

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 346**

51 Int. Cl.:
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)
A01N 37/18 (2006.01)
A01N 43/04 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02797786 .7**
96 Fecha de presentación: **27.08.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1427830**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2004**

54 Título: **Ácidos nucleicos y polipéptidos Bv8 con actividad mitógena**

30 Prioridad:
29.08.2001 US 316184 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.08.2012

73 Titular/es:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:
FERRARA, Napoleone y
LE COUTER, Jennifer

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 386 346 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

Ácidos nucleicos y polipéptidos Bv8 con actividad mitógena.

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere en general a procedimientos, composiciones y ensayos que utilizan
5 Bv8, una proteína con actividades mitógenas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIONCélulas endoteliales

[0002] El microambiente local afecta profundamente el fenotipo y las propiedades de crecimiento de las células endoteliales vasculares de una manera específica del tejido o el órgano, pero la naturaleza de las señales
10 instructivas locales es en gran medida desconocida. Existe una evidencia convincente de que las familias del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de la angiopoyetina de los factores de crecimiento específicos de las células endoteliales son esenciales para el desarrollo embrionario y para la angiogénesis en una variedad de circunstancias fisiológicas y patológicas (Ferrara y Alitalo, Nature Medicine, 5: 1359-1364 (1999); Carmeliet, Nature
15 Medicine, 6: 389-395 (2000)). Existe también una fuerte evidencia de una regulación local específica de tejido del fenotipo y del crecimiento de las células endoteliales (Aird y col., J. Cell Biol., 138: 1117-1124 (1997); Stewart y Wiley, Dev. Biol., 84: 183-192 (1981)). Las características morfológicas de las células endoteliales varían ampliamente entre los diferentes órganos (Simionescu y Simionescu, Cell and Tissue Biology, Urban and Schwarzenberg, Baltimore, (1988) pp. 355-398). Además, el sitio de aplicación determina las propiedades de los nuevos vasos en incluso una extensión mayor que el tipo de factor angiogénico probado (Dellian y col., Am. J.
20 Pathology, 149: 59-71 (1996); Roberts y col., Am. J. Pathology, 153: 1239-1248 (1998)). La base molecular de esta influencia del microambiente local sobre la vasculatura es desconocida, pero se cree que el estroma especializado juega un papel principal (Dellian, más arriba). Posiblemente, una red integrada de estímulos, que puede incluir las proteínas secretadas específicas de tejidos, además de componentes de la matriz celular y extracelular, funciona para determinar le estructura y la función, así como la modulación del crecimiento del endotelio residente.

25 **[0003]** De esta manera, existe una necesidad actual de identificar y caracterizar factores que influyen el crecimiento y/o la diferenciación de las células endoteliales. Además de aumentar nuestro conocimiento del desarrollo de la vasculatura, dichos compuestos podrían ser útiles en el diagnóstico y el tratamiento de las dolencias asociadas con el tejido vascular.

Células secretoras de hormonas

30 **[0004]** Aunque se han hecho progresos en el avance de la ciencia y de las terapias médicas, sigue existiendo una necesidad de nuevos tratamientos para las dolencias médicas de la sociedad. Una solución para encontrar nuevos tratamientos ha sido estudiar cómo funciona el organismo. En particular, es de interés saber cómo las células señalizadoras controlan el comportamiento del organismo. Por ejemplo, las células endocrinas secretan moléculas de señalización denominadas hormonas en las que un mal funcionamiento de la secreción de estas
35 hormonas puede conducir a una variedad de trastornos.

[0005] Las células especializadas en la secreción de hormonas incluyen las células de las gónadas, secretoras de testosterona (células de Leydig de los testículos), estrógeno (células de la teca interna del folículo ovárico) y progesterona (células del cuerpo lúteo del folículo ovárico). Aunque existen una variedad de tratamientos en el campo médico que utilizan la administración exógena de testosterona, estrógenos y progesterona,
40 permanece una necesidad de regular las células que producen estas hormonas.

[0006] Otras células especializadas en la secreción de hormonas incluyen las células de las glándulas adrenales y las células del sistema digestivo. Por ejemplo, las células de las glándulas adrenales secretan epinefrina, norepinefrina y hormonas esteroides tales como mieneralcorticoides y glucocorticoides. De particular interés es el cortisol, que está producido en la corteza de las glándulas adrenales y que influye el metabolismo de
45 muchos tipos de células. Las células del sistema digestivo incluyen aquellas del páncreas que secretan insulina. La insulina está secretada por los islotes de Langerhans y es esencial para el metabolismo de los carbohidratos. La insulina se usa en el tratamiento y el control de la diabetes mellitus, sin embargo, sigue existiendo una necesidad de tratamientos eficaces para trastornos tales como la diabetes. Otras hormonas de interés del tracto intestinal y respiratorio incluyen serotonina, endorfina, somatostatina, gastrina, secretina, colecistoquinina, glucagón y
50 bombesina.

[0007] Existen numerosas enfermedades y trastornos asociados con las células secretoras de hormonas, en particular las células endoteliales esteroideogénicas en el interior de las glándulas endocrinas. Sería, por tanto,

deseable identificar los factores de crecimiento que afectan específicamente a dichas células endoteliales. Dichos factores de crecimiento específicos de células endoteliales serían herramientas valiosas para diagnosticar y tratar los trastornos asociados con dichos tipos de células, ya para identificar además los fármacos candidatos útiles en el diagnóstico y tratamiento de dichas enfermedades.

5 Bv8

[0008] Bv8 es una proteína pequeña que se aisló originalmente de secreciones de la piel de la rana *Bombina variegata* (Mollay y col. Eur. J. Pharmacol: 374: 189-196 (1999)). Bv8 muestra más de un 40% de identidad con MIT-1, una pequeña proteína del veneno de la mamba negra que ha demostrado ser muy potente induciendo la contracción intestinal (Schweitz y col. FEBS Lett. 461: 183-188 (1999)). Se han clonado algunos homólogos de mamíferos de Bv8 de ratones y seres humanos y han demostrado tener secuencias aminoterminales idénticas (Wechselberger y col. FEBS Lett. 462: 177-181 (1999)). De forma igual que MIT-1, Bv8 humana ha demostrado contraer potentemente el músculo liso gastrointestinal, con CE₅₀ en el intervalo subnanomolar (Li y col. Mol. Pharm. 59: 692-698 (2001)). Se han identificado dos formas de Bv8 en seres humanos, reflejando la forma más larga la presencia de un exón cortado y empalmado alternativamente. La forma más larga de Bv8 humana es aproximadamente un 78% homóloga y un 58% idéntica a VRPA, descrita en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 09/886.242

RESUMEN DE LA INVENCION

[0009] La presente invención se basa en la identificación de actividades novedosas de Bv8. En particular, se ha encontrado que Bv8 induce la proliferación en células endoteliales, promueve la supervivencia de células endoteliales y promueve la angiogénesis. Tal como se ha descrito en detalle en la presente memoria descriptiva, se pueden usar ácidos nucleicos y polipéptidos de Bv8 en numerosos ensayos y en diagnóstico y tratamiento de dolencias asociadas con las células endoteliales.

[0010] En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento in vitro para inducir la proliferación de células endoteliales, aumentando la supervivencia de las células endoteliales, o induciendo la angiogénesis, que comprende poner en contacto dichas células con un polipéptido que tenga al menos un 80 por ciento de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4 o una molécula de ácido nucleico que codifique dicho polipéptido. En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto las células con Bv8 en una cantidad eficaz para inducir la proliferación de las células. El procedimiento puede comprender además poner en contacto las células con VEGF. En otra realización, el procedimiento comprende introducir ácido nucleico que codifica Bv8 en las células en una cantidad eficaz para inducir la proliferación celular, Este procedimiento puede comprender además introducir un ácido nucleico que codifica VEGF en las células.

[0011] En una realización, el Bv8 es un polipéptido Bv8 de la secuencia natural. Preferiblemente, el polipéptido Bv8 de la secuencia natural es un polipéptido Bv8 humano natural. El polipéptido Bv8 natural puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. En otra realización, la secuencia natural de Bv8 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6. En otra realización el Bv8 es capaz de unirse a la heparina. En otra realización más Bv8 es una inmunoadhesina de Bv8. En una realización adicional el Bv8 es un Bv8 quimérico.

[0012] En una realización, las células son células de una glándula esteroideogénica

[0013] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido que tiene al menos un 80 por ciento de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4 o una molécula de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido en la preparación de un medicamento para tratar una dolencia asociada con tejidos productores de hormonas. En una realización, el tratamiento comprende preferiblemente administrar al mamífero una composición que comprende Bv8 en una cantidad eficaz para tratar la dolencia. En otra realización, el tratamiento comprende además administrar VEGF o uno de sus agonistas al mamífero. El mamífero es preferiblemente un ser humano.

[0014] En una realización Bv8 se une a la heparina. En otra realización, Bv8 es un polipéptido Bv8 de la secuencia natural. Preferiblemente, el polipéptido Bv8 de la secuencia natural es un polipéptido Bv8 humano natural. El polipéptido Bv8 humano natural puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. En otra realización, la secuencia natural de Bv8 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

[0015] En un aspecto más la invención proporciona un procedimiento in vitro para inhibir la proliferación de células endoteliales, la supervivencia de células endoteliales, o la angiogénesis, que comprende poner en contacto dichas células con un antagonista de un polipéptido que tenga al menos un 80 por ciento de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, en el que dicho polipéptido es capaz de inducir la

proliferación de células endoteliales, aumentar la supervivencia de células endoteliales, o inducir la angiogénesis, y en el que el antagonista es un anticuerpo, un fragmento del anticuerpo de unión a antígeno, o una molécula antisentido. En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto las células endoteliales con una antagonista de Bv8 en una cantidad eficaz para inhibir la proliferación celular.

5 **[0016]** En un aspecto más adicional, la presente invención proporciona el uso de una antagonista de un polipéptido que tiene al menos un 80 por ciento de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, en el que dicho polipéptido es capaz de inducir la proliferación de células endoteliales, aumentar la supervivencia de células endoteliales, o inducir la angiogénesis, en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer en un mamífero en el que el antagonista es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo de unión a
10 antígeno, o una molécula antisentido. El tratamiento comprende preferiblemente administrar un antagonista de Bv8 en una cantidad eficaz para tratar el cáncer. En una realización el cáncer es un cáncer dependiente de hormonas. En otra realización, el cáncer es un cáncer de testículos.

[0017] En otro aspecto, el cáncer es de órganos reproductores en un mamífero, preferiblemente un ser humano. En una realización, el tratamiento comprende administrar un antagonista de Bv8 al mamífero en una cantidad eficaz
15 para tratar el cáncer, El cáncer es preferiblemente cáncer de testículos.

[0018] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un antagonista de un polipéptido que tiene al menos un 80 por ciento de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, en el que dicho polipéptido es capaz de inducir la proliferación de células endoteliales, aumentar la supervivencia de las células endoteliales, o inducir la angiogénesis, en la preparación de un medicamento para tratar
20 la angiogénesis o una enfermedad o dolencia asociada con una proliferación excesiva no deseada o incontrolada de células endoteliales en un mamífero en el que el antagonista es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, o una molécula antisentido.

[0019] En una realización, el tratamiento comprende preferiblemente administrar al mamífero un antagonista del mismo Bv8 en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad. El mamífero es preferiblemente un ser humano.

25 **[0020]** En un aspecto más adicional, la invención proporciona el uso de un antagonista de un polipéptido que tiene al menos un 80 por ciento de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, en el que dicho polipéptido es capaz de inducir la proliferación de células endoteliales, aumentar la supervivencia de células endoteliales o inducir la angiogénesis, para la fabricación de un medicamento para regular la fertilidad en un mamífero, en el que el antagonista es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, o molécula
30 antisentido. En una realización, el mamífero es un ser humano. El tratamiento comprende preferiblemente administrar un antagonista de Bv8 al mamífero en una cantidad eficaz para regular la fertilidad.

[0021] En realizaciones que se refieren al tratamiento de un trastorno dependiente de hormonas esteroideas en un mamífero, preferiblemente el mamífero es un ser humano. El trastorno dependiente de hormonas esteroideas se selecciona preferiblemente entre el grupo que consiste de hiperplasia adrenal congénita lipoide, infertilidad,
35 maduración sexual, tumores dependientes de andrógenos, pubertad precoz, síndrome de McCune-Albright, hipoplasia adrenal congénita, e hipogonadismo hipogonadotrópico.

[0022] Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento para identificar un antagonista de Bv8 poniendo en contacto un compuesto candidato con un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 por ciento de identidad con la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4; determinar la capacidad del
40 polipéptido de promover la proliferación de células endoteliales, la supervivencia de células endoteliales, o la angiogénesis; e identificar una molécula candidata que inhiba la actividad de proliferación de células endoteliales, la actividad de supervivencia de células endoteliales, o la actividad de la angiogénesis del polipéptido como un antagonista de Bv8. En una realización, se identifica un antagonista de Bv8 por su inhibición de la capacidad de Bv8 de estimular la proliferación de células endoteliales. En otra realización se identifica un antagonista de Bv8 por su
45 inhibición de la capacidad de Bv8 de promover la supervivencia de células endoteliales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0023]

La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) de un ADNc que codifica un homólogo de Bv8 humano. Se presentan también en negrita y subrayadas las posiciones de los codones de inicio y
50 detención respectivos.

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de un polipéptido homólogo de Bv8 humano tal como fue derivado de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Una presunta secuencia señal está comprendida por los aminoácidos 1 a 21.

La Figura 3 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 3) de un ADNc que codifica una versión cortada y empalmada de manera alternativa del homólogo de Bv8 humano. Se presentan también en negrita y subrayadas las posiciones de los respectivos codones de inicio y detención.

5 Las Figuras 4 muestran la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4 de un polipéptido homólogo de Bv8 humano tal como fue derivada de la secuencia de codificación de la SEQ ID NO: 3:

La Figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 5) de un homólogo de Bv8 de ratón. Se presentan también en negrita y subrayadas las posiciones de los respectivos codones de inicio y detención.

La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de un polipéptido homólogo de Bv8 de ratón tal como fue derivada de la secuencia de codificación de SEQ ID NO: 5.

10 La Figura 7 muestra una alineación de los homólogos de Bv8 de ratón y ser humano. Se recuadra un potencial dominio de unión a heparina. Tal como se indicó, este dominio no está presente en una transcripción alternativamente cortada y empalmada. Los homólogos de Bv8 de ratón y ser humano son aproximadamente un 96% idénticos.

15 La Figura 8 muestra una alineación de la secuencia de aminoácidos de Bv8 y EG-VEGF humanas. Bv8 humana es aproximadamente un 60% idéntica a EG-VEGF humana.

La Figura 9 muestra que el análisis de transferencia Western de muestras de ARN humano desveló una única transcripción de aproximadamente 1,8 kb. La expresión fue visible en testículos. Se indican los contenidos de las bandas por encima de las manchas, y se indica el tamaño (kb) a la derecha.

20 Las Figuras 10A y 10B muestran el análisis de transferencia Northern de la expresión de Bv8 en el ratón y la rata. En ratón, se puede observar la expresión de Bv8 en la mama y los testículos (Fig. 10A). En rata, la expresión de Bv8 es solo visible en los testículos (Fig. 10B). Además es también visible en testículos de rata una banda más pequeña de 0,8 kb.

25 Las Figuras 11A y 11B muestran que Bv8 induce la proliferación de células endoteliales. La Fig. 11A muestra que la administración de Bv8 a concentraciones de 1, 10 y 50 nM aumenta la proliferación muestra la proliferación de células endoteliales de capilares corticales adrenales bovinas (ACE) en comparación con controles no tratados ("C"). De manera similar, la Fig 11B indica que Bv8 a las tres concentraciones aumenta la proliferación de células de capilares cerebrales bovinas. En ambos casos, la proliferación inducida por Bv8 es menor que la inducida por VEGF ("V").

30 Las Figuras 12 muestran que Bv8 promueve la supervivencia de células endoteliales. Tras la incubación en medios que contienen Bv8 5 o 25 nM, muy pocas células de capilares cerebrales bovinas fueron apoptóticas tras la incubación en FCS o EG-VEGF al 2%. Bv8 y VEGF mostraron un efecto sinérgico, con unas pocas células apoptóticas presentes en el cultivo tras la incubación con Bv8 y VEGF juntas o por separado.

35 La Figura 13 muestra que Bv8 aumentó la formación capilar intersticial en los testículos de ratones sin pelo. Tras la inyección de vectores adenovíricos a los testículos de los ratones, que expresaban tanto LacZ, VEGF, EG-VEGF, como Bv8, se observó un aumento en la proliferación vascular intratesticular en animales tratados con Bv8.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES A LAS QUE SE HACE REFERENCIA

I. Definiciones

40 **[0024]** A no ser que se defina otra cosa, los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que una persona normalmente experta en la técnica a la cual esta invención pertenece conoce habitualmente. Véanse, por ejemplo Singleton y col., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2ª ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 1994); Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989). Para los fines de la presente invención, se definen a
45 continuación los siguientes términos.

[0025] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos "Bv8" y "polipéptido BV8", "que se utilizan indistintamente", se refiere a las variantes de Bv8, Bv8 de la secuencia natural, y Bv8 quimérica, cada una de las cuales se define en la presente memoria descriptiva. Opcionalmente, Bv8 no se asocia con la glicosilación natural. "Glicosilación natural" se refiere a los restos carbohidrato que se unen covalentemente a Bv8 cuando ésta se
50 produce en células de mamíferos, particularmente en las células en las que se produce en la naturaleza. De acuerdo

con esto, el Bv8 producido en una célula no humana es un ejemplo de Bv8 que puede “no estar asociado con la glicosilación natural”. Algunas veces Bv8 puede no estar glicosilada en todas, como es en el caso en el que se produce en procariontas, por ejemplo, *E. coli*.

[0026] El ácido nucleico de Bv8 es ARN o ADN que codifica un polipéptido de Bv8, tal como se ha definido anteriormente, o que se hibrida a dicho ADN o ARN y permanece unido de forma estable a éste en condiciones rigurosas de hibridación y es mayor de aproximadamente 10 nucleótidos de longitud. Las condiciones rigurosas son aquellas que (1) emplean baja fuerza iónica y elevada temperatura para el lavado, por ejemplo, NaCl 0,15 M / citrato de sodio 0,015 M / NaDodSO₄ al 0,1% a 50°C, o (2) uso durante la hibridación de un agente de desnaturalización tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (vol/vol) con albúmina de suero bovino al 0,1% / Ficoll al 0,1% / polivinilpirrolidona al 0,1% / tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C.

[0027] El ácido nucleico se une de manera operable cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. El ácido nucleico de Bv8 se puede unir de manera operable con otra secuencia de ácido nucleico en un vector que se pueda expresar en un organismo hospedador concreto. Esto se puede llevar a cabo mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia de una líder secretora se une de manera operable al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido. Un promotor o potenciador está unido de manera operable a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido de manera operable a una secuencia de codificación si está colocado de forma que facilite la transcripción. Por lo general, “unido de manera operable” significa que las secuencias de ADN que están enlazadas son contiguas y, en el caso del líder de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen porqué ser contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligadura en sitios de unión convenientes. Si no existen sitios tales, entonces se usan adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica habitual.

[0028] “Secuencia natural de Bv8” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que Bv8 derivado de la naturaleza. De esta manera, la secuencia natural de Bv8 puede tener la secuencia de aminoácidos de Bv8 humana que se produce naturalmente, Bv8 de murino, o Bv8 de cualquier otra especie de mamífero. Por ejemplo, en la Figura 2 se muestra una secuencia de aminoácidos de la secuencia natural de longitud completa de la Bv8 humana (SEQ ID NO: 2). En la Figura 4 se muestra una segunda secuencia natural de longitud completa de la Bv8 humana (SEQ ID NO: 4). Estas dos secuencias son el resultado del corte y empalme alternativo de un exón que codifica un dominio general de unión de heparina. De esta manera, en la Figura 2 se muestra la secuencia natural de la Bv8 humana cuya secuencia de aminoácidos comprende un dominio de unión de heparina, mientras que la secuencia natural de Bv8 representada gráficamente en la Figura 4 (SEQ ID NO: 4) no lo contiene. En la Figura 6 se muestra una secuencia natural de la secuencia de aminoácidos de Bv8 de ratón (SEQ DE ID NO: 6). Se dan a conocer también las secuencias de Bv8 humana y de murino, por ejemplo, en Wechselberger et al. (FEBS Lett. 462: 177-181 (1999)) y Li y col. (Mol. Pharm. 59: 692-698 (2001)). Dicha secuencia natural de Bv8 se puede aislar de la naturaleza o se puede producir mediante medios recombinantes y/o sintéticos. El término “secuencia natural de Bv8” abarca específicamente las formas prepro, pro y madura y las formas truncadas de Bv8, las formas variantes que se producen naturalmente (por ejemplo, las formas alternativamente cortadas y empalmadas, tales como la que se muestra en la Figura 4 (SEQ ID NO: 4) y las variantes alélicas que se producen naturalmente. Una secuencia natural preferida de Bv8 es una secuencia natural de longitud completa de la Bv8 humana tal como se muestra en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2).

[0029] “Variantes de Bv8” son polipéptidos Bv8 biológicamente activos que tienen una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia del polipéptido Bv8, tal como las que se muestran en las Figs. 2, 4 y 6 (SEQ ID NOS; 2, 4 y 6) de Bv8 humana y de murino, en virtud de una inserción, delección, modificación y/o sustitución de uno o más restos de aminoácidos en la secuencia natural. Las variantes de Bv8 tienen generalmente menos de un 10 % de identidad de la secuencia con una secuencia natural de Bv8, tal como la Bv8 humana de la Fig. 2 (SEQ ID NO: 2). Normalmente, sin embargo, una variante de Bv8 biológicamente activa tendrá una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente un 70% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de una Bv8 que se produce naturalmente tal como la Bv8 humana de la Fig. 2 (SEQ ID NO: 2) preferiblemente al menos aproximadamente un 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente un 80%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 85%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 90%, con una creciente preferencia de al menos aproximadamente un 95% a al menos aproximadamente un 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos, en incrementos del 1%, las variantes de Bv8 incluyen fragmentos peptídicos de al menos 5 aminoácidos que retienen una actividad biológica de la secuencia natural correspondiente del polipéptido Bv8. Las variantes de Bv8 incluyen también polipéptidos Bv8 en los que se añaden uno o más restos de aminoácidos el extremo N o al extremo C de, o dentro de, una secuencia de Bv8 natural. Las variantes de Bv8 incluyen también polipéptidos de Bv8 en los que se delecionan numerosos restos de aminoácidos y se sustituyen opcionalmente por uno o más restos de aminoácidos. Las variantes de Bv8 se pueden modificar también

covalentemente, por ejemplo, mediante sustitución con un resto diferente de un aminoácido que se produce naturalmente o modificando un resto de aminoácido para producir un aminoácido que se produce naturalmente. Las variantes de Bv8 pueden comprender un dominio de unión de heparina.

- [0030]** “Porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos” con respecto a la secuencia de Bv8 se define en la presente memoria descriptiva como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos con los restos de la secuencia de Bv8, tras alinear las secuencias e introducir los huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de la secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de la secuencia, Ninguna de las extensiones, deleciones o inserciones en el extremo N, el extremo C o internas en la secuencia de Bv8 candidata deben construirse de tal manera que afecten la identidad u homología de la secuencia. Se conocen bien en la técnica los procedimientos y programas informáticos para la alineación. Uno de dichos programas informáticos es “ALIGN-2”, autorizado por Genentech, Inc, que se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de la Propiedad Industrial de los Estados Unidos, Washington, D.C. 20559, en la que se encuentra registrado con el N° de Registro de la Propiedad Industrial N° TXU510087
- [0031]** Una molécula “Bv8 quimérica” es un polipéptido que comprende una Bv8 de longitud completa o uno o más dominios de la misma fusionados o unidos a un polipéptido heterólogo. La molécula Bv8 quimérica compartirá generalmente al menos una propiedad biológica en común con Bv8 que se produce naturalmente. Un ejemplo de molécula Bv8 quimérica es una que está etiquetada a fines de purificación. Otra molécula Bv8 es una inmunoadhesina de Bv8.
- [0032]** El término “epítipo etiquetado” cuando se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un polipéptido quimérico que comprende una BV8 fusionada a un “polipéptido etiqueta. El polipéptido etiqueta tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo frente al cual se puede preparar un anticuerpo, que sea lo suficientemente corto de tal manera que no interfiera con la actividad biológica de Bv8. El polipéptido etiqueta es, preferiblemente, bastante único, de tal manera que el anticuerpo no tiene sustancialmente reacción cruzada con otros epítipos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente al menos seis restos de aminoácidos y normalmente entre aproximadamente 8-50 restos de aminoácidos (preferiblemente entre aproximadamente 9-30 restos). Se prefieren las secuencias de poli-histidina, que se unen al níquel permitiendo el aislamiento de la proteína etiquetada mediante cromatografía de afinidad de Ni-NTA tal como se describe (véase, por ejemplo, Lindsay y col. Neuron 17: 571-574 (1996)).
- [0033]** “Bv8 aislado” significa Bv8 que se ha purificado de una fuente de Bv8 o que se ha preparado mediante procedimientos recombinantes o sintéticos y se ha purificado. Bv8 purificado está sustancialmente exento de otros polipéptidos o péptidos. “Sustancialmente exento” significa aquí menos de aproximadamente 5%, preferiblemente menos de aproximadamente 2%, más preferiblemente menos de aproximadamente 1%, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 0,5%, lo más preferible menos de aproximadamente 0,1% de contaminación con otra fuente de proteínas.
- [0034]** Proteína “esencialmente pura” significa una composición que comprende al menos aproximadamente un 90% en peso de proteína, basándose en el peso total de la composición, preferiblemente al menos aproximadamente un 95% en peso, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90% en peso, incluso más preferiblemente al menos un 95% en peso. Proteína “esencialmente homogénea” significa una composición que comprende al menos aproximadamente un 99% en peso de proteína, basándose en el peso total de la composición.
- [0035]** “Agonistas” de Bv8 son moléculas o compuestos que tienen una o más de las propiedades biológicas de la secuencia natural de Bv8. Estas pueden incluir, pero no se limitan a, moléculas pequeñas orgánicas, péptidos y anticuerpos agonistas dirigidos contra Bv8.
- [0036]** El término “antagonista” se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe, o neutraliza, parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido Bv8 natural. Las moléculas antagonistas adecuadas incluyen específicamente los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo antagonistas o las variantes de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos, péptidos, moléculas pequeñas orgánicas de Bv8 naturales, etc. Los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido Bv8 pueden comprender poner en contacto un polipéptido Bv8 con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido Bv8.
- [0037]** “Activo” o “actividad” para los fines de la presente memoria descriptiva se refieren a la(s) forma(s) de Bv8 que retienen una actividad biológica y/o inmunológica de Bv8 natural o que se produce naturalmente, en el que la actividad “biológica” se refiere a una función biológica (tanto inhibidora o estimuladora) producida por un Bv8 natural o que se produce naturalmente diferente de la de la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo frente a un epítipo antigénico poseído por un Bv8 natural o que se produce naturalmente y una actividad “inmunógena” se

refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo frente a un epítipo antigénico poseído por un Bv8 natural o que se produce naturalmente.

[0038] De esta manera, “biológicamente activo” cuando se usa con “Bv8” o “Bv8 aislado” o un agonista de Bv8, significa un polipéptido Bv8 que inhibe o comparte una función efectora de la secuencia natural de Bv8. Una función efectora principal de Bv8 es su capacidad para estimular la proliferación de células endoteliales. Incluso de manera más preferible, la actividad biológica es la capacidad de inducir la proliferación en las células endoteliales capilares, preferiblemente las células esteroidogénicas, dentro de las glándulas endocrinas. Una función efectora adicional de Bv8 es la capacidad para inducir la angiogénesis.

[0039] “Propiedad biológica” cuando se usa junto con “Bv8” o “Bv8 aislado” o un “agonista” de Bv8, significa que tiene una función efectora o antigénica o actividad que se produce o lleva a cabo directa o indirectamente por la secuencia natural de Bv8 (tanto en su conformación natural como desnaturalizada). Las funciones efectoras incluyen la potenciación de la proliferación de las células endoteliales y/o la inducción de la angiogénesis.

[0040] “Receptor de Bv8” es una molécula a la que se une Bv8 y que media en las propiedades biológicas de Bv8.

[0041] El término “anticuerpo” en la presente memoria descriptiva, se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente al ser humano, no humanos (por ejemplo, murino) y los anticuerpos monoclonales humanizados (que incluyen anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad biológica deseada.

[0042] “Anticuerpos” (Ab) e “inmunoglobulinas” (Ig) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos presentan especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen los anticuerpos y otras moléculas del tipo de los anticuerpos que carecen de especificidad por el antígeno. Los polipéptidos del último tipo se producen, por ejemplo, a bajos niveles por el sistema linfático y a niveles crecientes por los mielomas.

[0043] Los “anticuerpos naturales” y las “inmunoglobulinas naturales” son normalmente glicoproteínas heterotetrámeras de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera tiene también enlaces disulfuro intracadena regularmente separados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por numerosos dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los restos de aminoácidos concretos forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada.

[0044] El término “variable” se refiere al hecho de que algunas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y en la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno concreto. Sin embargo la variabilidad no está uniformemente distribuida a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables en los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada. Las porciones más fuertemente conservadas de los dominios variables se denominan la región de la estructura (FR), Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR (FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente), adoptando ampliamente una configuración de lámina β , conectada con tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de la lámina β Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad mediante las FR y, con las regiones hipervariables procedentes de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos (véase Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), páginas 647-669). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

[0045] El término “región hipervariable” cuando se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a los restos de aminoácidos de una región determinante de la complementariedad o “CDR” (es decir, los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos restos procedentes de una “región hipervariable” (es decir, los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:

901-917 (1987)). “Marco” o restos “FR” son aquellos restos de los dominios variables diferentes de los restos de la región hipervariable tal como se define en la presente memoria descriptiva.

5 **[0046]** La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento “Fc” residual, cuyos nombres reflejan su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina da como resultado un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y es aún capaz de la reticulación del antígeno.

10 **[0047]** “Fv” es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. Esta región consiste de un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena ligera en asociación estrecha, no covalente. Es en esta configuración que existen tres regiones hipervariables de cada dominio variable que interactúan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero V_H-V_L . Colectivamente, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres regiones hipervariables específicas de un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno aunque a una menor afinidad que el sitio de unión completo.

15 **[0048]** El fragmento Fab contiene también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmento Fab en la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteína(s) procedentes de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente memoria descriptiva de Fab' en la que el(los) resto(s) de cisteína de los dominios constantes soportan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo 20 $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagras entre ellos. Se conocen también otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

[0049] Las “cadenas ligeras” de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de sus dominios constantes.

25 **[0050]** Dependiendo en la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, se pueden asignar las inmunoglobulinas a diferentes tipos. Existen cinco tipos principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM y algunos de estos pueden dividirse adicionalmente en subtipos (isotipos), *por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a los diferentes tipos de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ y μ , respectivamente. Son bien conocidas las estructuras de las subunidades 30 y las configuraciones tridimensionales de los diferentes tipos de inmunoglobulinas.

[0051] “Fragmentos de anticuerpo” comprende una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente su dominio de unión a antígeno o variable. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; los diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

35 **[0052]** El término “anticuerpo monoclonal” tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de 40 anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se construye de forma que requiera la población del anticuerpo mediante cualquier procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de 45 acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante el procedimiento del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y col., Nature 256: 495 (1975), o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplos la Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” se pueden aislar también de bibliotecas de anticuerpos expresados en fagos usando, por ejemplo, las técnicas descritas en Clackson y col., Nature 352: 624-628 (1991) y Marks y col., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991).

50 **[0053]** Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria descriptiva incluyen anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecen a un tipo o subtipo particular de anticuerpo, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico con u homólogo a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otro tipo o subtipo de anticuerpo, así 55 como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Patente de los

Estados Unidos N° 4.816, 567, y Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)).

[0054] Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de murino) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de la región hipervariable del receptor se sustituyen por los restos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tenga la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos ejemplos, los restos de la región de la estructura (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas de las FR son las de una secuencia de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente, la de una inmunoglobulina no humana. Para los detalles adicionales véanse Jones y col., Nature 321: 522-525 (1986); Reichmann y col., Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

[0055] Los fragmentos de anticuerpo “Fv monocatenario” o “sFv” comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión del sFv véanse Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

[0056] El término “diacuerpos” se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H-V_L). Utilizando un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen los diacuerpos más completamente en, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 93/11161; y Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).

[0057] La expresión “anticuerpos lineales” cuando se usa a lo largo de esta solicitud se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata y col. Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995). De manera breve, estos anticuerpos comprenden una pareja de segmentos Fd en tándem ($V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$) que forman una pareja de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o mono-específicos.

[0058] El término “epítipo” se usa para referirse a sitios de unión de anticuerpos (monoclonales o policlonales) sobre antígenos de proteínas.

[0059] Por “anticuerpo agonista” se entiende un anticuerpo que es agonista de Bv8 y posee de esta manera una o más de las propiedades biológicas de la secuencia natural de Bv8.

[0060] El término “inmuno adhesina de Bv8” se usa de manera indistinta con el término “quimera de Bv8-inmunoglobulina” y se refiere a una molécula quimérica que combina al menos una porción de una molécula de Bv8 (natural o variante) con una secuencia de inmunoglobulina. La secuencia de inmunoglobulina, de manera preferible, pero no necesariamente, es un dominio constante de la inmunoglobulina. Las inmuno adhesinas pueden poseer muchas de las propiedades químicas y biológicas de los anticuerpos humanos. Debido a que se pueden construir inmuno adhesinas a partir de una secuencia de proteína humana con una especificidad deseada unida a una secuencia del dominio constante (Fc) y de la inmunoglobulina bisagra humana adecuada, se puede conseguir la especificidad de unión de interés utilizando componentes completamente humanos. Dichas inmuno adhesinas son mínimamente inmunógenas para el paciente, y son seguras para el uso crónico o repetido.

[0061] Los ejemplos de inmuno adhesinas homomultiméricas que se han descrito para el uso terapéutico incluyen la inmuno adhesina CD4-IgG para el bloqueo de la unión del VIH a la superficie celular de CD4. Los datos obtenidos de los ensayos clínicos en Fase I, en los que se administró CD4-IgG a mujeres embarazadas justo antes de la administración, sugieren que la inmuno adhesina puede ser útil en la prevención de la transferencia materno-fetal del VIH (Ashkenazi y col., Intern. Rev. Immunol. 10: 219-227 (1993)). Se ha desarrollado una inmuno adhesina que se une al factor de necrosis tumoral (TNF.) TNF es una citocina proinflamatoria que ha demostrado ser un mediador principal del choque séptico. Basándose en un modelo de ratón del choque séptico, una inmuno adhesina de un receptor de TNF ha demostrado ser prometedora como candidata para el uso clínico en el tratamiento del choque séptico (Ashkenazi, A. y col. (1991) PNAS USA 88: 10535-10539). La U.S. Food and Drug Administration (FDA)

aprobó el 2 de noviembre de 1998 ENBREL® (etanercept), una inmunoadhesina que comprende una secuencia de un receptor de TNF fusionada a una región de un Fc de IgG, para el tratamiento de la artritis reumatoide. La FDA aprobó el 6 de junio de 2000 el nuevo uso ampliado de ENBREL® en el tratamiento de la artritis reumatoide. Para la información reciente de los bloqueantes de TNF, que incluyen ENBREL®, véanse Lovell y col., N. Engl. J. Med. 342: 763-169 (2000), y el editorial que lo acompaña en la p 810-811; y Weinblatt y col., N. Engl. J. Med. 340: 253-259 (1999); revisado en Maini y Taylor, Annu. Rev. Med. 51: 207-229 (2000).

[0062] Si los dos brazos de la estructura de la inmunoadhesina tienen especificidades diferentes, la inmunoadhesina se denomina una "inmunoadhesina biespecífica" por analogía con los anticuerpos biespecíficos. Dietsch y col., J. Immunol. Methods 162: 123 (1993) describe dicha inmunoadhesina biespecífica combinando los dominios extracelulares en un tipo de célula diferente en la naturaleza. Los estudios de unión indicaron que la proteína de fusión de la inmunoglobulina biespecífica así formada tenía una capacidad aumentada de unirse a una línea de células mieloides en comparación con las inmunoadhesinas monoespecíficas que las que se derivaba.

[0063] El término "heteroadhesina" se usa de manera indistinta con la expresión "adhesina de heteromultímero quimérico" y se refiere a un complejo de moléculas quiméricas (secuencias de aminoácidos) en los que cada molécula quimérica se combina con una porción biológicamente activa, tal como el dominio extracelular de cada monómero de un receptor heteromultimérico, con un dominio de multimerización. El "dominio de multimerización" promueve la interacción estable de las moléculas quiméricas dentro del complejo heteromultímero. Los dominios de multimerización pueden interactuar mediante una secuencia de inmunoglobulina, una cremallera de leucina, una región hidrófoba, una región hidrófila, o un tiol libre que forma un enlace disulfuro intermolecular entre las moléculas quiméricas del heteromultímero quimérico. El dominio de multimerización puede comprender una región constante de la inmunoglobulina. Además, se puede diseñar mediante ingeniería genética una región de multimerización de tal manera que las interacciones estéricas no solo promuevan una interacción estable, sino que promuevan además la formación de heterodímeros sobre homodímeros de una mezcla de monómeros. Se construyen "protuberancias" sustituyendo pequeñas cadenas secundarias de aminoácidos de la interfase del primer polipéptido con cadenas secundarias más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Opcionalmente, se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfase del segundo polipéptido sustituyendo grandes cadenas secundarias de aminoácidos con unas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). La secuencia de inmunoglobulina, de manera preferible, pero no necesariamente, es un dominio constante de la inmunoglobulina. El resto de inmunoglobulina en las quimeras de la presente invención se puede obtener de los subtipos IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄, de, IgA, IgE, IgD o IgM, pero preferiblemente de IgG₁ o IgG₃.

[0064] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "tratamiento" es una solución para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. A los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estabilización del estado de la enfermedad (es decir, sin empeoramiento), retraso o ralentizamiento de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad, y remisión (tanto parcial como total), ya sea detectable como indetectable. "Tratamiento" puede significar también la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. "Tratamiento" es una intervención llevada a cabo con la intención de evitar el desarrollo o la alteración de la patología de un trastorno. De acuerdo con estos, "tratamiento" se refiere a tratamiento terapéutico y medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen los que presentan ya el trastorno así como aquellos en los que se va a evitar el trastorno: Específicamente, el tratamiento puede evitar, ralentizar o de otra forma disminuir directamente la patología de la degeneración o el daño celular, tal como la patología de las células tumorales en el tratamiento canceroso, o puede volver las células más susceptibles al tratamiento mediante otros agentes terapéuticos.

[0065] "Esteroidogénesis es la regulación aguda mediada por CAMP, inducida hormonalmente de la biosíntesis de hormonas esteroides en "células esteroidogénicas" caracterizada por la movilización del colesterol desde los almacenes celulares a la membrana externa de la mitocondria, y su translocación a la membrana interna donde se produce la conversión del colesterol en pregnenolona.

[0066] "Tejido esteroidogénico" se refiere al tejido que produce hormonas esteroides mediante el proceso de Esteroidogénesis. Los ejemplos incluyen los tejidos de la glándula adrenal, los órganos reproductores, el tejido intestinal y del tracto respiratorio.

[0067] Administración "crónica" se refiere a la administración del(de los) agente(s) en un modo continuo en oposición a un modo agudo, con el fin de mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un periodo extendido de tiempo. Administración "intermitente" es un tratamiento que no se lleva a cabo de manera consecutiva sin interrupción, sino más bien, es cíclico en la naturaleza.

[0068] "Mamífero", para los fines del tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, otros primates superiores, animales domésticos y de granja y de zoo, deportes, o

mascotas, tales como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferiblemente el mamífero es un ser humano.

[0069] “Tumor”, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, tanto malignas como benignas y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

- 5 **[0070]** Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la dolencia fisiológica en mamíferos que está caracterizada normalmente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres de particular interés en la presente memoria descriptiva incluyen los cánceres de los órganos reproductores, por ejemplo, cáncer de ovarios, cáncer de testículos, cáncer de útero, cáncer de cuello de matriz; cáncer de próstata, cánceres de la glándula adrenal, incluyendo los cánceres de la corteza adrenal (por ejemplo, carcinoma Adrenocortical) y de la
10 médula adrenal; cáncer de tiroides; cáncer de paratiroides; cáncer de páncreas; y carcinoma endometrial.

[0071] La “patología” de una enfermedad incluye todos los fenómenos que comprenden el bienestar del paciente. Para el cáncer, estos incluyen, sin limitación, el crecimiento celular anormal o descontrolado, la metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de las células adyacentes liberación de citocinas u otros productos secretores a niveles anormales, supresión o agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, etc.

- 15 **[0072]** La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente y consecutiva en cualquier orden).

[0073] “Vehículos” tal como se usa en la presente memoria descriptiva incluye los vehículos, excipientes, o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no sean tóxicos para la célula o el mamífero que se expone a los anteriores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución acuosa a pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones
20 tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o
25 dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes azucarados tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

[0074] Un “liposoma” es una pequeña vesícula compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que útil para la administración de un fármaco (tal como un polipéptido Bv8 o un anticuerpo del anterior)
30 a un mamífero. Los componentes del liposoma están comúnmente dispuestos en una formación bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

[0075] Una “molécula pequeña” se define en la presente memoria descriptiva por tener un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Daltons.

[0076] “Los términos “factor de crecimiento endotelial vascular”, “VEGF”, “polipéptido VEGF” y “proteína VEGF”
35 cuando se usan en la presente memoria descriptiva abarcan la secuencia natural de VEGF y las variantes de VEGF (que se definen adicionalmente en la presente memoria descriptiva). El polipéptido VEGF se puede aislar de una variedad de fuentes, tales como de tipos de tejidos humanos o de otra fuente, o prepararse mediante procedimientos recombinantes y/o sintéticos.

[0077] Una “secuencia natural de VEGF” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos
40 que un VEGF derivado de la naturaleza. Dicha secuencia natural de VEGF se puede aislar de la naturaleza o se puede producir mediante medios recombinantes y/o sintéticos. El término “secuencia natural de VEGF” abarca específicamente formas truncadas o secretadas que se producen naturalmente (*por ejemplo*, una secuencia de un dominio extracelular), formas variantes que se producen naturalmente (*por ejemplo*, formas cortadas y empalmadas alternativamente) y variantes alélicas que se producen naturalmente del VEGF. En una realización de la invención,
45 la secuencia natural de VEGF es una de las cinco isoformas conocidas, consistentes de 121, 145, 165, 189 y 206 restos de aminoácidos, respectivamente, tal como se describe, por ejemplo en las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 5.332.671 y 5.240.848; En la Publicación PCT N^o WO 98/10071; Leung y col., Science 246: 1306-1309 (1989); y Keck y col., Science 246: 1309-1312 (1989).

[0078] “Polipéptido variante de VEGF” significa un polipéptido activo tal como se define a continuación que tiene al
50 menos aproximadamente un 80%, preferiblemente al menos aproximadamente un 85%, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90% incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 95%, lo más preferible al menos aproximadamente un 98% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de una secuencia natural de VEGF. Dichos polipéptidos variantes de VEGF incluyen, por ejemplo, polipéptidos VEGF en los que se añaden, o se eliminan uno o más restos de aminoácidos en el extremo N y/o el extremo C, así

como dentro de uno o más dominios internos, de la secuencia natural.

[0079] La identidad de la secuencia (tanto de los aminoácidos como del ácido nucleico) de VEGF se determina usando el mismo enfoque específicamente descrito con respecto a Bv8. De manera similar, las definiciones proporcionadas para los agonistas y antagonistas de Bv8, que incluyen, pero no se limitan a los anticuerpos, se aplicarán a los agonistas y antagonistas de VEGF.

B. Procedimientos para llevar a cabo la invención

1. Identificación de las variantes de Bv8

[0080] Además de la secuencia natural de longitud completa de los polipéptidos Bv8 descritos en la presente memoria descriptiva, se contempla que se puedan identificar, prepararse y usar variantes de Bv8 en la presente invención. Se pueden preparar las variantes de Bv8 introduciendo cambios de nucleótidos adecuados en el ADN de Bv8 y/o mediante síntesis del polipéptido Bv8 deseado. Los expertos en la técnica apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos posteriores a la traducción del Bv8, tales como cambiar el número o la posición de los sitios de glicosilación. Los procedimientos de producción de las variantes de Bv8 son preferiblemente los mismos que para la secuencia natural de Bv8 que se describe en detalle a continuación, siendo la única diferencia la sustitución del ácido nucleico que codifica la variante de Bv8 del ácido nucleico que codifica la secuencia natural de Bv8.

[0081] Se usan moléculas de ácido nucleico que codifican Bv8 en los procedimientos de la invención, los ADNc que codifican las variantes de longitud completa de Bv8 humana se proporcionan en las Figuras 1 y 2 (SEQ ID NOS: 1 y 2), y las correspondientes secuencias de aminoácidos deducidas se proporcionan en las Figuras 2 y 4 (SEQ ID NOS: 2 y 4). Se proporciona en la Figura 5 un ADNc que codifica Bv8 de ratón (SEQ ID NO: 5) y se proporciona la correspondiente secuencia de aminoácidos deducida en la Figura 6 (SEQ ID NO: 6). Los polinucleótidos usados en la presente invención se pueden obtener usando las técnicas normalizadas bien conocidas por los expertos en la técnica tales como, por ejemplo, selección mediante hibridación y metodología de la PCR.

[0082] Cualquier secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de Bv8 se puede usar para generar moléculas recombinantes que dirigen la expresión de Bv8. Adicionalmente, los procedimientos de la presente invención pueden utilizar también un polinucleótido de fusión entre una secuencia que codifica Bv8 y una segunda secuencia de codificación de una proteína heteróloga.

[0083] A fines de clonar secuencias de ADNc homólogas de longitud completa de cualquier especie el ADNc completo de Bv8 o clonar los miembros de la familia o la formas variantes de dichas variantes alélicas, las sondas de ADN etiquetadas preparadas a partir de los fragmentos que corresponden a cualquier parte de las secuencias de ADNc dadas a conocer en la presente memoria descriptiva se pueden usar para cribar una biblioteca de ADNc derivada de un tipo de célula o tejido que se piensa que expresa a Bv8. Más específicamente, los oligonucleótidos que corresponden a cualquiera de los términos 5' o 3' de la secuencia de codificación se pueden usar para obtener una secuencia de nucleótidos más larga.

[0084] Puede ser necesario cribar múltiples bibliotecas de ADNc procedentes de diferentes tejidos para obtener un ADNc de longitud completa, En el caso en el que sea difícil identificar los clones de ADNc que codifican la región de codificación 5' terminal completa, una situación que se encuentra a menudo en la clonación del ADNc, se puede utilizar la técnica RACE (Amplificación Rápida del los Extremos de ADNc). RACE es una estrategia probada basada en la PCR para amplificar el extremo 5' de los ADNc incompletos. Esta comercialmente disponible (de Clontech) el ARN Listo para 5' RACE sintetizado de una placenta humana que contiene una única secuencia de anclaje. Para obtener el extremo 5' del ADNc, se lleva a cabo la PCR sobre un ADNc Listo para 5' RACE usando el anclaje proporcionado con el cebador y el cebador 3'. A continuación se lleva a cabo una PCR secundaria usando el cebador anclado y el cebador 3' anidado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez obtenida, la secuencia de ADNc de longitud completa se puede traducir en la secuencia de aminoácidos y examinarse en busca de determinadas características tales como un marco de lectura abierto continuo flanqueado por los sitios de inicio y terminación de la traducción, una potencial secuencia señal y finalmente una similitud estructural global para las secuencias de Bv8 dadas a conocer en la presente memoria descriptiva.

[0085] Alternativamente, se puede usar una sonda etiquetada par cribar una genoteca derivada de cualquier organismo de interés utilizando las condiciones rigurosas adecuadas que se describen a *continuación*.

[0086] El aislamiento de la secuencia que codifica Bv8 o de una secuencia homóloga se puede llevar a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando dos combinados de cebadores de oligonucleótidos degenerados diseñados sobre la base de las secuencias de codificación de Bv8 dadas a conocer en la presente memoria descriptiva. El molde para la reacción puede ser ADNc obtenido mediante transcripción inversa (RT) del ARNm preparado a partir de, por ejemplo, líneas de células o tejidos humanos o no humanos conocidos o

sospechosos de expresar un alelo del gen Bv8.

[0087] Se puede subclonar el producto de la PCR y secuenciarse para asegurar que las secuencias amplificadas representan las secuencias de una secuencia de codificación de Bv8. El fragmento de la PCR puede a continuación usarse para aislar un clon de ADNc de longitud completa mediante una variedad de procedimientos. Por ejemplo, el
5 fragmento amplificado puede etiquetarse y usarse para seleccionar una biblioteca de ADNc expresado en fago. Alternativamente, el fragmento etiquetado se puede usar para aislar clones genómicos mediante el cribado de una genoteca.

[0088] Se puede utilizar también la tecnología de la PCR para aislar secuencias de ADNc de longitud completa. Se puede aislar, por ejemplo, ARN, siguiendo procedimientos normalizados, a partir de una fuente celular o tisular
10 adecuada. Se puede llevar a cabo una reacción mediante RT sobre el ARN utilizando un cebador de oligonucleótido específico para la mayoría de extremos 5' del fragmento amplificado para el cebado de la síntesis de la primera cadena. El híbrido de ARN/ADN resultante puede a continuación "diseñarse a medida" con guaninas utilizando una reacción normalizada de la transferasa terminal, se puede digerir el híbrido con ARNasa H, y a continuación se
15 puede cebar una segunda síntesis de la cadena con un cebador poli-C. De esta manera, las secuencias de ADNc en la dirección 5' del fragmento amplificado se pueden aislar fácilmente.

[0089] Se puede aislar un clon de ADNc de una variante mutante o alélica del gen Bv8, por ejemplo, utilizando la PCR. En este caso, se puede sintetizar la primera cadena de ADNc hibridando un oligonucleótido oligo-dT con un
20 ARNm aislado de un tejido conocido o sospechoso de expresar Bv8 en un individuo que supuestamente lleva el alelo de Bv8 mutante, y extendiendo la nueva cadena con la transcriptasa inversa. A continuación se sintetiza la segunda cadena del ADNc usando un oligonucleótido que se hibrida específicamente al extremo del gen normal. Usando estos dos cebadores, se amplifica el producto a continuación mediante la PCR, se clona en un vector adecuado, y se somete a un análisis de la secuencia de ADN mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. Comparando la secuencia de ADN del alelo de Bv8 mutante con la del alelo de Bv8 normal,
25 se puede(n) determinar la(s) mutación(es) responsable(s) de la pérdida o alteración de la función del producto del gen Bv8 mutante.

[0090] Alternativamente, se puede construir una biblioteca genómica usando el ADN obtenido de un individuo sospechoso de o conocido por transportar un alelo del Bv8 mutante. A continuación se puede etiquetar un gen Bv8
desemparejado o cualquiera de sus fragmentos adecuados y utilizarse como una sonda para identificar el alelo de Bv8 mutante correspondiente en dicha bibliotecas. Los clones que contienen las secuencias del gen Bv8 mutante se
30 pueden purificar a continuación y someterse al análisis de la secuencia de acuerdo con los procedimientos conocidos por el experto en la técnica.

[0091] Adicionalmente, se puede construir una biblioteca de expresión utilizando ADNc sintetizado de, por ejemplo, ARN aislados de un tejido conocido, o sospechoso, de expresar un alelo de Bv8 mutante en un individuo
35 sospechoso de o conocido por transportar dicho alelo mutante. De esta manera, los productos génicos preparados mediante el tejido del supuesto mutante se pueden expresar y seleccionarse usando las técnicas normalizadas de selección de anticuerpos juntos con los anticuerpos creado frente al producto génico de Bv8 normal, tal como se describe a continuación.

[0092] Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos ácido nucleico, polinucleótido y nucleótido son indistintos y se refieren a cualquier ácido nucleico, tanto compuesto de desoxirribonucleósidos como
40 de ribonucleósidos, y tanto compuestos de enlaces de fosfodiéster como de enlaces modificados tales como fosfotriéster, fosforoamidato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéter, puente de fosforoamidato puente de metileno fosfonato, puente de fosforoamidato, puente de metileno fosfonato, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, puente de fosforotioato o enlaces de sultona, y las combinaciones de dichos enlaces.

[0093] Los términos ácido nucleico, polinucleótido y nucleótido incluyen específicamente los ácidos nucleicos
45 compuestos de diferentes bases que de las cinco bases que se producen biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo). Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener al menos un resto de una base modificada que se selecciona entre el grupo que incluye, pero no se limita a 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetilo) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometil-uracilo, dihidrouracilo beta-D-galactosilqueosina,
50 inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5N-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-
55 (3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina.

[0094] Además, un polinucleótido usado en la invención puede comprender al menos un resto de azúcar modificado seleccionado entre el grupo que incluye, pero no se limita a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

[0095] No se pretende que los procedimientos de la presente invención estén limitados por la fuente del polinucleótido. El polinucleótido puede proceder de un mamífero humano o no humano, derivado de cualquier fuente recombinante, sintetizado *in vitro* o mediante síntesis química. El nucleótido puede ser ADN o ARN y puede existir en una forma bicatenaria, monocatenaria o parcialmente bicatenaria.

[0096] Los ácidos nucleicos útiles en la presente invención incluyen, por medio de ejemplo y sin limitación, oligonucleótidos tales como ADN y ARN antisentido; ribozimas; ADN para terapia génica; quimeras de ADN y/o ARN; diversas formas estructurales de ADN que incluyen ADN monocatenario, ADN bicatenario, ADN superenrollado y/o ADN de triple hélice; ADN-Z y similares. Se pueden preparar los ácidos nucleicos mediante cualquier medio convencional utilizado normalmente para preparar ácidos nucleicos en gran cantidad. Por ejemplo, se pueden sintetizar químicamente ADN y ARN utilizando reactivos comercialmente disponibles y sintetizadores mediante procedimientos que son bien conocidos en la técnica (*véase, por ejemplo*, Gait, 1985, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, Inglaterra). Se pueden producir los ARN con rendimiento elevado mediante transcripción *in vitro* utilizando plásmidos tales como SP65 (Promega Corporation, Madison, WI).

[0097] Se puede usar cualquier transcripción de ARNm codificada por las secuencias de ácido nucleico de Bv8 en los procedimientos de la presente invención, incluyendo en particular, las transcripciones de ARNm resultantes de un cortado y empalmado o procesamiento alternativo de los precursores de ARNm.

[0098] En algunas circunstancias, tal como cuando se desea aumentar la estabilidad de la nucleasa, se pueden preferir los ácidos nucleicos que tienen enlaces internucleósidos modificados. Los ácidos nucleicos que contienen internucleósidos modificados se pueden sintetizar también usando reactivos y procedimientos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se conocen bien en la técnica los procedimientos para sintetizar ácidos nucleicos que contienen fosfonato, fosforotioato, fosforoditioato, fosforoamidato metoxietil fosforoamidato, formacetal, tioformacetal, diisopropilsililo, acetamidato, carbamato, dimetilensulfuro (-CH₂-S-CH₂), dimetilensulfóxido (-CH₂SO-CH₂), dimetilensulfona (-CH₂-SO₂-CH₂), 2'-O-alquilo y enlaces internucleósidos 2'-desoxi-2'-fluoro fosforotioato (*véanse* Uhlmann y col., 1990, *Chem. Rev.*, 90: 543-584; Schneider y col., 1990, *Tetrahedron Lett.*, 31: 335 y las referencias citadas en el anterior).

[0099] En algunas realizaciones de la presente invención, el nucleótido usado es un nucleótido α -anomérico. Un nucleótido α -anomérico forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en los que, al contrario que en las unidades β usuales, las cadenas avanzan paralelas entre sí (Gautier y col., 1987, *Nucl. Acids Res.* 15: 6625-6641). El nucleótido es un 2N-O-metilribonucleótido (Inoue y col., 1987, *Nucl. Acids Res.* 15: 6131-6148), o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue y col., 1987, *FEBS Lett.* 215: 327-330).

[0100] Los ácidos nucleicos pueden purificarse mediante cualquier medio adecuado, como se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden purificar mediante HPLC en fase inversa o intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño o electroforesis en gel. Por supuesto, el técnico experto reconocerá que el procedimiento de purificación dependerá en parte del tamaño del ADN que se va a purificar.

[0101] Se pueden usar también polinucleótidos aislados o purificados que tengan al menos 10 nucleótidos (es decir, una porción hibridable) de una secuencia de codificación o su complementos en los procedimientos de la presente invención. En otras realizaciones, los polinucleótidos contienen al menos 25 nucleótidos (continuos), 50 nucleótidos, 100 nucleótidos, 150 nucleótidos, o 200 nucleótidos de una secuencia de codificación de Bv8, o de una secuencia de codificación de Bv8 de longitud completa. Los ácidos nucleicos pueden ser mono o bicatenarios. Adicionalmente, la invención se refiere a polinucleótidos que se hibridan selectivamente con un complemento de las anteriores secuencias de codificación. En las realizaciones preferidas, los polinucleótidos contienen al menos 10, 25, 50, 100, 150 o 200 nucleótidos de una secuencia de codificación de Bv8 de longitud completa.

[0102] Las secuencias de nucleótidos que codifican un mutante de Bv8, fragmentos peptídicos de Bv8, formas truncadas de Bv8 y proteínas de fusión de Bv8 pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias de Bv8 de longitud completa, formas truncadas de Bv8, o fragmentos peptídicos de Bv8 que codifican nucleótidos fusionados a una proteína o péptido relacionado, tal como por ejemplo, un dominio fusionado a un dominio Fc de Ig que aumenta la estabilidad y la semivida de la proteína de fusión resultante (*por ejemplo*, Bv8-Ig) en el torrente sanguíneo; o una enzima tal como una proteína fluorescente o una proteína luminiscente que se puede usar como un marcador.

[0103] Además, las variantes de polinucleótido Bv8 que se han generado, al menos en parte, mediante alguna forma de evolución dirigida, por ejemplo, transposición génica y/o recombinación recursiva de secuencias, descritas en las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 5.605.793 y 5.837.458, se pueden usar en los procedimientos de la

presente invención. Por ejemplo, usando dichas técnicas, se puede usar una secuencia de codificación, o una pluralidad de secuencias de codificación de Bv8, como punto de partida para la generación de novedosas secuencias y/o proteínas estructuralmente similares con características funcionales y/o estructurales alteradas.

[0104] Genes homólogos muy relacionados con las secuencias de polinucleótidos que codifican Bv8 descritos anteriormente pueden ser también útiles en la presente invención. Genes homólogos muy relacionados son los polinucleótidos que codifican proteínas que tienen al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de una Bv8 que se produce naturalmente tal como la Bv8 humana madura de la Fig. 2 o la Fig. 4 (SEQ ID NOS: 2 y 4) con preferencia creciente de al menos aproximadamente un 80% a al menos aproximadamente un 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos, en incrementos del 1%. Los homólogos muy relacionados pueden codificar proteína que comparten actividades funcionales con Bv8.

[0105] Los procedimientos de la presente invención se benefician también del uso de (a) vectores de ADN que contienen cualquiera de las anteriores secuencias de codificación y/o sus complementos (es decir, antisentido); (b) vectores de expresión de ADN que contienen cualquiera de las anteriores secuencias de codificación de Bv8 operativamente asociadas con un elemento regulador que dirige la expresión de las secuencias de codificación; (c) células hospedadoras diseñadas mediante ingeniería genética que contienen cualquiera de las anteriores secuencias de codificación de Bv8 operativamente asociadas con un elemento regulador que dirige la expresión de las secuencias de codificación en la célula hospedadora; y (d) células hospedadoras diseñadas mediante ingeniería genética que expresan un gen Bv8 endógenos bajo el control de un elemento regulador introducido de manera exógena (es decir, activación génica).

[0106] Se pueden llevar a cabo variaciones en la secuencia natural de Bv8 o en diversos dominios de la Bv8 descrita en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y directrices que se muestran para las mutaciones conservativas y no conservativas, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N° 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones que codifican Bv8 que dan como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos de Bv8 en comparación con la secuencia natural de Bv8. Opcionalmente, la variación es mediante sustitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios de Bv8. La directriz para determinar cual resto de aminoácido se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar adversamente la actividad deseada se puede encontrar comparando la secuencia de Bv8 con la de las moléculas de proteína homólogas conocidas y minimizar el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en las regiones de elevada homología. Las sustituciones en los aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido con otro aminoácido que tenga una estructura y/o propiedades químicas similares, tales como la sustitución de una leucina con una serina, es decir, sustituciones conservativas de aminoácidos. Las inserciones o delecciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de 1 a 5 aminoácidos. Se puede determinar la variación permitida mediante inserciones, delecciones o sustituciones realizadas sistemáticamente de los aminoácidos en la secuencia y ensayo de las variantes resultantes para la actividad presentada por la secuencia de longitud completa o nativa madura.

[0107] Los fragmentos del polipéptido Bv8 son también útiles en los procedimientos de la presente invención. Dichos fragmentos pueden estar truncados en el extremo N o el extremo C, o pueden carecer de restos internos por ejemplo cuando se comparan con una proteína natural de longitud completa. Algunos fragmentos carecen de restos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido Bv8.

[0108] Se pueden preparar fragmentos de Bv8 mediante cualquiera de las numerosas técnicas convencionales. Se pueden sintetizar químicamente fragmentos de los péptidos deseados. Una solución alternativa implica generar fragmentos de Bv8 mediante digestión enzimática tratando, por ejemplo, la proteína con una enzima conocida por escindir las proteínas en los sitios definidos por restos de aminoácidos concretos, o digiriendo el ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando el fragmento deseado. Otra técnica adecuada más implica aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica un fragmento de polipéptido deseado, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los términos deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, los fragmentos de los polipéptidos Bv8 comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica en co polipéptido Bv8 natural.

[0109] En las realizaciones particulares, en la Tabla 1 se muestran bajo el encabezamiento de sustituciones preferidas las sustituciones conservativas de interés. Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces, se introducen en los productos seleccionados más cambios sustanciales, denominados sustituciones a modo de ejemplo en la Tabla 1, o como se describe a continuación en referencia a los tipos de aminoácidos.

Tabla 1

Restos originales	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E9)	asp	asp
Gly (G)	pro; 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)	leu; val, ile; ala; tyr	Leu
Pro (P)	ala	Al
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	lle; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

[0110] Se llevan a cabo modificaciones en la función o identidad inmunológica del polipéptido Bv8 seleccionando las sustituciones que difieren significativamente en su efectos sobre el mantenimiento (s) de la estructura del esqueleto del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o hélice, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena secundaria. Los restos que se producen naturalmente se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena secundaria.

(1) hidrófobas: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

10 (2) hidrófilas neutras: cys, ser, thr;

(3) ácidas: asp, glu;

(4) básicas: asn, gln, his, lys, arg;

(5) restos que influyen la orientación de la cadena: gly, pro; and

(6) aromáticas: trp, tyr, phe.

15 **[0111]** Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de uno de estos tipos por otro tipo. Dichos restos sustituidos se pueden introducir también en los sitios de sustitución conservativa o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

[0112] Se pueden llevar a cabo variaciones usando los procedimientos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al emplazamiento), mutagénesis mediante barrido de alanina y mutagénesis mediante la PCR. Se pueden llevar a cabo la mutagénesis dirigida al emplazamiento (Carter y col., Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller y col., Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)), mutagénesis mediante casete
5 (Wells y col., Gene, 34: 315 (1985)), mutagénesis mediante selección de la restricción (Wells y col., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)) u otras técnicas conocidas sobre el ADN clonado para producir el ADN de la variante de Bv8.

[0113] Se puede emplear el análisis de los aminoácidos mediante barrido para identificar uno o más restos de aminoácidos junto con una secuencia contigua. Entre los aminoácidos resultantes del barrido preferidos está los
10 aminoácidos neutros, relativamente pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es normalmente un aminoácido de barrido preferido entre este grupo debido a que elimina la cadena secundaria más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante (Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)). Se prefiere también normalmente la alanina debido a que es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente en posiciones soterradas y
15 expuestas (Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)). Si la sustitución de la alanina no da como resultados cantidades de variantes, se puede usar un aminoácido isotérico.

2. Producción de Bv8 y variantes de Bv8

[0114] Se conocen bien en la materia las técnicas adecuadas para la producción de Bv8 y variantes de Bv8. Debido a que las técnicas preferidas son las mismas para Bv8 y las variantes de Bv8, las técnicas descritas a
20 continuación se aplican a variantes de Bv8 así como a la secuencia natural de Bv8.

[0115] Los procedimientos preferidos de producción incluyen el aislamiento de Bv8 a partir de una fuente endógena del polipéptido, la síntesis peptídica (usando un sintetizador peptídico) y técnicas recombinantes (o cualquier combinación de estas técnicas).

[0116] La mayor parte de la siguiente discusión pertenece a la producción recombinante de Bv8 mediante el
25 cultivo de células transformadas con un vector que contiene el ácido nucleico de Bv8 y la recuperación del polipéptido a partir del cultivo celular. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que existen muchas maneras de producir Bv8.

[0117] De manera breve, este procedimiento implica transformar células humanas primarias que contienen un gen que codifica Bv8 con una construcción (es decir, un vector) que comprende un gen amplificable (tal como la
30 dihidrofolato reductasa (DHFR) u otros descritos a continuación) y al menos una región flanqueante de una longitud de al menos aproximadamente 150 pb que es homóloga con una secuencia de ADN en el locus de la región de codificación del gen Bv8 para proporcionar la amplificación del gen Bv8. El gen amplificable debe estar en el sitio que no interfiere con la expresión del gen Bv8. La transformación se lleva a cabo de tal manera que la construcción llega a integrarse homológamente en el genoma de las células primarias para definir una región amplificable.

[0118] A continuación se seleccionan las células primarias que comprenden la construcción mediante el gen
35 amplificable u otro marcador presente en la construcción. La presencia del gen marcador establece la presencia y la integración de la construcción en el genoma hospedador. No se necesita realizar selección de las células primarias, debido a que la selección se realizará en el segundo hospedador. Si se desea, se puede determinar la incidencia del episodio de recombinación homóloga empleando la PCR secuenciando cualquiera de las secuencias de ADN
40 amplificadas resultantes o determinando la longitud adecuada del fragmento de la PCR cuando el ADN procedente de los integrantes homólogos correctos está presente y se expande solo en aquellas células que contienen dichos fragmentos. También, si se desea, las células seleccionadas se pueden amplificar en este momento mediante el estresamiento de las células con el agente de amplificación adecuado (tal como metotrexato si el gen amplificable es DHFR), de tal manera que se obtienen múltiples copias del gen diana. Preferiblemente, sin embargo, la etapa de
45 amplificación no se lleva a cabo hasta después de la segunda transformación descrita a continuación.

[0119] Tras la etapa de selección, se aíslan grandes porciones del genoma, suficientemente grandes para incluir la
región amplificable completa, procedentes de las células primarias seleccionadas, y se seleccionan los clones que contienen la región amplificable. La región amplificable se amplifica a continuación por medio de un agente de
50 amplificación si no se amplifica ya en las células primarias. Finalmente, las células hospedadoras de la expresión amplificables que comprenden ahora múltiples copias de la región amplificable que contiene Bv8 se hacen crecer de tal manera que expresen el gen y produzcan la proteína.

[0120] Se puede obtener el ADN que codifica Bv8 de cualquier biblioteca de ADNc preparada de un tejido que se
piense que posea el ARNm de Bv8 y exprese éste a un nivel detectable. De acuerdo con esto, se puede obtener convenientemente el ADN de Bv8 de una biblioteca de ADNc preparada, por ejemplo, a partir de múltiples tejidos

humanos. Se puede obtener también el ADN que codifica Bv8 a partir de una biblioteca genética o mediante síntesis de oligonucleótidos.

5 **[0121]** Se criban las bibliotecas con sondas (tales como anticuerpos de Bv8 u oligonucleótidos de aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por éste. Se puede llevar a cabo la selección del ADNc o de la genoteca con la sonda seleccionada usando procedimientos normalizados tal como se describe en los capítulos 10-12 de Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica Bv8 es usar la metodología de la PCR tal como se describe en la sección 14 de Sambrook y col., *más arriba*.

10 **[0122]** Un procedimiento preferido para aislar ADNc de Bv8 es usar secuencias de oligonucleótidos cuidadosamente seleccionada para cribar bibliotecas de ADNc de diversos tejidos humanos. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben ser de suficiente longitud y suficientemente inequívocas de tal manera que se minimicen los falsos positivos. Las secuencias preferidas se obtienen de Bv8 que se produce naturalmente dada a conocer en la presente memoria descriptiva.

15 **[0123]** El oligonucleótido se puede etiquetar de tal manera que se pueda detectar tras la hibridación con el ADN en la biblioteca que se está cribando. El procedimiento preferido de marcado es usar ATP etiquetado con ³²P con polinucleótido cinasa, que es bien conocida en la técnica, para Radiomarcado el oligonucleótido. Sin embargo, se pueden usar otros procedimientos para etiquetar el oligonucleótido, incluyendo, pero sin limitarse a, la biotilación o el etiquetado con enzimas.

20 **[0124]** El ácido nucleico que codifica (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) Bv8 se inserta en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión adicionales. Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

25 **[0125]** El Bv8 de esta invención se puede producir de manera recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser parte del ADN de Bv8 que se inserta en el vector. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferiblemente una que no se reconoce y procesa la secuencia señal de Bv8 natural, la secuencia señal está sustituida por una secuencia señal procariota seleccionada, 30 por ejemplo, procedente del grupo que consiste de la fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp, y líderes de la endotoxina II termoestable. Para la secreción de levaduras, la secuencia señal natural puede estar sustituida por, por ejemplo, la invertasa líder de levadura, un factor líder (incluyendo las líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, la última descrita en la Patente de los Estados Unidos N° 5.010.182 otorgada el 23 de abril de 1991), o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179 publicado el 4 de abril de 1990), o 35 la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, la secuencia señal natural (por ejemplo la presecuencia de Bv8 que dirige normalmente la secreción de Bv8 de las células humanas *in vivo*) es satisfactoria, aunque pueden ser adecuadas otras secuencias señal de mamíferos, tales como las secuencias señal de otros polipéptidos de Bv8 animal, y la secuencias señal de los polipéptidos secretados de la misma o especies relacionadas, así como las líderes secretorias víricas, por ejemplo, 40 la señal gD del herpes simple.

[0126] El ADN de dicha región precursora está ligado en el marco de lectura al ADN que codifica la Bv8 madura o una variante soluble de la misma.

45 **[0127]** Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células hospedadoras seleccionadas. Generalmente, en los vectores de clonación se trata de una secuencia que permite al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico del hospedador, e incluye los orígenes la replicación o las secuencias que se replican de forma autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras, y virus. El origen de replicación procedente del plásmido pBR322 es adecuado para la mayor parte de bacterias Gram negativas, el origen del plásmido de 2 μ es adecuado para levaduras, y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o VPB) son útiles para los vectores de 50 clonación en células de mamíferos. Generalmente, el origen del componente de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamíferos (el origen de SV40 puede usarse normalmente solo debido a que contiene el promotor temprano).

[0128] La mayor parte de los vectores de expresión son vectores "lanzadera", capaces de replicación en al menos un tipo de organismos pero que se pueden transfectar a otro organismo para la expresión. Por ejemplo, un vector se 55 clona en *E. coli* y a continuación el mismo vector se transfecta en células de levaduras o mamíferos para la

expresión incluso aunque no sea capaz de replicarse de manera independiente del cromosoma de la célula hospedadora.

[0129] Se puede amplificar también el ADN mediante la inserción en el genoma hospedador. Esto se lleva a cabo fácilmente usando especies de *Bacillus* como hospedadores, pero incluyendo en el vector una secuencia de ADN que es complementaria a una secuencia que se encuentra en el ADN genómico de *Bacillus*. La transfección de *Bacillus* con este vector da como resultado la recombinación homóloga con el genoma y la inserción de ADN de Bv8. Sin embargo, la recuperación del ADN genómico que codifica Bv8 es más compleja que la de un vector replicado de manera exógena debido a que se requiere la digestión de la enzima de restricción para escindir el ADN de Bv8.

[0130] Los vectores de expresión y de clonación deben contener un gen de selección, denominado también un marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o el crecimiento de células hospedadoras transformadas que crecen en un medio de cultivo selectivo. Las células hospedadoras no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican las proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) deficiencias en el complemento auxótrofo, o (c) suministro de nutrientes críticos no disponible a partir de medios complejos, *por ejemplo*, el gen que codifica la D-alanina racemasa de *Bacilli*.

[0131] Un ejemplo de esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Aquellas células que se transforman satisfactoriamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a los fármacos y de esta manera sobrevive al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

[0132] Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para las células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para capturar el ácido nucleico de Bv8, tales como DHFR o timidina cinasa. Los transformantes de las células de mamíferos se colocan bajo presión de selección de tal manera que solo los transformantes se adaptan exclusivamente a sobrevivir en virtud de haber capturado el marcador. Se impone la presión de selección cultivando los transformantes bajo condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio se cambia sucesivamente, lo que conduce por tanto a la amplificación del gen de selección y del ADN que codifica Bv8. La amplificación es el proceso por el cual los genes con mayor demanda para la producción de una proteína crítica para el crecimiento se reiteran en tándem en el interior de los cromosomas de sucesivas generaciones de células recombinantes. Se sintetizan cantidades crecientes del ADN amplificado. Otros ejemplos de genes amplificables incluyen metalotioneína I y II, preferiblemente en genes de la metalotioneína de primates, adenosina desaminasa, ornitina decarboxilasa, etc. Se proporciona un sistema de vectores preferido en la Patente de los Estados Unidos N° 5.561.053.

[0133] Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican en primer lugar cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora adecuada cuando se emplea DHFR natural es la línea de células de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada tal como se ha descrito por Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980). A continuación se exponen las células transformadas a niveles crecientes de metotrexato. Esto conduce a la síntesis de múltiples copias del gen DHFR, y, simultáneamente múltiples copias de un ADN diferente que comprende los vectores de expresión, tales como el ADN que codifica Bv8. Se puede usar esta técnica de amplificación con cualquier hospedador adecuado de otra manera, *por ejemplo*, ATCC N° CCL61 CHO-K1, a pesar de la presencia de DHFR endógeno si se emplea, por ejemplo, un gen mutante DHFR que es muy resistente a Mtx (documento EP 117.060).

[0134] Alternativamente, las células hospedadoras (particularmente los hospedadores naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o transformadas simultáneamente con secuencias de ADN que codifican Bv8, la proteína DHFR natural, y otro marcador seleccionable tal como aminoglicósido 3' fosfotransferasa (APH) se pueden seleccionar mediante el crecimiento celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglicosídico, *por ejemplo*, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la Patente de los Estados Unidos N° 4.965.199.

[0135] Un gen de selección adecuado para uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido YRp7 de levadura (Stinchcomb y col., Nature, 282: 39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección de una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1. Jones, Genetics, 85: 12 (1977). La presencia de una lesión de *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona a continuación un entorno eficaz para detectar la transformación mediante el crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan por plásmidos conocidos que soportan el gen *Leu2*.

[0136] Adicionalmente, se pueden usar vectores derivados del plásmido circular pKD1 de 1,6 μ m para la transformación de levaduras de *Kluyveromyces*. Bianchi y col., Curr. Genet., 12: 185 (1987). Más recientemente, se notificó un sistema de expresión para la producción a gran escala de la quimosina recombinante de ternero de *K. lactis*. Van den Berg, Bio/Technology, 8: 135 (1990). Se han dado a conocer también vectores de expresión de múltiples copias estables para la secreción de albúmina de suero humana recombinante mediante cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer y col., Bio/Technology, 9: 968-975 (1991).

[0137] Los vectores de expresión y de clonación contienen normalmente un promotor que se reconoce por el organismo hospedador y se une de manera operable al ácido nucleico de Bv8. Los promotores son secuencias no traducidas localizadas en la dirección 5' (5') del codón de inicio de un gen estructural (generalmente con aproximadamente 100 a 1000 pb) que controla la transcripción y la traducción de una secuencia de ácido nucleico concreta, tal como la secuencia de ácido nucleico de Bv8, a la cual se une de manera operable. Dichos promotores estará comprendidos normalmente en dos tipos, inducibles y constitutivos. Los promotores inducibles son promotores que inician niveles crecientes de transcripción del ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones del cultivo, *por ejemplo*, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. En este momento, se conoce bien un gran número de promotores reconocidos por una variedad de células hospedadoras potenciales. Estos promotores se unen de manera operable al ADN que codifica Bv8 eliminando el promotor de la fuente de ADN mediante digestión de la enzima de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector. Se pueden usar la secuencia promotora de Bv8 natural y muchos promotores heterólogos para dirigir la amplificación y/o la expresión del ADN de Bv8. Sin embargo, se prefieren los promotores heterólogos, ya que generalmente permiten una mayor transcripción y mayores rendimientos en comparación con el promotor de Bv8 natural.

[0138] Los promotores adecuados para el uso con hospedadores procariontes incluyen los sistemas promotores de la β lactamasa y la lactosa (Chang y col., Nature, 275: 615 (1978); Goeddel y col., Nature, 281: 544 (1979)), fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (trp) (Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980); documento EP 36.776), y promotores híbridos tales como el promotor tac. deBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983). Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Se han publicado sus secuencias de nucleótidos, permitiendo por tanto a un técnico experto ligarlos de manera operable a un ADN que codifica Bv8 (Siebenlist y col., Cell, 20: 269 (1980)) usando enlazadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido. Los promotores para el uso en sistemas bacterianos contendrán también una secuencia de Shine-Delgamo (S.D.) unida de manera operable al ADN que codifica Bv8.

[0139] Se conocen las secuencias promotoras de los eucariotas, Virtualmente, todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases en la dirección 5' del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia que se encuentra 70 a 80 bases en la dirección 5' del inicio de la transcripción de muchos genes es la región CXCAAT en la que X puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayor parte de genes eucariotas es una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poliadenina al extremo 3' de la secuencia de codificación. Todas estas secuencias se insertan de manera adecuada en los vectores de expresión procariontes.

[0140] Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para el uso con los hospedadores de levaduras incluyen los promotores de 3-fosfoglicerato cinasa (Hitzeman y col., J. Biol. Chem., 255: 2073 (1980)) u otras enzimas glicolíticas (Hess y col., J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry, 17: 4900 (1978)), tales como enolasa, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, hexolanasa, piruvato decarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa 6 fosfato isomerasa, 3 fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, trifosfato isomerasa y glucocinasa.

[0141] Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras de la alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, las enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, la metalotioneína, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, y las enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para el uso en la expresión de levaduras se describen adicionalmente en el documento EP 73.657. Se usan también ventajosamente potenciadores de levaduras con promotores de levaduras.

[0142] La transcripción de Bv8 a partir de vectores en células hospedadoras de mamíferos está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de genomas de virus tales como el virus del poliovirus, el virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B lo más preferible el virus 40 de simios (SV40), a partir de promotores heterólogos de mamíferos, *por ejemplo*, el promotor de la actina o un promotor de la inmunoglobulina, a partir de promotores del choque térmico, y procedente del promotor normalmente asociados con la secuencia Bv8, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células hospedadoras.

- [0143]** Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que contiene también el origen de replicación vírico de SV40. Fiers y col., *Nature*, 273: 113 (1978); Mulligan y col., *Science*, 209: 1422-1427 (1980); Pavlakis y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 7398-7402 (1981). El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción E de HindIII. Greenaway y col., *Gene*, 18: 355-360 (1982). Se da a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 4.419.446 un sistema para expresar ADN en hospedadores de mamíferos que utiliza el virus del papiloma bovino como vector. Se describe una modificación de este sistema en la Patente de los Estados Unidos N° 4.601.978. Véase también Gray y col., *Nature*, 295: 503-508 (1982) en la expresión del interferón inmune que codifica ADNc en células de monos; Reyes y col., *Nature*, 297: 598-601 (1982) en la expresión del ADNc del interferón β en células de ratón bajo el control de un promotor de la timidina cinasa del virus del herpes simple; Canaani y co., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 5166-5170 (1982) en la expresión del interferón del gen $\beta 1$ en células de ratones y conejos cultivadas; y Gorman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 6777-6781 (1982) en la expresión de secuencias CAT bacterianas en células CV-1 de riñón de mono, fibroblastos embrionarios de pollo; células de ovario de hámster chino células Hela, y células NIH-3T3 de ratón que utilizan como promotor la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous.
- [0144]** La transcripción de un ADN que codifica Bv8 por los eucariotas superiores está a menudo aumentada por la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en cis del ADN, normalmente de aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Los potenciadores tienen orientación y posición relativamente independientes, que se han encontrado en 5' (Laimins y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 993 (1981)) y 3' (Lusky y col., *Mol. Cell Bio.*, 3: 1108 (1983)) a la unidad de transcripción, en el interior de un intrón (Banerji y col., *Cell*, 33: 729 (1983)), así como dentro de la propia secuencia de codificación. Osborne y col., *Mol. Cell Bio.*, 4: 1293 (1984). Se conocen ahora muchas secuencias potenciadoras procedentes de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Normalmente, sin embargo, se utilizará una potenciadora procedente de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado opuesto del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del poliovirus en el lado opuesto del origen de la replicación, y los potenciadores del adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature*, 297: 17-18 (1982) sobre los elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede cortar y empalmar en el vector en la posición 5' o 3' de la secuencia que codifica Bv8, pero se localiza preferiblemente en un sitio 5' procedente del promotor.
- [0145]** Los vectores de expresión usados en las células hospedadoras eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos, o células nucleadas procedentes de otros organismos multicelulares), contendrán las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles a partir de 5' y, ocasionalmente 3', las regiones no traducidas de los ADN eucariotas o víricos o los ADNc. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica Bv8.
- [0146]** La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes anteriormente relacionados emplea técnicas de ligadura, los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se escinden, se diseñan a medida, se vuelven a ligar en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos.
- [0147]** Para el análisis de confirmación de las secuencias correctas en los plásmidos construidos, se utilizan mezclas de ligadura para transformar la cepa 294 de *E. coli* K12 (ATCC 31.446) y los transformantes satisfactorios seleccionados para la resistencia a la ampicilina o tetraciclina cuando sea adecuado. Los plásmidos procedentes de los transformantes se preparan, analizan mediante la digestión de la endonucleasa de restricción, y/o se secuencian mediante el procedimiento de Messing y col., *Nucleic Acids Res.*, 9: 309 (1981) o mediante el procedimiento de Maxam y col., *Methods in Enzymology*, 65:499 (1980).
- [0148]** Particularmente útiles en la preparación de Bv8 y las variantes de Bv8 son los vectores de expresión que proporcionan la expresión transitoria el ADN en células de mamífero que codifican Bv8. En general, la expresión transitoria implica el uso de un vector de expresión que es capaz para replicarse eficazmente en una célula hospedadora, de tal manera que la célula hospedadora acumula muchas copias del vector de expresión y, a la vez, sintetiza elevados niveles de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión. Sambrook y col., *más arriba*, pp. 16.17 - 16.22. Los sistemas de expresión transitoria, que comprenden un vector de expresión y una célula hospedadora adecuados, permiten la identificación positiva conveniente de los polipéptidos codificados por los ADN clonados, así como la selección rápida de dichos polipéptidos para las propiedades biológicas o fisiológicas deseadas. De esta manera, los sistemas de expresión transitoria son particularmente útiles en la invención a fines de identificar los análogos y las variantes de Bv8 que son Bv8 biológicamente activas.
- [0149]** Se describen en Gething y col., *Nature*, 293: 620-625 (1981); Mantei y col., *Nature*, 281: 40-46 (1979); documentos EP 117.060; y EP 117.058, otros procedimientos, vectores y células hospedadoras adecuados para la adaptación a la síntesis de Bv8 en cultivos celulares de vertebrados recombinantes. Un plásmido particularmente útil

para la expresión de un cultivo de células de mamíferos de Bv8 es pRK5 (documento EP 307.247) o pSVI6B. Documento WO 91/08291 publicado el 13 de junio de 1991.

[0150] Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o la expresión del ADN en los vectores de la presente memoria descriptiva son células procariotas de levaduras o eucariotas superiores. Los procariotas
5 adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tal como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo., *Serratia marcescens*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo., *B. licheniformis* 41P dado a conocer en el documento DD 266710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedador de
10 clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.466), aunque son adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos más bien que limitantes. La cepa W3110 es un hospedador u hospedador parental particularmente preferido debido a que es una cepa hospedadora común para las fermentaciones del producto del ADN recombinante. Preferiblemente, la célula hospedadora debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, se puede modificar la cepa
15 W3110 para efectuar una mutación genética en los genes que codifican las proteínas, incluyendo los ejemplos de dichos hospedadores la cepa 27c7 de *E. coli* W3110. El genotipo completo de 27C7 es *tonAΔ ptr3 phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 ompTΔ degP41kan'*. Se depositó la cepa 27C7 el 30 de octubre de 1991 en la American Type Culture Collection como ATCC No. 55.244. Alternativamente, se puede emplear la cepa de *E. coli* que tiene una proteasa periplásmica mutante dada a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 4.946.783 otorgada el 7 de
20 agosto de 1990.

[0151] Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son adecuados como hospedadores de clonación o expresión para los vectores que codifican Bv8. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura común del pan, es la más comúnmente usada entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, otros numerosos géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y
25 son útiles en la presente memoria descriptiva, tales como *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y col., Nature, 290: 140 (1981); documento EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1985); hospedadores de *Kluyveromyces* (Patente de los Estados Unidos N° 4.943.529; Fleer y col., más arriba) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (documentos MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt y col., J. Bacteriol., 737 (1983)), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906; Van den Berg y col., más arriba), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070; Sreekrishna y col., J. Basic Microbiol., 28: 265-278 (1988)); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 (1979)); *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538 publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357 publicado
30 el 10 de enero de 1991), y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 (1983); Tilburn y col., Gene, 26: 205-221 (1983); Yelton y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 (1984)) y *A. niger*. Kelly y col., EMBO J., 4: 475-479 (1985).

[0152] Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de Bv8 glicosilada se derivan de organismos multicelulares. Dichas células hospedadoras son capaces del procesamiento de complejos y de actividades de
40 glicosilación. En principio, cualquier cultivo de células eucariotas superiores es factible ya sea a partir de un cultivo de células de vertebrados o de invertebrados. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovíricas y las células hospedadoras de insectos correspondientes a partir de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Véanse, por ejemplo.,
45 Luckow y col., Bio/Technology, 6: 47-55 (1988); Miller y col., en Genetic Engineering, Setlow y col., eds., Vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), pp. 277-279; y Maeda y col., Nature, 315: 592-594 (1985). Está disponible una variedad de cepas víricas para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y se pueden usar dichos virus como el virus de la presente memoria descriptiva de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

[0153] Se pueden utilizar como hospedadores cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, y tabaco. Normalmente, las células vegetales se transfectan mediante incubación con algunas cepas de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, que se ha manipulado previamente para contener el ADN que codifica Bv8. Durante la incubación del cultivo de células vegetales con *A. tumefaciens*, el ADN que codifica Bv8 se transfiere al hospedador de células vegetales de tal manera que se transfecta, y expresará, bajo las condiciones
55 adecuadas, el ADN que codifica Bv8. Además, están disponibles secuencias reguladoras y señalizadoras compatibles con las células vegetales, tales como el promotor de la nopalina sintasa y las secuencias señal de la poliadenilación. Depicker y col., J. Mol. Appl. Gen., 1: 561 (1982). Adicionalmente, los segmentos de ADN aislados de la región en la dirección 5' del gen T-DNA 780 son capaces de activar o aumentar los niveles de transcripción de

los genes expresables en plantas en un tejido vegetal que contiene ADN recombinante. Documento EP 321.196, publicado el 21 de junio de 1989.

[0154] Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en un cultivo (cultivo de tejidos) se ha vuelto un procedimiento rutinario. Véase, por ejemplo, Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, editores (1973). Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento del cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello de matriz humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); hepatocitos humanos (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci., 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0155] Las células hospedadoras se transfectan y transforman preferiblemente con los vectores de expresión o clonación anteriormente descritos para la producción de Bv8 y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[0156] La transfección se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula hospedadora tanto si como si no cualquier secuencia de codificación se expresa de hecho. Un técnico normalmente experto conoce numerosos procedimientos de transfección, por ejemplo, CaPO_4 y electroporación. Se reconoce generalmente una transfección satisfactoria cuando se produce cualquier indicación del funcionamiento de este vector en la célula hospedadora.

[0157] La transformación significa introducir ADN en un organismo de tal manera que el ADN sea replicable, tanto como un elemento extracromosómico como mediante un integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se lleva a cabo usando técnicas normalizadas adecuadas para dichas células. Se usa generalmente el tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, tal como se describe en la sección 1.82 de Sambrook y col., más arriba, o la electroporación para los procariontes u otras células que contienen barreras sustanciales de la pared celular. Se usa la infección con *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de algunas células vegetales, tal como se describe en Shaw y col., Gene, 23: 315 (1983) y en el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Además, las plantas se pueden transfectar usando tratamiento con ultrasonidos tal como se describe en el documento WO 91/00358 publicado el 10 de junio de 1991.

[0158] Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se prefiere el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y col., Virology, 52: 456-457 (1978). Se han descrito los aspectos generales de las transformaciones del sistema hospedador de células de mamíferos en la Patente de los Estados Unidos N° 4.399.216 otorgada el 16 de agosto de 1983. Las transformaciones en levaduras se llevan a cabo normalmente de acuerdo con el procedimiento de Van Solingen y col., J. Bact., 130: 946 (1977) y Hsiao y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 3829 (1979). Sin embargo, se pueden usar también otros procedimientos para introducir ADN en las células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policonaciones, por ejemplo, polibreno, poliornitina, etc. Para las diversas técnicas para la transformación de células de mamíferos, véanse Keown y col., Methods in Enzymology, 185: 527-537 (1990) y Mansour y col., Nature, 336: 348-352 (1988).

[0159] Las células procariontes usadas para producir un polipéptido Bv8 se cultivan en medios adecuados tal como se describe generalmente en Sambrook y col., más arriba.

[0160] Las células hospedadoras de mamíferos usadas para producir el Bv8 de esta invención se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM) Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para el cultivo de células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col. Meth. Enz., 58: 44 (1979), Barnes y col., Anal. Biochem., 102: 255 (1980), Patentes de los Estados Unidos N°s 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; Documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o Patente de los Estados Unidos Re. 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios se puede suplementar según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCINTM), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a las

concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Se puede incluir también cualquier otro suplemento necesario a las concentraciones adecuadas que un experto en la técnica conocería. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son aquellas previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para la expresión y serán evidentes para el técnico normalmente experto.

5 **[0161]** En general, los principios, protocolos, y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos de células de mamíferos se pueden encontrar en *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991).

[0162] Las células hospedadoras referidas en esta divulgación abarcan las células en el cultivo así como las células que están en el interior de un animal hospedador.

- 10 **[0163]** Se pueden medir la amplificación y/o la expresión génica en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción del ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980)), inmunotransferencia (análisis de ADN), o hibridación in situ, usando una sonda etiquetada adecuadamente, basándose en las secuencias proporcionadas en la presente memoria descriptiva. Se pueden emplear diversas etiquetas, más comúnmente radioisótopos, particularmente ³²P.
- 15 Sin embargo, se pueden emplear otras técnicas, tales como la utilización de nucleótidos modificados con biotina para la introducción en un polinucleótido. La biotina a continuación sirve como el sitio de unión para la avidina o los anticuerpos, que se puede etiquetar con una amplia variedad de etiquetas, tales como radionucleidos, agentes fluorescentes, enzimas, o similares. Alternativamente, se pueden emplear anticuerpos que pueden reconocer dupletes específicos, incluyendo dupletes de ADN, dupletes de ARN, y dupletes híbridos de ADN-ARN, o dupletes de ADN-proteína. Los anticuerpos a la vez se pueden etiquetar y se puede llevar a cabo el ensayo en el que el duplete se une a una superficie, de tal manera que tras la formación de un duplete sobre la superficie se puede detectar el anticuerpo unido al duplete.
- 20

- [0164]** Se puede medir, alternativamente, la expresión génica mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido y ensayo de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Con técnicas de tinción inmunohistoquímica, se prepara una muestra celular, normalmente mediante deshidratación y fijación seguido por reacción con anticuerpos etiquetados específicos del producto génico acoplado, en el que las etiquetas son normalmente visualmente detectables, tales como etiquetas enzimáticas, etiquetas fluorescentes, etiquetas luminiscentes, y similares. Una técnica de tinción particularmente sensible adecuada para el uso en la presente invención se describe por Hsu y col., *Am. J. Clin. Path.*, 75: 734-738 (1980).
- 25
- 30

[0165] Los anticuerpos útiles para la tinción y/o el ensayo inmunohistoquímicos de muestras de fluidos pueden ser tanto monoclonales como policlonales, y se pueden preparar tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

- [0166]** Bv8 se recupera preferiblemente del medio de cultivo como un polipéptido secretado, aunque se puede recuperar también a partir de lisados de células hospedadoras. Si Bv8 se une a la membrana, se puede liberar de la membrana usando una disolución detergente adecuada (por ejemplo, Triton X 100).
- 35

- [0167]** Cuando se produce Bv8 en una célula recombinante diferente de una de origen humano, el Bv8 está completamente exento de proteínas o polipéptidos de origen humano. Sin embargo, es necesario purificar Bv8 de las proteínas o polipéptidos de células recombinantes para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas como para Bv8. Como en la primera etapa, el medio de cultivo o el lisado se pueden centrifugar para eliminar los desechos celulares particulados. A continuación se puede purificar Bv8 de proteínas y polipéptidos solubles contaminantes con los siguientes procedimientos, que son procedimientos de purificación adecuados a modo de ejemplo: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC en fase inversa; cromatografía en gel de sílice; cromatofocalización; inmunoafinidad; resina de unión de epítipo-etiqueta; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; y columnas de proteína A Sefarosa para eliminar contaminantes tales como IgG.
- 40
- 45

3. Modificaciones de Bv8

- [0168]** Dentro del alcance de esta invención se incluyen modificaciones covalentes de Bv8 y variantes de Bv8. Un tipo de modificación covalente comprende hacer reaccionar restos de aminoácidos objetivos de un polipéptido Bv8 con una agente de derivatización orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas secundarias seleccionadas o los restos de los extremos N o C del Bv8. Es útil la derivatización con agentes bifuncionales, por ejemplo, para reticular Bv8 a una matriz o superficie soporte insoluble en agua para uso en el procedimiento para purificar anticuerpos dirigidos contra Bv8, y viceversa. Los agentes de reticulación comúnmente usados incluyen, por ejemplo 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-
- 50

azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluyen ésteres de disuccinimidilo tal como 3,3'-ditiobis (succinimidilpropionato), maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenil) dítio]propioimidato.

[0169] Otras modificaciones incluyen la desamidación de restos de glutaminilo y asparaginilo a los correspondientes restos de glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de serilo o de restos treonilo, la metilación de los (grupos α -amino de lisina, arginina, cadenas secundarias de histidina (T.E. Creighton, *Protein: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetilación de la amina del extremo N, y amidación de cualquier grupo carboxilo del extremo C.

[0170] Otro tipo de modificación covalente del polipéptido incluida dentro del alcance de esta invención comprende alterar el modelo de glicosilación natural del polipéptido. "Se pretende "alterar el modelo de glicosilación natural" para los fines de la presente memoria descriptiva significa eliminar uno o más restos carbohidratos que se encuentran en la secuencia natural de Bv8 (tanto eliminando el sitio de glicosilación subyacente como eliminando la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o añadir uno o más sitios de glicosilación de las proteínas naturales, lo que implica un cambio en la naturaleza y las proporciones de los diversos restos de carbohidrato presentes.

[0171] La adición de sitios de glicosilación al polipéptido Bv8 se puede llevar a cabo alterando la secuencia de aminoácidos. La alteración se puede hacer, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más restos de serina o treonina de la secuencia natural de Bv8 (para los sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos de Bv8 se puede alterar opcionalmente mediante cambios al nivel del ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido Bv8 en las bases preseleccionadas de tal manera que se generen los codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

[0172] Otro medio de aumentar el número de restos de carbohidrato en el polipéptido Bv8 es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Se describen dichos procedimientos en la técnica, por ejemplo, en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

[0173] La eliminación de restos de carbohidrato presentes en el polipéptido Bv8 se puede llevar a cabo química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de los codones que codifican los restos de aminoácidos que sirven como dianas para la glicosilación. Se conocen en la materia las técnicas de desglicosilación química y se describen, por ejemplo, por Hakimuddin, y col., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259: 52 (1987) y por Edge y col., *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981). Se puede conseguir la escisión enzimática de los restos de carbohidrato sobre los polipéptidos mediante el uso de una variedad de endo y exoglicosidasas tal como se ha descrito por Thotakura y col., *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

[0174] Otro tipo de modificación covalente de Bv8 comprende la unión del polipéptido Bv8 a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), propilenglicol, polioxialquilenos, de la manera que se muestra en las Patentes de los Estados Unidos N^{os} 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

[0175] El Bv8 de la presente invención se puede modificar también de manera que forme una molécula quimérica que comprende Bv8 fusionado con otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos.

[0176] En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión de Bv8 con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al cual se puede unir selectivamente un anticuerpo antietiqueta. El epítipo etiqueta se coloca generalmente en el extremo amino o carboxilo de Bv8. La presencia de dichas formas etiquetadas con epítipo de Bv8 se pueden detectar utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. También, la provisión del epítipo etiqueta permite a Bv8 purificarse fácilmente mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo antietiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se una al epítipo etiqueta. Se conocen bien en la técnica diversos polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos incluyen polihistidina (poli-his) o etiquetas de poli-histidinaglicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta flue HA y su anticuerpo 12CA5 (Field y col., *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2159-2165 (1988)); la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la anterior (Evan y col., *Molecular and Cellular Biology*, 5: 3610-3616 (1985)); y la etiqueta de la glicoproteína D del virus del Herpes Simple (gD) y su anticuerpo (Paborsky y col., *Protein Engineering*, 3(6): 547-553 (1990)). Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido Flag (Hopp y col., *BioTechnology*, 6: 1204-1210 (1988)); el péptido del epítipo KT3 (Martin y col., *Science*, 255: 192-194 (1992)); un péptido del epítipo de la α tubulina (Skinner y col., *J. Biol. Chem.*, 266: 15163-15166 (1991)); y el péptido etiqueta de la proteína 10 del gen T7 (Lutz-Freyermuth y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6393-6397(1990)).

[0177] En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión de Bv8 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (denominada también como inmunoadhesina), dicha fusión sería en la región Fc de una molécula de IgG.

[0178] El diseño de inmunoadhesina más sencillo y más obvio combina la(s) región(es) de unión de la proteína "adhesina" con las regiones de bisagra y Fc de una cadena pesada de la inmunoglobulina. De manera ordinaria, cuando se preparan quimeras de Bv8-inmunoglobulina para el uso en la presente invención, el ácido nucleico que codifica Bv8 se fusionará en el extremo C con el ácido nucleico que codifica el extremo N de una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina, sin embargo, son también posibles fusiones en el extremo N.

[0179] Normalmente, en dichas fusiones, el polipéptido quimérico codificado retendrá al menos la funcionalidad de la bisagra activa y de los dominios CH2 y CH3 de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Se realizan también fusiones en el extremo C de la porción Fc de un dominio constante, o inmediatamente en el extremo N de la CH1 de la cadena pesada o la correspondiente región de la cadena ligera.

[0180] El sitio preciso en el cual se realiza la fusión no es crítico; se conocen bien sitios particulares y se pueden seleccionar con el fin de optimizar la actividad biológica de las quimeras de Bv8-inmunoglobulina.

[0181] En algunas realizaciones, las quimeras de Bv8-inmunoglobulina se ensamblan como monómeros, o hetero u homomultímeros, y particularmente como dímeros o tetrámeros, esencialmente tal como se ilustra en el documento WO 91/08298.

[0182] En una realización preferida, la secuencia de Bv8 se fusiona en el extremo N a la porción del extremo C de un anticuerpo (en particular el dominio Fc), que contiene las funciones efectoras de una inmunoglobulina, por ejemplo, inmunoglobulina G₁ (IgG1). Es posible fusionar la región constante de la cadena pesada completa de la secuencia de Bv8. Sin embargo, más preferiblemente, se usa en la fusión una secuencia que comienza en la región bisagra exactamente en la dirección 5' del sitio de escisión de la papaína (que define la Fc de la IgG químicamente; restos 216, teniendo en cuenta que el primer resto de la región constante de la cadena pesada es 114, o los sitios análogos de otras inmunoglobulinas). En una realización particularmente preferida, la secuencia de aminoácidos de Bv8 se fusiona con la región bisagra y CH2 y CH3, o con la bisagra de CH1, los dominios CH2 y CH3 de una cadena pesada de IgG1, IgG2 o IgG3. El sitio preciso en el cual la fusión se realiza no es crítico y se puede determinar el sitio óptimo mediante experimentación rutinaria.

[0183] En algunas realizaciones, las quimeras de Bv8-inmunoglobulina se ensamblan como multímeros, y particularmente como homodímeros o tetrámeros. Generalmente, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural básica de cuatro cadenas es la forma en la que IgG, IgD, e IgE existen. Una unidad de cuatro cadenas se repite en las inmunoglobulinas de más elevado peso molecular; IgM existe generalmente como un pentámero de unidades básicas de cuatro que se mantiene unido mediante enlaces disulfuro. La globulina IgA, y, ocasionalmente, la globulina IgG, pueden existir también en forma multimérica en el suero. En el caso de un multímero, cada unidad de cuatro puede ser la misma o diferente.

[0184] Alternativamente, la secuencia de Bv8 se puede insertar entre las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera de la inmunoglobulina, de tal manera que se obtiene una inmunoglobulina que comprende una cadena pesada quimérica. En esta realización, la secuencia de Bv8 se fusiona al extremo 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina en cada brazo de una inmunoglobulina, tanto entre la bisagra como en el dominio CH2, o entre los dominios CH2 y CH3. Se han notificado construcciones similares por Hoogenboom y col., Mol. Immunol., 28: 1027-1037 (1991).

[0185] Aunque no se requiere la presencia de una cadena ligera de la inmunoglobulina en las inmunoadhesinas de la presente invención, una cadena ligera de inmunoglobulina puede estar presente tanto covalentemente asociada con el polipéptido de fusión de la cadena pesada de Bv8-inmunoglobulina, o fusionado directamente con Bv8. En el caso. En el primer caso, el ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina se expresa de manera simultánea normalmente con el ADN que codifica la proteína de fusión de la cadena pesada de Bv8-inmunoglobulina. Tras la secreción, la cadena pesada híbrida y la cadena ligera se asocian covalentemente para proporcionar una estructura similar a la inmunoglobulina que comprende dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina enlazadas mediante disulfuro. Los procedimientos adecuados para la preparación de dichas estructuras se dan a conocer, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567 otorgada el 28 de marzo de 1989.

[0186] En una realización preferida, las secuencias de inmunoglobulina usadas en la construcción de las inmunoadhesinas de la presente invención son de un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina IgG. Para las inmunoadhesinas humanas, se prefiere el uso de las secuencias de inmunoglobulina IgG1 e IgG3 humanas. Una principal ventaja del uso de IgG1 es que las inmunoadhesinas de IgG1 se pueden purificar

eficazmente sobre la proteína A inmovilizada. En contraste, la purificación de IgG3 requiere la proteína G un medio significativamente menos versátil. Sin embargo, deben considerarse otras propiedades estructurales y funcionales de las inmunoglobulinas cuando se escoge la molécula de fusión de Ig de una construcción concreta de inmunoadhesina. Por ejemplo, la bisagra de Igg3 es más larga y más flexible, de tal manera que puede acomodar 5 dominios de adhesina más grandes que pueden no plegarse o funcionar adecuadamente cuando se fusionan con IgG1. Otra consideración puede ser la valencia; las inmunoadhesinas de IgG son homodímeros bivalentes, mientras que los subtipos de Ig similares a IgA e IgM pueden originar estructuras diméricas o pentaméricas, respectivamente, de la unidad homodimérica de Ig básica. Para las inmunoadhesinas de Bv8 designadas para la aplicación *in vivo*, son también importantes las propiedades farmacocinéticas y las funciones efectoras especificadas por la región Fc.

10 Aunque IgG1, IgG2 e IgG4 tienen todas semividas *in vivo* de 21 días, sus potencias relativas en la activación del sistema del complemento son diferentes. IgG4 no activa el complemento, e IgG2 es significativamente más débil en la activación del complemento que IgG1. Además, a diferencia de Igg1, IgG2 no se une a los receptores de Fc sobre las células mononucleares o neutrófilas. Aunque IgG3 es óptima para la activación del complemento, su semivida *in vivo* es aproximadamente un tercio de los otros isotipos de IgG. Otra consideración importante para las 15 inmunoadhesinas designadas que se van a usar como agentes terapéuticos humanos es el número de variantes alotípicas del isotipo concreto. En general, se prefieren los isotipos de IgG con unos pocos alotipos serológicamente definidos. Por ejemplo, IgG1 tiene solo cuatro sitios alotípicos serológicamente definidos, dos de los cuales (G1m y 2) están localizados en la región Fc; y uno de estos sitios G1m1, es no inmunógeno. En contraste, existen 12 alotipos serológicamente definidos en IgG3, todos los cuales están en la región Fc, solo tres de estos sitios (G3m5, 11 y 21) 20 tienen un alotipo que es no inmunógeno. De esta manera, el potencial de inmunogenicidad de una inmunoadhesina γ 3 es mayor que la de una inmunoadhesina γ 1.

[0187] Con respecto a la inmunoglobulina parental, un punto de unión útil es exactamente en la dirección 5' de las cisteínas de la bisagra que forman los enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas. En un diseño frecuentemente usado, el codón del resto del extremo C de la parte de Bv8 de la molécula se coloca directamente 25 en la dirección 5' de los codones de la secuencia DKHTHTCPPCP de la región bisagra de IgG1.

[0188] Los procedimientos generales adecuados para la construcción y la expresión de las inmunoadhesinas son los mismos que los dados a conocer anteriormente en la presente memoria descriptiva con respecto a Bv8. Las inmunoadhesinas de Bv8 son las más convenientemente construidas fusionando la secuencia de ADNc que codifica la porción de Bv8 en marco con una secuencia de ADNc de Ig. Sin embargo, se puede usar también la fusión a 30 fragmentos de Ig genómicos (véanse, *por ejemplo*, Gascoigne y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 2936-2940 (1987); Aruffo y col., Cell, 61: 1303-1313 (1990); Stamenkovic y col., Cell, 66: 1133-1144 (1991)). El último tipo de fusión requiere la presencia de secuencias reguladoras de Ig para la expresión. Los ADNc que codifican regiones constantes de la cadena pesada de IgG se pueden aislar basándose en la secuencia publicada de las bibliotecas de ADNc derivadas de linfocitos de bazo o de sangre periférica, mediante técnicas de hibridación o de la reacción en 35 cadena de la polimerasa (PCR). El ADNc que codifica partes de Bv8 e Ig de la inmunoadhesina se inserta en tándem e un vector plásmido que dirige la expresión eficaz en las células hospedadoras escogidas. Para la expresión en células de mamífero, se pueden usar vectores basados en pRK5 (Schall y col., Cell, 61: 361-370 (1990)) y vectores basados en CDM8 (Seed, Nature, 329: 840 (1989)). Se puede crear la unión exacta eliminando las secuencias extra entre los codones de unión designados usando la mutagénesis delecional dirigida contra 40 oligonucleótidos (Zoller y col., Nucleic Acids Res., 10: 6487 (1982); Capon y co., Nature, 337: 525-531 (1989)). Se pueden usar oligonucleótidos sintéticos, en los que cada mitad es complementaria con la secuencia en cualquier lado de la unión deseada; idealmente, estas son de 36 a 48 mers. Alternativamente, se pueden usar técnicas de la PCR para unir las dos partes de la molécula en marco con un vector adecuado.

[0189] La elección de la línea de células hospedadoras para la expresión de inmunoadhesinas de Bv8 depende 45 principalmente de la expresión del vector. Otra consideración es la cantidad de proteína que se requiere. Se pueden producir a menudo cantidades en miligramos mediante transfecciones transitorias. Por ejemplo, la línea de células de riñón embrionario humano 293 transformadas con EIA de adenovirus se puede transfectar transitoriamente con vectores basados en pRK5 mediante una modificación del procedimiento del fosfato de calcio para permitir una expresión eficaz de la inmunoadhesina. Se pueden usar vectores basados en CDM8 para transfectar células COS 50 mediante el procedimiento del DEAE-dextrano (Aruffo y col., Cell, 61: 1303-1313 (1990); Zettmeissl y col., DNA Cell Biol. US. 9: 347-353 (1990)). Si se desean cantidades mayores de proteína, se puede expresar la inmunoadhesina tras la transfección estable de una línea de células hospedadoras. Por ejemplo, se puede introducir un vector basado en pRK5 en células de ovario de hámster chino (CHO) en presencia de un plásmido adicional que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) y que confiere resistencia a G418. Se pueden seleccionar los clones resistentes a 55 G418 en el cultivo; estos clones se hacen crecer en presencia de niveles crecientes de metotrexato inhibidor de DHFR; se seleccionan los clones, en el que el número de copias de genes que codifican la DHFR y las secuencias de inmunoadhesina se amplifican simultáneamente. Si la inmunoadhesina contiene una secuencia líder hidrófoba en su extremo N, es probable que se procese y secrete por las células transfectadas. La expresión de las inmunoadhesinas con más estructuras complejas puede requerir únicamente células hospedadoras adecuadas, por

ejemplo, se pueden proporcionar componentes tales como la cadena ligera o la cadena J por algunos hospedadores celulares de mieloma o hibridoma (Gascoigne y col., 1987, *más arriba*, Martin y col., J. Virol., 67: 3561-3568 (1993)).

[0190] Las inmunoadhesinas se pueden purificar convenientemente mediante cromatografía de afinidad. La adecuabilidad de la proteína A como un ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo del dominio Fc de la inmunoglobulina que se usa en la quimera. Se puede usar la proteína A para purificar inmunoadhesinas que están basadas en las cadenas pesadas de $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ humanas (Lindmark y col., J. Immunol. Meth., 62: 1-13 (1983)). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón ya para $\gamma 3$ humana (Guss y col., EMBO J., 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad es más a menudo agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como las de vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que se pueden conseguir con agarosa. Las condiciones para unir una inmunoadhesina a la columna de afinidad de la proteína A o G vienen dictadas completamente por las características del dominio Fc; esto es, su especie e isotipo. Generalmente, cuando se escoge el ligando apropiado, se produce una unión eficaz directamente a partir del fluido de cultivo sin acondicionar. Una característica que distingue a las inmunoadhesinas es que, para moléculas $\gamma 1$ humanas, la capacidad de unión de la proteína A está bastante disminuida con respecto a un anticuerpo del mismo tipo de Fc. Se puede eluir la unión de la inmunoadhesina eficazmente tanto a pH ácido (a o por encima de 3,0), como en un tampón a pH neutro que contienen la sal medianamente caótrona. Esta etapa de cromatografía de afinidad puede dar como resultado una preparación de inmunoadhesina que es > 95% pura.

[0191] Se pueden usar otros procedimientos conocidos en la técnica en lugar de, o adicionalmente a, cromatografía de afinidad sobre proteína A o G para purificar inmunoadhesinas. Las inmunoadhesinas comparten similitudes con anticuerpos en una cromatografía en gel tiorfílico (Hutchens y col., Anal. Biochem., 159: 217-226 (1986)) e inmovilizan la cromatografía de quelatos metálicos (Al-Mashikhi y col., J. Dairy Sci., 71: 1756-1763 (1988)). En contraste con los anticuerpos, sin embargo, su comportamiento sobre columnas de intercambio iónico viene dictado no solo por sus puntos isoeléctricos, sino también por la carga del dipolo que puede existir en las moléculas debido a su naturaleza quimérica.

[0192] Si se desea, las inmunoadhesinas se pueden hacer biespecífica. De esta manera, las inmunoadhesinas de la presente invención pueden combinar un dominio Bv8 y un dominio, tal como un dominio procedente de otro factor de crecimiento. Para las moléculas biespecíficas, son ventajosas las moléculas triméricas compuestas por una cadena pesada de anticuerpo quimérico en un brazo y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de anticuerpo quimérico en el otro brazo de su estructura tipo anticuerpo, debido a la facilidad de purificación. En contraste a los cuadros productores de anticuerpos usados tradicionalmente para la producción de inmunoadhesinas biespecíficas, que producen una mezcla de diez tetrámeros, las células transfectadas con el ácido nucleico que codifica las tres cadenas de una estructura de inmunoadhesina trimérica producen una mezcla de solo tres moléculas, y la purificación del producto deseado de esta mezcla es correspondientemente más fácil.

35 4. Reparación e identificación de moduladores de la actividad de Bv8

[0193] La presente invención abarca también procedimientos de selección de compuestos para identificar aquellos que imitan o potencian una o más actividades biológicas de Bv8 (agonistas) o previenen el efecto de Bv8 (antagonistas). Los agonistas y antagonistas de Bv8 se denominan también como moduladores de Bv8. Los ensayos de selección de los fármacos antagonistas candidatos se diseñan para identificar compuestos que se unen o complejan con polipéptidos de Bv8, o interfieren de otra forma con la interacción de Bv8 con otras proteínas celulares.

a. Selección de moléculas pequeñas

[0194] Las moléculas pequeñas pueden tener la capacidad de actuar como agonistas o antagonistas de Bv8 y de esta manera ser terapéuticamente útiles. Dichas moléculas pequeñas pueden incluir moléculas pequeñas que se producen naturalmente, compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos y péptidos. Sin embargo, las moléculas pequeñas en la presente invención no están limitadas a estas formas. Están comercialmente disponibles extensas bibliotecas de moléculas pequeñas y se conocen bien en la técnica una amplia variedad de ensayos para seleccionar estas moléculas para la actividad deseada.

[0195] Las moléculas pequeñas agonistas o antagonistas de Bv8 candidatas se identifican preferiblemente en primer lugar en un ensayo que permite la rápida identificación de potenciales moduladores de la actividad de Bv8. Un ejemplo de dicho ensayo es el ensayo de unión proteína-proteína en el que se mide la capacidad de la molécula candidata para unirse a un receptor de Bv8. En otro ejemplo, se mide la capacidad de las moléculas candidatas para interferir con la unión de Bv8 a un receptor de Bv8.

[0196] En una realización preferida, se identifican moléculas pequeñas agonistas de Bv8 por su capacidad para

imitar una o más de las actividades biológicas de Bv8. Por ejemplo, se seleccionan moléculas pequeñas por su capacidad de inducir la proliferación de células endoteliales, para promover la supervivencia de la célula endotelial, tal como se describe en los ejemplos 2 y 3 siguientes o para inducir la angiogénesis, tal como se describe en el ejemplo 4 siguiente.

- 5 **[0197]** En otra realización, se identifican moléculas pequeñas antagonistas de Bv8 por su capacidad para inhibir una o más de las actividades biológicas de Bv8. De esta manera, un compuesto candidato se pone en contacto con Bv8. A continuación se evalúa la actividad biológica de Bv8. En una realización se determina la capacidad de Bv8 para estimular la proliferación de células endoteliales, por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 2. En otra realización, se determina la capacidad de Bv8 para promover la supervivencia de células endoteliales, por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 3. Se identifica un compuesto como un antagonista en el que la actividad de Bv8 está inhibida.

[0198] Los compuestos identificados como agonistas o antagonistas de Bv8 se pueden usar en los procedimientos de la presente invención. Por ejemplo, se pueden usar los antagonistas de Bv8 para tratar el cáncer.

b. Preparación e identificación de anticuerpos agonistas

- 15 **[0199]** Se contemplan también en la presente invención agonistas de anticuerpos policlonales y monoclonales humanos y no humanos (que incluyen las formas humanizadas de anticuerpos monoclonales no humanos) que imitan las propiedades biológicas de Bv8. Estos incluyen variantes de secuencias de aminoácidos y fragmentos de anticuerpos. Se conocen en la materia las técnicas generales para la producción de dichos anticuerpos y la selección de anticuerpos agonistas y se describen brevemente a continuación.

20 *(i) Anticuerpos policlonales*

- [0200]** Se conocen en la técnica los procedimientos para preparar anticuerpos policlonales. Se pueden formular anticuerpos policlonales en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente de inmunización y, si se desea, un adyuvante. Normalmente, el agente de inmunización y/o el adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. Puede ser útil conjugar el agente de inmunización con una proteína conocida por ser inmunógena en el mamífero que se está inmunizando, tal como un inhibidor de la albúmina de suero, o de la tripsina de soja. Los ejemplos de adyuvantes que se pueden emplear incluyen el adyuvante completo de Freund y MPL-TDM.

(ii) Anticuerpos monoclonales

- 30 **[0201]** Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando el procedimiento del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler y col., *Nature*, 256: 495 (1975), o se pueden preparar mediante procedimientos de ADN recombinante (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567).

- 35 **[0202]** En el procedimiento del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal hospedador adecuado, tal como un hámster o un macaco, tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria descriptiva para estimular que los linfocitos produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, se pueden inmunizar los linfocitos *in vitro*. A continuación se fusionen los linfocitos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103, (Academic Press, 1986)).

- 40 **[0203]** Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y hacen crecer en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales sin fusionar. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo de los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), condiciones bajo las cuales se evita el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

- 45 **[0204]** Las células mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan de manera estable un elevado nivel de producción de anticuerpos por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como un medio HAT. Entre estas, las líneas de células de mieloma preferidas son las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de los tumores de ratón MOP-21 y M.C.-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Se han descrito líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur y co., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987)).

[0205] El medio de cultivo en el cual se hacen crecer las células de hibridoma se evalúa para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA).

5 **[0206]** Se puede determinar, por ejemplo, la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal mediante el análisis Scatchard de Munson y col., *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

[0207] Después de que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad, y actividad deseadas, las células se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y crecimiento mediante procedimientos normalizados (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio DMEM o RPMI-1640. Además, se pueden hacer crecer células de hibridoma *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.

[0208] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido de ascitis, o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina tales como, por ejemplo, cromatografía con proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, 15 diálisis, o cromatografía de afinidad.

[0209] El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (usando, por ejemplo, sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el AD se puede colocar en vectores de expresión, que a 20 continuación se transfectan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra forma proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en células hospedadoras recombinantes. Se puede modificar también el ADN, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación por los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera en lugar de las secuencias de murino homólogas, Morrison, y col., *Proc. Nat Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 25 6851 (1984), o uniendo covalentemente a la secuencia de codificación de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia de codificación de un polipéptido no de inmunoglobulina. De esta manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal agonista de Bv8 descrito en la presente memoria descriptiva.

[0210] Se pueden preparar también anticuerpos quiméricos o híbridos *in vitro* usando los procedimientos 30 conocidos en la química de las proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que implican agentes reticulantes. Se pueden construir, por ejemplo, inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluye iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

[0211] Se describirá la producción recombinante de anticuerpos con más detalle a continuación.

(iii) Anticuerpos humanizados

35 **[0212]** Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en éste a partir de una fuente no humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo como restos de "importación", que se capturan normalmente de un dominio variable de "importación". La humanización se puede llevar a cabo esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen y col., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), 40 sustituyendo las CDR o las secuencias de CDR por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano.

[0213] De acuerdo con esto, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Cabilly, *más arriba*), en los que sustancialmente, se ha sustituido menos de un dominio variable intacto por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de las CDR y posiblemente algunos restos FR se sustituyen por restos procedentes de sitios 45 análogos en anticuerpos de roedores.

[0214] Es importante que los anticuerpos se humanicen reteniendo la elevada afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar esta meta, de acuerdo con un procedimiento preferido, se preparan anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales que utilizan modelos tridimensionales de las secuencias parentales y 50 humanizadas. Están comúnmente disponibles modelos tridimensionales de la inmunoglobulina y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas muestras permite el análisis del probable papel de los restos en el funcionamiento de la secuencia de la inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influencia la capacidad de la inmunoglobulina

candidata de unirse a su antígeno. De esta forma, se pueden seleccionar restos de FR y combinarse a partir de la secuencia consenso y de importación de tal manera que se consigan las características del anticuerpo deseado, tales como una afinidad creciente por el(los) antígeno(s) diana. En general, los restos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en influenciar la unión del antígeno. Para detalles adicionales, véase la solicitud de los EE.UU. con N° de serie 07/934.373 presentada el 21 de agosto de 1992, que es una continuación en parte de la solicitud con n° de serie 07/715.272 presentada el 14 de junio de 1991.

(iv) *Anticuerpos humanos*

[0215] Se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos mediante el procedimiento del hibridomas. Se han descrito líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor, J. *Immol.* 133, 3001 (1984), y Brodeur, y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987).

[0216] Es ahora posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en los ratones mutantes de la línea quimérica y germinal da como resultados una inhibición completa de la producción del anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz génica de la inmunoglobulina de la línea germinal humana en dicha línea germinal de ratones mutantes dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras el estímulo del antígeno. Véanse, por ejemplo., Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2551-2555 (1993); Jakobovits y col., *Nature* 362, 255-258 (1993).

[0217] Mendez y col. (*Nature Genetics* 15: 146-156 (1997)) han mejorado adicionalmente la tecnología y han generado una línea de ratones transgénicos designada como "Xenomouse II" que, cuando se estimula con un antígeno, genera anticuerpos humanos completos de elevada afinidad. Esto se consigue mediante integración de la línea germinal de los loci de la cadena pesada y la cadena ligera de la megabase humana en ratones con delección en el segmento J_H endógeno tal como se ha descrito anteriormente. Xenomouse II hospeda 1.020 kb del locus de la cadena pesada humana que contiene aproximadamente 66 genes de V_H , las regiones D_H y J_H completas y tres regiones constantes diferentes (μ , δ y γ), y hospeda también 800 kb del locus κ humano que contiene 32 genes de V_κ , segmentos J_κ y genes C_κ . Los anticuerpos producidos en estos ratones semejan estrechamente lo que se observa en seres humanos en todos los aspectos, que incluyen la redistribución, el ensamblaje y el repertorio génico. Los anticuerpos humanos se expresan preferentemente sobre los anticuerpos endógenos debido a la delección en el segmento J_H endógeno que evita la redistribución del gen en el locus de murino.

[0218] Alternativamente, se puede usar la tecnología de expresión en fago (McCafferty y col., *Nature* 348: 552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo in vitro, a partir de los repertorios del gen del dominio variable de la inmunoglobulina (V) procedentes de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en marco tanto en un gen mayor como menor de la proteína revestida de un bacteriófago filamentosos, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosos contiene una copia de un ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del fago dan también como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta aquellas propiedades. De esta manera, el fago imita algunas de las propiedades de los linfocitos B. Se puede llevar a cabo la expresión en fago en una variedad de formatos; para su revisión véanse, por ejemplo Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571 (1993). Diversas fuentes de segmentos génicos de tipo V que se pueden usar para la expresión en fago. Clackson y col., *Nature* 352: 624-628 (1991) aislaron una matriz diversa de anticuerpos dirigidos contra oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatorizada de genes V derivados de bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para una matriz diversa de antígenos (que incluye autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), o Griffith y col., *EMBOJ.* 12: 725-734 (1993). En una respuesta inmune natural, los genes del anticuerpo acumulan mutaciones a una mayor velocidad (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán una mayor afinidad, y los linfocitos B que expresan la inmunoglobulina superficial con elevada afinidad se replican y diferencian preferentemente durante el posterior estímulo del antígeno. Este proceso natural se puede imitar empleando la técnica conocida como "intercambio de cadenas" (Marks y col., *BiolTechnol.* 10: 779-783 [1992]). En este procedimiento, la afinidad de los anticuerpos humanos "primarios" obtenidos mediante la expresión en fago se puede aumentar mediante la sustitución secuencial de las genes de la región V de la cadena pesada y ligera con repertorios de variantes que se producen naturalmente (repertorios) de los genes del dominio V obtenidos de donantes inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades en el intervalo nM. Una estrategia para preparar repertorios muy grandes de anticuerpos de expresión en fago (conocidos también como "la madre de todas las bibliotecas" ha sido descrita por Waterhouse y col., *Nucl. Acids Res.* 21: 2265-2266 (1993), y Griffith et al., *EMBO J.* (1994), en prensa, ha notificado el aislamiento de un anticuerpo

humano de elevada afinidad directamente de dicha gran biblioteca de expresión en fago. Se puede usar también el intercambio de genes para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos de roedores. De acuerdo con este procedimiento, que se denomina también como "impresión de epítomos", el gen del dominio V de la cadena pesada o ligera de los anticuerpos de roedores obtenido mediante la técnica de expresión en fago se sustituye con un repertorio de genes del dominio V humano, creando quimeras de roedor-humano. La selección del antígeno da como resultado el aislamiento de dominios variables humanos capaces de restaurar un sitio de unión a antígeno funcional, es decir, el epítomo gobierna (imprime) la elección del compañero. Cuando el procedimiento se repite a fin de sustituir el dominio V restante de roedor, se obtiene un anticuerpo humano (véase la solicitud de patente PCT WO 93/06213, publicada el 1 de abril de 1993. A diferencia de la humanización tradicional de los anticuerpos de roedor mediante el injerto de la CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen región de la estructura o restos de CDR de origen roedor.

(v) *Anticuerpos biespecíficos*

[0219] Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos diferentes antígenos. Se conocen en la técnica los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos está basada en la expresión simultánea de dos parejas de la cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina, en el que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Millstein y Cuello, Nature 305, 537-539 (1983)). Debido al acortamiento aleatorio de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpos, de las cuales solo una tiene la correcta estructura biespecífica. La purificación de la molécula correcta, que usualmente se lleva a cabo mediante etapas de cromatografía de afinidad, es más bien incómoda, y los rendimientos del producto son bajos. Se dan a conocer procedimientos similares en la publicación de solicitud PCT N° WO 93/08829 (publicada el 13 de mayo de 1993), y en Traunecker y col., EMBO 10, 3655-3659 (1991).

[0220] De acuerdo con una solución diferente y más preferida, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan con las secuencias del dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la bisagra, las regiones CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se transfieren simultáneamente en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en las realizaciones cuando relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usados en la construcción proporcionan óptimos rendimientos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias de codificación de dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales da como resultado elevados rendimientos o cuando las relaciones no son de particular significancia. En una realización preferida de esta solución, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada híbrida de inmunoglobulina con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida que proporciona una segunda especificidad de unión en el otro brazo. Se ha encontrado que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones no deseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Esta solución se da a conocer en la Publicación PCT N° WO 94/04690, publicada el 3 de marzo de 1994.

[0221] Para detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., Methods in Enzymology 121, 210 (1986).

(vi) *anticuerpos heteroconjugados*

[0222] Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Se ha propuesto, por ejemplo dichos anticuerpos para dirigir las células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (publicaciones de solicitudes PCT N°s WO 91/00360 y WO 92/200373; documento EP 03089). Se pueden preparar anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Son bien conocidos en la técnica los agentes de reticulación adecuados, y se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos N° 4.676.980, junto con numerosas técnicas de reticulación.

(vii) *Fragmentos de anticuerpo*

[0223] En algunas realizaciones, el anticuerpo agonista de Bv8 (que incluye anticuerpos de murino, humanos y

humanizados y variantes de anticuerpos) es un fragmento de anticuerpo. Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, por ejemplo, Morimoto y col., J. Biochem. Biophys. Methods 24: 107-117 (1992) y Brennan y col., Science 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, se pueden recuperar directamente fragmentos de Fab'-SH de E. coli y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). En otra realización, el F(ab')₂ se forma usando la cremallera GCN4 de leucina para promover el ensamblaje de la molécula de F(ab')₂. De acuerdo con otra solución, se pueden aislar fragmentos Fv, Fab o F(ab')₂ directamente a partir de un cultivo celular hospedador recombinante. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el profesional experto.

(viii) *identificación de anticuerpos agonistas*

[0224] Los anticuerpos agonistas de Bv8 se identifican basándose en su actividad biológica. En una realización, los anticuerpos agonistas de Bv8 se identifican por su capacidad para inducir la proliferación de células endoteliales, tal como se describe en el Ejemplo 2. En otra realización, los anticuerpos agonistas de Bv8 se identifican por su capacidad de inducir la angiogénesis, tal como se describe en el Ejemplo 4.

5. Ensayos de selección de proteínas que actúan con Bv8

[0225] Se puede emplear cualquier procedimiento adecuado para detectar interacciones proteína-proteína para identificar proteínas u otras moléculas, incluyendo, pero sin limitarse a proteínas transmembrana o intracelulares, que interactúan con Bv8. Entre los procedimientos tradicionales que se pueden emplear están la inmunoprecipitación simultánea, la reticulación y la purificación simultánea mediante gradientes o columnas cromatográficas para identificar proteínas que interactúan con Bv8. Para dichos ensayos, el componente de Bv8 puede ser una proteína de longitud completa, uno de sus derivados solubles, un péptido correspondiente a un dominio de interés, o una proteína de fusión que contiene alguna región de Bv8.

[0226] Se pueden emplear procedimientos que dan como resultado la identificación simultánea de genes que codifican proteínas capaces de interactuar con Bv8. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, sondear bibliotecas de expresión, de una manera similar a la de la técnica bien conocida del sondeo de anticuerpos de bibliotecas de 8gt11, usando Bv8 etiquetada o una de sus variantes.

[0227] Un procedimiento que detecta las interacciones de proteínas in vivo, el sistema doble híbrido, se describe en detalle solo a fines de ilustración y no por medio de limitación. Se ha descrito una versión de este sistema (Chien y col., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9578-9582) y está comercialmente disponible de Clontech (Palo Alto, CA).

[0228] De manera breve, utilizando dicho sistema, se construyen plásmidos que codifican dos proteína híbridas: un plásmido consiste de nucleótidos que codifican el dominio de unión del ADN de una proteína activadora de la transcripción fusionada con una secuencia de nucleótidos que codifica Bv8, o un polipéptido, péptido, o proteína de fusión de los anteriores, y el otro plásmido consiste de nucleótidos que codifican el dominio de activación de la proteína activadora de la transcripción fusionado con un ADNc que codifica una proteína desconocida que se ha recombinado en este plásmido como parte de una biblioteca de ADNc. El plásmido de fusión del dominio de unión al ADN y la biblioteca de ADNc se transforman en una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que contiene un gen indicador (por ejemplo, HBS o lacZ) cuya región reguladora contiene el sitio de unión del activador de la transcripción. Cualquier proteína híbrida sola no puede activar la transcripción del gen indicador; el dominio híbrido de unión a ADN no puede debido a que no proporciona la función de activación y el dominio híbrido de activación no puede debido a que no puede localizar los sitios de unión del activador. La interacción de las dos proteínas híbridas reconstituye la proteína activadora funcional y da como resultado la expresión del gen indicador, que se detecta mediante un ensayo por el producto del gen indicador.

[0229] El sistema doble híbrido o la metodología relacionada se pueden usar para seleccionar las bibliotecas del dominio de activación para las proteínas que interactúan con el producto del gen "anzuelo". Por medio de ejemplo, y no por medio de limitación, se puede usar Bv8 como el producto del gen anzuelo. Las secuencias genómicas o de ADNc totales se fusionan con el ADN que codifica un dominio de activación. Esta biblioteca y un plásmido que codifica un producto de un gen anzuelo de Bv8 fusionado con el dominio de unión de ADN se transforman simultáneamente en una cepa indicadora de levadura, y los transformantes resultantes se seleccionan para aquellos que expresan el gen indicador. Por ejemplo, y no por medio de limitación, una secuencia de un gen anzuelo de Bv8, por ejemplo, los genes del marco de lectura abierto, se pueden clonar en un vector de tal manera que se fusione traducionalmente con el ADN que codifica el dominio de unión al ADN de la proteína GAL4. Estas colonias se purifican y se aíslan los plásmidos de la biblioteca responsables de la expresión del gen indicador. A continuación se usa la secuenciación del ADN para identificar las proteínas codificadas por los plásmidos de la

biblioteca.

[0230] Se puede preparar una biblioteca de ADN de la línea de células a partir de la cual se van a detectarlas proteínas que interactúan con el producto del gen anzuelo de Bv8 usando los procedimientos practicados de manera rutinaria en la técnica. De acuerdo con el sistema particular descrito en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, se pueden insertar fragmentos de ADNc en un vector de tal manera que se fusionen traduccionalmente con el dominio de activación transcripcional de GAL4. Esta biblioteca se puede transformar simultáneamente junto con el plásmido de fusión del gen anzuelo de Bv8-GAL4 en una cepa de levadura que contiene un gen lacZ impulsado por un promotor que contiene la secuencia de activación de GAL4. Una proteína codificada por ADNc, fusionada al dominio de activación transcripcional de GAL4, que interactúa con el producto del gen anzuelo de Bv8 reconstituirán una proteína GAL4 activa y por tanto impulsarán la expresión. Se pueden detectar colonias que impulsan la expresión mediante procedimientos rutinarios en la técnica; A continuación se puede purificar el ADNc a partir de estas cepas, y usarse para producir y aislar la proteína que interactúa con el gen anzuelo de Bv8, usando las técnicas practicadas de manera rutinaria en la materia.

a. Ensayos de compuestos que modulan la expresión o actividad de Bv8

[0231] Los siguientes ensayos se diseñan para identificar los compuestos que interactúan con (*por ejemplo*, se unen a) Bv8, los compuestos que interfieren con la interacción de Bv8 con sus moléculas de unión, análogos o receptores, y con los compuestos que modulan la actividad de la expresión génica de Bv8 (*es decir*, modulan el nivel de expresión génica de Bv8) o modulan los niveles de Bv8 en el cuerpo. Se pueden utilizar adicionalmente ensayos que identifican los compuestos que se unen a las secuencias reguladoras génicas de Bv8 (*por ejemplo*, secuencias promotoras) y, consecuentemente, pueden modular la expresión génica de Bv8. Véase, *por ejemplo*, Platt, K.A., 1994, J. Biol. Chem. 269: 28558-28562.

[0232] Los compuestos que se pueden seleccionar de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a péptidos, anticuerpos y sus fragmentos, y otros compuestos orgánicos (*por ejemplo*, peptidomiméticos) que se unen a un Bv8 o a un receptor de Bv8 y que imitan tanto la actividad estimulada por un ligando natural (*es decir*, agonistas) como inhiben la actividad estimulada por el ligando natural (*es decir*, antagonistas)

[0233] Dichos compuestos pueden incluir, pero no se limitan a, péptidos tales como, por ejemplo, péptidos solubles, que incluyen, pero no se limitan a los miembros de bibliotecas de péptidos aleatorios, (véanse, por ejemplo, Lam, K.S. y col., 1991, Nature 354: 82-84; Houghten, R. y col., 1991, Nature 354: 84-86), y bibliotecas moleculares derivadas de la química combinatoria preparadas de aminoácidos de configuración D y/o L, fosfopéptidos (que incluyen, pero no se limitan a miembros de bibliotecas de fosfopéptidos dirigidos aleatoriamente o parcialmente degenerados; véase, por ejemplo, Songyang, Z. y col., 1993, Cell 72: 767-778), anticuerpos, (que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, antiidiotípicos, quiméricos o monocatenarios, y fragmentos de expresión de bibliotecas FAB, F(abN)₂ y Fab, y sus fragmentos de unión a epítopo), y moléculas pequeñas orgánicas o inorgánicas.

[0234] Otros compuestos que se pueden seleccionar de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a moléculas pequeñas orgánicas que son capaces de acceder en una célula adecuada (por ejemplo, una célula endotelial) y afectar a la expresión de un gen Bv8 o algún otro gen implicado en una ruta mediada por Bv8 (por ejemplo, interactuando con la región reguladora o los factores de transcripción implicados en la expresión génica); o dichos compuestos que afectan o sustituyen la actividad de Bv8 o de algunos otros factores intracelulares implicados en la transducción de la señal de Bv8, las rutas catabólicas o metabólicas.

[0235] La modelización por ordenador y las tecnologías de búsqueda permiten la identificación de compuestos, o la mejora de los compuestos ya identificados, que pueden modular la expresión o la actividad de Bv8. Habiendo identificado dicho compuesto o composición, se identifican los sitios o regiones activas. Dichos sitios activos pueden ser normalmente sitios de unión de ligandos. Se puede identificar el sitio activo usando procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, a partir de las secuencias de aminoácidos de los péptidos, a partir de las secuencias de nucleótidos de los ácidos nucleicos, o a partir del estudio de los complejos del compuesto o composición relevantes con su ligando natural. En el último caso, se pueden usar los procedimientos químicos o cristalográficos de rayos X para encontrar el sitio activo mediante la búsqueda en la que se encuentra sobre el factor el ligando complejoado.

[0236] A continuación, se determina la estructura geométrica tridimensional del sitio activo. Esto se puede llevar a cabo mediante procedimientos conocidos, incluyendo la cristalografía mediante rayos X, que puede determinar una estructura molecular completa. Por otra parte, se puede usar la RMN en fase sólida o líquida para determinar algunas distancias intramoleculares. Se puede usar cualquier otro procedimiento experimental de determinación de la estructura para obtener las estructuras geométricas parciales o completas. Se pueden medir las estructuras geométricas con un ligando complejoado, natural o artificial, que puede aumentar la fiabilidad del sitio activo de la

estructura determinada.

[0237] Si se determina una estructura incompleta o insuficientemente precisa, se pueden usar los procedimientos informáticos basados en la modelización numérica para completar la estructura o mejorar su precisión. Se puede utilizar cualquier procedimiento de modelización reconocido, incluyendo los modelos parametrizados específicos de los biopolímeros particulares tales como proteínas o ácidos nucleicos, modelos dinámicos moleculares basados en movimientos moleculares informatizados, modelos mecánicos estadísticos basados en conjuntos térmicos, o modelos combinados. Para la mayoría de tipos de modelos, los campos de fuerza moleculares normalizados, que representan las fuerzas entre los átomos y los grupos constituyentes, son necesarios, y se pueden seleccionar a partir de los campos de fuerza conocidos en la fisicoquímica. Las estructuras experimentales incompletas o menos precisas pueden servir como restricciones de las estructuras completas y más precisas calculadas mediante estos procedimientos de modelización.

[0238] Finalmente, habiendo determinado la estructura del sitio activo (o sitio de unión), tanto experimentalmente, mediante modelización, como mediante una combinación, se pueden identificar los compuestos moduladores candidatos mediante búsqueda en las bases de datos que contienen los compuestos junto con la información de su estructura molecular. Dicha búsqueda trata de encontrar los compuestos que tienen las estructuras que corresponden a la estructura del sitio activo determinado y que interactúan con los grupos que definen el sitio activo. Dicha búsqueda puede ser manual, pero es preferiblemente asistida por ordenador. Estos compuestos que se encuentran a partir de esta búsqueda son potenciales moduladores de la actividad de Bv8.

[0239] Alternativamente, se pueden usar estos procedimientos para identificar compuesto de modulación mejorados a partir de un compuesto de modulación o ligando ya conocidos. La composición del compuesto conocido se puede modificar y los efectos estructurales de la modificación se pueden determinar usando los procedimientos de modelización experimentales e informáticos descritos anteriormente aplicados a la nueva composición. A continuación se compara la estructura alterada con la estructura del sitio activo del compuesto a determinar si da resultado un ajuste o interacción deseados. De esta manera, variaciones sistemáticas en la composición, tales como la variación de los grupos secundarios, se pueden evaluar rápidamente para obtener compuestos moduladores modificados o ligandos de especificidad o actividad mejorados. Los procedimientos de modelización experimentales e informáticos adicionales útiles para identificar los compuestos moduladores basados en la identificación de los sitios activos (o sitios de unión) de Bv8, y los factores de transducción y transcripción relacionados serán evidentes para los expertos en la técnica

[0240] Los procedimientos de modulación experimentales e informáticos adicionales útiles para identificar compuestos moduladores basados en la identificación de sitios activos (o sitios de unión de Bv8, y los factores de transducción y transcripción relacionados serán evidentes para los expertos en la técnica.

[0241] Los ejemplos de sistemas de modelización molecular son los programas CHARMM y QUANTA (Polygen Corporation, Waltham, MA). CHARMM lleva a cabo las funciones de minimización de la energía y de dinámica molecular. QUANTA lleva a cabo la construcción, modelización gráfica y análisis de la estructura molecular. Quanta permite la construcción, modificación, visualización, y el análisis interactivo del comportamiento de las moléculas entre sí.

[0242] Numerosos artículos revisan la modelización por ordenador de fármacos interactivos con proteínas específicas, tales como Rotivinen, y col., 1988, Acta Pharmaceutical Fennica 97: 159-166; Ripka, New Scientist 54-57 (16 de junio de 1988); McKinaly y Rossmann, 1989, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29: 111-122; Perry y Davies, OSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design pp. 189-193. (Alan R. Liss, Inc. 1989); Lewis y Dean, 1989 Proc. R. Soc. Lond. 236: 125-140 y 141-162; y, con respecto a un receptor del modelo para los componentes del ácido nucleico, Askew, y col., 1989, J. Am. Chem. Soc. 111:1082-1090. Otros programas informáticos que seleccionan y representan gráficamente los productos químicos están disponibles de compañías tales como BioDesign, Inc. (Pasadena, CA.), Allelix, Inc. (Mississauga, Ontario, Canada), e Hypercube, Inc. (Cambridge, Ontario). Aunque estos se diseñan principalmente para la aplicación de fármacos específicos a proteínas concretas, se pueden adaptar al diseño de fármacos específicos para las regiones del ADN o ARN, una vez que se ha identificado la región.

[0243] Aunque se describe anteriormente con referencia al diseño y a la generación de compuestos que podrían alterar la unión, se podrían seleccionar también bibliotecas de compuestos conocidos, incluyendo productos naturales o productos químicos sintéticos, y materiales biológicamente activos, incluyendo proteínas, para los compuestos que son inhibidores o activadores.

[0244] Pueden ser útiles los compuestos identificados mediante ensayos tales como los descritos en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, en la elucidación de la función biológica del producto génico de Bv8. Dichos compuestos se pueden administrar a un paciente a las dosis terapéuticamente eficaces para tratar cualquiera de una

variedad de trastornos fisiológicos. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad del compuesto suficiente para dar como resultado cualquier mejora, impedimentos, prevención, o alteración de cualquier síntoma biológico.

b. Ensayos de compuestos que se unen a Bv8

5 **[0245]** Se pueden diseñar sistemas para identificar compuestos capaces de interactuar con (por ejemplo, unirse a) o imitar a Bv8, o capaces de interferir con la unión de Bv8 a un receptor análogo, molécula de enlace o sustrato. Los compuestos identificados pueden ser útiles, por ejemplo, en la modulación de la actividad de los productos génicos de Bv8 natural y/o mutante; pueden ser útiles en la elaboración de la función biológica de Bv8, se pueden utilizar en selecciones para identificar compuestos que perturban las interacciones normales de Bv8; o pueden por sí mismos
10 perturbar o activar dichas interacciones,

[0246] El principio de los ensayos usados para identificar los compuestos que se unen a Bv8, o los receptores o sustratos análogos de Bv8, implica preparar una mezcla de reacción de Bv8 y el compuesto de ensayo bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir a los dos componentes interactuar y unirse, formando de esta manera un complejo que se puede eliminar y/o detectar en la mezcla de reacción. Las especies de Bv8 usadas
15 pueden variar dependiendo de la meta del ensayo de selección. Por ejemplo, cuando se desean agonistas de los receptores naturales, se pueden utilizar el Bv8 de longitud completa, el Bv8 truncado, un péptido, o una proteína de fusión que contiene uno o más dominios de Bv8 fusionados con una proteína o polipéptido que da como resultado ventajas en el sistema de ensayo (por ejemplo, marcado, aislamiento del complejo resultante, etc.). Cuando se consideran los compuestos que interactúan directamente con Bv8, se pueden usar los péptidos que corresponden
20 con las proteínas Bv8 y de fusión que contienen Bv8.

[0247] Se pueden llevar a cabo ensayos de selección de una variedad de formas. Por ejemplo, un procedimiento para llevar a cabo dicho ensayo implica anclar el Bv8, polipéptido, péptido, o proteína de fusión derivada de los anteriores, o la sustancia de ensayo sobre una fase sólida y detectar los complejos de Bv8/compuesto de ensayo anclados en la fase sólida al final de la reacción. En una realización de dicho procedimiento, se puede anclar el Bv8
25 reactivo sobre una superficie sólida, y el compuesto de ensayo, que no está anclado, se puede etiquetar, tanto directa como indirectamente.

[0248] En la práctica, se pueden utilizar de manera conveniente placas de microtitulación como la fase sólida. Se puede inmovilizar el componente anclado mediante enlaces no covalentes o covalentes. Se puede llevar a cabo el enlace no covalente revistiendo sencillamente la superficie sólida con una disolución de la proteína y secando.
30 Alternativamente, se puede usar un anticuerpo inmovilizado, preferiblemente un anticuerpo monoclonal, específico de la proteína que se va a inmovilizar para anclar la proteína a la superficie sólida. Las superficies se pueden preparar por adelantado y almacenarse.

[0249] Con el fin de llevar a cabo el ensayo, se añade el componente no inmovilizado a la superficie revestida que contiene el componente anclado. Después que se completa la reacción, se eliminan los componentes sin reaccionar
35 (por ejemplo, mediante lavado) bajo las condiciones tales que cualquier complejo formado permanecerá inmovilizado sobre la superficie sólida. La detección de los complejos anclados sobre la superficie sólida se puede llevar a cabo de numerosas formas. Cuando se preetiqueta el componente anteriormente no inmovilizado, la detección de la etiqueta inmovilizada sobre la superficie indica que se formaron los complejos. Cuando el componente anteriormente no inmovilizado no se preetiqueta, se puede usar una etiqueta indirecta para detectar los complejos anclados sobre
40 la superficie; por ejemplo, usando un anticuerpo etiquetado específico del componente anteriormente no inmovilizado (el anticuerpo, a la vez, se puede etiquetar directamente o etiquetar indirectamente con un anticuerpo etiquetado dirigido contra Ig).

[0250] Alternativamente, se puede llevar a cabo una reacción en una fase líquida, separarse los productos de reacción de los componentes sin reaccionar, y detectarse los complejos; usando, por ejemplo, un anticuerpo
45 inmovilizado específico de una proteína Bv8, polipéptido, péptido o proteína de fusión o el compuesto de ensayo para anclar cualquier complejo formado en disolución, y un anticuerpo etiquetado específico del otro componente del posible complejo para detectar los complejos anclados.

c. Ensayos de los compuestos que interfieren con las interacciones de Bv8

[0251] Las macromoléculas que interactúan con Bv8 se denominan para, los fines de esta discusión, como
50 "moléculas de unión". Estas moléculas de unión es probable que estén implicadas en las rutas biológicas mediadas por Bv8. Por tanto, es deseable identificar los compuestos que interfieren con o perturban la interacción de dichas moléculas de unión, lo que puede ser útil en la regulación o el aumento de la actividad de Bv8 en el cuerpo y/o controlar los trastornos asociados con esta actividad (o una deficiencia de la misma).

[0252] El principio básico de los sistemas de ensayo usados para identificar los compuestos que interfieren con la

interacción entre Bv8 y una molécula o moléculas de unión implica preparar una mezcla de reacción que contiene Bv8, o alguna de sus variantes, y la molécula de unión bajo las condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir a las dos interactuar y unirse, formando de esta manera un complejo. Con el fin de ensayar un compuesto para la actividad inhibitoria, se prepara la mezcla de reacción en presencia y ausencia del compuesto de ensayo. El compuesto de ensayo se puede incluir inicialmente en la mezcla de reacción, o se puede añadir en el momento posterior a la adición del Bv8 y su molécula de unión. Las mezclas de reacción del control se incuban sin el compuesto de ensayo o con placebo. A continuación se detecta la formación de cualquier complejo entre Bv8 y la molécula de unión. La formación de un complejo en la reacción de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de ensayo indica que el compuesto interfiere con la interacción del Bv8 y la molécula de unión interactiva. Adicionalmente, se puede comparar también la formación del complejo dentro de las mezclas de reacción que contienen el compuesto de ensayo y la proteína Bv8 normal para la formación del complejo dentro de las mezclas de reacción que contienen el compuesto de ensayo y un Bv8 mutante. Esta comparación puede ser importante en aquellos casos en los que sea deseable identificar los compuestos que perturban específicamente las interacciones de Bv8 mutante, o mutada, pero no las proteínas normales.

[0253] El ensayo de los compuestos que interfieren con la interacción entre Bv8 y las moléculas de unión se puede llevar a cabo en un formato heterogéneo u homogéneo. Los ensayos heterogéneos implican el anclaje tanto de Bv8 como de la molécula de unión, sobre una fase sólida y la detección de los complejos anclados sobre la fase sólida al final de la reacción. En los ensayos homogéneos, la totalidad de la reacción se lleva a cabo en una fase líquida. En cualquier solución, se puede modificar el orden de adición de los reactivos para obtener diferente información acerca de los compuestos que se están ensayando. Por ejemplo, los compuestos de ensayo que interfieren con la interacción por competición se pueden identificar realizando la reacción en presencia de la sustancia de ensayo; es decir, añadiendo la sustancia de ensayo a la mezcla de reacción antes de, o simultáneamente con, Bv8 y la molécula de unión interactiva. Alternativamente, los compuestos de ensayo que perturban los complejos preformado, por ejemplo, los compuestos con mayores constantes de unión que desplazan uno de los componentes del complejo, se pueden ensayar añadiendo el compuesto de ensayo a la mezcla de reacción después que se han formado los complejos. Se describen brevemente los diversos formatos a continuación.

[0254] En un sistema de ensayo heterogéneo, tanto Bv8 como la molécula de unión interactiva, están ancladas sobre una superficie sólida mientras que la especie no anclada se etiqueta, tanto directa como indirectamente. En la práctica, se utilizan convenientemente placas de microtitulación. La especie anclada se puede inmovilizar mediante enlaces no covalentes o covalentes. El enlace no covalente se puede llevar a cabo sencillamente revistiendo la superficie sólida con una disolución del Bv8 o la molécula de unión y secando. Alternativamente, se puede usar un anticuerpo inmovilizado específico de la especie que está anclada para anclar la especie a la superficie sólida se pueden preparar las superficies por adelantado y almacenarse.

[0255] A fines de llevar a cabo el ensayo, el compañero de la especie inmovilizada se expone a una superficie revestida con o sin el compuesto de ensayo. Después que se completa la reacción, se eliminan los componentes sin reaccionar (por ejemplo, mediante lavado) y cualquier complejo formado permanecerá inmovilizado sobre la superficie sólida. Se puede llevar a cabo la detección de los complejos anclados sobre la superficie sólida de numerosas formas. Cuando la especie no inmovilizada está preetiquetada, la detección de la etiqueta inmovilizada sobre la superficie indica que se formaron los complejos. Cuando la especie no inmovilizada no está preetiquetada, se puede usar una etiqueta indirecta para detectar los complejos anclados sobre la superficie, por ejemplo, utilizando un anticuerpo etiquetado específico de la especie inicialmente no inmovilizada (el anticuerpo, a la vez, puede etiquetarse directamente o etiquetarse indirectamente con un anticuerpo etiquetado dirigido contra Ig)

[0256] Alternativamente, la reacción se puede llevar a cabo en una fase líquida, en presencia o ausencia del compuesto de ensayo, separarse los productos de reacción de los componentes sin reaccionar, y detectarse los complejos; utilizando, por ejemplo un anticuerpo inmovilizado específico de uno de los componentes de unión para anclar cualquier complejo formado en la disolución, y un anticuerpo etiquetado específico del otro compañero para detectar los complejos anclados. De nuevo, dependiendo del orden de adición de los reactivos a la fase líquida, se pueden identificar los compuestos de ensayos que inhiben el complejo o que perturban los complejos preformados.

[0257] En una realización alternativa de la invención, se puede usar un ensayo homogéneo. En esta solución, se prepara un complejo preformado de Bv8 y una molécula de unión interactiva en la que se etiquetan tanto Bv8 como sus compañeros de unión, pero la señal generada por la etiqueta se detiene rápidamente debido a la formación del complejo (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N° 4.109.496 de Rubenstein que utiliza esta solución para los inmunoensayos). La adición de una sustancia de ensayo que compete con, y desplaza una de las especies procedentes del complejo preformado dará como resultado la generación de una señal por encima de la de fondo. De esta forma, se pueden identificar las sustancias de ensayo que perturban la interacción.

[0258] En una realización particular, se puede preparar una fusión de Bv8 para la inmovilización. Por ejemplo, Bv8 o uno de sus fragmentos peptídicos, se pueden fusionar con un gen de la glutatión-S-transferasa (GST) usando un

vector de fusión, tal como pGEX-5X-1, de tal manera que se mantiene su actividad de unión en la proteína de fusión resultante. La molécula de unión interactiva se puede purificar y usar para dar lugar a un anticuerpo monoclonal, usando los procedimientos practicados rutinariamente en la técnica y descritos anteriormente. Se puede etiquetar este anticuerpo con el isótopo radioactivo ¹²⁵I, por ejemplo, mediante los procedimientos practicados rutinariamente en la técnica. E un ensayo heterogéneo, la proteína de fusión se puede anclar a perlas de glutatión-agarosa. A continuación se puede añadir la molécula de unión interactiva en presencia o ausencia del compuesto de ensayo de una manera que permita que se produzca la interacción y la unión. Al final del periodo de reacción, se puede eliminar mediante lavado el material no unido, y se puede añadir el anticuerpo monoclonal al sistema y permitir que se una a los componentes complejados. Se puede detectar la interacción entre Bv8 y la molécula de unión interactiva midiendo la cantidad de radioactividad que permanece asociada con las perlas de glutatión-agarosa. Una inhibición satisfactoria de la interacción por el compuesto de ensayo dará como resultado una disminución en la radioactividad medida.

[0259] Alternativamente, la proteína de fusión GST y la molécula de unión interactiva se pueden mezclar juntas en líquido en ausencia de perlas sólidas de glutatión-agarosa. Se puede añadir el compuesto de ensayo tanto durante como después de que se deja interactuar a las especies. Esta mezcla se puede añadir a continuación a las perlas de glutatión-agarosa y el material no unido se elimina mediante lavado. De nuevo, se puede detectar la extensión de la inhibición de la interacción entre Bv8 y la molécula de unión añadiendo el anticuerpo etiquetado y midiendo la radioactividad asociada con las perlas.

[0260] En otra realización de la invención, se pueden emplear estas mismas técnicas usando fragmentos de péptidos que corresponden a los dominios de unión de Bv8 y a la molécula interactiva o de unión (en los casos en los que la molécula de unión es una proteína), en lugar de una de ambas de las proteínas de longitud completa: Se puede usar cualquier número de procedimientos practicados de manera rutinaria en la técnica para identificar y aislar los sitios de unión. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis del gen que codifica una de las proteínas y selección para la perturbación de la unión en un ensayo de inmunoprecipitación simultánea. A continuación se pueden seleccionar las mutaciones compensatorias en el gen que codifica la segunda especie en el complejo. El análisis de la secuencia de los genes que codifican las proteínas respectivas desvelará las mutaciones que corresponden a la región de la proteína implicada en la unión interactiva. Alternativamente, se puede anclar una proteína a una superficie sólida usando los procedimientos descritos anteriormente, tales como tripsina. Tras el lavado, un péptido marcado, relativamente corto que comprende el dominio de unión puede permanecer asociado con el material sólido, que se puede aislar e identificar mediante la secuenciación de aminoácidos. También, una vez que se obtiene el gen que codifica la molécula de unión intracelular, se pueden diseñar cortos segmentos génicos se puede diseñar mediante ingeniería genética para expresar los fragmentos peptídicos de la proteína, que a continuación, que a continuación se puede ensayar para la actividad de unión y purificarse o sintetizarse.

[0261] Por ejemplo, y no por medio de limitación, se puede anclar Bv8 a un material sólido tal como se describe, anteriormente, preparando una proteína de fusión GST y permitiendo a ésta unirse a perlas de glutatión agarosa. La molécula de unión interactiva se puede etiquetar con un isótopo radioactivo, tal como ³⁵S, y se escinde con una enzima proteolítica tal como tripsina: A continuación se pueden añadir los productos de escisión a la proteína de fusión anclada y permitirles unirse. Tras eliminar mediante lavado los péptidos no unidos, el material unido etiquetado, que representa el dominio de unión de la molécula de fusión intracelular se puede eluir, purificar y analizar para la secuencia de aminoácidos mediante procedimientos bien conocidos. Los péptidos identificados de esta manera se pueden producir sintéticamente o fusionarse con las proteínas de facilitación adecuadas usando la tecnología de ADN recombinante.

6. Composiciones farmacéuticas

[0262] Los polipéptidos Bv8 y sus moduladores descritos en la presente memoria descriptiva se pueden emplear como agentes terapéuticos. Los polipéptidos Bv8 y los moduladores de Bv8 de la presente invención se pueden formular de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mientras que el producto de Bv8 del mismo se combina en una premezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones terapéuticas de Bv8 se preparan mezclando un Bv8 que tenga un grado deseado de pureza, preferiblemente esencialmente puro, con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, más arriba), en la forma de una torta liofilizada o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes son no tóxicos para la célula o el mamífero que se está exponiendo a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Los ejemplos incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes que incluyen ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilporrildona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes azucarados tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, Pluronic o PEG.

[0263] El Bv8 que se va a usar para la administración *in vivo* debe ser estéril. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como filtración a través de membranas de filtración estériles, antes de o tras la liofilización y reconstitución. Bv8 se puede almacenar en forma liofilizada. Las composiciones de Bv8 terapéuticas generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, 5 por ejemplo, una bolsa o vial de disolución intravenosa que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

[0264] Bv8 se combina opcionalmente con, o se administra en concierto con otros factores de crecimiento. Por ejemplo, se puede combinar con EG-ECGF o VEGF.

[0265] Bv8 se puede usar con otras terapias convencionales para tratar el cáncer.

10 **[0266]** La ruta de administración está de acuerdo con procedimientos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión mediante rutas intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, administración tópica, o mediante sistemas de liberación continua.

[0267] Las dosificaciones y concentraciones de fármacos deseadas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo del uso concreto previsto. La determinación de la dosificación o la 15 ruta de administración adecuadas está bien comprendida dentro de los conocimientos de un médico normalmente experto. Los experimentos animales proporcionar unas directrices precisas para la determinación de las dosis eficaces para la terapia humana. El escalado interespecies de las dosis eficaces se puede llevar a cabo siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. and Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" En Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi y col., Eds., Pergamon Press, Nueva York 1989, pp. 42-96.

20 **[0268]** Cuando se desea la administración de liberación continua del polipéptido o del modulador de Bv8 en una formulación con características de liberación adecuadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que requiera la administración del polipéptido Bv8, se contempla la microencapsulación del polipéptido o modulador de Bv8. Por ejemplo, Bv8 en forma purificada puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de 25 gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, 1980, (A. Osol, Ed).

[0269] Bv8 se puede incorporar en preparaciones de liberación continua para uso terapéutico. Los ejemplos 30 adecuados de preparaciones de liberación continua incluyen matrices poliméricas semipermeables en la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación continua incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato) tal como se describe en Langer y col., J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981) y Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982) o pol (alcohol vinílico), poliláctidos (Patente de los Estados Unidos N° 3.773.919, documento EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico 35 y gamma etil-L-glutamato (Sidman, y col., Biopolymers 22: 547 (1983)), acetato de etilvinilo no degradable (Langer, y col., más arriba) o copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como Lupron Depot™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (documento EP 133.988).

[0270] Aunque los polímeros tales como acetato de etilvinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación 40 de moléculas durante más de 100 días, algunos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante un largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden discurrir estrategias racionales para la estabilización de las proteínas dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de 45 agregación es la formación de un enlace S-S mediante intercambio tio-disulfuro, se puede conseguir la estabilización modificando restos sulfidrido, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados, y desarrollando composiciones específicas de la matriz polimérica.

[0271] Las composiciones de Bv8 de liberación continua incluyen también Bv8 atrapado liposómicamente. Los liposomas que contienen Bv8 se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica. (Epstein, y col., 1985, 50 Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 3688; Hwang, y col., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030; documentos DE 3.218.121 A; EP 52322A; EP 36676A; EP 88046A; EP 143949A; EP 142641A; Solicitud de patente japonesa N° 83-118008; Patentes de los Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP 102.324A). Normalmente los liposomas son de tipo unilamellar pequeño (aproximadamente 200-800 Angstroms) en el que el contenido de lípidos es mayor de aproximadamente 30 mol en % de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para la terapia de Bv8 55 óptima.

[0272] Cuando se aplica tópicamente, Bv8 se combina adecuadamente con otros ingredientes, tales como vehículos y/o adyuvantes. No existen limitaciones sobre la naturaleza de dichos otros ingredientes, excepto que deben ser fisiológicamente aceptables y eficaces para su pretendida administración, y no pueden degradar la actividad de los ingredientes activos de la composición. Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen pomadas, 5 cremas, geles, o suspensiones, con o sin colágeno purificado. Las composiciones se pueden impregnar también en parches, tiritas, y vendajes transdérmicos, preferiblemente en forma líquida o semilíquida.

[0273] Para obtener una formulación de gel, el Bv8 formulado en una composición líquida se puede mezclar con una cantidad eficaz de polisacárido o polímero sintético soluble en agua tal como PEG, para formar un gel de la viscosidad adecuada que se va a aplicar tópicamente. El polisacárido que se puede usar incluye, por ejemplo, 10 derivados de celulosa tales como derivados de celulosa eterificada, incluyendo alquil celulosas, hidroxialquilcelulosas y alquilhidroxialquilcelulosas, por ejemplo, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, e hidroxipropilcelulosa; almidón y almidón fraccionado; agar; ácido algínico y alginatos; goma arábica; pululano; agarosa; carragenatos; dextranos; dextrinas; fructanos; inulina, mananos; xilanos; arabinanos; quitosanes; glicógenos; glucanos; y bpolímeros sintéticos; así como gomas tales 15 como goma xantana; goma guar; goma garrofín; goma arábica; goma tragacanto; y goma karaya; y sus derivados y mezclas. El agente gelificante preferido en la presente memoria descriptiva es uno que es inerte para los sistemas biológicos, no tóxico, sencillo de preparar, y no demasiado líquido o viscoso y no desestabilizara el Bv8 que se mantiene en su interior.

[0274] Preferiblemente, el polisacárido es un derivado de celulosa eterificada, más preferiblemente uno que está 20 bien definido, purificado, y relacionado en la USP, por ejemplo, la metilcelulosa y los derivados de hidroxialquilcelulosa, tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, e hidroxipropilmetilcelulosa. La más preferida en la presente memoria descriptiva es la metilcelulosa.

[0275] El polietilenglicol útil para la gelificación es normalmente una mezcla de PEG de bajo y alto peso molecular para obtener la viscosidad adecuada. Por ejemplo, una mezcla de un PEG de peso molecular 400-600 con uno de 25 peso molecular 1500. Sería eficaz para este objetivo cuando se mezcla en la relación adecuada para obtener una pasta.

[0276] El término "soluble en agua" como se aplica a los polisacáridos y a los PEG se entiende que incluye soluciones y dispersiones coloidales. En general, la solubilidad de los derivados de celulosa se determina mediante el grado de sustitución de los grupos éter, y los derivados estabilizantes útiles en la presente memoria descriptiva 30 deberían tener una cantidad suficiente de dichos grupos éter por unidad de glucosa anhidro en la cadena de celulosa para volver los derivados solubles en agua. Un grado de sustitución del éter de al menos 0,35 grupos éter por unidad de glucosa anhidro es generalmente suficiente. Adicionalmente los derivados de celulosa pueden estar en la forma de sales de metales alcalinos, por ejemplo, las sales de Li, Na, K, o Cs.

[0277] Si se emplea metilcelulosa en el gel, éste comprende preferiblemente aproximadamente 2-5%, más 35 preferiblemente aproximadamente 3%, del gen y Bv8 está presente en una cantidad de aproximadamente 300-1000 mg por ml de gel.

[0278] Los dispositivos de membranas semipermeables implantables son útiles como medios para administrar fármacos en algunas circunstancias. Por ejemplo, se pueden encapsular las células que secretan Bv8, variantes de Bv8, quimeras de Bv8 o agonistas o antagonistas de Bv8, y dichos dispositivos se pueden implantar en un paciente. 40 De acuerdo con esto, se incluye también un procedimiento para evitar o tratar el cáncer que comprende implantar células que secretan Bv8, sus agonistas o antagonistas que se puedan requerir para la dolencia concreta, en el cuerpo de pacientes que lo necesitan. Finalmente, la presente invención incluye un dispositivo para evitar o tratar el cáncer mediante el implante en un paciente de un implante que comprende una membrana semipermeable, y células que secretan Bv8 (o sus agonistas o antagonistas que se puedan requerir para la dolencia concreta) 45 encapsulado en el interior de dicha membrana, y siendo permeable dicha membrana a Bv8 (o sus agonistas o antagonistas) e impermeable a los factores del paciente perjudiciales para las células. Las propias células del paciente, transformadas para producir Bv8 ex vivo, podrían implantarse directamente en el paciente, opcionalmente sin dicha encapsulación. La metodología para la encapsulación de la membrana de las células vivas es similar a la del técnico normalmente experto en la materia, y la preparación de las células encapsuladas y su implante en 50 pacientes se puede llevar a cabo sin experimentación excesiva.

[0279] La composición farmacéutica que comprende Bv8 o un agonista o antagonista de Bv8 se localiza preferiblemente en un recipiente adecuado. El recipiente viene acompañado preferiblemente por instrucciones que detallan el uso y la dosificación apropiados de la composición farmacéutica. Un experto en la técnica reconocerá que estas instrucciones variarán dependiendo del procedimiento de tratamiento.

55 7. Procedimientos de tratamiento

[0280] Los agentes terapéuticos proporcionados en la presente memoria descriptiva se pueden usar en numerosos tratamientos los tratamientos incluyen el tratamiento de un mamífero, preferiblemente un ser humano, con una dolencia asociada con la producción hormonal del tejido o de las glándulas endocrinas y/o con una dolencia asociada con una angiogénesis excesiva, no deseada o incontrolada. En un aspecto, Bv8 o un agonista de Bv8 se administra a un mamífero que lo necesita en una cantidad eficaz para tratar la dolencia. Bv8 se puede administrar en forma de polipéptido o de ácido nucleico Preferiblemente, se usa Bv8 o un agonista de Bv8 cuando la dolencia es tal que requiere la supervivencia de o un aumento en el número de células productoras de una hormona concreta. Los ejemplos de dichas dolencias incluyen la diabetes. Otras dolencias incluyen aquellas en las que se desea aumentar el número de o potenciar la supervivencia de células en los órganos reproductores, tales como las células en los testículos. Otras dolencias incluyen aquellas en las que se desea disminuir la formación de nuevos vasos sanguíneos Los ejemplos de dichas dolencias incluyen tumores, tales como cáncer de testículos.

[0281] Bv8 se puede administrar junto con otro compuesto o composición. En una realización, el compuesto es VEGF o uno de sus agonistas o antagonistas. Opcionalmente, el compuesto puede ser un ácido nucleico que codifica un polipéptido, tal como VEGF.

[0282] En una realización, los compuestos tales como los identificados mediante los ensayos de selección en la sección 4 y 5, anterior, se pueden usar para modular el nivel de la actividad o la expresión de Bv8. Específicamente, los compuestos identificados que son agonistas de Bv8 o que son capaces de estimular la unión de Bv8 con su receptor pueden ser útiles para los tratamientos en los que se desea un nivel creciente de la actividad de Bv8. De manera similar, dichos compuestos identificados que son capaces de aumentar la expresión génica de Bv8 pueden ser útiles para este tipo de tratamiento.

[0283] Preferiblemente, Bv8 o uno de sus agonistas o antagonistas se administra a un individuo con una dolencia asociada con la producción hormonal del tejido o de las glándulas endocrinas, preferiblemente, una dolencia que requiere una disminución en el número de células productoras de una hormona concreta, una disminución en la proliferación celular o una disminución en la angiogénesis. Por ejemplo, se proporciona en la presente memoria descriptiva un procedimiento de regular la fertilidad en un individuo, que comprende administrar un antagonista de Bv8 a un individuo en una cantidad eficaz para regular la fertilidad. Se pueden administrar también antagonistas de Bv8 para tratar quistes y otras dolencias asociadas con la proliferación en exceso en tejidos productores de hormonas.

[0284] Los trastornos dependientes de hormonas esteroideas se pueden abordar también utilizando composiciones y procedimientos de la presente invención. Dichos trastornos incluyen hiperplasia adrenal congénita lipoide, infertilidad, maduración sexual, tumores androgenodependientes, pubertad precoz, síndrome de McCune-Albright, hipoplasia adrenal congénita, o hipogonadismo hipogonadotrópico.

[0285] Una dolencia específica que se puede tratar por los agentes y las composiciones proporcionados en la presente memoria descriptiva es el cáncer, en particular, el cáncer esteroide, por ejemplo, el cáncer androgenodependiente. Un procedimiento preferido de tratar el cáncer tal como se proporciona en la presente memoria descriptiva comprende la administración de un antagonista de Bv8 a un individuo con, o en riesgo de tener cáncer en una cantidad eficaz para tratar el cáncer. En una realización, el cáncer es de testículos.

[0286] En una realización adicional, se administra un antagonista de Bv8 a un paciente en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos, tales como en el tratamiento del cáncer. Se contempla que se pueda administrar Bv8 antes de, durante o después del tratamiento con el agente quimioterapéutico de tal manera que aumenta la eficacia terapéutica. Los agentes quimioterapéuticos preferidos incluyen, pero no se limitan a vincristina, cisplatino, metotrexato, 3'-azido-3'-desoxitimidina, taxanos (por ejemplos paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) and doxetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia)) y/o antibióticos de antraciclina Se pueden seguir las instrucciones del fabricante en la determinación de la preparación y las pautas terapéuticas de dichos agentes quimioterapéuticos o se pueden determinar empíricamente por el profesional experto. La preparación y las pautas terapéuticas de dicha quimioterapia se describen también en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

[0287] Debe entenderse que los procedimientos para aumentar la proliferación celular e inhibir la proliferación celular se pueden llevar a cabo *in vivo* o *in vitro*. En algunos casos, puede ser deseable añadir Bv8 a una muestra de células *in vitro* con el fin de estimular la proliferación de un tipo específico de célula. La muestra tratada con Bv8 se puede usar a continuación en los ensayos de selección o trasplantarse en un individuo que necesita el tratamiento o en un modelo animal.

[0288] Una cantidad eficaz de Bv8 o un agonista o antagonista de Bv8 que se vaya a emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la ruta de administración, y la dolencia del paciente. De acuerdo con esto, será necesario para el terapeuta valorar la dosificación y modificar la ruta de administración según

se requiera para obtener el óptimo efecto terapéutico. Normalmente, el médico administrará el Bv8 hasta que se alcance una dosificación que consiga el efecto deseado. Una dosificación diaria típica para el tratamiento sistémico puede variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más por día, de manera preferible aproximadamente 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la ruta de administración. Se anticipa que serán eficaces diferentes formulaciones para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos y que la administración tendrá como objetivo un órgano o tejido, por ejemplo, puede necesitar administrarse de una manera diferente de la de otro órgano o tejido.

[0289] Como una proposición general alternativa, el Bv8 se formula y administra en el sitio o tejido objetivo a una dosificación capaz de establecer en el tejido un nivel de Bv8 que sea eficaz pero no excesivamente tóxico. Esta concentración intratejido debería mantenerse, si es posible, mediante infusión continua, liberación continua, aplicación tópica, implante celular que exprese Bv8, o inyección a frecuencias empíricamente determinadas. El progreso de esta terapia se vigila fácilmente mediante ensayos convencionales.

[0290] El régimen de dosificación debe determinarse basándose en las circunstancias individuales. Sin embargo, en una realización preferida. Bv8 o un agonista o antagonista de Bv8 se administra cada día, más preferiblemente en días alternos e incluso más preferiblemente, al menos dos veces a la semana. El tratamiento se continúa preferiblemente cada seis meses, más preferiblemente durante un mes e incluso más preferiblemente durante al menos dos semanas. Un experto en la técnica apreciará que el terapeuta debe determinar el régimen exacto de dosificación basándose en las circunstancias individuales.

[0291] Se puede usar también el ácido nucleico que codifica un polipéptido Bv8 en la terapia génica. En las aplicaciones de terapia génica, se introducen los genes en células a fines de conseguir la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para la sustitución de un gen defectivo. "Terapia génica" incluye la terapia génica convencional en la que se consigue un efecto duradero mediante un único tratamiento, y la administración de agentes terapéuticos génicos, que implica la administración una sola vez o repetida de un ADN o ARNm terapéuticamente eficaz. Se pueden usar ARN y ADN antisentido como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de algunos genes *in vivo*. Se ha demostrado ya que se pueden importar oligonucleótidos antisentido cortos en las células en las que actúan como inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones celulares producidas por su restringida captación por la membrana celular. (Zamecnik y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4143-4146 [1986]). Los oligonucleótidos se pueden modificar para potenciar su captación, por ejemplo, sustituyendo sus grupos fosfodiéster negativamente cargados por grupos sin cargar.

[0292] Existe una variedad de técnicas disponibles para la introducción de ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del hospedador previsto. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio, etc. Las técnicas de transferencia génica *in vivo* actualmente preferidas incluyen la transfección con vectores víricos (normalmente retrovíricos), la transfección mediada por proteína-liposoma revestidos de virus (Dzau y col., Trends in Biotechnology 11, 205-210 (1993)). En algunas situaciones es deseable proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente que dirija las células, tal como un anticuerpo específico de una proteína de membrana superficial celular o la célula diana, un ligando de un receptor en la célula diana, etc. Cuando se emplean liposomas, se pueden usar proteínas que se unan a la proteína de la membrana superficial celular asociada con endocitosis para dirigir y/o facilitar la captación, proteínas de la cápsida o sus fragmentos trópicos para un tipo de célula particular anticuerpos para las proteínas que experimentan internalización en ciclación, proteínas que dirigen la localización intracelular de la diana y potencian la semivida intracelular. Se describe la técnica de la endocitosis mediada por el receptor, por ejemplo, en Wu y col., J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); y Wagner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990). Para la revisión de un marcador génico y los protocolos de terapia génica, véase Anderson y col., Science 256, 808-813 (1992).

[0293] Se pueden usar también las secuencias de Bv8 en los procedimientos de diagnóstico. La expresión en exceso de Bv8 puede indicar un quiste o cáncer en un órgano reproductor. Además, una muestra de un paciente se puede analizar para el Bv8 mutado o disfuncional. Generalmente, dichos procedimientos incluyen comparar la expresión de Bv8 en una muestra procedente de un paciente con la de un control

50 8. Artículos de fabricación

[0294] La presente solicitud describe también un artículo de fabricación que comprende materiales útiles para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno o para regular la fertilidad. El artículo de fabricación comprende preferiblemente un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales tales como vidrio y plástico. El recipiente mantiene una composición que comprende Bv8 o uno de sus agonistas o antagonistas. En una realización, el artículo de fabricación comprende un antagonista de Bv8

y las instrucciones de uso del antagonista de Bv8 para tratar o prevenir el cáncer. En otra realización, el artículo de fabricación comprende Bv8 y las instrucciones de uso del Bv8 para tratar o prevenir una dolencia que está asociada con un tejido endotelial productor de hormonas. En otra realización más, el artículo de fabricación comprende un antagonista de Bv8 y las instrucciones de uso del antagonista de Bv8 para regular la fertilidad. El prospecto puede 5 indicar también el régimen de dosificación adecuado. En una realización, el prospecto indica que la composición es para administrarse en una dosis de entre aproximadamente 0,01 µg/kg y 50 mg/kg.

EJEMPLOS

[0295] Se usaron los reactivos comercialmente disponibles referidos en los ejemplo de acuerdo con las instrucciones del fabricante a no ser que se indicara otra cosa. La fuente de aquellas células s identifica en los 10 siguientes ejemplos, y a lo largo de la memoria descriptiva, mediante números de acceso en los que ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

EJEMPLO 1

Análisis de transferencia Northern

[0296] Para elucidar el modelo de expresión de Bv8, se llevó a cabo el análisis de transferencia Northern usando 15 ARN de una amplia variedad de tejidos humanos, de ratón y ratas. Se hibridaron transferencias de ARN humano con una sonda de ADN etiquetad con ³²P basada en el ADNc de Bv8 de murino, mientras que se hibridaron transferencias de ARN de ratón y rata con una sonda de ADN marcada con ³²P basándose en el ADNc de Bv8 de murino.

[0297] Se llevó a cabo el análisis de transferencia Northern de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la 20 técnica. Por ejemplo, se prepararon sondas de ADNc usando 30-50 ng de fragmentos de ADNc humano o de ratón con el kit Redi-Prime II (Amersham), utilizando 3000 µCi/mmol de dCTP etiquetado con ³²P (Amersham). Se purificaron las sondas en columnas de Sephadex G50 (Pharmacia) y se llevó a cabo la hibridación a 68°C en disolución de hibridación ExpressHyb (Stratagene). En otro ejemplo, se incubaron las transferencias con las sondas en tampón de hibridación 5 X SSPE; 2 X solución de Denhardt; 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón cizallado 25 desnaturalizado; formamida al 50%; SDS al 2%) durante 60 horas a 42°C. se lavaron las transferencias varias veces en 2 X SSC; SDS al 0,05% durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por un lavado de 30 minutos en 0,1 X SSC; SDS al 0,1% a 50°C. Se desarrollaron las transferencias tras exposición durante la noche mediante análisis con phosphorimager. Se avaluó la carga de ARN equivalente mediante la hibridación con una sonda de actina como control.

[0298] Se detectaron las transcripciones de ARNm de Bv8. La Figura 9 muestra que se detectó una única especie 30 de ARN de 1,8 kb en testículos humanos con una sonda de Bv8 humana: No se detectó la expresión en ninguno de los otros tejidos humanos que se analizaron. La Figura 10A muestra que se detectó una única especie de ARNm en testículos y corazón de ratón. La Figura 10B muestra que las transcripciones de 1,8 kb y 0,8 kb están presentes en testículos de rata, pero no en otros tejidos de rata. En conjunto, estos hallazgos indican que los testículos son el sitio 35 principal de expresión del ARNm de Bv8.

EJEMPLO 2

Ensayos de proliferación celular

[0299] Para determinar la sensibilidad de tipos de células concretos a Bv8, se evaluaron células endoteliales de 40 capilar cortical adrenal bovino (ACE) y células endoteliales del capilar cerebral bovino (BBC) para la respuesta proliferativa.

[0300] De manera breve, se cultivaron células endoteliales ACE (células endoteliales de capilar cortical adrenal) y células endoteliales BBC (de capilar cerebral bovino) en DMEN con baja glucosa suplementado con suero de ternera bovina al 10%. Para los ensayos de proliferación celular, se plaquearon 6000 células en cada pocillo de placas de 12 pocillos en los medios anteriores para el control ("C" en la Fig. 11), 10 ng/ml de VEGF ("V" en la Fig. 11, 50, 10 o 1 45 nm de Bv8 (proteína recombinante etiquetada con Fc). Se obtuvieron los recuentos celulares totales después de 1 semana utilizando un contador Coulter. El aumento de veces en el número de células es relativo al control de la dolencia ajustado arbitrariamente a un valor de 1. Los medios y otros reactivos de cultivo celular se obtuvieron de Life Technologies, Inc. Para el comportamiento del ensayo, véase también Aravind y Koonin, Curr. Biol. 8: 477-478 (1998).

[0301] Se muestran los resultados preliminares en las Figs. 11A y 11 B, lo que indica el aumento en el número de 50 células con respecto a los controles. Bv8 produjo un aumento en la proliferación celular a todas las concentraciones ensayadas, con un efecto máximo observado a una concentración de 50 not. VEGS, indujo un incremento de casi

tres veces en la proliferación de células ACE y BCC en comparación con el control sin tratar.

EJEMPLO 3

Ensayo de supervivencia celular

- [0302]** Se midió el efecto de Bv8 sobre la supervivencia de las células endoteliales. Se plaquearon 5 aproximadamente 2×10^5 células de capilar cerebral bovino (BBC) en cada pocillo de placas de 6 pocillo que contenían medios completos (tal como se describe en el Ejemplo 2, anterior). Los siguientes días se aspiraron los medios completos y se cultivaron las células en medios sin ninguna adición e en medios que comprendían uno de los siguientes componentes: FCS al 2%, DCS al 10%, 20 ng/ml de VEGF ("V" en la Fig. 12), 5 nM de Bv8, 25 nM de Bv8, 20 ng/ml de VEGF + 25 nM de Bv8 ("V+Bv8" en la Fig. 12, o 25 nM de EG-VEGF. Tras incubación durante 48 10 horas, se eliminaron las células mediante tripsinización y se fijaron con etanol frío al 70% durante varias horas. A continuación se tiñeron las células a temperatura ambiente durante 2-4 horas con 5 μ g/ml de yoduro de propidio y 20 ng/ml de ARNasa en PBS. Se determinó el perfil sub-G1 de células mediante el análisis FACS. Este porcentaje de población celular se representó gráficamente como porcentaje de células apoptóticas en el eje vertical de la gráfica en la Figura 12.
- 15 **[0303]** Como se puede observar en la Figura 12, Bv8 potenció la supervivencia de las células endoteliales BBC. En particular, unas pocas células apoptóticas fueron visibles en el cultivo en presencia de cualquier concentración de Bv8 que en presencia de FCS al 2% o de EG-VEGF 25 nM. Bv8 y VEGF mostraron un efecto sinérgico, con una combinación de los dos compuestos que aumentaban la supervivencia celular en una mayor extensión que cualquier factor de crecimiento por sí mismo o FCS al 10%.

20 EJEMPLO 4

Introducción in vivo de la angiogénesis

- [0304]** Se midió la capacidad de Bv8 para inducir una respuesta angiogénica. En un conjunto de experimentos, se determinó el efecto de Bv8 en la proliferación vascular testicular en los testículos de ratones Beige empalados sin pelo.
- 25 **[0305]** Se han descrito anteriormente los adenovirus que codifican LacZ, VEGF, y EG-VEGF (LeCouter, Nature, 412: 877-84, 2001). Para la producción de adenovirus que codifican Bv8, se clonó el ADN que codificaba 81 isoformas de aminoácidos de Bv8 en el vector lanzadera del CMV (Stratagene) y se siguieron las instrucciones del fabricante para producir el vector del adenovirus recombinante y el virus recombinante: Se purificó el virus usando el kit a gran escala de Virapur (Carlsbad, CA), y se valoró.
- 30 **[0306]** Para los estudios *in vivo*, se inyectaron vectores adenovíricos (LacZ, VEGF, EG-VEGF y BvS) en los testículos de ratones sin pelo Beige a 10^7 - 10^8 ufp (n=5), después de siete días, se sacrificaron los animales y se fijaron y procesaron los testículos para la histología.

- [0307]** Tal como se puede observar en la Figura 13, Bv8, similar a VEGF y EG-VEGF, aumentó in vivo la formación de capilares intersticiales en células de testículos de ratones sin pelo. No se observó aumento en la formación de 35 capilares intersticiales o en la angiogénesis en cualquiera de los grupos, ni el de PBS ni el de control con adenovirus LacZ. En numerosos animales tratados, se observó también atrofia tubular. La atrofia tubular puede ser resultado de un aumento en la presión intersticial que es el resultado de una inducción de la respuesta angiogénica.

- [0308]** La anterior memoria descriptiva escrita se considera que es suficiente para permitir a un experto en la técnica practicar la invención. Sin embargo, diversas modificaciones de la invención, además de las que se muestran 40 y describen en la presente memoria descriptiva serán evidentes a los expertos en la técnica de la anterior descripción.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0309]

<110> GENENTECH, INC.

45 FERRARA, Napoleone

LE COUTER, Jennifer

<120> ÁCIDOS NUCLEICOS Y POLIPÉPTIDOS BV8 CON ACTIVIDAD MITÓGENA

ES 2 386 346 T3

<130> GENENT.088VPC

<150> US 60/316.184

<151> 29-08-2001

<160> 6

5 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 427

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <400> 1

```

tgagggcgcc atgaggagcc tgtgctgcg cccactcctg ctctctttgc tgctgccgcc 60
gctgctgctc acgccccgcg ctggggacgc cgccgtgatc accgggggctt gtgacaagga 120
ctcccaatgt ggtggaggca tgtgctgtgc tgtcagtatc tgggtcaaga gcataaggat 180
ttgcacacct atgggcaaac tgggagacag ctgccatcca ctgactcgta aaaacaattt 240
tggaatgga aggcaggaaa gaagaaagag gaagagaagc aaaaggaaaa aggagggtcc 300
atTTTTTggg cggaggatgc atcacacttg cccatgtctg ccagggttgg cctgTTTtacg 360
gacttcattt aaccgattta tttgTTtagc ccaaaagtaa tcgctctgga gtagaaacca 420
aatgtga                                         427
    
```

<210> 2

<211> 129

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

<210> 3

<211> 363

20 <212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 386 346 T3

<400> 3

```

gagggcgcca tgaggagcct gtgctgcgcc ccaactcctgc tectcttget gctgccgccc 60
ctgctgctca cgccccgcgc tggggacgcc gccgtgatca ccggggcttg tgacaaggac 120
tcccaatgtg gtggaggcat gtgctgtgct gtcagtatct gggtaagag cataaggatt 180
tgcacaccta tgggcaaaact gggagacagc tgccatccac tgactcgtaa agttccattt 240
tttgggcgga ggatgcatca cacttgccca tgtctgccag gcttggcctg tttacggact 300
tcatttaacc gatttatattg tttagcccaa aagtaatcgc tctggagtag aaaccaaatg 360
tga 363

```

<210> 4

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

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

```

<210> 5

10 <211> 1338

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 5

ES 2 386 346 T3

```

cggacgcgtg ggcgtcccct aaccgccacc gcgtccccgg gacgccatgg gggaccccgcg 60
ctgtgccccg ctactgctac ttctgctgct accgctgctg ttcacaccgc cgcgccggga 120
tgccgcgggtc atcaccgggg cttgcgacaa ggactctcag tgcggaggag gcatgtgctg 180
tgctgtcagt atctgggtta agagcataag gatctgcaca cctatgggcc aagtgggcca 240
cagctgccac cccctgactc ggaaagtcc attttggggg cggaggatgc accacacctg 300
cccctgcctg ccaggcttgg cgtgtttaag gacttcttcc aaccggttta tttgcttggc 360
ccggaaatga tcaactctgaa gtaggaactt gaaatgcgac cctccgctgc acaatgtccg 420
tcgagtctca cttgtaattg tggcaaacaa agaatactcc agaaagaaat gttctcccc 480
ttccttgact ttccaagtaa cgtttctatc tttgattttt gaagtggcct tttttttttt 540
ttttttttcc tttccttgaa ggaaagtttt gatttttggg gagatttata gaggactttc 600
tgacatggct tctcatttcc ctgtttatgt tttgccttga catttttgaa tgccaataac 660
aactgttttc acaaatagga gaataagagg gaacaatctg ttgcagaaac ttccttttgc 720
cccttgcccc actcgccccg ccccgccccg ccccgccctg cccatgcgca gacagacaca 780
cccttactct tcaaagactc tgatgatcct caccttactg tagcattgtg ggtttctaca 840
cttccccgcc ttgctgggtg acccactgag gaggtcaga gagctagcac tgtacaggtt 900
tgaaccagat cccccaagca gctcatttgg ggcagacgtt gggagcgctc caggaacttt 960
cctgcaccca tctggcccac tggctttcag ttctgctggt taactggtgg gaggacaaaa 1020
ttaacgggac cctgaaggaa cctggcccgt ttatctagat ttgtttaagt aaaagacatt 1080
ttctccttgt tgtggaatat tacatgtctt tttctttttt atctgaagct tttttttttt 1140

ttctttaagt cttcttgttg gagacatttt aaagaacgcc actcgaggaa gcattgattt 1200
tcatytggca tgacaggagt catcatttta aaaaatcggg gttaagttat aatttaact 1260
ttatttghtaa cccaaaggty taatgtaaat ggatttcctg atatcctgcc atttgtactg 1320
gtatcaatat ttytatgt                                     1338

```

<210> 6

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

```

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

```


REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento in vitro para inducir la proliferación de células endoteliales, que aumenta la supervivencia de las células endoteliales, o que induce la angiogénesis, que comprende poner en contacto las células con un polipéptido Bv8 que tenga al menos un 80 por ciento de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4 o una molécula de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además poner en contacto dichas células con VEGF o un ácido nucleico que codifica VEGF.
3. Un procedimiento in vitro de inhibir la proliferación de células endoteliales, la supervivencia de células endoteliales, o la angiogénesis, que comprende poner en contacto las células con un antagonista de un polipéptido Bv8 que tiene al menos un 80 por ciento de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, en el que dicho polipéptido es capaz de inducir la proliferación de células endoteliales, aumentar la supervivencia de las células endoteliales, o inducir la angiogénesis, y en el que el antagonista es un anticuerpo dirigido contra Bv8, un fragmento de anticuerpo dirigido contra Bv8 que se une a antígeno, o una molécula antisentido dirigida contra el ácido nucleico que codifica Bv8.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichas células endoteliales son células de una glándula esteroideogénica.
5. Uso de un antagonista de un polipéptido Bv8 que tiene al menos un 80 por ciento de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, en el que dicho polipéptido es capaz de inducir la proliferación de células endoteliales, aumentar la supervivencia de las células endoteliales o inducir la angiogénesis, para la fabricación de un medicamento para regular la fertilidad en un mamífero, en el que el antagonista es un anticuerpo dirigido contra Bv8, un fragmento de anticuerpo dirigido contra Bv8 que se une a antígeno, o una molécula antisentido dirigida contra un ácido nucleico que codifica Bv8.
6. Uso de un polipéptido Bv8 que tiene al menos un 80 por ciento de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4 o una molécula de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido, en la preparación de un medicamento para tratar una dolencia asociada con un tejido productor de hormonas en un mamífero.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la dolencia es un trastorno dependiente de una hormona esteroide.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la dolencia es hiperplasia adrenal congénita lipoide, infertilidad, maduración sexual, tumor androgenodependiente, pubertad precoz, síndrome de McCune Albright, hiperplasia adrenal congénita, o hipogonadismo hipogonadotrópico.
9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el mamífero es un ser humano.
10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que el medicamento comprende VEGF o un ácido nucleico que codifica VEGF.
11. Uso de un antagonista de un polipéptido Bv8 que tiene al menos un 80 por ciento de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, en el que dicho polipéptido es capaz de inducir la proliferación de células endoteliales, aumentar la supervivencia de las células endoteliales, o inducir la angiogénesis, en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o dolencia asociada con una angiogénesis excesiva, no deseada, o incontrolada o la proliferación de células endoteliales en un mamífero en el que el antagonista es un anticuerpo dirigido contra Bv8, un fragmento de anticuerpo dirigido contra Bv8 que se une a antígeno, o una molécula antisentido dirigida contra un ácido nucleico que codifica Bv8.
12. Uso de un antagonista de un polipéptido Bv8 que tiene al menos un 80 por ciento de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, en el que dicho polipéptido es capaz de inducir la proliferación de células endoteliales, aumentar la supervivencia de las células endoteliales, o inducir la angiogénesis, en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer en un mamífero en el que el antagonista es un anticuerpo dirigido contra Bv8, un fragmento de anticuerpo dirigido contra Bv8 que se une a antígeno, o una molécula antisentido dirigida contra un ácido nucleico que codifica Bv8.
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el cáncer es un cáncer dependiente de hormona.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el cáncer es cáncer de un órgano reproductor.

15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el órgano reproductor es ovario, testículo, útero, o cuello del útero.
16. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que el medicamento comprende un antagonista de VEGF y el antagonista es un anticuerpo dirigido contra VEGF, un fragmento de anticuerpo dirigido contra VEGF que se une a antígeno, o una molécula antisentido dirigida contra el ácido nucleico que codifica VEGF.
17. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 16, en el que el polipéptido Bv8 es un polipéptido Bv8 de secuencia natural.
18. El procedimiento o uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el polipéptido Bv8 es un polipéptido Bv8 humano natural.
19. El procedimiento o uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el polipéptido Bv8 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 6.
20. El procedimiento de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 5 a 16, en el que el polipéptido Bv8 se une a heparina.
21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que el polipéptido Bv8 es un polipéptido quimérico o inmunoadhesina.
22. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en el que la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido Bv8 comprende los ácidos nucleicos 11 a 400 de la SEQ ID NO: 1, los ácidos nucleicos 10 a 336 de la SEQ ID NO: 3; o los ácidos nucleicos 57 a 484 de la SEQ ID NO: 5.
23. Un procedimiento para identificar un antagonista de Bv8, que comprende:
- poner en contacto una molécula candidata con un polipéptido Bv8 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 por ciento de identidad con la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4;
 - determinar la capacidad del polipéptido para promover la proliferación de células endoteliales, la supervivencia de las células endoteliales, o la angiogénesis; y
 - identificar una molécula candidata que inhiba la actividad de proliferación de células endoteliales, la actividad de supervivencia de células endoteliales, o la actividad de angiogénesis del polipéptido como un antagonista de Bv8.
24. Un antagonista de un polipéptido Bv8 que tiene al menos un 80 por ciento de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, en el que dicho polipéptido es capaz de inducir la proliferación de células endoteliales, aumentar la supervivencia de las células endoteliales o inducir la angiogénesis, para uso en la regulación de la fertilidad en un mamífero, en el que el antagonista es un anticuerpo dirigido contra Bv8, un fragmento de anticuerpo dirigido contra Bv8 que se une a antígeno, o una molécula antisentido dirigida contra el ácido nucleico que codifica Bv8.
25. Un polipéptido de Bv8 que tiene al menos un 80 por ciento de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4 o una molécula de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido para uso en el tratamiento de una dolencia asociada con un tejido productor de hormonas en un mamífero.
26. Un antagonista de un polipéptido Bv8 que tiene al menos un 80 por ciento de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, en el que dicho polipéptido es capaz de inducir la proliferación de células endoteliales, aumentar la supervivencia de las células endoteliales, o inducir la angiogénesis, para uso en el tratamiento de una enfermedad o dolencia asociada con una angiogénesis excesiva, no deseada o incontrolada o la proliferación de células endoteliales en un mamífero en el que el antagonista es un anticuerpo dirigido contra Bv8, un fragmento de anticuerpo dirigido contra Bv8 que se une a antígeno, o una molécula antisentido dirigida contra un ácido nucleico que codifica Bv8.
27. Un antagonista de un polipéptido de Bv8 que tiene al menos un 80 por ciento de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, en el que dicho polipéptido es capaz de inducir la proliferación de células endoteliales, aumentar la supervivencia de las células endoteliales, o inducir la angiogénesis, para uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero en el que el antagonista es un anticuerpo dirigido contra Bv8, un fragmento de anticuerpo dirigido contra Bv8 que se une a antígeno, o una molécula antisentido dirigida contra el ácido nucleico que codifica Bv8.

28. El antagonista para uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el cáncer es un cáncer dependiente de hormona.

29. El antagonista para el uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el cáncer es cáncer de un órgano reproductor.

5 30. El antagonista para uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 29, en el que el órgano reproductor es ovario, testículo, útero, o cuello del útero.

31. El antagonista para uso en el tratamiento de una enfermedad o dolencia asociada con una angiogénesis excesiva, no deseada o incontrolada o la proliferación de células endoteliales en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 26 o el antagonista para el uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 30, que es para el uso con un antagonista de VEGF, en el que el antagonista de VEGF es un anticuerpo dirigido contra VEGF, un fragmento de anticuerpo dirigido contra VEGF que se une a antígeno, o una molécula antisentido dirigida contra un ácido nucleico que codifica VEGF.

10 32. Una composición que comprende un antagonista de Bv8 en una premezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable, en la que la composición es para el uso que se define en cualquiera de las 15 reivindicaciones 24 y 26 a 31; y

en la que el antagonista de Bv8 es un antagonista de un polipéptido Bv8 que tiene al menos un 80 por ciento de identidad con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 4, en la que dicho polipéptido es capaz de inducir la proliferación de células endoteliales, aumentar la supervivencia de las células endoteliales o inducir la angiogénesis, en la que el antagonista es un anticuerpo dirigido contra Bv8, un fragmento de anticuerpo dirigido contra Bv8 que se une a antígeno, o una molécula antisentido dirigida contra un ácido nucleico que codifica Bv8.

20 33. El procedimiento o uso de cualquiera de las reivindicaciones 3-5 y 11-20 o el antagonista de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 y 26-31, o la composición de acuerdo con la reivindicación 32, en el que el anticuerpo antagonista de Bv8 o el fragmento de anticuerpo que se une a antígeno es biespecífico.

FIG. 1

TGAGGGCGCCATGAGGAGCCTGTGCTGCGCCCCACTCCTGCTCCTCTTGCTGCTGCCGCC
GCTGCTGCTCACGCCCCGCGCTGGGGACGCCGCGTGATCACCGGGGCTTGTGACAAGGA
CTCCCAATGTGGTGGAGGCATGTGCTGTGCTGTCAGTATCTGGGTCAAGAGCATAAGGAT
TTGCACACCTATGGGCAAAC TGGGAGACAGCTGCCATCCACTGACTCGTAAAAACAATTT
TGAAATGGAAGGCAGGAAAGAAGAAAGAGGAAGAGAAGCAAAGGAAAAAGGAGGTTCC
ATTTTTTGGGCGGAGGATGCATCACACTTGCCCATGTCTGCCAGGCTTGGCCTGTTTACG
GACTTCATTTAACCGATTTATTTGTTTAGCCAAAAGTAATCGCTCTGGAGTAGAAACCA
AATGTGA

FIG. 2

MRSLLCCAPLLLLLLLLLPLLLLTPRAGDAAVITGACDKDSQCGGGMCCAVSIWVKSIRICT
PMGKLGDSCHPLTRKNNFGNGRQERRKRKRKSKRKKEVPPFFGRRMHHTCPCLPGLACLRT
SFNRFICLAQK

Características importantes de la proteína:

Secuencia señal:

1-21

Dominio transmembrana:

Ninguno

Sitio de fosforilación de la proteína cinasa dependiente de AMPc y GMPc:

87-90

Sitio de N-miristoilación:

41-46

42-47

43-48

Sitio de amidación:

99-102

FIG. 3

GAGGGCGCCATGAGGAGCCTGTGCTGCGCCCCACTCCTGCTCCTCTTGCTGCTGCCGCCG
CTGCTGCTCACGCCCCGCGCTGGGGACGCCGCGTGATCACCGGGGCTTGTGACAAGGAC
TCCAATGTGGTGGAGGCATGTGCTGTGCTGTCAGTATCTGGGTCAAGAGCATAAGGATT
TGCACACCTATGGGCAAACCTGGGAGACAGCTGCCATCCACTGACTCGTAAAGTTCCATTT
TTTGGGCGGAGGATGCATCACACTTGCCCATGTCTGCCAGGCTTGGCCTGTTTACGGACT
TCATTTAACCGATTTATTTGTTTAGCCCCAAAAGTAATCGCTCTGGAGTAGAAACCAAATG
TGA

FIG. 4

MRS LCCAP LLLLLLLL PLLLLLTPRAGDAAVITGACDKDSQCGGGMCCAVSIWVKSIRICT
PMGKLGDSCHPLTRKVPFFGRRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLAQK

Características importantes de la proteína:

Secuencia señal:

1-21

Dominio transmembrana:

Ninguno

Sitio de N-miristoilación:

41-46

42-47

43-48

Sitio de amidación:

78-81

FIG. 5

CGGACGCGTGGGCGTCCCCTAACCGCCACCGCGTCCCCGGGACGCCATGGGGGACCCGCG
 CTGTGCCCCGCTACTGCTACTTCTGCTGCTACCGCTGCTGTTCACACCGCCCCGCGGGGA
 TGCCGCGGTCATCACCGGGGCTTGCGACAAGGACTCTCAGTGC GGAGGAGGCATGTGCTG
 TGCTGTCAGTATCTGGGTTAAGAGCATAAGGATCTGCACACCTATGGGCCAAGTGGGCGA
 CAGCTGCCACCCCTGACTCGGAAAGTCCATTTTGGGGCGGAGGATGCACCACACCTG
 CCCCTGCCTGCCAGGCTTGGCGTGTTAAGGACTTCTTTCAACCGGTTTATTTGCTTGGC
 CCGGAAATGATCACTCTGAAGTAGGAACTTGAAATGCGACCCTCCGCTGCACAATGTCCG
 TCGAGTCTCACTTGTAAATTGTGGCAAACAAAGAATACTCCAGAAAGAAATGTTCTCCCC
 TTCCTTGACTTTC AAGTAACGTTTCTATCTTTGATTTTTGAAGTGGCTTTTTTTTTTTTT
 TTTTTTTTCTTTTCTTGAAGGAAAGTTTTGATTTTTGGAGAGATTTATAGAGGACTTTC
 TGACATGGCTTCTCATTTCCCTGTTTATGTTTTGCCTTGACATTTTTGAATGCCAATAAC
 AACTGTTTTTCAAAATAGGAGAATAAGAGGGGAACAATCTGTTGCAGAACTTCCTTTTGC
 CCTTTGCCCCACTCGCCCCGCCCCGCCCCGCCCCGCCCTGCCCATGCGCAGACAGACACA
 CCCTTACTCTTCAAAGACTCTGATGATCCTCACCTTACTGTAGCATTGTGGGTTTCTACA
 CTCCCCGCTTGCTGGTGGACCCACTGAGGAGGCTCAGAGAGCTAGCACTGTACAGGTT
 TGAACCAGATCCCCAAGCAGCTCATTTGGGGCAGACGTTGGGAGCGCTCCAGGAACTTT
 CCTGCACCCATCTGGCCCACTGGCTTTCAGTCTGCTGTTTAACTGGTGGGAGGACAAAA
 TTAACGGGACCCTGAAGGAACCTGGCCCCTTATCTAGATTTGTTTAAAGTAAAAGACATT
 TTCTCCTTGTGTTGGAATATTACATGCTTTTTTCTTTTTTATCTGAAGCTTTTTTTTTTT
 TTCTTTAAGTCTTCTGTTGGAGACATTTTAAAGAACGCCACTCGAGGAAGCATTGATTT
 TCATYTGGCATGACAGGAGTCATCATTTTAAAAAATCGGTGTTAAGTTATAATTTAAACT
 TTATTTGTAACCCAAAGGTYTAATGTAAATGGATTCCTGATATCCTGCCATTTG TACTG
 GTATCAATATTTYTATGT

FIG. 6

MGDPRCAPLLLLLLLLLPLLFTPPAGDAAVITGACDKDSQCGGGMCCAVSIWVKSIRICTP
MGQVGDSCHPLTRKVPFWGRRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLARK

Características importantes de la proteína:

Secuencia señal:
1-20

Dominio transmembrana:
Ninguno

Sitio de N-miristoilación:
40-45
41-46
42-47

Sitio de amidación:
77-80

FIG. 7

M RSLCCAPLLLLLLLLPPLLLTPRAGDAAVITGACDKD S QCGGGM CCAVSI 50 ser humano

M GD PRCAPLLLLLLLLPPLLETPRAGDAAVITGACDKD S QCGGGM CCAVSI 50 ratón

W VKSIRICTPMGKLGDSCHPLTRKNNFGNGRQERRRKRKRKKEVPPFF-G

W VKSIRICTPMGQVGDSCHP LTRKSHVANGRQERRRAKRRKRKKEVPPFWG

RRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLAQK

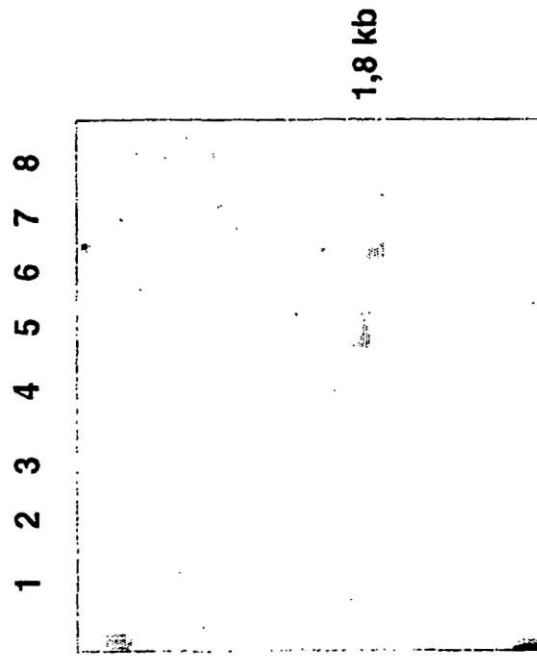
RRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLARK

FIG. 8

M R S L C C A P L L L L L L P P L L L T P R A G D A A V I T G A C D K D S Q C G G M C C A V S I 50 Bv8
AVITGACERDVQCGAGTCCAISL 50 EG-VEGF

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

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



- 1 páncreas
- 2 médula adrenal
- 3 tiroides
- 4 corteza adrenal
- 5 testículo
- 6 timo
- 7 intestino delgado
- 8 estómago

FIG. 9

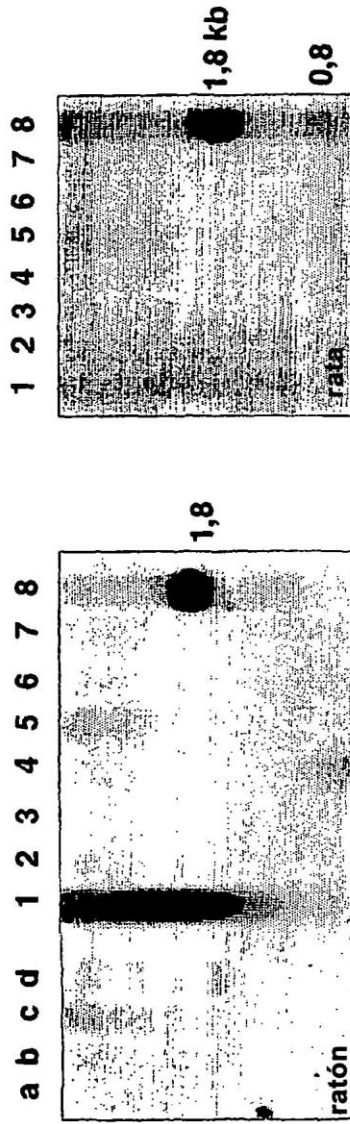


FIG. 10B

FIG. 10A

- | | | |
|------------|-----------|-----------------------|
| a - día 7 | 1 corazón | 5 hígado |
| b - día 11 | 2 cerebro | 6 músculo esquelético |
| c - día 15 | 3 bazo | 7 riñón |
| d - día 17 | 4 pulmón | 8 testículo |

Bioactividad de Bv8:
Células endoteliales de capilares adrenales y de capilares cerebrales

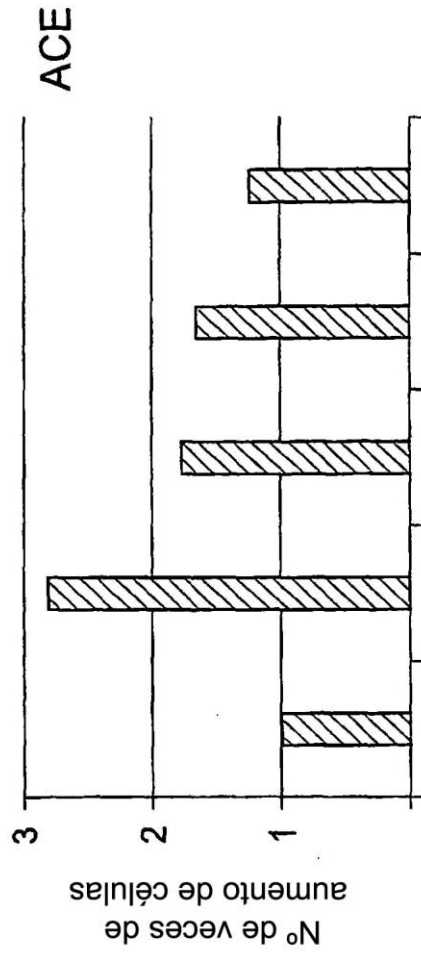


FIG. 11A

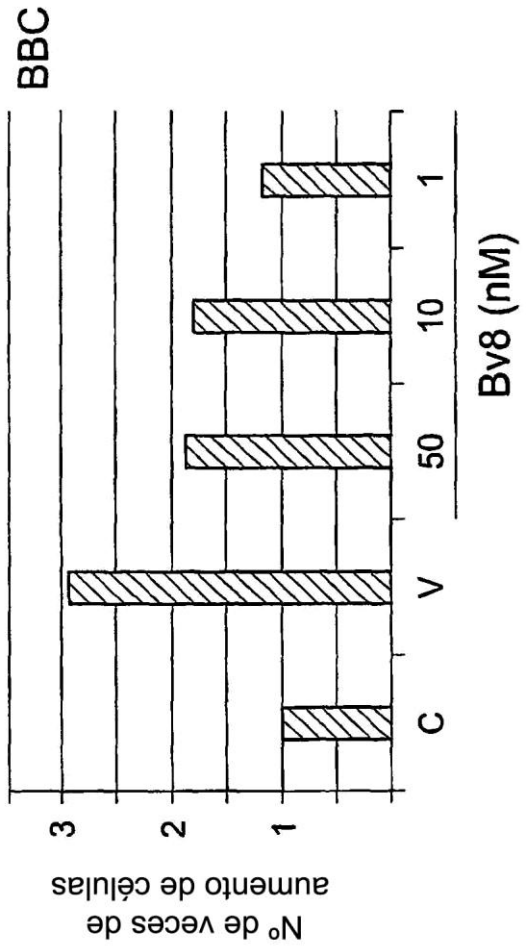


FIG. 11B

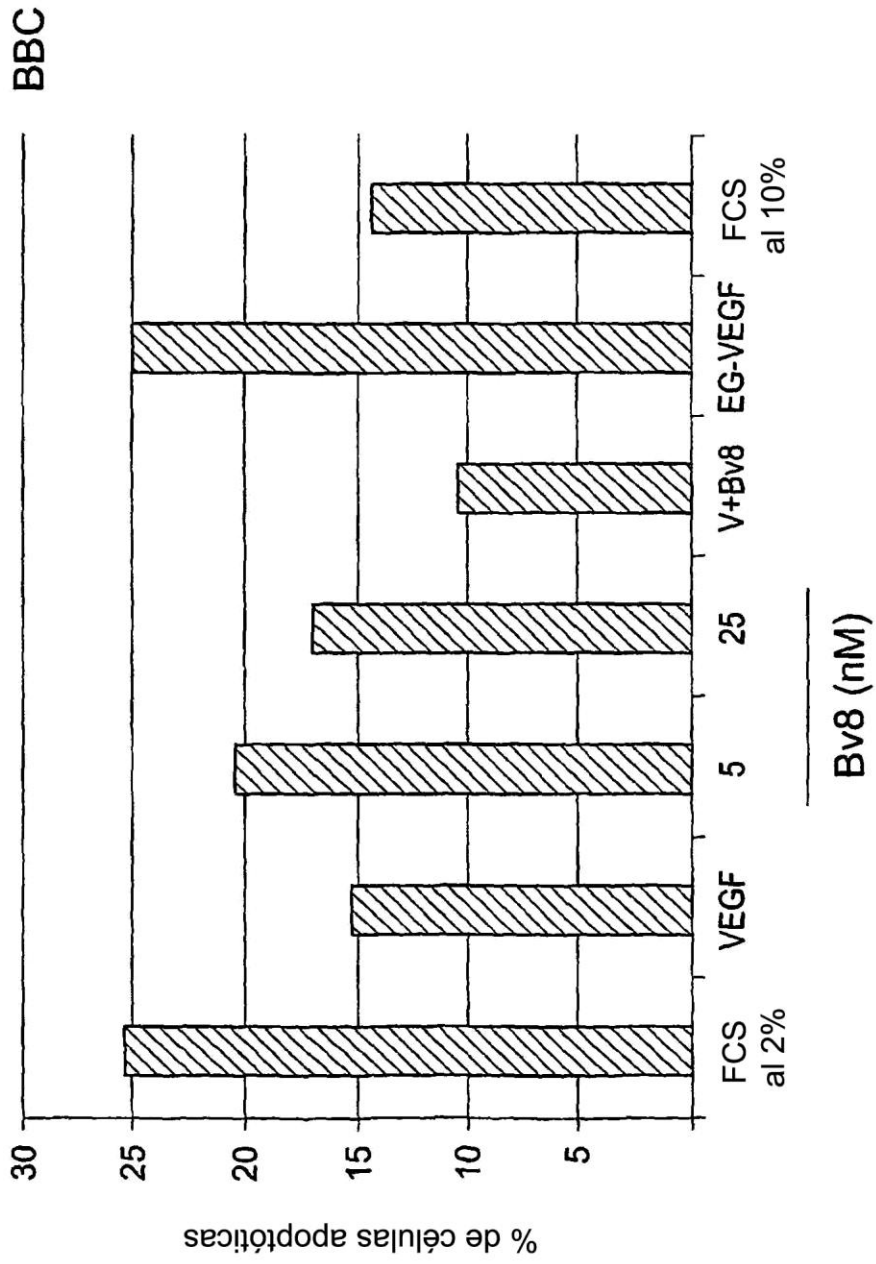


FIG. 12

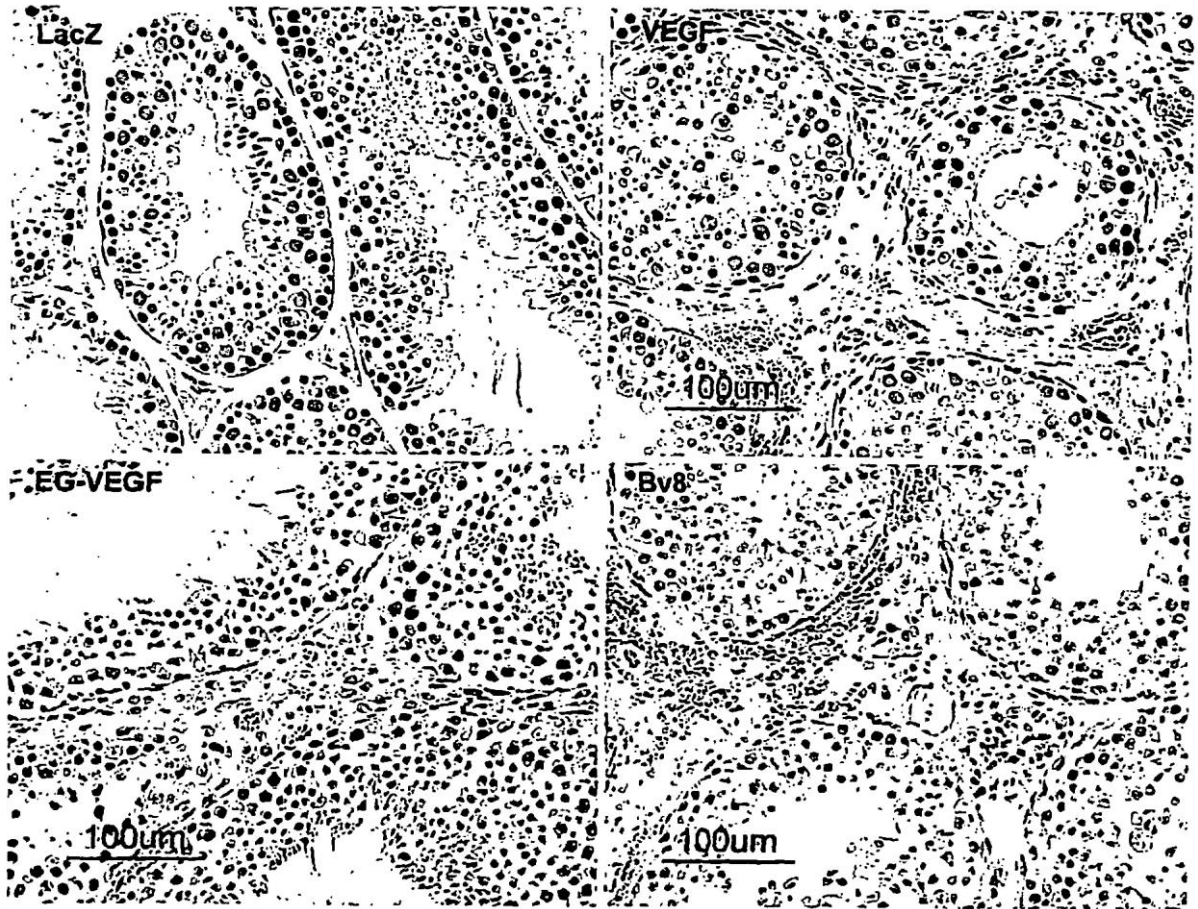


FIG. 13