fragmentos codificada por la secuencia mostrada en la Figura 1 ó 2 o uno de sus fragmentos.

Las proteínas alteradas preferidas o sus fragmentos, son aquellas que todavía retienen su actividad y preferiblemente tienen una homología de al menos 80%, más preferiblemente 90% y más preferiblemente 95% con la proteína o uno de sus fragmentos, codificada por la secuencia mostrada en la Figura 1 ó 2, o uno de sus fragmentos. Preferiblemente dichas proteínas alteradas o sus fragmentos difieren sólo en 1 a 10 aminoácidos. Se prefiere además que los cambios de aminoácidos sean conservativos.

Los cambios conservativos son los que sustituyen un aminoácido por otro de la familia de aminoácidos que está relacionada por sus cadenas laterales. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o una sustitución conservativa similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado, no tendrán un efecto importante en la actividad biológica de la proteína.

Sin embargo, a veces es conveniente alterar los aminoácidos con el fin de alterar la actividad biológica de la proteína. Por ejemplo, pueden ser particularmente útiles las mutaciones que suprimen o potencian una o más de las funciones de la proteína. Dichas mutaciones generalmente se pueden hacer alterando cualesquiera secuencias conservadas de la proteína. Las mutaciones que aumentan el número de aminoácidos que pueden formar enlaces disulfuro con otros aminoácidos en la proteína son particularmente preferidos con el fin de aumentar la estabilidad de la proteína. También se pueden hacer las mutaciones que disminuyen el número de aminoácidos que pueden formar enlaces disulfuro con otros aminoácidos en la proteína si se desea disminuir la estabilidad de la proteína. Se prefiere que dichas proteínas alteradas o sus fragmentos tengan una homología de al menos 80%, más preferiblemente 90% y más preferiblemente 95% con la proteína o uno de sus fragmentos, codificada por la secuencia mostrada en la Figura 1 ó 2 o uno de sus fragmentos. Preferiblemente dichas proteínas alteradas o sus fragmentos difieren sólo en 1 a 10 aminoácidos.

La molécula de nucleótidos de la presente invención se puede obtener por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias se pueden obtener por clonación genómica o clonación de ADNc de líneas celulares adecuadas o de ADN o ADNc obtenido directamente de los tejidos de un organismo, tal como un ratón. Entre las líneas celulares adecuadas se incluyen cualesquiera líneas celulares de fibroblastos tales como la línea celular 3T3, descrita por Hu y col. (1994). Los clones positivos se pueden cribar usando sondas adecuadas para la molécula de nucleótidos deseada. También se puede usar la clonación por PCR. Las sondas y cebadores se pueden generar fácilmente puesto que en esta memoria se dan las secuencias que codifican la proteína o uno de sus fragmentos, codificada por la molécula de nucleótidos de la presente invención.

Se pueden usar numerosas técnicas patrón conocidas en el campo de la biología molecular para preparar las moléculas de nucleótidos deseadas o las sondas y cebadores para identificar los clones positivos. Las moléculas de nucleótidos sondas o cebadores se pueden sintetizar completamente usando métodos de síntesis de oligonucleótidos patrón, tales como el método de la fosfaramidita.

Se pueden usar numerosas técnicas para alterar la secuencia de ADN obtenida por los procedimientos de síntesis o clonación, y dichas técnicas son conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar técnicas de mutagénesis dirigida, mutagénesis dirigida por oligonucleótido y PCR, para alterar la secuencia de ADN. Dichas

ES 2 239 338 T3

técnicas son conocidos por los expertos en la técnica y están descritas en la amplia bibliografía conocida por los expertos en la técnica, por ejemplo, Sambrook y col., (1989).

5 La presente invención proporciona además la proteína codificada por la molécula de nucleótidos de la presente invención.

Preferiblemente, la proteína codificada por la molécula de nucleótidos de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 ó 2, o uno de sus fragmentos.

10 El término "proteína" tal como se usa en esta invención, se refiere a un polímero de aminoácidos y no se refiere a una longitud específica del producto; por lo tanto dentro del término proteína están incluidos péptidos, oligopéptidos y proteínas. El término además no se refiere o excluye modificaciones después de expresión de la proteína, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones y fosforilaciones. En la definición se incluyen proteínas que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales), proteínas con uniones sustituidas, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto naturales como sintetizadas.

15 La proteína de la presente invención se puede obtener de células que producen naturalmente la proteína tales como células de fibroblasto usando técnicas de purificación patrón. Sin embargo, se prefiere usar una célula hospedante y sistema de vector adecuados para la expresión de la molécula de nucleótidos de la presente invención. La molécula de nucleótidos de la presente invención se puede expresar en una variedad de sistemas de expresión diferentes, por ejemplo, los usados con células de mamíferos, baculovirus, bacterias y microorganismos eucariotas tales como levaduras.

20 Todos los sistemas de expresión antes mencionados son conocidos en la técnica y la expresión de secuencias de nucleótidos ahora es una técnica patrón conocida por los expertos en la técnica.

25 Preferiblemente, se usan sistemas de expresión de célula hospedante eucariota, p. ej., de mamífero. En particular, las células hospedantes de mamífero adecuadas incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster pequeño (BKC), células de origen hepático tales como células HepG2, y mieloma o líneas celulares de hibridoma.

La presente invención proporciona además un vector para expresar la molécula de nucleótidos de la presente invención, que comprende un promotor y una molécula de nucleótidos de la presente invención.

35 Un promotor de mamífero puede ser cualquier secuencia de ADN que se puede unir a la ARN-polimerasa de mamífero y puede iniciar la transcripción corriente abajo de una secuencia codificante en el ARNm. Los promotores particularmente útiles son los derivados de genes víricos de mamíferos, tales como el promotor temprano de SV40, promotor tardío principal de adenovirus y el promotor del virus herpes simplex. Adicionalmente, también se pueden usar secuencias de genes no víricos como promotores, tales como del gen de metalotioneína murina.

40 La molécula de nucleótidos de la presente invención puede ser expresada intracelularmente en células de mamífero. Se puede unir una secuencia promotora directamente con la molécula de nucleótidos de la presente invención, en cuyo caso el primer aminoácido en el extremo N de la proteína codificada será una metionina codificada por el codón de inicio ATG.

45 Alternativamente, la proteína codificada por la molécula de nucleótidos de la presente invención puede ser segregada de la célula por la unión de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder, a la molécula de nucleótidos de la presente invención. La proteína de fusión codificada comprenderá un fragmento de la secuencia líder y la proteína codificada por la molécula de nucleótidos de la presente invención. La secuencia líder conducirá a la secreción de la proteína de fusión fuera de la célula. Preferiblemente, hay sitios de procesamiento entre la secuencia líder y la proteína codificada por la molécula de nucleótidos de la presente invención que permiten que la secuencia líder sea escindida enzimática o químicamente. Un ejemplo de dicha secuencia líder es la secuencia líder triparite de adenovirus.

55 El vector de la presente invención preferiblemente es un vector de ácido nucleico que comprende ADN. El vector puede ser de configuración lineal o circular, y se puede adaptar para la existencia episomal o integrada en la célula hospedante, como se expone en la extensa bibliografía conocida por los expertos en la técnica. Los vectores se pueden suministrar a células usando sistemas de suministro vírico o no vírico. La elección del sistema de suministro determinará si la molécula de ADN se va a incorporar en el genoma de la célula o permanecerá episomal.

60 El vector de la presente invención puede comprender además elementos de control tales como señales de poliadenilación, señales de terminación de la transcripción, potenciadores, regiones de control de locus (LCR).

65 La presente invención proporciona además una célula hospedante transformada con el vector de la presente invención.

La transformación se refiere a la inserción de un polinucleótido exógeno en una célula hospedante, sin tener en cuenta el método usado para la inserción, por ejemplo, captación directa, transducción, apareamiento-f o electropora-

ción. El polinucleótido exógeno se puede mantener como un vector no integrado (episoma), o se puede integrar en el genoma del hospedante.

Preferiblemente, la célula hospedante es una célula eucariota, más preferiblemente una célula de mamífero, tal como células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster pequeño (BKH), células de origen hepático tales como células HepG2, y líneas celulares de mieloma o hibridoma.

La presente invención proporciona además un método para producir la proteína codificada por la molécula de nucleótidos de la presente invención, que comprende transfectar una célula hospedante con el vector de la presente invención, cultivar la célula hospedante transfectada en condiciones adecuadas con el fin de conducir a la expresión de la molécula de ADN y a la producción de la proteína deseada. Después, la proteína se puede recoger de las células transfectadas o del medio de crecimiento celular dependiendo de si la proteína es secretada, usando técnicas patrón.

La presente invención proporciona además la molécula de nucleótidos de la presente invención para usar en terapia.

La presente invención proporciona además el uso de la molécula de nucleótidos de la presente invención en la fabricación de una composición para el tratamiento de trastornos del desarrollo.

La presente invención proporciona además el uso de la molécula de nucleótidos de la presente invención en el tratamiento de trastornos del desarrollo.

Se sabe que los genes regulados por Fos están implicados en el desarrollo y en la diferenciación celular. De acuerdo con esto, el descubrimiento de genes regulados por Fos tiene consecuencias en el control del desarrollo y diferenciación celular.

Se ha encontrado que las secuencias de nucleótidos mostradas en la Figura 1 y Figura 2 tienen una secuencia similar a los genes de una familia de factores de crecimiento caracterizada por la identificación de la familia del factor de crecimiento de plaquetas (PDGF). La secuencia más claramente relacionada es la del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). VEGF forma un homodímero que es un factor de crecimiento activo en la angiogénesis y crecimiento celular endotelial (véase Keck y col., 1989 y Leung y col., 1989). VEGF también se ha usado para estimular la angiogénesis y producir así un efecto terapéutico (véase Takeshita y col., 1994).

La proteína codificada por la secuencia de la Figura 1 es una proteína de ratón, y la proteína codificada por la secuencia de la Figura 2 es el homólogo humano de la proteína de ratón codificada por la secuencia dada en la Figura 1. Ambas proteínas se denominan en lo sucesivo factor de crecimiento inducido por c-Fos (FIGF).

Por lo tanto, se puede ver que el uso de la molécula de nucleótidos de la presente invención en terapia es una aplicación importante de las secuencias de los genes regulados por Fos de la presente invención.

Las secuencias de nucleótidos mostradas en la Figura 1 y Figura 2 tienen interés particular en trastornos de pulmón, ya que se ha encontrado que las secuencias de nucleótidos son expresadas principalmente en los pulmones. Entre los trastornos pulmonares particulares que se pueden tratar usando la molécula de nucleótidos que codifica la proteína o sus fragmentos que son codificados por la secuencia mostrada en la Figura 1 o Figura 2, se incluyen la neumonía y neumoconiosis. La molécula de nucleótidos también se puede usar después de neumonectomía con el fin de ayudar al pulmón a que vuelva a crecer.

La secuencia de nucleótidos de la Figura 2 se ha cartografiado del cromosoma humano Xp22, cerca del sitio que cartografía la patología displasia espondiloepifisaria (SEDL). El mapa genético de esta región es descrito por Ferrero y col. (1995), y el mapa de la enfermedad SEDL es descrito por Heuertz y col. (1993). Por lo tanto, SEDL se puede tratar usando la molécula de nucleótidos que codifica la proteína o sus fragmentos, que son codificados por la secuencia dada en la Figura 1 o en la Figura 2.

Como se ha discutido previamente, se ha encontrado que los genes regulados por Fos están implicados en el avance tumoral y metástasis. Por inhibición de los genes regulados por Fos se puede inhibir o suprimir el crecimiento tumoral.

Previamente, Kim y col., (1983), suprimieron el crecimiento tumoral mediante inyección de anticuerpos monoclonales específicos para VEGF. Como se ha expuesto previamente, VEGF tiene una secuencia de nucleótidos similar a las secuencias de nucleótidos mostradas en la Figura 1 y Figura 2.

De acuerdo con esto, por inhibición de la expresión, traducción *in vivo*, etc. de las moléculas de nucleótidos salvajes de la presente invención, se puede inhibir o suprimir el crecimiento tumoral.

Las acciones de los genes regulados por Fos correspondientes a las moléculas de nucleótidos de la presente invención se pueden inhibir por una serie de técnicas.

Un objetivo adicional de la presente invención es el uso de la proteína de la presente invención para identificar el receptor o receptores de la proteína o de un complejo de proteína que comprende la proteína.

ES 2 239 338 T3

Los expertos en la técnica conocen métodos para identificar receptores, y se han descrito ampliamente en la bibliografía. Sin embargo, básicamente hay tres modos principales de identificar receptores:

5 i. Ensayar todos los receptores conocidos que se unen a moléculas similares. Esto es particularmente útil para la proteína codificada por las secuencias de ADN mostradas en la Figura 1 y Figura 2, como se ha encontrado que VEGF tiene una secuencia similar.

10 ii. Llevar a cabo una etapa de purificación de unión. Por ejemplo, la proteína de la presente invención o un complejo de proteína que comprende la proteína de la presente invención, se puede inmovilizar en un soporte sólido, y después se pasan numerosas posibles moléculas receptoras, especialmente proteínas de membrana, sobre el soporte sólido. Schusted y col., (1995), describen procedimientos de purificación de la unión.

15 iii. Por cribado de bibliotecas de expresión con el fin de encontrar células que carecen del receptor o receptores, y después usar el método de clonación de receptor descrito por Seed y Aruffo, (1987).

Los expertos en la técnica también conocen otros métodos y se pueden usar con el fin de encontrar el receptor o receptores.

20 Para identificar el receptor o receptores se podrán diseñar fármacos que bloqueen o potencien la actividad del receptor o receptores y produzcan moléculas de anticuerpo que bloqueen el receptor o receptores. Una vez que se conoce la secuencia de ADN del receptor o receptores, se pueden diseñar una serie de terapias génicas para corregir los errores en el receptor o receptores, o para bloquear la expresión del receptor o receptores.

25 La presente invención proporciona además el uso de la proteína de la presente invención en un ensayo para identificar antagonistas o agonistas de la proteína que se pueden usar como fármacos en el tratamiento del cáncer y trastornos del desarrollo, respectivamente. Los ensayos para identificar dichos potenciales fármacos se usan con frecuencia y son conocidos por los expertos en la técnica. Un ejemplo de dicho ensayo es descrito claramente por Tsunoda y col., (1994).

30 La presente invención proporciona además el uso de la molécula de nucleótidos, molécula de nucleótidos antisentido, proteína o molécula de anticuerpo de la presente invención, o cualquiera de sus combinaciones, para diagnosticar un estado patológico o una predisposición a una enfermedad.

35 La molécula de nucleótidos o molécula de nucleótidos antisentido de la presente invención se puede usar para determinar la presencia del gen correspondiente a la molécula de nucleótidos, o para determinar la cantidad de ARN transcrito del gen.

40 La proteína de la presente invención se puede usar en un ensayo para determinar la cantidad de proteína codificada por el gen correspondiente a la molécula de nucleótidos de la presente invención.

Determinando la presencia del gen correspondiente a la molécula de nucleótidos de la presente invención o el ARN transcrito o la proteína codificada por el gen, se puede diagnosticar un estado patológico o una predisposición a una enfermedad causada por la presencia del gen o la sobreexpresión del gen.

45 La presente invención proporciona además el uso de la molécula de nucleótidos de la presente invención para generar un animal transgénico. En particular, la invención proporciona el uso de dichas moléculas de nucleótidos para generar animales transgénicos no humanos, especialmente ratones transgénicos.

50 Se pueden generar animales transgénicos que son adecuados como modelos para la investigación. Por ejemplo, se pueden usar animales transgénicos que sobreexpresan la molécula de nucleótidos de la presente invención, con el fin de determinar que efectos tendrá la sobreexpresión. Alternativamente, se pueden generar animales transgénicos en los que la molécula de nucleótidos salvaje de la presente invención “no se expresa”. Entonces se puede investigar el efecto de “no expresar” la molécula de nucleótidos.

55 Los expertos en la técnica conocen métodos para generar dichos animales transgénicos y se pueden llevar a cabo fácilmente puesto que las moléculas de nucleótidos que se van a sobreexpresar o “no se van a expresar” se describen en esta memoria.

60 Los animales transgénicos de la presente invención posteriormente también se pueden reproducir con ratones que sobreexpresan Fos o con ratones que no expresan Fos, con el fin de determinar los efectos del control de Fos alterado.

La presente invención también proporciona una molécula de nucleótidos que comprende todo o parte de la secuencia mostrada en una cualquiera de las Figuras 1 ó 2.

65 La molécula de nucleótidos que comprende toda o parte de la secuencia mostrada en una cualquiera de las Figuras 1 ó 2, puede codificar una proteína o puede ser no codificante. Preferiblemente, la molécula de nucleótidos codifica adicionalmente las secuencias de control del gen Fos correspondientes a la secuencia de nucleótidos mostrada en una cualquiera de las Figuras 1 ó 2. Además se prefiere que la molécula de nucleótidos codifique una secuencia que

ES 2 239 338 T3

confiera a un gen regulación por Fos. Es particularmente preferido que la molécula de nucleótidos comprenda la secuencia TGACTCA.

La presente invención ahora se ilustra en los ejemplos adjuntos con referencia a las siguientes figuras.

Figura 1

Secuencia de ADN del gen F0401 regulado por Fos, que muestra la secuencia de proteína codificada y las regiones homólogas a VEGF (subrayadas).

Figura 2

Secuencia de ADN del gen regulado por Fos HF175 (homólogo humano de F0401), que muestra la proteína codificada.

Figura 3

Alineamiento de la proteína codificada por FIGF con el dominio conservado de la familia de factores de crecimiento de PDGF/VEGF. Los puntos indican restos de cisteína que son característicos de estos factores de crecimiento.

Figura 4

(A) Ensayo de inmunoprecipitación de la proteína FIGF. Se marcaron metabólicamente células COS-7 transfectadas sólo con el vector (-) o con un vector que contenía la secuencia que codifica FIGF controlada por un promotor de CMV (+), durante 1 hora con [³²S]-metionina y [³⁵S]-cisteína, cada uno con una concentración de 100 μ Ci/ml. Después de 1 hora o 22 horas de seguimiento, el medio condicionado y los lisatos celulares se inmunoprecipitaron por separado con anticuerpos policlonales anti-FIGF. [La proteína FIGF se expresó en *E. coli* controlado por el promotor T5. El fragmento de ADNc, de la región codificante de FIGF, se generó por PCR a partir del resto de metionina en la posición +40 y se clonó en el vector pQE-31 (Qiagen) para obtener una proteína de fusión con un marcador de histidina N-terminal. La proteína se expresó en bacterias TG1 (pREP+) por inducción durante 4 horas a 37°C en presencia de isopropil-b-D-tiogalactopiranosido 2 mM. La proteína recombinante se localizó exclusivamente en cuerpos de inclusión, y se purificó en una columna de Ni-NTA-Resina, en condiciones desnaturalizantes de acuerdo con los protocolos del fabricante (Qiagen). Los anticuerpos se aumentaron inyectando a conejos 200 μ g de FIGF recombinante en forma de proteína desnaturalizada en adyuvante completo de Freund. El suero se preparó después de 4 inyecciones en adyuvante incompleto de Freund a intervalos de 3 semanas]. Los inmunocomplejos se recogieron mediante perlas de proteína A-Sepharosa (Pharmacia) y se separaron en SDS-PAGE al 12% en presencia de b-mercaptoetanol al 3%. Las flechas indican las bandas específicas presentes sólo en las células transfectadas con FIGF.

(B) Actividad mitógena medida como incorporación de [³H]-timidina en fibroblastos c-fos (-/-). Las células se incubaron con medio condicionado de células COS-7 transfectadas con el vector de expresión de FIGF o sólo con el vector. Un día después de la transfección, las células se dividieron y se mantuvieron en suero al 2%. Los medios condicionados se recogieron 120 horas después.

(C) Actividad mitógena medida como incorporación de [³H]-timidina en fibroblastos c-fos (-/-). Las células se incubaron con medio condicionado de clones estables c-fos (-/-), concretamente FH-10.2, FH-10.5, FH-9.3, FH-9.6, FH-10.9 y células c-fos (-/-) (prueba), que expresan constitutivamente FIGF exógeno controlado por el promotor de CMV. Los medios condicionados se recogieron de las células cultivadas durante 48 horas en suero al 0,5%.

(D) Actividad mitógena medida como incorporación de [³H]-timidina en fibroblastos c-fos (-/-). Las células se incubaron con FIGF recombinante parcialmente renaturalizado. En las mismas condiciones, la incubación con PDGF-BB (Sigma), usado como testigo positivo, induce aproximadamente una incorporación de timidina 30% mayor, mientras que VEGF (Sigma) no induce la incorporación de timidina por encima del valor de fondo. Los datos mostrados son la media de seis experimentos llevados a cabo con dos preparaciones de FIGF diferentes.

(E) Actividad mitógena medida como incorporación de [³H]-timidina en fibroblastos de embrión de ratón. Las células se cultivaron con FIGF recombinante parcialmente renaturalizado. Las células MEF se obtuvieron de embriones de 13-15 días de ratones B6D2F1. Los embriones se sacrificaron, se aclararon y se tripsinizaron durante 30 min a 37°C. Las células MEF se hicieron crecer 24 horas en medio que contenía suero al 0,5% antes de añadir los factores de crecimiento. En las mismas condiciones, la incubación con PDGF-BB (Sigma), usado como un testigo positivo, induce una incorporación de timidina aproximadamente 30% mayor, mientras que VEGF (sigma) no induce incorporación por encima del valor de fondo. Los datos mostrados son la media de seis experimentos llevados a cabo con dos preparaciones de FIGF diferentes. En cada experimento se restaron los valores de fondo.

Figura 5

(A) Expresión de FIGF en células cultivadas. Análisis de transferencia Northern de ARN total obtenido de: fibroblastos c-fos (-/-) (calles 1-3); una línea celular estable, obtenida de células c-fos (-/-), que expresan c-fos exógeno

ES 2 239 338 T3

(calles 4-6), fibroblastos c-fos (+/+) (calles 7-9). Se extrajo ARN celular por el método del tiocianato de guanidina después de incubar las células durante 48 horas en suero al 0,5% (tiempo 0). La concentración de suero se aumentó al 10% y se recogió el ARN total a las 2 ó 4 horas según se indica. Las calles 10 y 11 muestran la expresión de FIGF en fibroblastos c-fos (-/-) transfectados transitoriamente sólo con el vector (prueba) o que contienen c-fos controlado por el promotor constitutivo FBJ-LTR (c-fos). Los ARN de las células transitoriamente transfectadas se recogieron 30 horas después de cultivar las células en medio que contenía suero al 0,5%. Cada calle se cargó con 10 µg de ARN celular total.

(B) Expresión de PDGF o VEGF. Se extrajeron los ARN celulares totales de células c-fos (-/-) (calles 1-3) o de una línea celular estable, obtenida de células c-fos (-/-), que expresaban c-fos exógeno (calles 4-6), como se indica en el panel A.

Se usó gliceraldehído-fosfato-deshidrogenasa (GAP-DH) como testigo para la carga de ARN.

Figura 6

Análisis Northern de ARN poli-A+ extraído de diferentes tejidos de ratón.

Figura 7

(A) Morfología de células deficientes en c-fos. Las células se transfectaron establemente sólo con el vector.

(B) Morfología de un clon celular obtenido de células deficientes en c-fos, establemente transfectadas con el vector de expresión que contiene FIGF controlado por el promotor de CMV.

(C) Morfología de células establemente transfectadas con un vector de expresión que contenía el ADNc de FIGF en la orientación antisentido controlado por el promotor de CMV.

(D) Morfología de células establemente transfectadas con el vector de expresión que contiene c-fos controlado por el promotor de FBJ-LTR.

(E) Un clon celular obtenido de las mismas células que en D (que expresan c-fos constitutivamente) transfectadas con un vector de expresión FIGF controlado por el promotor de CMV.

(F) Un clon celular obtenido de las mismas células que en D (que expresan c-fos constitutivamente) transfectadas con un vector de expresión que contiene el ADNc de FIGF en la orientación antisentido, controlado por el promotor de CMV.

(G) Fibroblastos c-fos (-/-) cultivados durante 120 horas en medio que contenía suero al 0,5%.

(H) Células como en G pero tratadas durante 120 horas con FIGF recombinante parcialmente renaturalizado. Se analizaron diez clones independientes obtenidos de 3 transfecciones independientes. Todos mostraron cambios morfológicos similares a los observados en la figura.

Ejemplos

Cultivo celular y aislamiento de clones

Se generaron fibroblastos de ratón, células salvajes respecto a la expresión de c-Fos (+/+) y líneas celulares 3T3 deficientes en c-Fos (-/-) y línea celular establemente transfectada que expresaba constitutivamente c-Fos, como se ha descrito (Hu, y col., 1994). Todas las líneas celulares se hicieron crecer a 37°C con CO₂ al 5% en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero ternero fetal al 10% (FCS), glutamina y penicilina-estreptomicina. Las células se cultivaron hasta que alcanzaron aproximadamente 70% de confluencia, se subalimentaron con suero durante 48 horas en DMEM que contenía FCS al 0,5%, y se estimularon con DMEM que contenía FCS al 10% durante 0, 2 y 4 horas antes de aislar el ARN. El ARN total se aisló usando el método del isotiocianato de guanidina. Se llevó a cabo la presentación diferencial del ARNm como describen Laing y col., y modificada por Bauer y col. (Bauer y col., 1993). Brevemente, del ARN extraído se separó la contaminación de ADN cromosómico de 50 µg de ARN total aislado por tratamiento con DNasa I. Se usaron 0,2 µg de ARN, extraído a las 2 ó 4 horas después de inducción con suero, para la transcripción inversa en un volumen de reacción de 40 µl usando cebadores dT₁₂mN y transcriptasa inversa 300 U MMLV (Promega Corp., Madison, WI) con un tiempo de incubación de 60 min a 37°C. La mezcla de PCR para la amplificación del ADNc contenía cebador dT₁₂mN, uno de los 20 cebadores desoxinucleótidos decámeros con secuencia arbitraria (Kit A - Operon Biotechnology Inc., Alameda, CA), ³³P-dATP (Amersham International plc, Bucking-hamshire, Inglaterra) y polimerasa Taq 1U (Promega Corp.). Las muestras se sometieron a 40 ciclos de amplificación usando un termociclador PTC-100 (MJ Research Inc., Watertown, MA). Los parámetros de los ciclos eran los siguientes: 94°C durante 30 segundos, 42°C durante 90 segundos, 72°C durante 30 segundos y un periodo de expansión adicional a 72°C durante 10 minutos. Se ajustaron 2 µl de mezcla de la PCR con glicerol al 5% y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 6% sin urea (Bauer y col., 1993). Las bandas de ADNc expresado de forma diferencial, se recuperaron del gel y se volvieron a amplificar. Las sondas de ADNc reamplificadas se hicieron

correr en un gel de agarosa al 1,5%, se purificaron y clonaron en el vector pGEM-T usando el sistema de clonación TA (Promega Corp.). Los clones positivos se seleccionaron usando el fenotipo azul-blanco.

Caracterización y secuenciación de nuevos clones

5 Típicamente de una banda se podían obtener de 1 a 3 clones diferentes, que se usaron para la caracterización sucesiva por análisis de transferencia Northern. Los fragmentos de ADNc se marcaron con ³²P-dCTP usando un kit de marcaje de cebador aleatorio (Amersham International plc.). Se cribaron las señales de hibridación y se cuantificaron con PhosphorImager usando el software Image Quant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). La secuenciación del
10 ADN plasmídico de las sondas de ADNc clonadas con el cebador T7 o SP6, se llevó a cabo manualmente usando el kit Sequenase V 2.0 (US Biochemical Inc., Cleveland, Ohio). Brevemente, el ARN extraído de las células se sometió a amplificación usando cebadores aleatorios, y se identificaron las bandas de un tipo celular por comparación y se aislaron. Los fragmentos obtenidos se ensayaron en la transferencia Northern con ARN de líneas celulares para confirmar que los ARNm correspondientes están regulados positivamente en células que expresan Fos. Después se generó una
15 biblioteca de ADNc propia en vectores lambda ZAP a partir de líneas celulares de fibroblastos de ratón para obtener los clones de longitud completa usando un kit de síntesis y clonación de ADNc (Stratagene). El cribado se llevó a cabo de acuerdo con el fabricante. Los clones positivos primero se analizaron mediante mapa de restricción, y los más largos se sometieron a secuencia de ADN.

20 Análisis de clones

La secuencia de F0401 se muestra en la Figura 1 y la secuencia de HF175 se muestra en la Figura 2: un análisis búsqueda sencillo en los bancos de datos NIH y EMBL puso de manifiesto que F0401 y el homólogo humano FIGF son genes nuevos, y sus secuencias son similares a los genes de una familia de factores de crecimiento caracterizados por la identidad de la familia del factor de crecimiento de plaquetas (PDGF). El patrón de consenso de la familia es: C-V-x(3)-R-C-x-G-C-C-N. Los miembros de esta familia forman dímeros con enlaces disulfuro y son mitógenos potentes. La secuencia más parecida a F0401 y HF175 es la del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que forma un homodímero y es un factor de crecimiento activo en la angiogénesis y el crecimiento celular endotelial (Keck y col., 1989; Leung y col., 1989). Puesto que VEGF es un factor de crecimiento su sobreexpresión puede dar como resultado angiogénesis tumoral (Plate y col., 1993). Informes recientes indican el posible uso terapéutico basado en la inhibición de VEGF en tumores (Kim y col., 1993), y en el tratamiento con VEGF para estimular la angiogénesis (Takeshita y col., 1994).

Los siguientes experimentos se llevaron a cabo usando F0401.

35 La secuencia de proteína predicha para FIGF tiene una secuencia hidrófoba en el extremo N que puede codificar un péptido señal. Esta región del extremo N larga no muestra una homología significativa con proteínas conocidas. Sin embargo, hay un dominio cargado positivamente en esta región que puede permitir la unión de la proteína a la membrana celular o a la matriz extracelular.

40 Para verificar si FIGF es una proteína segregada, se transfectaron células COS-7 con un vector de expresión que contenía el ADNc de FIGF controlado por el promotor del gen temprano inmediato del citomegalovirus (CMV). Los anticuerpos policlonales, contra FIGF recombinante (como se ha descrito previamente), inmunoprecipitaron una banda específica que se observa tanto en los lisatos celulares como en los medios condicionados de las células COS-7 transfectadas con FIGF (Fig. 4A). Después de 1 hora de marcaje seguido de 1 hora de seguimiento, estaba presente principalmente una banda específica en el lisato celular, mientras que después de un seguimiento más largo de 4 horas, la proteína se acumulaba en el líquido sobrenadante celular. En condiciones no desnaturalizantes, FIGF se agregó en una forma multímera. La adición de b-mercaptoetanol dio como resultado una desnaturalización parcial de la proteína que migró mayoritariamente como una banda de 66 kDa y sólo se pudo encontrar una fracción minoritaria de la proteína como un monómero de los 33 kDa de masa molecular esperado (Fig. 4A). Estos resultados muestran que FIGF es una proteína secretada y puede formar dímeros. La dimerización de FIGF se podía predecir puesto que el dominio central de FIGF es altamente conservado y contiene los restos de cisteína implicados en la dimerización tanto de PDGF como de VEGF. Además se investigó si el medio condicionado de las células que producían FIGF podía promover el crecimiento celular *in vitro*, ensayado como la incorporación de [³H]-timidina (Vaziri y col., (1995)). El medio condicionado se obtuvo de células COS-7 transfectadas transitoriamente o de clones estables, derivados de fibroblastos c-fos (-/-), que expresaban FIGF controlado por el promotor de CMV. La actividad mitógena del medio que contenía FIGF se ensayó en fibroblastos c-fos (-/-). El medio condicionado tanto de COS-7 transfectadas (Fig. 4B) como de clones de fibroblastos estables que sobreexpresan FIGF (Fig. 4C), induce la síntesis de ADN en fibroblastos c-fos (-/-). Como en las células de mamífero la expresión de FIGF podía inducir la activación de otros factores de crecimiento, que a su vez serían responsables de la incorporación de [³H]-timidina medida, se ensayó la actividad mitógena de una proteína FIGF recombinante expresada en *E. coli* (como se ha descrito previamente). Con el fin de obtener una proteína recombinante biológicamente activa, la proteína FIGF de *E. coli* purificada se renaturalizó parcialmente en presencia de una mezcla de glutatión reducido y oxidado. La proteína recombinante purificada se ajustó a 0,4 mg/ml y se redujo completamente en presencia de urea 8 M, b-mercaptoetanol al 2%, durante 1 hora a 370°C. La proteína reducida se dializó contra una solución que contenía Tris-Cl 50 mM pH 8,0, urea 1 M, glutatión reducido 5 mM y glutatión oxidado 0,5 mM durante 2 días, y contra una solución que contenía Tris-Cl 20 mM pH 7,5, NaCl 0,7 M durante 1 día, como describen Hoppe y col., *Biochemistry*, 28, págs. 2956-2960 (1989); Hoppe y col. *Eur. J. Biochem.*, 187, págs. 207-214 (1990). El FIGF parcialmente replegado inducía la síntesis de ADN en fibroblastos

c-fos (-/-) de una forma dependiente de la dosis (Fig. 4D). Como se esperaba, las células c-fos (-/-) también son sensibles a PDGF-BB, mientras que el tratamiento con VEGF no inducía incorporación de [³H]-timidina en estas células. La actividad mayor de síntesis de ADN se obtuvo con 2 μg de FIGF purificado. La actividad específica aparentemente baja observada de FIGF recombinante, probablemente se debe a la baja eficacia del repliegado correcto de FIGF, puesto que FIGF contiene 29 restos de cisteína de 358 aminoácidos. También se ensayó la actividad mitógena de FIGF recombinante en fibroblastos de embrión de ratón (MEF). FIGF inducía la síntesis de ADN en fibroblastos de embrión de ratón de una forma dependiente de la dosis (Fig. 4E). Se aisló el ADNc de FIGF por cribado diferencial de ARN de células que diferían sólo en la expresión de c-fos. El análisis de la expresión del gen de FIGF por transferencia Northern pone de manifiesto que el mensajero de FIGF apenas se puede detectar en fibroblastos c-fos (-/-), mientras que su expresión es alta en fibroblastos c-fos (+/+) salvajes (Fig. 5A, compárense las calles 1-3 con las calles 7-9). La expresión de FIGF se restablece completamente en clones estables, derivados de células c-fos (-/-), que expresan c-fos exógeno controlado por el promotor constitutivo de FBJ-LTR (Hu y col., (1994)) (Fig. 5A, compárense las calles 1-3 con las calles 4-6). La transfección transitoria de c-fos exógeno da como resultado la inducción de FIGF en células c-fos (-/-), aunque debido al menor número de células transfectadas, la inducción observada es menos pronunciada (Fig. 5A, calles 10 y 11). Por lo tanto, la expresión de FIGF depende de c-fos. Además, FIGF no es inducido por el homólogo de levadura AP-1 constitutivo GCN4. En células de mamífero GCN4 puede activar la mayoría de los genes diana de AP-1, pero no es oncogénico. En fibroblastos salvajes c-Fos es la proteína Fos mayoritaria asociada con c-Jun o Jun B en la primera hora después de la inducción con suero. Después c-Fos ya no es detectable y se sustituye por FraJ1 y FraJ2 en el complejo de AP-1. En células que expresan c-fos, FIGF es altamente expresado cuando las células se mantienen en condiciones de suero bajo y disminuye a niveles indetectables en 6 horas después de la inducción con suero (Fig. 5A). Este patrón de expresión de FIGF se puede observar tanto en células salvajes como en células que expresan constitutivamente c-fos (Fig. 5A). Por lo tanto, se observa una discrepancia entre el máximo esperado de expresión de c-fos y la aparición de FIGF, cuyo mensajero se acumula en la fase inactiva. El patrón de regulación de FIGF sugiere que además de la expresión de c-fos, son necesarios controles de regulación adicionales para su activación. Aunque FIGF pertenece a la familia de factores de crecimiento de PDGF/VEGF, su expresión se parece más a la expresión de genes específicos de parada de crecimiento (gas). Es interesante que, uno de ellos, gas6, actúa como un factor de crecimiento. Tanto el factor de crecimiento PDGF como VEGF están implicados en la formación de tumor (Kim y col., (1993)). Además, PDGF es el principal mitógeno del suero que induce la activación de la transcripción de c-fos. Con el fin de comparar el patrón de expresión de este factor de crecimiento con respecto a FIGF, se midieron los niveles de los mensajeros de PDGF y VEGF en fibroblastos que diferían en la expresión de c-fos. Como se puede observar en la Fig. 5B, la regulación de los mensajeros tanto de PDGF como de VEGF es distinta de la FIGF. Estos factores de crecimiento son inducidos rápidamente después de la inducción con suero y su expresión es independiente de la de c-fos. El avance del tumor se caracteriza por cambios morfológicos del tumor que conducen a que las células mutadas pierdan su adhesión a los vecinos originales y escapen del tejido de origen. Se ha implicado a c-fos en el avance del tumor y su sobreexpresión induce una morfología celular transformada en fibroblastos y células epiteliales. Puesto que FIGF es un factor de crecimiento dependiente de c-fos, se analizó si su sobreexpresión podía inducir la transformación morfológica de los fibroblastos. Como se puede observar en la Fig. 7, la expresión constitutiva de FIGF en los fibroblastos induce un fenotipo transformado. Los clones estables derivados de células c-fos (-/-), que expresan FIGF constitutivamente, adquieren una morfología con forma de huso, se hacen más refractivos y se desprenden de la placa (Fig. 7, B frente a A). Por el contrario, los clones estables que expresan el mensajero de FIGF antisentido adquieren una morfología plana menos refringente (Fig. 7C) que es más parecido al fenotipo de células c-fos (-/-) mantenidas en condiciones de poco suero (Fig. 7G). La sobreexpresión de c-fos altera la morfología de la célula c-fos (-/-) de la misma forma que la observada con la sobreexpresión de FIGF, aunque el fenotipo es menos pronunciado (Fig. 7D). La sobreexpresión tanto de c-fos como de FIGF conduce a un fenotipo extremo en los fibroblastos: las células se hacen más largas, desorganizadas y pierden contacto (Fig. 7E). La expresión del mensajero antisentido de FIGF en células que expresan constitutivamente c-fos induce una inversión del fenotipo transformado (Fig. 7F). Por lo tanto, las células que expresan c-fos pero que carecen de FIGF pierden la mayor parte del fenotipo transformado, sugiriendo que la morfología observada en las células que expresan c-fos constitutivamente se debe a FIGF. También se obtienen alteraciones morfológicas similares por el tratamiento de células con FIGF recombinante purificado. Los fibroblastos c-fos (-/-), mantenidos en medio que contiene suero al 0,5% durante 120 horas, dejan de crecer, se vuelven grandes y planos y menos refringentes (Fig. 7G). El tratamiento de células con FIGF recombinante induce el fenotipo refringente, alargado y no adherente (Fig. 7H).

Los tumores obtenidos de células deficientes en c-fos no pueden experimentar avance maligno incluso aunque lleven el v-H-Ras activado. Por lo tanto, la expresión de c-fos es esencial para la activación de los genes diana responsables del fenotipo maligno. FIGF es un factor de crecimiento autocrino dependiente de c-fos que puede inducir acceso a la división celular, y cuando es sobreexpresado, un fenotipo transformado en fibroblastos. Los datos sugieren que el papel de c-fos en la activación del fenotipo maligno se debe a la activación de FIGF.

Experimentos adicionales sobre FIGF usando una sonda específica para FIGF en el análisis Northern de ARN derivado de tejidos de ratón, muestran que el gen de FIGF sólo es expresado en células que expresan Fos y pobremente en células que carecen del oncogén Fos (Figura 5). La transferencia de ARN usada en el ensayo Northern se obtuvo de Clontec. El análisis de su expresión en tejidos de ratón muestra que FIGF es expresado principalmente en el pulmón (Figura 6) y ya está presente el día 7 de vida del embrión de ratón (no se muestra).

Por lo tanto FIGF es una molécula relacionada con el factor de crecimiento VEGF, regulado positivamente por el oncogén Fos. Podría estar implicado en tumores y en el desarrollo.

Referencias

1. **Angel** y col., (1988) *Cell* 55, págs. 875-885
- 5 2. **Angel** and **Karin**, (1991), *Biochim, Biophys. Acta*, 1072, págs. 129-57
3. **Bauer** y col., (1993), *NAR*, 21, págs. 4272-4280
- 10 4. **Bergens** y col., (1994), *EMBO J.*, 13, págs. 1176-1188
5. **Brenner** y col., (1989), *Nature*, 337, págs. 661-663
6. **Cantor** y col., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, págs. 10932-10936
- 15 7. **Curren** y col., (1983), *Mol. Cell. Biol.*, 3, págs. 914-921
8. **Distel** y col., (1987) *Cell*, 49, págs. 835-844
9. **Farrar** y col., (1989), *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 5, págs. 229-261
- 20 10. **Ferrero** y col., (1995), *Human Molecular Genetics*, 4, págs. 1821-1827
11. **Gius** y col., (1990), *Mol. Cell. Biol.*, 10, págs. 4243-4255
- 25 12. **Gurney** y col., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, págs. 18133-18139
13. **Hasty** y col., (1990), *Arthritis Rheum.*, 33, págs. 388-397
14. **Hay** y col., (1989), *Genes Dev.*, 3, págs. 293-303
- 30 15. **Heuertz** y col., (1993), *Genomics*, 18, págs. 100-104
16. **Holt** y col., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, págs. 4794-4798
- 35 17. **Hu** y col., (1994), *EMBO J.*, 13, págs. 3094-3103
18. **Keck** y col., (1989), *Science*, 246, págs. 1309-1311
19. **Kerr** y col., (1988), *Science*, 242, págs. 1424-1427
- 40 20. **Kim** y col., (1993), *Nature*, 362, págs. 841-844
21. **Kovary & Bravo**, (1991), *Mol. Cell. Biol.*, 11, págs. 2451-2459
- 45 22. **Kovary & Bravo**, (1991), *Mol. Cell. Biol.*, 11, págs. 4466-4472
23. **Leung** y col., (1989), *Science*, 246, págs. 1306-1309
24. **Liang** y col., (1993), *NAR*, 21, págs. 3269-3275
- 50 25. **Liotta** and **Stetler**, (1990), *Semin. Cancer Biol.*, 1, págs. 99-106
26. **Lord** y col., (1993), *Mol. Cell. Biol.*, 13, págs. 841-851
- 55 27. **Miller** y col., (1984), *Cell*, 36, págs. 51-60
28. **Plate** y col., (1993) *Cancer Research*, 53, págs. 5822-5827
29. **Riabowol** y col., (1988), *Mol. Cell. Biol.*, 8, págs. 1670-1676
- 60 30. **Rollins** y col., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, págs. 3738-3742
31. **Ruther** y col., (1989), *Oncogene*, 4, págs. 861-865
- 65 32. **Sambrook** y col., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
33. **Sassone** y col., (1988), *Nature*, 334, págs. 314-319

ES 2 239 338 T3

34. **Schonthal** y col., (1988), *Cell*, 54, págs. 325-334

35. **Schusled** y col., (1995), *Brain Res.*, 670, págs. 14-28

5 36. **Seed & Aruffo**, (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, págs. 3365-3369

37. **Superti-Furga** y col., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, págs. 5114-5118

38. **Takeshita** y col., (1994), *J. Clin. Invest.*, 93, págs. 662-670

10

39. **Tsunoda** y col., (1994), *Anti-cancer Res.*, 14, págs. 2637-2642

40. **Vaziri** y col., (1995), *Mol. Cell. Biol.*, 15, págs. 1244-1253

15

41. **Woessner** and **Gurja**, (1991), *J. Rheumatol.*, Suppl. 27. págs. 99-101

42. EP-A-0120693

43. EP-A-0125023

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de nucleótidos que tiene al menos 80% de homología con la secuencia de nucleótidos expuesta entre el nucleótido 283 y el nucleótido 1356 de la Figura 1, codificando dicha molécula de nucleótidos una proteína con actividad mitógena, o un fragmento de dicha molécula de nucleótidos, cuyo fragmento codifica una proteína con actividad mitógena.
- 10 2. Una molécula de nucleótidos que tiene al menos 80% de homología con la secuencia de nucleótidos expuesta entre el nucleótido 242 y el nucleótido 1303 de la Figura 2, codificando dicha molécula de nucleótidos una proteína con actividad mitógena, o un fragmento de dicha molécula de nucleótidos, cuyo fragmento codifica una proteína con actividad mitógena.
- 15 3. La proteína codificada por la molécula de nucleótidos o el fragmento de dicha molécula de nucleótidos de la reivindicación 1 o reivindicación 2.
4. Un vector para expresar la molécula de nucleótidos de la reivindicación 1 o reivindicación 2, que comprende un promotor y dicha molécula de nucleótidos.
- 20 5. Una célula hospedante transformada con el vector de la reivindicación 4.
6. La célula hospedante de la reivindicación 5 que es una célula de ovario de hámster chino.
- 25 7. Un método para producir la proteína de la reivindicación 3, que comprende cultivar la célula hospedante de la reivindicación 5 o reivindicación 6 en condiciones que conducen a la producción de la proteína, y recoger la proteína.
8. La molécula de nucleótidos de la reivindicación 1 o reivindicación 2, para usar en la terapia.
- 30 9. El uso de la molécula de nucleótidos de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la fabricación de una composición para tratar trastornos del desarrollo.
10. El uso de la proteína de la reivindicación 3, para identificar el receptor de dicha proteína.
- 35 11. El uso de la proteína de la reivindicación 3, en un ensayo para identificar antagonistas o agonistas de dicha proteína.
12. El uso de la molécula de nucleótidos de la reivindicación 1 o reivindicación 2, la proteína de la reivindicación 3 en el diagnóstico *in vitro* de un estado patológico o una predisposición a una enfermedad.
- 40 13. El uso de la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 1 o reivindicación 2, para generar un animal transgénico no humano.

45

50

55

60

65

FIG. 1

```

10      30      50
. . . . .
ggaagatatagaccacctcctgattatttttcagcgggaaactttgaaatattttcatt
. . . . .

70      90      110
. . . . .
gctttctccataactaagatttgtgtgaggcagtgaggagtcaccttgacttactcaag
. . . . .

130     150     170
. . . . .
tcatttcattggatttttaattacaactgatcatgtgatgttttttccatgtaaagttt
. . . . .

190     210     230
. . . . .
ggggcttcaaaactttgcttctgtggagaatgccttttgcaaacacttttoagtagctgacctgg
. . . . .

250     270     290
. . . . .
aaacaactgcttagtcatcgytagacatttaaaatattcaaaaatgtatggagaatgggga
. . . . .
      N Y G E H G

```

FIG. 1(1)

310	330	350
atggggaatacctcatgatgttccatgtgtacttggcagggttcaggagcgaacat		
M G N I L M M F H V Y L V Q G F R S E H		
370	390	410
ggaccagtgaaggattttcttttggagcgatcatccgggtccatgttggaaogtctgaa		
G P V K D F S F R R S S R S M L E R S E		
430	450	470
caacagatccgagcagcttctagtttggaggagtgctgcaaatcgcgcaactctgaggac		
Q Q I R A A S S L E E L L Q I A H S E D		

FIG. 1(III)

490	.	510	.	530
	tggaagctgtggc	gtgccgggttgaagctcaaaagtcttgccagtgatggactcacgctca	.	
	W K L W R C R L K L K S L A S M D S R S			
550	.	570	.	590
	gcatcccatcgctcca	cagatttgccggcaactttctatgacactgaaacactaaagtt	.	
	A S H R S T R F A A T F Y D T E T L K V			
610	.	630	.	650
	atagatgaagaatggcagagacc	caatgacggccctagagagacatgacgtagaaagtcgcc	.	
	I D E E W Q R T Q C B P R E T C V E V A			
670	.	690	.	710
	agtgagctggggaagacaaco	aacacatttctcaagccccctgtgtaaatgtcttcggg	.	
	S E L G K T T N T F F K P P C V N V F R			

FIG. 1(III)

730	750	770
<p>tgtggaggctgctgcaacgagagggtgtgatgtgtatgaaacaagaacctcctacatc C G C C N E B G V M C M N T S T S Y I</p>		
790	810	830
<p>tccaacagctctttgagatatcagtgccctctgaocatcagtgcccgagttagtgccctgtt S K Q L F E I S V P L T S V P E L V P V</p>		
850	870	890
<p>aaaattgccaaaccatacgggttgtaagtgcttgcccacggggcccccgcattcctactca K I A N H T G C K C L P T G P R H P Y S</p>		
910	930	950
<p>attatcagaagatccattcagaccaccagaagaagatgaatgtcctcattccaagaactc I I R R S I Q T P E E D E C P H S K K L</p>		
970	990	1010
<p>tgctcctattgacatgctgtgggataaacacczfaatgtgttttgcagaagcagact C P I D M L W D N T K C K C V L Q D E T</p>		

FIG. 1(IV)

1030	1050	1070
ccactgctgggacagaagaccactcttaacctccaggaaaccactctctgtggaccgac		
P L P G T B D H S Y L Q E P T L C G P H		
1090	1110	1130
atgacgtttgatgaaagatcgcctgtgagtgcgctctgtaaagcaccatgtccgggagatctc		
M T F D E D R C E C Y C K A P C P G D L		
1150	1170	1190
attcagcaccggaaaactgcagttgotttgagtgcaaaagaaagtctggagagctgctgco		
I Q H P E N C S C F E C K E S L E S C C		
1210	1230	1250
caaaagcacaagatttttcaccagacacctgcagctgtgaggacagatgtccttttcac		
Q K H K I F H P D T C S C E D R C P F H		
1270	1290	1310
accagaacatgtgcaagtagaaagccagcctgtggaagcactggcgctttccaaggag		
T R T C A S R K P A C G K H W R F P K E		

FIG. 1(V)

1330	1350	1370
acaagggccaggactctacagccaggagacccttgattcaacttcccttcaagtccc		
T R A Q G L Y S Q E N P		
1390	1410	1430
cccatctgtcattttaaacagctcactgcttctgtcaagttgctgctcactgttgccac		
1450	1470	1490
taccctgccccccccctccccccctccagggtgttagaaaagttgatttgacctagtgt		
1510	1530	1550
catggtaaaggccacatttccatgcaatggcggctaggtgatccccagttcaactgacaaa		
1570	1590	1610
tgacttgtagcttcagatgtctttgcgccatccagcactcagaaaaggagggtctgagga		

1630 1650 1670
 gccccttgttcttgatgaaataagaaagggttgcctgaaacagagtagtagtgccactcga
 1690 1710 1730
 ttggttcctcgggctggcaagtccaaggypcaatgctcatgagttattgtgctctcttct
 1750 1770 1790
 tatgaggaaatttcatttgatgatcagcactgacaaatcccatccacttgactttt
 1810 1830 1850
 aggttactgaagcactgctgatgttttatatgtaaaatgtatttaagggaataaaac
 1870 1890
 tgttatgagcccaaaaaaa

FIG. 1(VI)

FIG. 2

```

1  GGCACGAGGTTTTTTTTTTTTCATCTCTCTCCTCCACCCCTAAGATTGTGCAAA 60
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CCGTGCTCCAAAAAATAAATAAAGTAGAGAGAGGGGTGGGATTTCTAACACGTTT

   G T R F F F F F F F I S L S P P L R L C K -
   A R G F F F F S S L S P H P * D C A K -
   H E V F F F F H L S L P T P K I V Q K -

61  AAAAGCGTACCTTGCCTAATTGAAATAATTTCATTGGATTTTGATCAGAAGTATTATT 120
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTTTCGCATGGAAACGGATTAACTTTATTAAAGTAACTAAACTAGTCTTGACTAATAAA

   K S V P C L I E I I S L D F D Q N * L F -
   K A Y L A * L K * F H W I L I R T D Y L -
   K R T L P N * N N F I G F * S E L I I W -

121  GGTTTCTGTGAGTTTIGAGGTTTCAAACTTCTCTGAGAAATGCCTTTTGAAC 180
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CCAAGACACACTTCAAACTCCAAGTTTGAAGGAAAGACCTTTACGGAAACTTIG

```


FIG. 2(II)

301 GGGCTCCAGTAAATGAACATGGACCAGTGAAGCGGATCATCTCAGTCCACATTTGGAACGATC + 360
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCCGAGGTCAATTACTTGTACTCTGGTCACTTCGGCTAGTAGAGTCAAGGTGTAAACCTTGCTAG

 G L Q * * T W T S E A I I S V H I G T I -
 [G S S N E H G P V K R S S Q S T L E R S] -
 A P V M N M D Q * S D H L S P H W N D L -

 361 TGAACAGCAGRTCAGGGCTGCTTCTAGTTTGGAGGAACTACTTCGAAATTACTCACTCTGA + 420
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACTTGTCTAGTCCCGACGAAGATCAAACTCCTTGTGATGAAGCTTAAATGAGTGAGACT

 * T A D Q G C F * F G G T T S N Y S L * -
 [E Q Q I R A A S S L E E L L R T T H S E] -
 N S R S Q L L L V W R N Y F E L L T L R -

GGACTGGAAGCTOTOGAGATGCAGGCTGAGGCTCAAAGTTTACCAGTATCGOACTCTCG

FIG. 2(IV)

```

601  G C C A G T G A G C T G G G A A G A G T A C C A A C A C A C A T T C T T C A A G C C C C C T T G T G T G A A C G T G T T
      C O G G T C A C T C G A C C C C T T C T C A T G G T T G T A A G A A G T T C G G G G A A C A C A C A C T T G C A C A A
      G Q * A G E E Y Q H I L Q A P L C E R V
      A S E L G K S T N T F F K P P C V N V E
      P V S W G R V P T H S S P L V * T C S
661  C C G A T G T G G T G T T G C A A T G A A G A G A G C T T A T A T G T G T A T G A A C A C C A G C A C C T C G T A
      G G T A C A C C A C C A C A A C G T T A C T T C T C G A A T A C A C A T A C T A C T T G T G T C G T G G A G C A T
      P M W L L Q * R E L Y V Y E H Q E L V
      R C G G C C N E E S F M C M N T S T S Y
      D V V V A M K R A L C V * T P A P R T
721  C A T T T C C A A C A G C T C T T T G A G A T A T C A G T G C C T T T G A C A T C A G T A C C T G A A T T A G T G C C
      G T A A G G T T G T C G A G A A C T C T A T A G T C A C G G A A C T G T A G T C A T G G A C T T A A T C A C G G
      H F Q T A L * D I S A F D I S T * I S A
      I S K O L F E I S V P L T S V P E L V P
      F P N S S L R Y Q C L * H Q Y L N * C L

```

FIG. 2(V)

781 TGTAAAGTTGCCAATCATACAGGTTGTAAGTCTTGCACACAGCCCCCGCCATCCATA + 840
 -----+-----+-----+-----+-----+
 ACAAATTCACAGGTTAGTATGTCCACATTCACGAACGGTTGTCCGGGGGGGTAGGTAT
 C * S C Q S Y R L * V L A N S P P S I - - -
 [V K V A N H T G C K C L P T A P R H P Y]
 L R L P I I Q V V S A C Q Q P P A I H T - - -
 841 CTCAAATTACAGAAGATCCATCCAGATCCCTGAGAGAGATCGCTGTCCCATCCAGAA + 900
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GAGTAAATAGTCTTCTAGGTAGGCTAGGGACITCTTCTAGCCGACAGGGTAAAGGTTCTT
 L N Y Q K I H P D P * R R S L F P F Q E - - -
 [S I R R S I Q I P E E D R C S H S K K]
 Q L S E D P S R S L K K I A V P I P R N - - -
 ACTCTCCTATTCACATGCTATGGGATACCACAAATGTAATGTGTTTGCAGGAGGA

FIG. 2(vii)

1081 TCATAATCCAGCACCCCAAAACTGCAGTTGCTTTGAGTGCAAGAAAGTCTGGAGACCTG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 1140 AGATTAGGTCGGGGGTTTGTGACGTTCAACGAAACTCAGCTTCTTTCAGACCTCTGGAC

 S N P A P Q K L Q L L * V Q R K S G D L -
 L I Q H P K N C S C F E C K E S E E I C -
 + S S T P K T A V A L S A K R V W R P A -

 1141 CTGCCAGACCAAGCTATTTCCACCAGACACCTGCAGCTGTGAGGACAGATGCCCCCTT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 1200 GACCGTCTTCGTTGATAAAGTGGTCTGTGGACCGTCCGACACTCCTGTCTACGGGGAA

 L P E A Q A I S P R E L Q L * G Q M P L -
 C Q K H K L F H P D I C S C E D R C P F -
 A R S T S Y F T Q T P A A V R T D A P F -

 1201 TCATACCAGACCAATGTGCAAGTGGCAAAACAGCATGTGCAAGCATTGCCCGCTTCCAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 1260 AGTATGGTCTGGTACACGTTTCCCGTTTGTGTTACACGTTTCCGTAACGGCGGAAGGTTT

 S Y Q T M C K W Q N S M C R A L P L S K -
 H T R P C A S G K T A C A K H C R F P K -
 I P D H V Q V A K Q H V Q S I A A F Q R -

FIG. 2(viii)

```

1261  GGAGAAAGGGCTGCCAGGGCCCCACAGCCGAAAGATCCATGATTCAGCGTTCCAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1320  CCTCTTTCCCGACGGGTCCCGGGGTGTGGCTTCTTAGGAACTAAGTCGCAAGGTTTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      G E K G C P Q A P Q P K E S L I Q E S K -
      E K R A A Q G P H S R K N P * F S V P S -
      R K Q L P R G P T A E R I L D S A F Q V -

1321  TTCCCAATCCCTGTCATTTTAACAGCATGCTGCTTTGCCAAGTTGCTGCACGTGTTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
1380  AAGGGTAGGGACAGTAAAAATTTGCTACGACGAAACGGTTCAACGACAGTGACAAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      F P I P V I F N S M L L C Q V A V T V F -
      S P S L S F L T A C C F A K L L S L F F -
      P R P C H F * Q H R A A L P S C C H C F F -

      TTCCAGCTGTAAATAAAAATCCATTTTACACAGCACCACTGAATCCAGACCACC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

```


FIG. 2(x)

```

1561  TTTTGGTTTGGTGAATGAGAAAGGTGTGTCIGTGCATGGAATGGCAGGTGTCATATGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAAACAAAACCCTACTCTTTCCACAGACCAGTACCTTACCGTCCACAGTATACT
1620
F L F F G E * E R C A G H G M A G V I * -
F C F L V N E K G V L V M E N Q V S Y D -
F V F W * M R K V C W S W N G R C H M T -

1621  CTGATTACTCAGAGCHGATGAGGAAACCTGTAGTCTCTGAGTCCCTTTGCTAATCGCAACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACTAATGAGTCTCGTCTACTCTCTTTGACATCAGAGACTCAGGAAACGATTAGCGTTGA
1680
L I T Q S R * G K L * S L S P L L I A T -
* L L R A D E E N C S L * V L C * S Q L -
D Y S E Q M R K T V V S E S F A N R N S -

1681  CTGTGAATTATTCIGATTCTTTTATGCAGAAATTGATTCGTATGATCAGTACTGACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAACACTTAATAGACTAAGHAAAATAACGCTCTFAAATAAGCATACTAGTCACTGACTGA
1740
L V N Y S D S F L C R I * F V * S V L T -
L * I I L I L F Y A E F D S Y D Q Y * L -
C E L F * F E F M Q N L I R M I S T D F -

```

```

1741  TCTGATTACTGTCAGCTTATAGTCTTCCAGTTTAATGAACCTACCATCTGATGTTTCAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
AAGACTAATGACAGGTGGAATATCAGAAGGTCAAATTACTTTGATGGTAGACTACAAGTA

F * L L S S L * S S S L M N Y H L M F H -
S D Y C P A Y S L P V * * T T I * C F I -
L I T V Q L I V F Q F N B L P S D V S Y -

1801  ATTTAAGTGTATTTAAGAAATAAACACCATTATTCAGCCATATAAANAANAANA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
TAAATTCACRPAATTTCTTTTATTGTGGTAATAAGTTCGGTATATTTTTTTTTTT

I * V Y L K K I N T I I Q A I * K K K K -
F K C I * R K * T P L P K P Y K K K K K -
L S V P K E N K H H Y S S E I K K K K K -
AAA

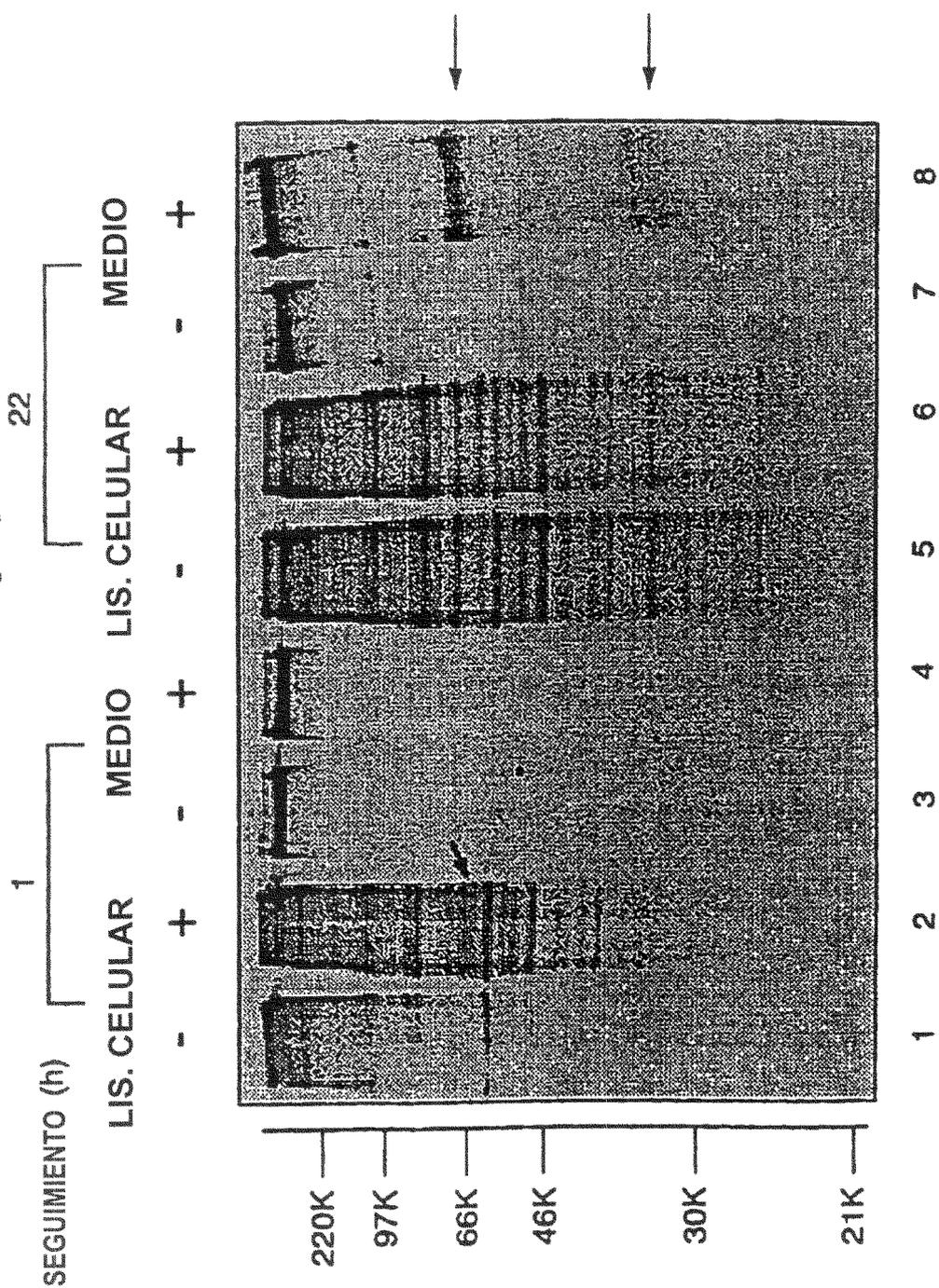
```

FIG. 2(xi)

FIG. 3

FIGF	(103)	T L K V I D F E W Q	R T Q C S P R E T C	M E V A S E L G K T	T . . N T F E K P P	C V N V F R G G C C
VEGF-C	(49)	I L K S I D N E W R	K T Q C M P R E V C	I D M G K E F G V A	T . . N T F E K P P	C V S V Y R E G G C C
VEGF	(39)	E V V K F M D V Y Q	R S Y C H R I E T L	M D I F O E Y P D E	I . . E Y I F K P S	C V P L M R E G G C C
PIGF	(39)	E V V P F Q F V W G	R S Y C R A L E R L	M D V V S E Y P S E	V . . E H M E S P S	C V S L L R R G T G C
PDGF-B	(84)	G S L T A E P A M	I A E C K T R T E V	F E I S R R R I D R	T N A N F L V W P P	C V E V Q R G S G C
PDGF-A	(83)	R R R S I E F A V	P A V C K T R T V I	Y E I P R S Q V D P	T S A N F L I W P P	C V E V K R G T G C
FIGF	(151)	C N E E G M C M N	T S T S Y I S K Q L	F E E T S . V P L T S	V P E L V P M K I A	N H T G C K G L P T
VEGF-C	(97)	C N S E G L Q C M N	T S T S Y L S K T L	F E E T . V P L S Q	G B K P V T I S F A	N H T S O R C M S K
VEGF	(87)	C N D E G L E C V P	F E E S N I T M Q I	M R L K . . P . H Q	G Q H I G E M S F L	Q H N K O E C R P K
PIGF	(87)	C G D E N L H C V P	V E T A N V T M Q W	L K R . . S . G D	R P S Y M E L T F S	Q H V R G E C R P L
PDGF-B	(134)	C N N R N V Q C R P	T Q V Q L R P V Q V	R K E I V R K K P	I F K K A T M T L E	D H L A C K G E T V
PDGF-A	(133)	C N T S S V K C Q P	S R V H H R S V K V	A K V E Y V R K K P	K L K E V Q V R L E	E H L E C A G A T E

FIG. 4(A)



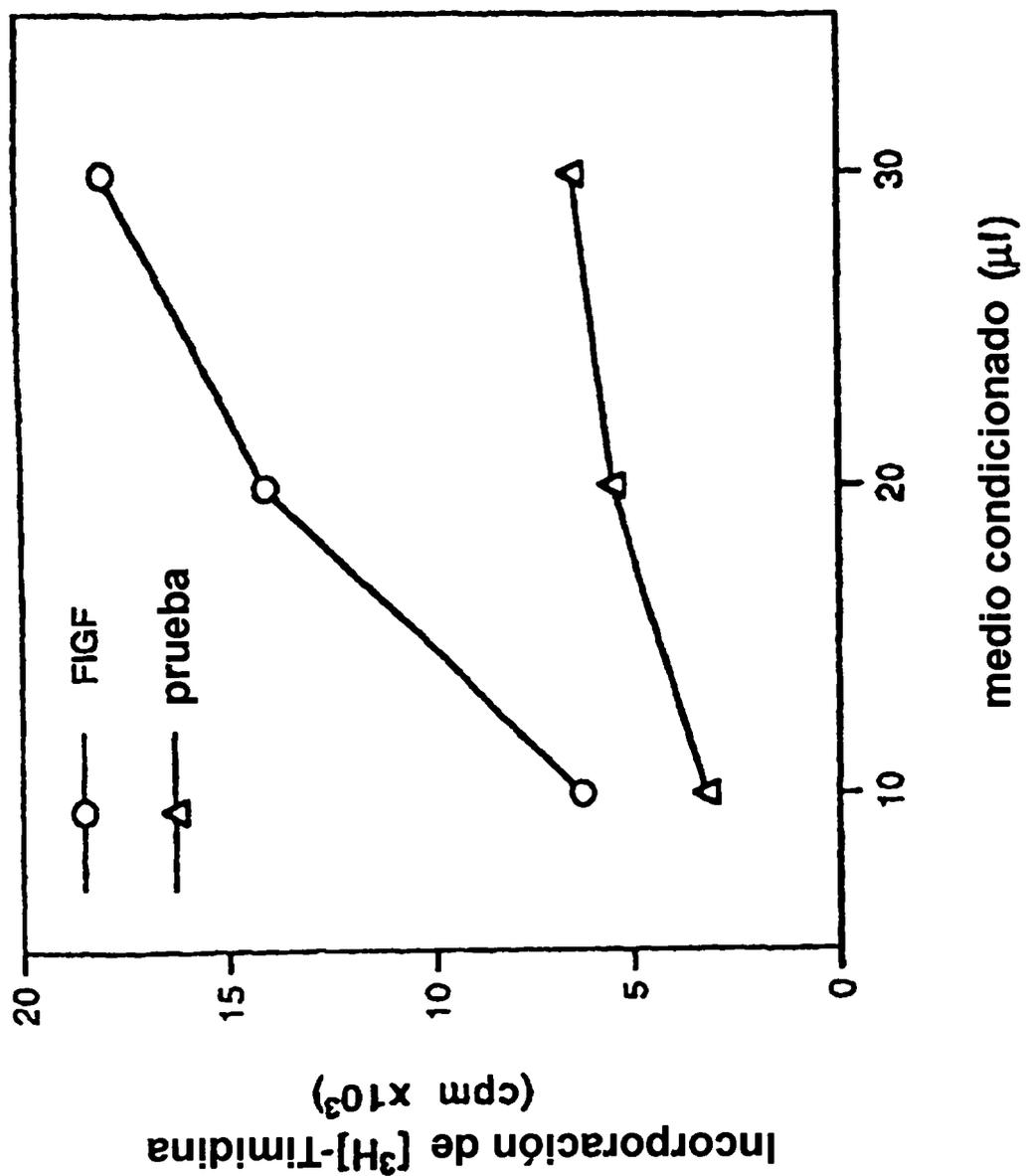
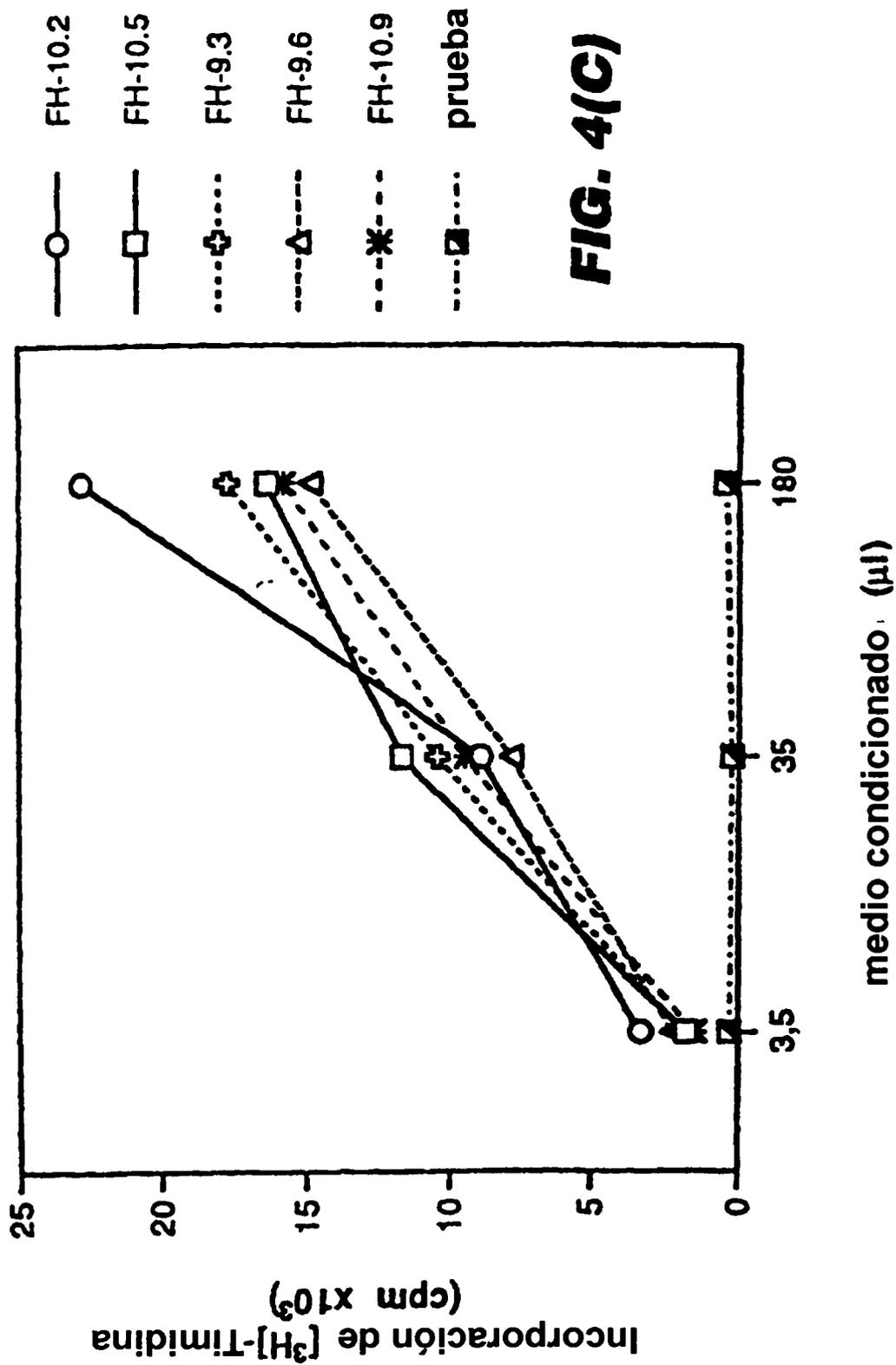


FIG. 4(B)



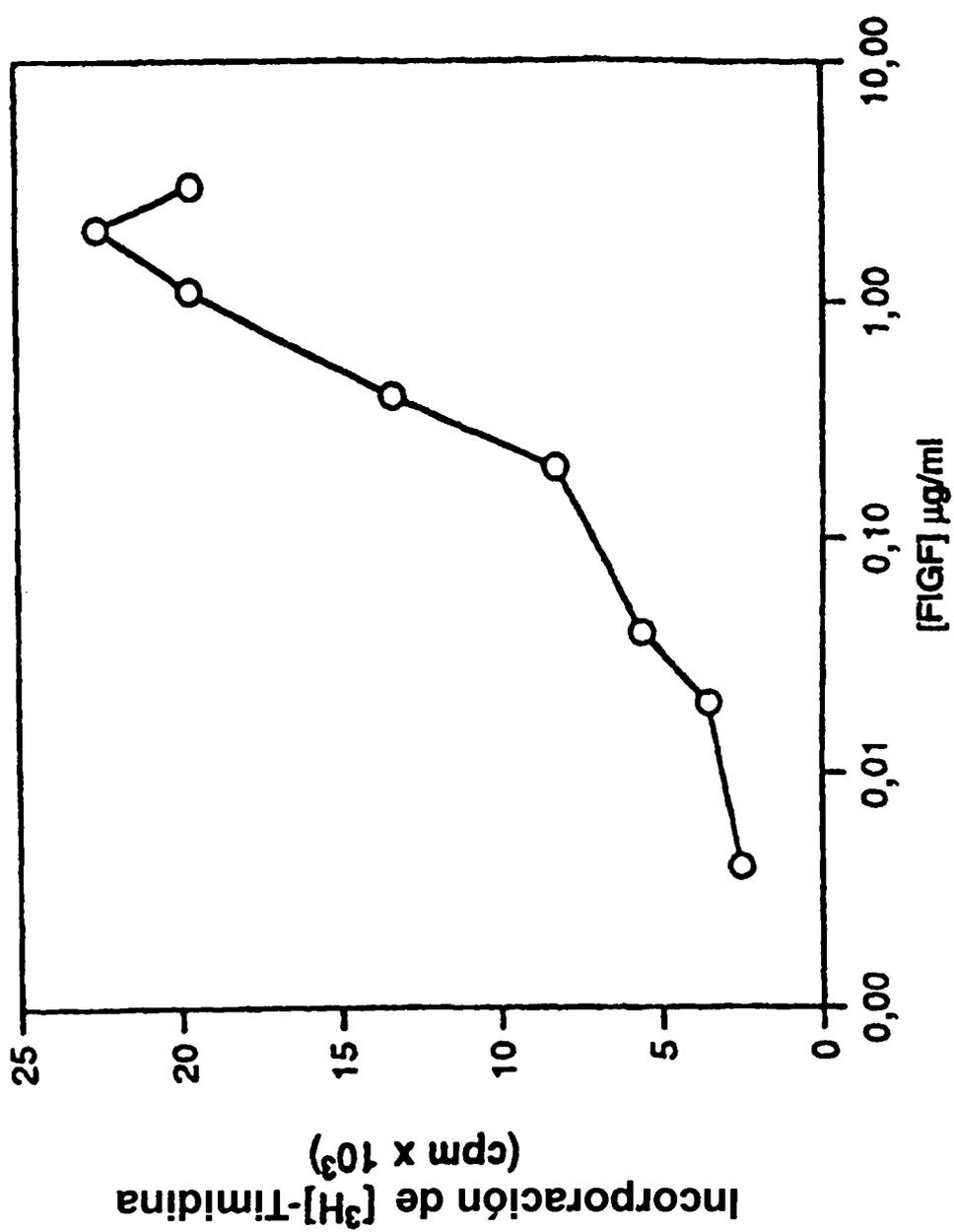


FIG. 4(D)

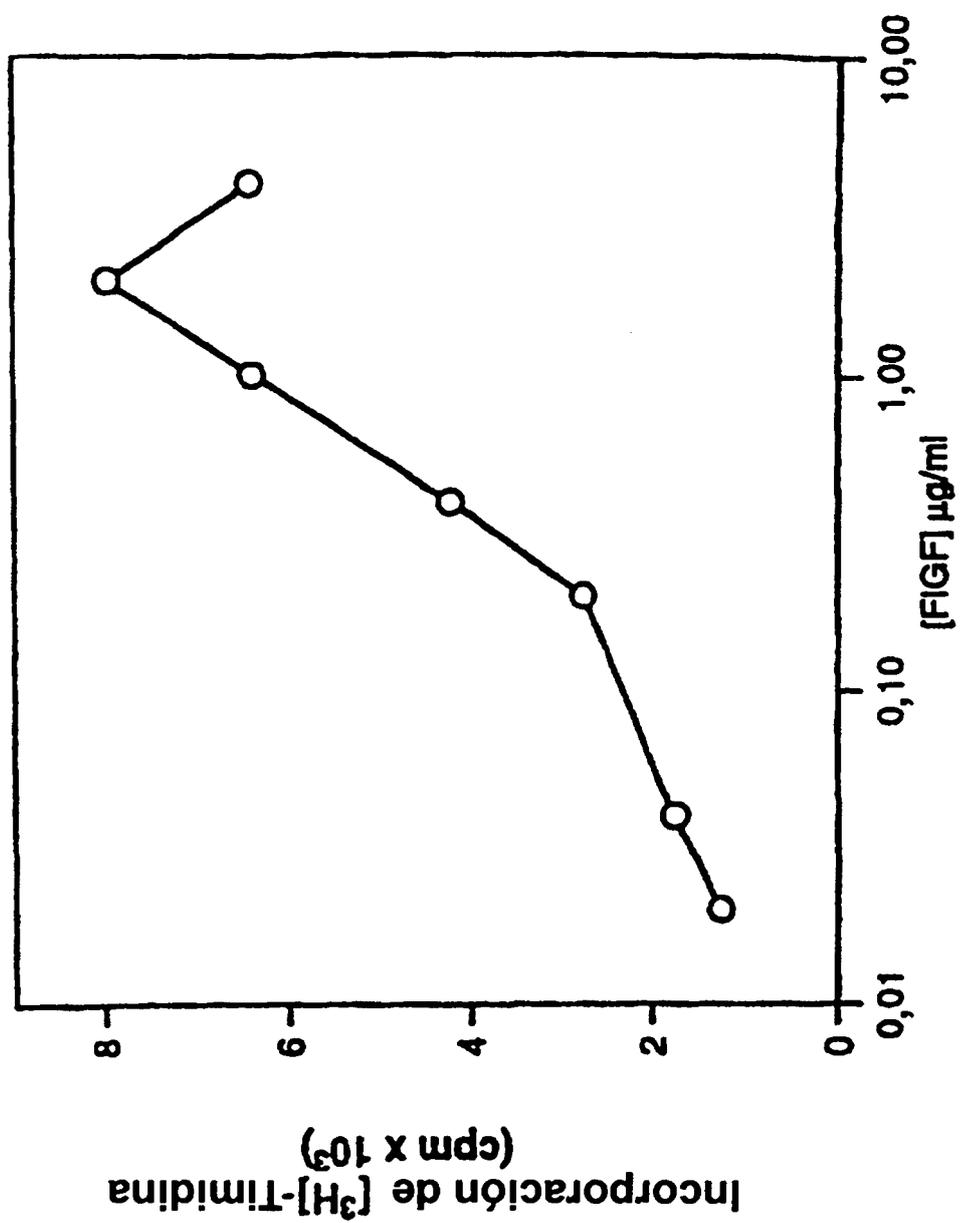


FIG. 4(E)

FIG. 5(A)

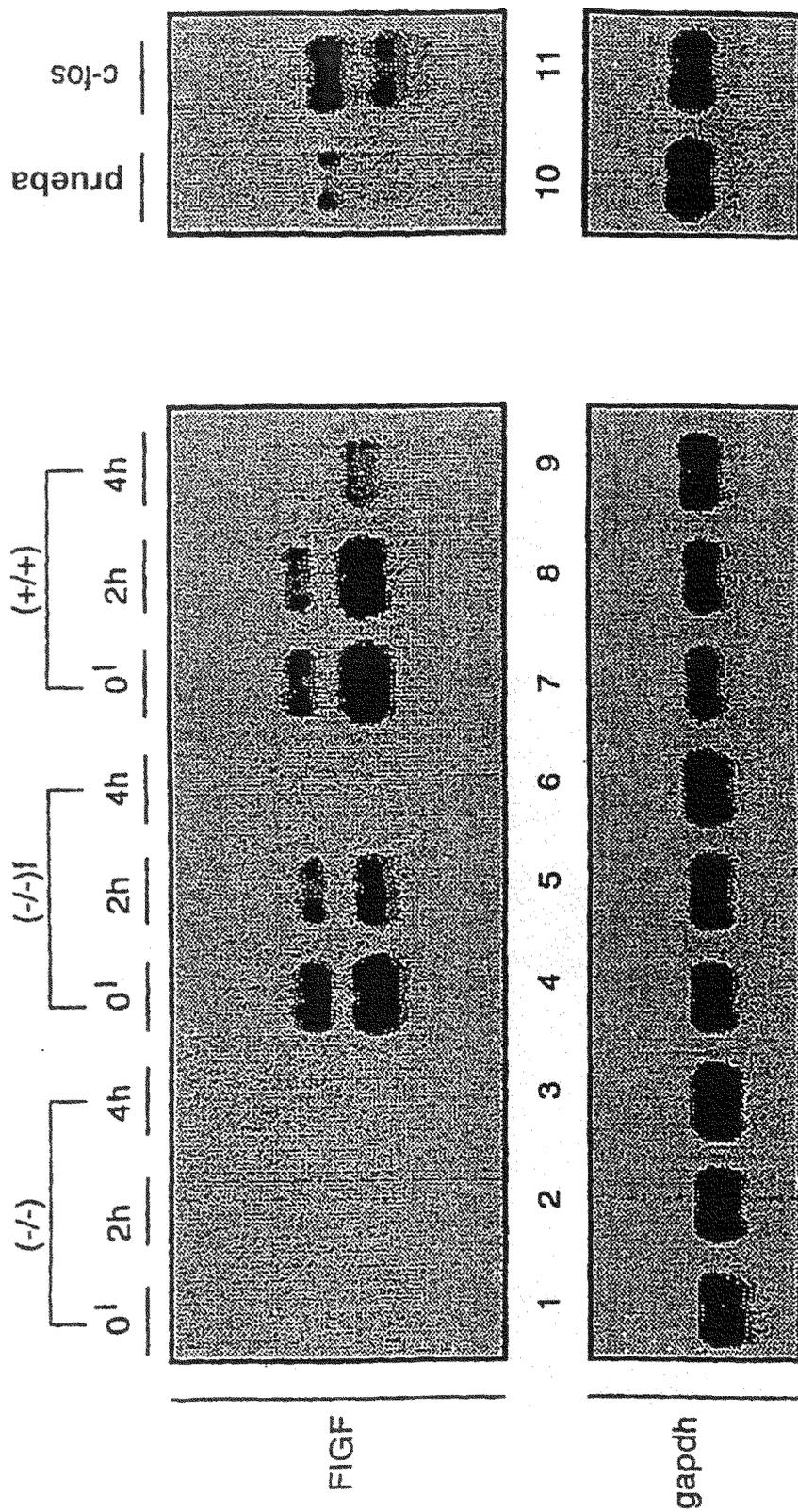


FIG. 5(B)

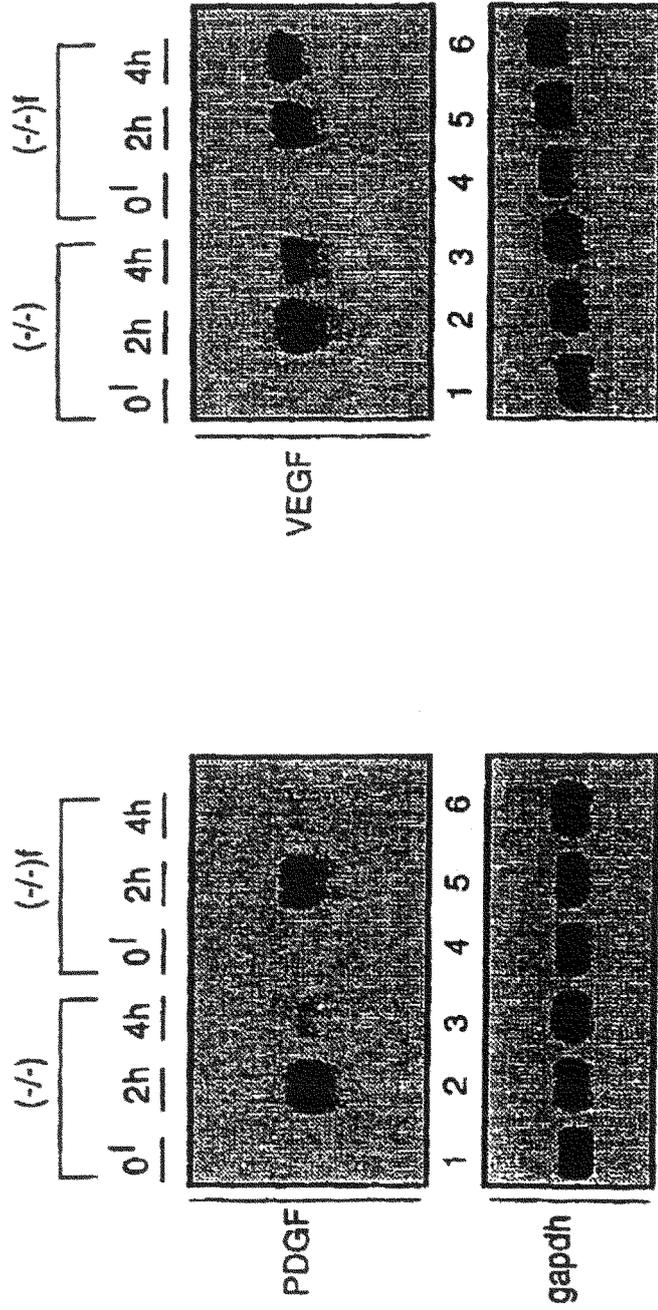


FIG. 6

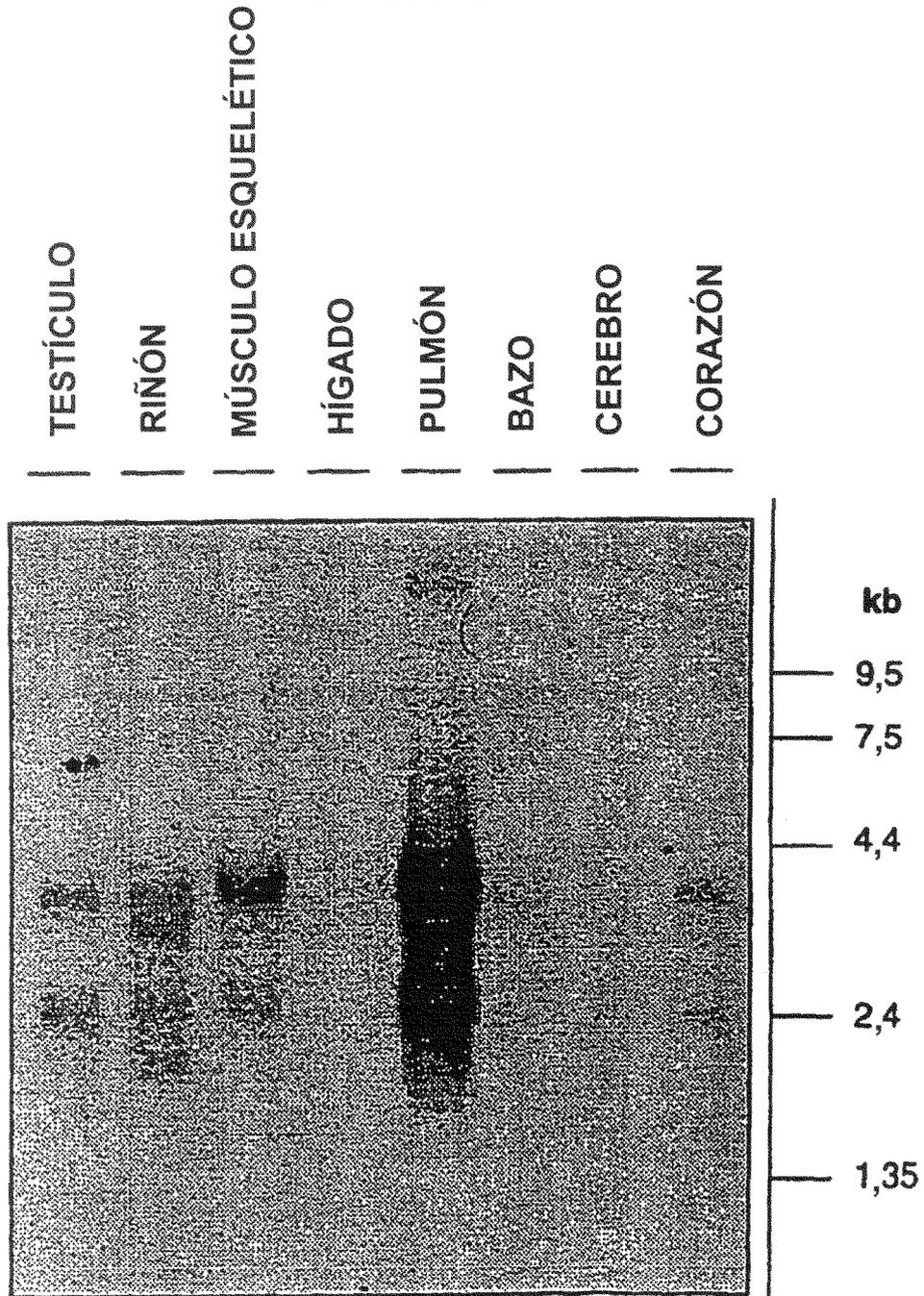


FIG. 7(C)

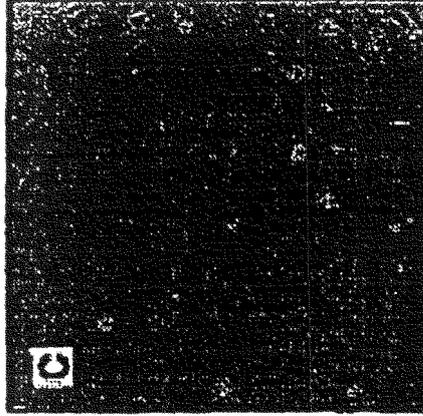


FIG. 7(B)

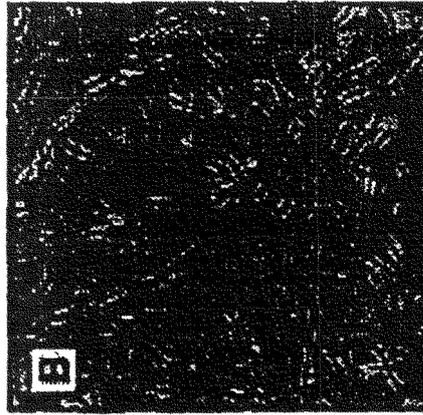


FIG. 7(A)

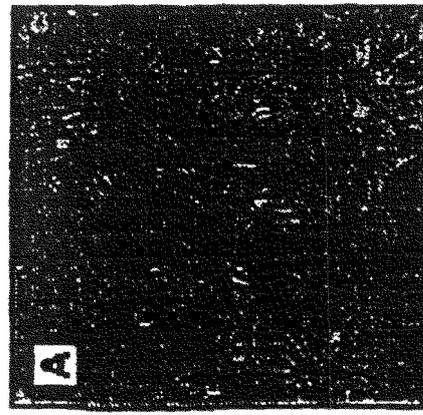


FIG. 7(F)

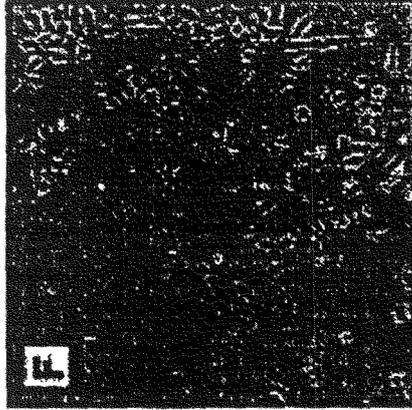


FIG. 7(E)

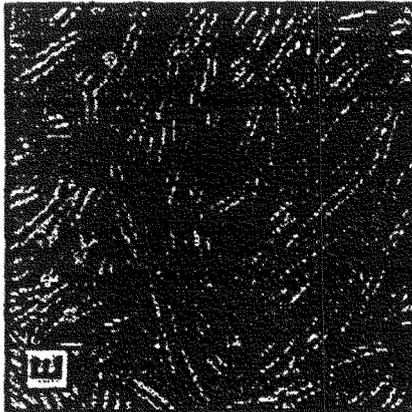


FIG. 7(D)

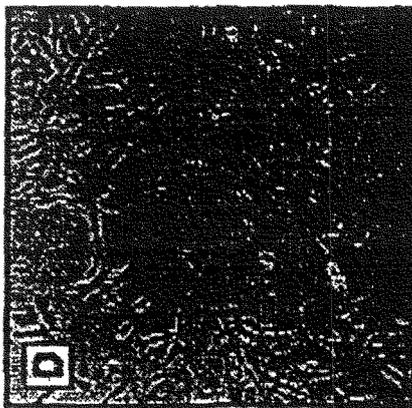


FIG. 7(G)

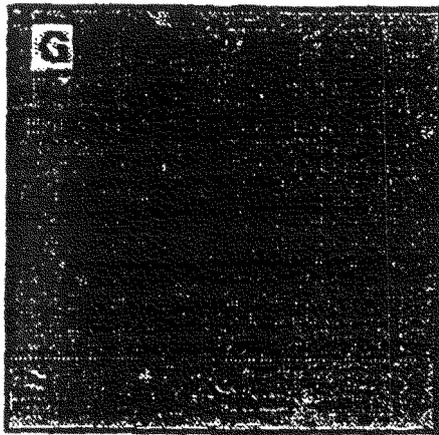


FIG. 7(H)

