

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 432 053**

(51) Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)  
**A61K 38/18** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.1999 E 08075507 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 1988102**

---

(54) Título: **Homólogo del factor del crecimiento ZVEGF3**

(30) Prioridad:

**07.12.1998 US 207120**  
**06.07.1999 US 142576 P**  
**21.10.1999 US 161653 P**  
**12.11.1999 US 165255 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.11.2013**

(73) Titular/es:

**ZYMOGENETICS, INC. (100.0%)**  
**1201 EASTLAKE AVENUE EAST**  
**SEATTLE, WASHINGTON 98102, US**

(72) Inventor/es:

**GAO, ZEREN;**  
**HART, CHARLES E.;**  
**PIDDINGTON, CHRISTOPHER S.;**  
**SHEPPARD, PAUL O.;**  
**SHOEMAKER, KIMBERLY E.;**  
**GILBERTSON, DEBRA G. y**  
**WEST, JAMES W.**

(74) Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 432 053 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

Homólogo del factor del crecimiento ZVEGF3

Antecedentes de la invención

- En animales pluricelulares, el crecimiento, la diferenciación y la migración celular están controlados por factores del crecimiento polipeptídicos. Estos factores del crecimiento desempeñan un papel tanto en el desarrollo normal como en la patogénesis, incluyendo el desarrollo de tumores sólidos.
- Los factores del crecimiento polipeptídicos influyen sobre los acontecimientos celulares uniéndose a receptores de superficie celular, muchos de los cuales son tirosina quinasas. La unión inicia una cadena de acontecimientos de señalización dentro de la célula, que en última instancia da como resultado cambios fenotípicos, tales como división celular, producción de proteasa y migración celular.
- Los factores del crecimiento se pueden clasificar en familias basándose en similitudes estructurales. Una de tales familias, la familia de PDGF (factor del crecimiento derivado de plaquetas), se caracteriza por una estructura dimérica estabilizada mediante enlaces de disulfuro. Esta familia incluye PDGF, los factores del crecimiento placentarios (PIGF) y los factores del crecimiento endoteliales vasculares (VEGF). Las cadenas polipeptídicas individuales de estas proteínas forman estructuras de orden más elevado características que tienen una configuración similar a corbata de lazo alrededor de un nudo de cistina, formado por enlaces de disulfuro entre pares de restos de cistina. Las interacciones hidrófobas entre bucles contribuyen a la dimerización de los dos monómeros. Véase Daopin y col., *Science* 257: 369, 1992; Lapthorn y col., *Nature* 369: 455, 1994. Los miembros de estas familias son activos tanto como dímeros como como heterodímeros. Véase, por ejemplo, Heldin y col., *EMBO J.* 7: 1387-1393, 1988; Cao y col., *J. Biol. Chem.* 271: 3154-3162, 1996. El motivo de nudo de cistina y el pliegue de corbata de lazo también son características de los factores del crecimiento factor del crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y factor del crecimiento nervioso (NGF), y las hormonas de glicoproteínas. Aunque sus secuencias de aminoácidos son bastante diferentes, todas estas proteínas contienen los seis restos de cisteína conservados del nudo de cistina.
- Se han identificado cuatro factores del crecimiento endotelial vascular: VEGF, también conocido como factor de permeabilidad vascular (Dvorak y col., *Am. J. Pathol.* 146: 1029-1039, 1995); VEGF-B (Olofsson y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 93: 2567-2581, 1996; Hayward y col., Publicación OMPI WO 96/27007); VEGF-C (Joukov y col., *EMBO J.* 15: 290-298, 1996); y VEGF-D (Oliviero, documento WO 97/12972; Achen y col., documento WO 98/07832). Cinco polipéptidos de VEGF (aminoácidos 121, 145, 165, 189 y 206) surgen a partir del corte y empalme alternativo de ARNm de VEGF.
- Los VEGF estimulan el desarrollo de vasculatura a través de un proceso conocido como angiogénesis, en el que las células endoteliales vasculares reentran en el ciclo celular, degradan la membrana basal subyacente y migran para formar nuevos brotes capilares. Estas células después se diferencian y se forman vasos maduros. Este proceso de crecimiento y diferenciación está regulado por un equilibrio de factores proangiogénicos y antiangiogénicos. La angiogénesis es primordial para la formación normal y reparación de tejido, que ocurre en el desarrollo de embrión y curación de heridas. La angiogénesis también es un factor en el desarrollo de determinadas enfermedades, incluyendo tumores sólidos, artritis reumatoide, retinopatía diabética, degeneración macular y aterosclerosis.
- Se han identificado varias proteínas de vertebrados e invertebrados que influyen sobre el desarrollo neuronal. Entre estas moléculas se encuentran miembros de la familia de neuropilina y la familia de semaforina/collapsina. Las extensiones de células neuronales, conocidas como procesos, crecen lejos del cuerpo de la célula para formar conexiones sinápticas. Los procesos largos y delgados que transportan información lejos del cuerpo celular se denominan axones y los procesos cortos y más gruesos que llevan información a y desde el cuerpo celular se denominan dendritas. Los axones y las dendritas se denominan de forma conjunta neuritas. Las neuritas se extienden por medio de conos de crecimiento, las puntas de crecimiento de las neuritas, que son altamente móviles y que son responsables en última instancia del aumento y ampliación de la red neuronal en el organismo.
- Se han identificado tres receptores para VEGF: KDR/Fk-1 (Matthews y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 88: 9026-9030, 1991), Flt-1 (de Vries y col., *Science* 255: 989-991, 1992) y neuropilina-1 (Soker y col., *Cell* 92: 735-745, 1998). La neuropilina-1 es una glicoproteína de superficie celular que se identificó inicialmente en tejidos nerviosos de renacuajo *Xenopus*, posteriormente en pollo, ratón y ser humano. La estructura principal de neuropilina-1 está altamente conservada entre estas especies de vertebrados. La neuropilina-1 ha demostrado ser un receptor de diversos miembros de la familia de semaforina incluyendo semaforina III (Kolodkin y col., *Cell* 90: 753-762, 1997), Sema E y Sema IV (Chen y col., *Neuron* 19: 547-559, 1997). Diversas actividades se han asociado con la unión de neuropilina-1 a sus ligandos. Por ejemplo, la unión de semaforina III a neuropilina-1 puede inducir colapso del cono de crecimiento neuronal y la repulsión de neuritas *in vitro* (Kitsukawa y col., *Neuron* 19: 995-1005, 1997).
- En ratones, la neuropilina-1 se expresa en el sistema cardiovascular, sistema nervioso y extremidades en fases del desarrollo particulares. Se observó que los ratones químéricos que sobreexpresan neuropilina-1 eran letales para los embriones (Kitsukawa y col., *Development* 121: 4309-4318, 1995). Los embriones químéricos mostraron varias

anormalidades morfológicas, incluyendo exceso de capilares y vasos sanguíneos, dilatación de vasos sanguíneos, corazones con malformaciones, brotación ectópica y defasciculación de fibras nerviosas y dedos adicionales. Todas estas anormalidades se produjeron en los órganos en los cuales se expresa la neuropilina-1 en el desarrollo normal. Los ratones que carecen del gen de neuropilina-1 tienen anormalidades cardiovasculares graves, incluyendo 5 deficiencia de formación de red vascular en los sistemas nerviosos central y periférico (Takashima y col., American Heart Association 1998 Meeting, Resumen N° 3178).

La neuropilina-1 se ha identificado como un receptor de superficie celular de VEGF (Soker y col., *ibid.*) y presenta actividad de unión selectiva por VEGF<sub>185</sub> sobre VEGF<sub>121</sub>. Se ha demostrado que se expresa en células endoteliales vasculares y células tumorales *in vitro*. Cuando la neuropilina-1 se coexpresa en células con KDR, la neuropilina-1 10 potencia la unión de VEGF<sub>165</sub> a KDR y quimiotaxis mediada por VEGF<sub>165</sub>. Por el contrario, la inhibición de unión de VEGF<sub>165</sub> a neuropilina-1 inhibe su unión a KDR y su actividad mitógena por células endoteliales (Soker, y col., *ibid.*). La neuropilina-1 también es un receptor de PIGF-2 (Migdal y col., J. Biol. Chem. 273: 22272-22278, 1998). Un 15 segundo receptor de Semaforina, la neuropilina-2, muestra homología con neuropilina-1 pero difiere en la especificidad de unión (Chen y col. Neuron 19: 547-559, 1997).

Las semaforinas son una familia grande de moléculas que comparten el dominio de semaforina de definición de 15 aproximadamente 500 aminoácidos. Esta familia se puede subdividir en múltiples subfamilias que contienen proteínas tanto secretadas como unidas a membrana. Los miembros selectos de estas subfamilias, clase III (SemD) y clase IV (SemD), forman homodímeros enlazados mediante puentes de disulfuro. En el caso de SemD, existe un procesamiento proteolítico adicional que crea una isoforma de 65-kDa que carece de la secuencia carboxilo terminal 20 de 33-kDa. La dimerización se cree que es importante para la actividad funcional (Klostermann y col., J. Biol. Chem. 273: 7326-7331, 1998). La colapsina-1, el primer miembro identificado en vertebrados de la familia de semaforina de 25 proteínas para la guía del axón, también ha demostrado formar dímeros covalentes, siendo la dimerización necesaria para la actividad de colapso (Koppel y col., J. Biol. Chem. 273: 15708-15713, 1998).

La semaforina III se ha asociado *in vitro* con la regulación del colapso de clon de crecimiento y quimiorrepulsión de 25 neuritas. *In vivo* también se ha demostrado que es necesaria para la inervación aferente sensorial correcta y otros aspectos del desarrollo, incluyendo defectos esqueléticos y cardíacos (Fehar y col., Nature 383: 525-528, 1996). Otros miembros de la familia de semaforina han demostrado estar asociados con otras formas de biología. El gen de 30 semaforina E humano se expresa en células sinoviales reumatoídes y se cree que desempeña un papel inmunsupresor a través de la inhibición de citoquinas (Mangasser-Stephan y col., Biochem. Biophys. Res. Comm. 234: 153-156, 1997). CD100, una semaforina de leucocitos, promueve la agregación y diferenciación de células B (Hall y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 93: 11780-11785, 1996). CD100 también ha demostrado expresarse en muchos linfomas de células T y puede ser un marcador de neoplasias de células T malignas (Dorfman y col., Am. J. Pathol. 153: 255-262, 1998). Los homólogos de semaforina también se han identificado en 35 virus de ADN (Lang, Genomics 51: 340-350, 1998) y en poxvirus (Comeau, y col. Immunity 8: 473-482, 1998). La transcripción del gen de semaforina de ratón, M-semaH, está relacionada con la capacidad metastásica de las líneas de células tumorales de ratón (Christensen y col., Cancer Res. 58: 1238-1244, 1998).

El papel de los factores del crecimiento, otras moléculas reguladoras y sus receptores en el control de los procesos celulares los hace candidatos y dianas probables de intervención terapéutica. Por ejemplo, el factor del crecimiento derivado de plaquetas, se ha divulgado para el tratamiento de enfermedad periodontal (Patente de Estados Unidos 40 N° 5.124.316), úlceras gastrointestinales (Patente de Estados Unidos N° 5.234.908) y úlceras dérmicas (Robson y col., Lancet 339: 23-25, 1992; Steed y col., J. Vasc. Surgr. 21: 71-81, 1995). La inhibición de actividad de receptor de PDGF ha demostrado reducir la hiperplasia de la íntima en arterias de babuino lesionadas (Giese y col., Restenosis Summit VIII, Poster Session N° 23, 1996; Patente de Estados Unidos N° 5.620.687). Los factores del crecimiento endotelial vascular (VEGF) han demostrado promover el crecimiento de vasos sanguíneos en extremidades 45 isquémicas (Isner y col., The Lancet 348: 370-374, 1996) y se han propuesto para su uso como agentes de curación de heridas, para tratamiento de enfermedad periodontal, para promover la endotelización en cirugía de injerto vascular y para promover la circulación colateral a continuación de infarto de miocardio (Publicación OMPI N° WO 95/24473; Patente de Estados Unidos N° 5.219.739). Los VEGF también son útiles para promover el crecimiento de 50 células endoteliales vasculares en cultivo. Un receptor de VEGF soluble (flt-1 soluble) se ha observado que bloquea la unión de VEGF a receptores de superficie celular y que inhibe el crecimiento de tejido vascular *in vitro* (Biotechnology News 16(17): 5-6, 1996).

En vista de la utilidad clínica demostrada de las hormonas, existen necesidades en la técnica de moléculas adicionales de este tipo para su uso como agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico y herramientas y reactivos de investigación. Estas y otras necesidades se abordan mediante la presente invención.

## 55 Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un antagonista de zvegf3 para su uso en la 60 reducción de fibrosis en un sujeto, en el que el antagonista de zvegf3 es un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo de un polipéptido como se muestra en los restos 235-345 o 226-345 de SEC ID N°: 2. La fibrosis puede ser fibrosis hepática. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de cadena sencilla.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un antagonista de zvegf3 para su uso en la supresión de la activación de células estrelladas en un sujeto, en el que el antagonista de zvegf3 es un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo de un polipéptido como se muestra en los restos 235-345 o 226-345 de SEC ID Nº: 2. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de cadena sencilla.

#### **Descripción relacionada**

En la presente memoria se describe un polipéptido aislado de al menos 15 restos de aminoácidos que comprende una parte que porta un epítopo de una proteína de SEC ID Nº: 2. También se describe en la presente memoria un polipéptido que comprende un segmento que tiene una identidad de al menos el 90 % con los restos 46-163 de SEC ID Nº: 2 o los restos 235-345 de SEC ID Nº: 2. Adicionalmente, se describe en la presente memoria un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en restos 15-162 de SEC ID Nº: 2, restos 46-163 de SEC ID Nº: 2, restos 15-170 de SEC ID Nº: 2, restos 46-170 de SEC ID Nº: 2, restos 15-234 de SEC ID Nº: 2, restos 46-234 de SEC ID Nº: 2, restos amida 15-229 de SEC ID Nº: 2, restos 15-230 de SEC ID Nº: 2, restos 15-345 de SEC ID Nº: 2, restos 46-345 de SEC ID Nº: 2, restos 235-345 de SEC ID Nº: 2 y restos 226-345 de SEC ID Nº: 2.

En la presente memoria se describe un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de la fórmula R<sub>1x</sub>-R<sub>2y</sub>-R<sub>3z</sub>, en la que R<sub>1</sub> comprende un polipéptido de desde 100 hasta 120 restos de longitud y que es al menos el 90 % idéntico a los restos 46-163 de SEC ID Nº: 2 y comprende un motivo de secuencia C[KR]Y[DNE][WYF]X{11,15}G[KR][WYF]C (SEC ID Nº: 4) que corresponde a los restos 104-124 de SEC ID Nº: 2; R<sub>2</sub> es un polipéptido al menos el 90 % idéntico a los restos 164-234 de SEC ID Nº: 2; R<sub>3</sub> es un polipéptido al menos el 90 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a los restos 235-345 de SEC ID Nº: 2 y comprende restos de cisteína en posiciones correspondientes a los restos 250, 280, 284, 296, 335 y 337 de SEC ID Nº: 2, un resto de glicina en una posición correspondiente al resto 282 de SEC ID Nº: 2 y un motivo de secuencia CX{18,33}CXGXCX{6,33}CX{20,40}CXC (SEC ID Nº: 3) que corresponde a los restos 250-337 de SEC ID Nº: 2; y cada uno de x, y y z es individualmente 0 o 1, sujeto a las limitaciones de que al menos uno de x y z es 1 y, si x y z son cada uno 1, entonces y es 1. Por tanto, se describen polipéptidos aislados de la fórmula anterior en los que (a) x= 1, (b) z= 1 y (c) x= 1 y z= 1. También se describen en la presente memoria polipéptidos en los que x= 1 y R<sub>1</sub> es al menos el 90 % idéntico a los restos 18-163 de SEC ID Nº: 2; x= 1 y R<sub>1</sub> comprende restos 46-163 de SEC ID Nº: 2; z= 1 y R<sub>3</sub> comprende restos 235-345 de SEC ID Nº: 2; x= 1, z= 1 y el polipéptido comprende los restos 46-229 de SEC ID Nº: 2, restos 164-345 de SEC ID Nº: 2 o restos 46-345 de SEC ID Nº: 2. El polipéptido aislado puede comprender además restos de cisteína en las posiciones correspondientes a los restos 286, 287, 291 y 294 de SEC ID Nº: 2. En la presente memoria se describen polipéptidos aislados que comprenden además una etiqueta de afinidad. También se describen en la presente memoria polipéptidos aislados que comprenden un dominio constante de inmunoglobulina.

En la presente memoria se describe una proteína aislada que comprende un primer polipéptido unido operativamente a un segundo polipéptido, en el que el primer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de la fórmula R<sub>1x</sub>-R<sub>2y</sub>-R<sub>3z</sub> como se ha divulgado anteriormente. La proteína modula la proliferación, diferenciación, metabolismo o migración celular. La proteína puede ser un heterodímero. El segundo polipéptido se puede seleccionar entre el grupo que consiste en VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, zvegf4, PIGF, PDGF-A y PDGF-B. La proteína puede ser un homodímero.

También se describe en la presente memoria una proteína aislada producida mediante un procedimiento que comprende las etapas de (a) cultivar una célula huésped que contiene un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos operativamente: un promotor de transcripción; un segmento de ADN que codifica un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en (i) restos 46-345 de SEC ID Nº: 2, (ii) restos 46-234 de SEC ID Nº: 2, (iii) restos 164-345 de SEC ID Nº: 2 y (iv) restos 235-345 de SEC ID Nº: 2; y un terminador de la transcripción, en condiciones en las cuales se expresa el segmento de ADN; y (b) recuperar a partir de la célula el producto de expresión de proteína de la construcción de ADN.

Se describe en la presente memoria un polinucleótido aislado de hasta aproximadamente 4 kb de longitud, en el que dicho polinucleótido codifica un polipéptido como se ha divulgado anteriormente. Opcionalmente, el polinucleótido es ADN.

También se describe en la presente memoria un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos operativamente: (a) un promotor de la transcripción; (b) un polinucleótido de ADN como se ha divulgado anteriormente; y (c) un terminador de la transcripción. El vector puede comprender adicionalmente una secuencia señal secretora unida operativamente al polinucleótido de ADN.

También se describe en la presente memoria una célula cultivada en la cual se ha introducido un vector de expresión como se ha divulgado anteriormente, en el que la célula expresa el polipéptido codificado por el segmento de ADN. La célula cultivada se puede usar dentro de un procedimiento para producir un polipéptido, comprendiendo el procedimiento cultivar la célula y recuperar el polipéptido expresado.

Las proteínas descritas en la presente memoria se pueden combinar con un vehículo farmacéuticamente aceptable

para proporcionar una composición farmacéutica.

La invención también proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo de un polipéptido como se ha divulgado anteriormente. Los anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, anticuerpos monoclonales y anticuerpos de cadena sencilla y pueden estar enlazados a una molécula informadora.

- 5 También se describe en la presente memoria un procedimiento para detectar una anormalidad genética en un paciente, que comprende las etapas de (a) obtener una muestra genética a partir de un paciente, (b) incubar la muestra genética con un polinucleótido que comprende al menos 14 nucleótidos contiguos de SEC ID N°: 1 o el complemento de SEC ID N°: 1, en condiciones en las que dicho polinucleótido se hibridará con una secuencia de polinucleótidos complementaria, para producir un primer producto de reacción y (c) comparar el primer producto de reacción con un producto de reacción de control, donde una diferencia entre el primer producto de reacción y el producto de reacción de control es indicativa de una anormalidad genética en el paciente.

También se describe en la presente memoria un procedimiento para estimular el crecimiento de fibroblastos o células de músculo liso que comprende aplicar a las células una cantidad eficaz de una proteína como se ha divulgado anteriormente.

- 10 15 En la presente memoria se describen procedimientos para modular el crecimiento celular u otros procesos celulares. También se describe en la presente memoria un procedimiento de estimulación del crecimiento de fibroblastos o células de músculo liso que comprende aplicar a las células una cantidad eficaz de una proteína como se ha divulgado anteriormente. Adicionalmente se describe en la presente memoria un procedimiento de activación de un receptor de PDGF alfa se superficie celular, que comprende exponer a una célula que comprende un receptor de PDGF alfa de superficie celular a un polipéptido o proteína como se ha divulgado anteriormente, mediante lo cual el polipéptido o proteína se une a y activa al receptor. Adicionalmente, también se describe en la presente memoria un procedimiento de inhibición de un proceso celular mediado por el receptor de PDGF alfa, que comprende exponer una célula que comprende un receptor de PDGF alfa de superficie celular a un compuesto que inhibe la unión de un polipéptido o proteína como se ha divulgado anteriormente al receptor.

- 20 25 En la presente memoria se describe un procedimiento de inhibición de la actividad de zvegf3 en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de un antagonista de zvegf3. Opcionalmente, el antagonista es un anticuerpo, un receptor, un fragmento de receptor de unión a ligando o una proteína de fusión IgG-Fc receptora.

- 30 35 40 En la presente memoria se describe un polinucleótido antisentido aislado que es el complemento de un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la fórmula R<sub>1x</sub>R<sub>2y</sub>R<sub>3z</sub> en la que R1 comprende un polipéptido de desde 100 hasta 120 restos de longitud y que es el 90 % idéntico a los restos 46-163 de SEC ID N°: 2 y comprende un motivo de secuencia C[KR]Y[DNE][WYF]X{11,15}G[KR][WYF]C (SEC ID N°: 4) que corresponde a los restos 104-124 de SEC ID N°: 2; R2 es un polipéptido al menos el 90 % idéntico a los restos 164-234 de SEC ID N°: 2; R3 es un polipéptido al menos el 90 % idéntico en secuencia de aminoácidos a los restos 235-345 de SEC ID N°: 2 y comprende restos de cisteína en las posiciones correspondientes a los restos 250, 280, 284, 296, 335 y 337 de SEC ID N°: 2, un resto de glicina en la posición correspondiente al resto 282 de SEC ID N°: 2 y un motivo de secuencia CX{18,33}CXGXCX{6,33}CX{20,40}CXC (SEC ID N°: 3) que corresponde a los restos 250-337 de SEC ID N°: 2; y cada uno de x, y y z es individualmente 0 o 1, sujeto a las limitaciones de que al menos uno de x y z es 1, y, si x y z son 1, entonces y es 1. Opcionalmente, el polinucleótido antisentido comprende además secuencias promotoras y terminadoras de la transcripción unidas operativamente. El polinucleótido antisentido se puede usar dentro de un procedimiento de inhibición de la producción de zvegf3 en una célula que comprende administrar a la célula el polinucleótido antisentido.

En los dibujos:

- 45 La Figura 1 es un perfil de hidrofilicidad de Hopp/Woods de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 2. El perfil se basa en una ventana de seis restos deslizante. Se ignoraron los restos G, S y T internados y H, Y y W expuestos. Estos restos se indican en la figura mediante letras minúsculas.  
 La Figura 2 es una ilustración del vector pHB12-8 para su uso en ADNc que se expresan en animales transgénicos.  
 La Figura 3 es una ilustración del vector pZMP6/zvegf3.  
 50 La Figura 4 es una ilustración del vector pZMP11/zv3GF-otPA.  
 La Figura 5 muestra los resultados de un ensayo de unión a receptor para zvegf3.  
 La Figura 6 es un alineamiento de secuencias de aminoácidos humanas (SEC ID N°: 2) y de ratón (SEC ID N°: 43).

#### Descripción detallada

- 55 El término “etiqueta de afinidad” se usa en la presente memoria para indicar un segmento polipeptídico que se puede unir a un segundo polipéptido para proporcionar purificación o detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios para unión del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, cualquier péptido o proteína para los cuales un anticuerpo u otro agente de unión específico está disponible se puede usar como una etiqueta de

afinidad. Las etiquetas de afinidad incluyen un trato de poli-histidina, proteína A (Nilsson y col., EMBO J. 4: 1075, 1985; Nilsson y col., Methods Enzymol. 198: 3, 1991), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, Gene 67: 31, 1988), proteína de unión a maltosa (Kellerman y Ferenci, Methods Enzymol. 90: 459-463, 1982; Guan y col., Gene 67: 21-30, 1987), etiqueta de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 82: 7952-4, 1985; véase SEC ID N°: 5), sustancia P, péptido Flag™ (Hopp y col., Biotechnology 6: 1204-10, 1988), péptido de unión a estreptavidina, tiorredoxina, ubiquitina, proteína de unión a celulosa, polimerasa T7 u otro epítopo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford y col., Protein Expression and Purification 2: 95-107, 1991. Los ADN que codifican etiquetas de afinidad y otros reactivos están disponibles a partir de proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; New England Biolabs, Beverly, MA; y Eastman Kodak, New Haven, CT).

El término "variante alélica" se usa en la presente memoria para indicar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de forma natural a través de la mutación y puede dar como resultado polimorfismo fenotípico dentro de poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silentes (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. El término variante alélica también se usa en la presente memoria para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

Los términos "amino-terminal" y "carboxilo-terminal" se usan en la presente memoria para indicar posiciones dentro de polipéptidos. Cuando el contexto lo permite, estos términos se usan con referencia a una secuencia particular o parte de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una determinada secuencia posicionada carboxilo-terminal a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido está localizada proximal al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

Una "región similar a cadena beta" es una región de una proteína caracterizada por determinadas combinaciones de los ángulos dihédricos phi ( $\phi$ ) y psi ( $\psi$ ) de la estructura principal de polipéptido. Las regiones en las que  $\phi$  es menor que -60° y  $\psi$  es mayor que 90° son similares a cadena beta. Los expertos en la técnica reconocerán que los límites de una cadena  $\beta$  son algo imprecisos y que pueden variar con los criterios usados para definirlas. Véase, por ejemplo, Richardson y Richardson en Fasman, ed., Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation, Plenum Press, Nueva York, 1989; y Lesk, Protein Architecture: A Practical Approach, Oxford University Press, Nueva York, 1991.

Un "complemento" de una molécula polinucleotídica es una molécula polinucleotídica que tiene una secuencia de base complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria a 5' CCCGTGCAT 3'.

"Correspondiente a", cuando se usa en referencia a una secuencia de nucleótidos o aminoácidos, indica la posición en una segunda secuencia que se alinea con la posición de referencia cuando dos secuencias están alineadas de forma óptima.

La expresión "secuencia de nucleótidos degenerada" indica una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados (en comparación con una molécula polinucleotídica de referencia que codifica un polipéptido). Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos, pero codifican el mismo resto de aminoácido (es decir, los tripletes GAU y GAC codifican cada uno Asp).

El término "vector de expresión" se usa para indicar una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés unido operativamente a segmentos adicionales que permiten su transcripción. Tales segmentos adicionales incluyen secuencias promotoras y terminadoras y también pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación, etc. Los vectores de expresión generalmente se obtienen a partir de ADN de plásmido o viral o pueden contener elementos de ambos.

El término "aislado", cuando se aplica a un polinucleótido, indica que el polinucleótido se ha retirado de su medio genético natural y que por lo tanto está libre de otras secuencias codificantes extrañas o indeseadas y está en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteína modificada por ingeniería genética. Tales moléculas aisladas son aquellas que están separadas de su entorno natural e incluyen ADNc y clones genómicos. Las moléculas de ADN aislado como se describen en la presente memoria están libres de otros genes con los cuales ellas están asociadas de forma normal, pero pueden incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural tales como promotores y terminadores. La identificación de regiones asociadas será evidente para un experto en la técnica (véase por ejemplo Dynan y Tijan, Nature 316: 774-78, 1985).

Un polipéptido o proteína "aislado" es un polipéptido o proteína que se encuentra en una condición diferente a su entorno nativo, tal como fuera de la sangre y de tejido animal. Dentro de una forma, el polipéptido o proteína aislado está sustancialmente libres de otros polipéptidos o proteínas, particularmente otros polipéptidos o proteínas de origen animal. Los polipéptidos o proteínas se pueden proporcionar en una forma altamente purificada, es decir, más del 95 % puras o más del 99 % puras. Cuando se usa en este contexto, el término "aislado" no excluye la presencia

del mismo polipéptido o proteína en formas físicas alternativas, tales como dímeros o formas glicosiladas o derivatizadas de forma alternativa.

Un “motivo” es una serie de posiciones de aminoácido en una secuencia de proteína para el cual son necesarios determinados restos de aminoácidos. Un motivo define el conjunto de restos posibles en cada posición de este tipo.

- 5 “Unido operativamente” significa que dos o más entidades están unidas de forma que las mismas funcionan de forma concertada para sus fines pretendidos. Cuando se hace referencia a segmentos de ADN, la frase indica, por ejemplo, que las secuencias codificantes están unidas en la fase de lectura correcta y la transcripción se inicia en el promotor y avanza a través del segmento o segmentos codificantes hacia el terminador. Cuando se hace referencia a polipéptidos, “unido operativamente” incluye secuencias enlazadas tanto covalentemente (por ejemplo, mediante enlaces de disulfuro) como no covalentemente (por ejemplo, mediante enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofobas o interacciones de sal-puente), donde se conservan la función o funciones deseadas de las secuencias.

10 El término “ortólogo” indica un polipéptido o proteína obtenido a partir de una especie que es el homólogo funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencia entre ortólogos son el resultado de la especiación.

- 15 Un “proceso celular mediado por receptor de PDGF alfa” es un proceso celular que ocurre como respuesta a la activación de un receptor de PDGF alfa. Tales procesos incluyen, sin limitación, división celular, quimiotaxis, diferenciación celular y producción o liberación de macromoléculas.

20 Un “polinucleótido” es un polímero de cadena sencilla o doble de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas leído desde el extremo 5’ al 3’. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN y se pueden aislar a partir de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro* o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. Los 25 tamaños de los polinucleótidos se expresan como pares de bases (abreviado “pb”), nucleótidos (“nt”) o kilobases (“kb”). Cuando el contexto lo permite, los últimos dos términos pueden describir polinucleótidos que son de cadena sencilla o de cadena doble. Cuando el término se aplica a moléculas de cadena doble el mismo se usa para indicar longitud global y se entenderá que es equivalente al término “pares de bases”. Reconocerán los expertos en la técnica que las dos cadenas de un polinucleótido de doble cadena pueden diferir ligeramente en longitud y que los extremos de la misma pueden estar escalonados como resultado de escisión enzimática; por tanto puede que todos los nucleótidos dentro de una molécula polinucleotídica de cadena doble no estén emparejados. Tales extremos no emparejados no excederán en general de 20 nt de longitud.

- 30 Un “polipéptido” es un polímero de restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, bien producido de forma natural o de forma sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 restos de aminoácidos se denominan comúnmente “péptidos”.

35 El término “promotor” se usa en la presente memoria por su significado reconocido en la técnica que indica una parte de un gen que contiene secuencias de ADN que permite la unión de ARN polimerasa y el inicio de la transcripción. Las secuencias promotoras se encuentran comúnmente, pero no siempre, en las regiones no codificantes 5’ de los genes.

- 40 Una “proteína” es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos de carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos se pueden añadir a una proteína por la célula en la cual se produce la proteína y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen en la presente memoria en términos de sus estructuras principales de aminoácidos; los sustituyentes tales como grupos de carbohidratos generalmente no se especifican, pero pueden sin embargo estar presentes.

45 Una “secuencia señal secretora” es una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un “péptido secretor”) que, como un componente de un polipéptido más grande, dirige al polipéptido más grande a través de una ruta secretora de una célula en la cual se sintetiza. El polipéptido más grande se escinde comúnmente para eliminar el péptido secretor durante el tránsito a través de la ruta secretora.

- 50 Un “segmento” es una parte de una molécula más grande (por ejemplo, polinucleótido o polipéptido) que tiene atributos específicos. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica un polipéptido especificado es una parte de una molécula de ADN más larga, tal como un plásmido o fragmento de plásmido, que, cuando se lee desde la dirección 5’ a 3’, codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido especificado.

55 Se comprenderá que los pesos moleculares y longitudes de polímeros determinados mediante procedimientos analíticos imprecisos (por ejemplo, electroforesis en gel) son valores aproximados. Cuando un valor de este tipo se expresa como “alrededor de” X o “aproximadamente” X, se comprenderá que el valor indicado de X tiene una precisión del ±20 %.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de una molécula de ADN novedosa que codifica un polipéptido que comprende un dominio del factor del crecimiento y un dominio CUB. El dominio del factor del crecimiento se caracteriza por una disposición de los restos de cisteína y cadenas beta que es característica de la

estructura del "nudo de cistina" de la familia PDGF. El dominio CUB muestra homología de secuencia con dominios CUB en las neuropilinas (Takagi y col., Neuron 7: 295-307, 1991; Soker y col., *ibid.*), proteína-1 morfogenética ósea humana (Wozney y col., Science 242: 1528-1534, 1988), proteína plasmática seminal porcina y proteína acídica del líquido seminal bovino (Romero y col., Nat. Struct. Biol. 4: 783-788, 1997) y proteína similar a tolloide de *X. laevis* (Lin y col., Dev. Growth Differ. 39: 43-51, 1997). El análisis de la distribución de tejido del ARNm que corresponde a este ADN novedoso mostró que la expresión estaba extendida en tejidos humanos adultos y que la expresión se producía hasta el día 15 en embriones de ratón. El polipéptido se ha denominado "zvegf3" en vista de su homología con los VEGF en el dominio del factor del crecimiento.

Las predicciones estructurales basadas en la secuencia de zvegf3 y su homología con otros factores del crecimiento sugieren que el polipéptido puede formar homomultímeros o heteromultímeros que actúan sobre tejidos para controlar el desarrollo de órganos modulando la proliferación, migración, diferenciación o metabolismo celular. Los heteromultímeros de zvegf3 pueden comprender un polipéptido de otro miembro de la familia de proteínas PDGF/VEGF, incluyendo VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, zvegf4 (SEC ID Nº: 36 y 37), PIGF (Maglione y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 88: 9267-9271, 1991), PDGF-A (Murray y col., Patente de Estados Unidos Nº 4.899.919; Hedin y col., Patente de Estados Unidos Nº 5.219.759) o PDGF-B (Chiu y col., Cell 37: 123-129, 1984; Johnsson y col., EMBO J. 3: 921-928, 1984). Los miembros de esta familia de polipéptidos regulan el desarrollo y regeneración de órganos, crecimiento de órganos posterior al desarrollo y mantenimiento de órganos, así como también procedimientos de mantenimiento y reparación. Estos factores también están implicados en procesos patológicos en los que los tratamientos terapéuticos son necesarios, incluyendo cáncer, artritis reumatoide, retinopatía diabética, enfermedad de extremidad isquémica, enfermedad vascular periférica, isquemia del miocardio, hiperplasia de la íntima vascular, aterosclerosis y formación de hemangioma. Para tratar estos procesos patológicos con frecuencia será necesario el desarrollo de compuestos que antagonicen a los miembros de la familia de proteínas PDGF/VEGF o sus receptores respectivos. Esto puede incluir el desarrollo de anticuerpos neutralizantes, antagonistas de molécula pequeña, formas modificadas de los factores del crecimiento que mantienen la actividad de unión a receptor pero que carecen de actividad activadora de receptor, receptores solubles, o moléculas antisentido o ribozima para bloquear la producción de polipéptido.

SEC ID Nº: 2 es la secuencia de un polipéptido descrito en la presente memoria. El análisis de la secuencia de aminoácidos mostrado en SEC ID Nº: 2 indica que los restos 1 a 14 forman un péptido secretor. El dominio CUB se extiende desde el resto 46 hasta el resto 163. Una secuencia similar a propéptido se extiende desde el resto 164 hasta el resto 234 e incluye dos sitios de escisión potenciales en su extremo carboxilo, un sitio dibásico en los restos 231-232 y un sitio diana para furina o una proteasa similar a furina en los restos 231-234. El dominio del factor del crecimiento se extiende desde el resto 235 hasta el resto 345. Los expertos en la técnica reconocerán que los límites de dominio son algo imprecisos y que se puede esperar que varíen en hasta  $\pm 5$  restos de las posiciones especificadas. Los sitios de escisión proteolítica potenciales se producen en los restos 232 y 234. Se ha observado que el procesamiento de zvegf3 recombinante producido en células BHK ocurre entre los restos 225 y 226. La escisión de péptido señal se prevé que ocurra después del resto 14 ( $\pm 3$  restos). Este análisis sugiere que la cadena polipeptídica de zvegf3 se puede escindir para producir una pluralidad de especies monoméricas como se muestra en la Tabla 1. La escisión después de Arg-234 se espera que dé como resultado eliminación posterior de restos 231-234, con conversión posible de Gly-230 a una amida. La escisión después de Lys-232 se espera que dé como resultado eliminación posterior del resto 231, nuevamente con conversión posible de Gly-230 a una amida. Adicionalmente, puede ser provechoso incluir hasta siete restos de la región interdominio en el extremo carboxilo del dominio CUB. La región interdominio puede estar truncada en su extremo amino por una cantidad similar. Véase la Tabla 1.

Tabla 1

Monómero	Restos (SEC ID Nº: 2)
dominio Cub	15 - 163 46 - 163 15 - 170 46 - 170
dominio CUB + región interdominio	15 - 234 46 - 234 15 - 229 amida 15 - 230
dominio Cub + región interdominio + dominio del factor del crecimiento	15 - 345 46 - 345

(continuación)

Monómero	Restos (SEC ID Nº: 2)
Dominio del factor del crecimiento	235 - 345
	226 - 345
Dominio del factor del crecimiento + región interdominio	164 - 345
	171 - 345

En la presente memoria también se describen polipéptidos que son al menos el 90 % o al menos el 95 % idénticos a los polipéptidos divulgados en la Tabla 1, en los que estos polipéptidos adicionales conservan ciertos motivos de secuencia característicos como se divulga más adelante.

- 5 Los polipéptidos zvegf3 se designan en la presente memoria con un subíndice que indica los restos de aminoácidos. Por ejemplo, los polipéptidos de dominio CUB divulgados en la Tabla 1 se denominan "zvegf3<sub>15-163</sub>", "zvegf3<sub>46-163</sub>", "zvegf3<sub>15-170</sub>" y "zvegf3<sub>46-170</sub>".
- 10 La estructura de orden superior de los polipéptidos zvegf3 se puede pronosticar mediante alineamiento de secuencia con homólogos conocidos y análisis informático usando software disponible (por ejemplo, las herramientas de modelado por homología y visualización Insight II®; MSI, San Diego, CA). El análisis de SEC ID Nº: 2 pronostica que la estructura secundaria del dominio del factor del crecimiento está dominada por el nudo de cistina, que une regiones similares a cadena beta variables y bucles en una estructura similar a corbata de lazo. El alineamiento de secuencias indica que los restos Cys dentro del dominio del factor del crecimiento en las posiciones 250, 280, 284, 296, 335 y 337 y Gly 282 están altamente conservados dentro de la familia. El análisis adicional sugiere 15 emparejamiento (formación de enlaces disulfuro) de restos Cys 250 y 296, 280 y 335 y 284 y 337 para formar el nudo de cistina. Esta disposición de restos conservados se puede representar mediante la fórmula CX{18,33}CXGXCX{6,33}CX{20,40}CXC (SEC ID Nº: 3), en la que los restos de aminoácidos están representados por el código de una letra convencional, X es cualquier resto de aminoácido, y {y,z} indica una región de restos variables (X) de y a z restos de longitud. Una estructura de corbata de lazo de consenso se forma como: extremo 20 amino a nudo de cistina → región similar a cadena beta 1 → bucle variable 1 → región similar a cadena beta 2 → nudo de cistina → región similar a cadena beta 3 → bucle variable 2 → región similar a cadena beta 4 → nudo de cistina → región similar a cadena beta 5 → bucle variable 3 → región similar a cadena beta 6 → nudo de cistina. Los bucles variables 1 y 2 forman un lado de la corbata de lazo y el bucle 3 variable forma el otro lado. La estructura del dominio del factor del crecimiento de zvegf3 parece apartarse de la estructura de consenso de los otros miembros 25 de la familia en el bucle 2 y regiones similares a cadena beta 3 y 4, en las que todas están abreviadas y básicamente reemplazadas por un grupo de cisteína que comprende los restos 285 (Ala) a 295 (Gln), que incluye restos Cys en las posiciones 286, 287, 291 y 294 de SEC ID Nº: 2. Los límites aproximados de las regiones similares a cadena beta en SEC ID Nº: 2 son: región 1, restos 251-259; región 2, restos 275-279; región 5, restos 297-301; región 6, restos 329-334. Los bucles separan las regiones 1 y 2 y las regiones 5 y 6.
- 30 El dominio CUB de zvegf3 se cree que forma una estructura de barril beta con nueve regiones similares a cadena beta distintas. Estas regiones comprenden los restos 48-51, 55-59, 72-78, 85-90, 92-94, 107-112, 119-123, 139-146, y 156-163 de SEC ID Nº: 2. Un alineamiento múltiple de dominios CUB de precursor de neuropilina de *Xenopus laevis* (Takagi y col., *ibid.*), BMP-1 humana (Wozney y col., *ibid.*) y proteína similar a tolloide de *X. laevis* (Lin y col., *ibid.*) indica la presencia de un motivo conservado que corresponde a los restos 104-124 de SEC ID Nº: 2. Este 35 motivo está representado por la fórmula C[KR]Y[DNE][WYF]X{11,15}G[KR][WYF]C (SEC ID Nº: 4), en la que los corchetes cuadrados indican los restos permisibles en una posición determinada y X{y,z} es como se ha definido anteriormente.
- 40 En la presente memoria se describen proteínas que comprenden dominios CUB homólogos al dominio CUB de zvegf3. Estos dominios homólogos tienen de 100 a 120 restos de longitud y comprenden un motivo de la secuencia C[KR]Y[DNE][WYF] X{11,15}G[KR][WYF]C (SEC ID Nº: 4) que corresponde a los restos 104-124 de SEC ID Nº: 2. Estos dominios CUB homólogos son al menos el 90 % idénticos a los restos 46-163 de SEC ID Nº: 2 o al menos el 95 % idénticos a los restos 46-163 de SEC ID Nº: 2.
- 45 Las proteínas que contienen dominio CUB pueden incluir además una región interdominio de zvegf3 u homólogo de la misma. La región interdominio es al menos el 90 % idéntica a los restos 164 a 234 de SEC ID Nº: 2.
- 50 Las proteínas adicionales descritas en la presente memoria comprenden el dominio del factor del crecimiento de zvegf3 o un homólogo del mismo. Estas proteínas, por tanto, comprenden un segmento polipeptídico que es al menos el 90 % o el 95 % idéntico a los restos 235-345 de SEC ID Nº: 2, en los que el segmento polipeptídico comprende restos Cys en las posiciones correspondientes a los restos 250, 280, 284, 296, 335 y 337 de SEC ID Nº: 2; una glicina en la posición correspondiente al resto 284 de SEC ID Nº: 2; y el motivo de secuencia CX{18,33}CXGXCX{6,33}CX{20,40}CXC (SEC ID Nº: 3) que corresponde a los restos 250-337 de SEC ID Nº: 2.

Las proteínas adicionales que comprenden combinaciones del dominio CUB, región interdominio y dominio del factor del crecimiento se han mostrado anteriormente en la Tabla 1. En cada caso, también se describen en la presente memoria proteínas homólogas que comprenden dominios homólogos como se ha divulgado anteriormente.

5 El análisis estructural y la homología pronostican que los polipéptidos zvegf3 forman un complejo con un segundo polipéptido para formar proteínas multiméricas. Estas proteínas incluyen homodímeros y heterodímeros. En el último caso, el segundo polipéptido puede ser un polipéptido zvegf3 truncado u otra variante u otro polipéptido, tal como un polipéptido PIGF, PDGF-A, PDGF-B, VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D o zvegf4. Entre las proteínas diméricas descritas en la presente memoria se encuentran dímeros formados por la asociación no covalente (por ejemplo, interacciones hidrófobas) con una segunda subunidad, bien sea un segundo polipéptido zvegf3 u otra segunda subunidad o mediante asociación covalente estabilizada por enlaces de disulfuro intermoleculares entre restos de cisteína de los monómeros componentes. Dentro de la SEC ID Nº: 2, los restos Cys en las posiciones 274, 286, 287, 291, 294 y 339 pueden formar enlaces de disulfuro intramoleculares o intermoleculares. Es probable que los restos 274 y 287 formen enlaces de disulfuro intercadena. En homodímeros, los polipéptidos componentes (designados A y B) se pueden unir en una disposición antiparalela con un patrón de enlace de disulfuro intercadena A274–B287, 15 A287–B274. Los datos sugieren además que se forman disulfuros intracadena mediante el emparejamiento de Cys286 con Cys291 y Cys294 con Cys339, aunque algunos o todos de estos cuatro restos pueden estar implicados en el emparejamiento intercadena.

20 Por tanto en la presente memoria se describen diversas proteínas multiméricas que comprenden un polipéptido zvegf3 como se ha divulgado anteriormente. Estos polipéptidos incluyen zvegf3<sub>15-234</sub>, zvegf3<sub>46-234</sub>, zvegf3<sub>15-229</sub> amida, zvegf3<sub>15-230</sub>, zvegf3<sub>15-345</sub>, zvegf3<sub>46-345</sub> y zvegf3<sub>235-345</sub>, así como también variantes y derivados de estos polipéptidos como se divulga en la presente memoria.

25 El porcentaje de identidad de secuencia se determina mediante procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul y col., Bull. Math. Bio. 48: 603-616, 1986, y Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 89: 10915-10919, 1992. En resumen, dos secuencias de aminoácidos se alinean para optimizar las puntuaciones de alineamiento usando una penalización de apertura de hueco de 10, una penalización por ampliación de hueco de 1 y la matriz de puntuación "BLOSUM62" de Henikoff y Henikoff (*ibid.*) como se muestra en la Tabla 2 (los aminoácidos se indican mediante los códigos de una letra convencionales). El porcentaje de identidad se calcula entonces como:

Número total de coincidencias idénticas

\_\_\_\_\_ x 100

**[Longitud de la secuencia más larga  
más el número de huecos introducidos  
en la secuencia más larga con el fin  
de alinear las dos secuencias]**

**Tabla 2**

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	-	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	-1	0	-3	-2	0
R	5	0	-2	-3	1	0	-2	0	-3	-2	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-1	-3	-2	-3
N	6	1	-3	0	0	0	1	-3	-3	-1	0	-3	-1	-3	-1	0	1	-4	-2	-3
D	6	-3	0	2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-1	0	-3	-1	-3	-1	0	-1	-4	-3
C	9	-3	2	-4	-3	-1	-1	-2	-1	-3	1	0	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1	-2
Q	5	2	-2	-2	0	-3	-3	-4	-3	-1	-2	-3	-2	-3	-1	0	-1	-2	-1	-3
E	5	2	-2	-3	0	-3	-1	-2	-1	-3	1	0	-2	-3	-1	0	-1	-2	-1	-3
G	6	-2	0	-2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-1	0	-2	-3	-1	-1	0	-1	-2	-3
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

El nivel de identidad entre secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de búsqueda de similitud "FASTA" divulgado por Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85: 2444, 1988) y por Pearson (Meth. Enzymol. 183: 63, 1990). En resumen, FASTA caracteriza en primer lugar similitud de secuencia identificando regiones compartidas por la secuencia problema (por ejemplo, SEC ID N°: 2) y una secuencia de ensayo que tienen o la densidad más elevada de identidades (si la variable ktup es 1) o pares de identidades (si ktup= 2), sin considerar sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos conservativas. Las diez regiones con la densidad más elevada de identidades posteriormente se puntúan nuevamente comparando la similitud de todos los aminoácidos emparejados usando una matriz de sustitución de aminoácidos y los extremos de las regiones

se "cortan" para incluir únicamente aquellos restos que contribuyen a la puntuación más elevada. Si existen varias regiones con puntuaciones mayores al valor "límite" (calculado mediante una fórmula predeterminada basada en la longitud de la secuencia y el valor de ktup), entonces las regiones iniciales cortadas se examinan para determinar si las regiones se pueden unir para formar un alineamiento aproximado con huecos. Finalmente, las regiones de puntuación más elevada de las dos secuencias de aminoácidos se alinean usando una modificación del algoritmo de Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 444, 1970; Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26: 787, 1974), que permite inserciones y supresiones de aminoácidos. Los parámetros preferidos para análisis FASTA son: ktup= 1, penalización por apertura de hueco= 10, penalización por ampliación de hueco= 1 y matriz de sustitución= BLOSUM62. Estos parámetros se pueden introducir en un programa FASTA modificando el archivo de matriz de puntuación ("SMATRIX"), como se ha explicado en el Apéndice 2 de Pearson, 1990 (*ibid.*).

También se puede usar FASTA para determinar la identidad de secuencia de moléculas de ácido nucleico usando una proporción como se ha divulgado anteriormente. Para comparaciones de secuencias de nucleótidos, el valor de ktup puede variar entre uno y seis, preferentemente de tres a seis, más preferentemente tres, con otros parámetros establecidos por defecto.

En la presente memoria se describen polipéptidos que tienen uno o más cambios de aminoácidos conservativos en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 2. La matriz BLOSUM62 (Tabla 2) es una matriz de sustitución de aminoácidos obtenida a partir de aproximadamente 2.000 alineamientos múltiples locales de segmentos de secuencia de proteína, que representan regiones altamente conservadas de más de 500 grupos de proteínas relacionadas (Henikoff y Henikoff, *ibid.*). Por tanto, las frecuencias de sustitución de BLOSUM62 se pueden usar para definir sustituciones de aminoácidos conservativas que se pueden introducir en las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria. Como se usa en la presente memoria, la expresión "sustitución de aminoácidos conservativa" se refiere a una sustitución representada por un valor BLOSUM62 de más de -1. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos es conservativa si la sustitución está caracterizada por un valor BLOSUM62 de 0, 1, 2 o 3. Las sustituciones de aminoácidos conservativas preferidas se caracterizan por un valor BLOSUM62 de al menos uno 1 (por ejemplo, 1, 2 o 3), mientras que las sustituciones de aminoácidos conservativas más preferidas se caracterizan por un valor BLOSUM62 de al menos 2 (por ejemplo, 2 o 3).

Las proteínas descritas en la presente memoria pueden comprender además extensiones amino- o carboxilo-terminales, tales como un resto de metionina aminoterminal, un resto de cisteína amino o carboxilo-terminal para facilitar el enlace posterior a hemocianina de lapa californiana activada por maleimida, un péptido engarce pequeño de hasta aproximadamente 20-25 restos o una ampliación polipeptídica que facilita la purificación (una etiqueta de afinidad) como se ha divulgado anteriormente. Se pueden usar dos o más etiquetas de afinidad en combinación. Los polipéptidos que comprenden etiquetas de afinidad pueden comprender además un engarce polipeptídico y/o un sitio de escisión proteolítica entre el polipéptido zvegf3 y la etiqueta de afinidad. Los sitios de escisión ilustrativos incluyen sitios de escisión de trombina y sitios de escisión de factor Xa.

En la presente memoria se describen diversas otras fusiones polipeptídicas y proteínas multiméricas relacionadas que comprenden una o más fusiones polipeptídicas. Por ejemplo, se puede preparar un polipéptido zvegf3 como una fusión a una proteína dimerizante como se divulga en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.155.027 y 5.567.584. Las proteínas dimerizantes ilustrativas a este respecto incluyen dominios de región constante de inmunoglobulina. La dimerización también se puede estabilizar fusionando un polipéptido zvegf3 a una secuencia de cremallera de leucina (Riley y col., Protein Eng. 9: 223-230, 1996; Mohamed y col., J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 51: 241-250, 1994). Las fusiones de inmunoglobulina-polipéptido zvegf3 y fusiones de cremallera de leucina se pueden expresar en células modificadas por ingeniería genética para producir diversos análogos de zvegf3 multiméricos. Dominios auxiliares se pueden fusionar al polipéptido zvegf3 para dirigirlos a células, tejidos o macromoléculas específicos (por ejemplo, colágeno). Por ejemplo, un polipéptido o proteína zvegf3 se puede dirigir a un tipo celular predeterminado fusionando un polipéptido zvegf3 a un ligando que se une específicamente a un receptor en la superficie de la célula diana. De esta manera, polipéptidos y proteínas se pueden dirigir con fines terapéuticos o de diagnóstico. Un polipéptido zvegf3 se puede fusionar a dos o más restos, tales como una etiqueta de afinidad para purificación y un dominio de dirección. Las fusiones polipeptídicas también pueden comprender uno o más sitios de escisión, particularmente entre dominios. Véase, Tuan y col., Connective Tissue Research 34: 1-9, 1996.

Las fusiones polipeptídicas descritas en la presente memoria generalmente no contendrán más de aproximadamente 1.500 restos de aminoácidos, con frecuencia no más de aproximadamente 1.200 restos, con frecuencia no más de aproximadamente 1.000 restos y en muchos casos serán considerablemente más pequeñas. Por ejemplo, un polipéptido zvegf3 de 331 restos (restos 15-345 de SEC ID Nº: 2) se puede fusionar a  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* (1.021 restos; véase Casadaban y col., J. Bacteriol. 143: 971-980, 1980), un espaciador de 10 restos y un sitio de escisión de factor Xa de 4 restos para producir un polipéptido de 1366 restos. En un segundo ejemplo, los restos 235-345 de SEC ID Nº: 2 se pueden fusionar a una proteína de unión a maltosa (aproximadamente 370 restos), un sitio de escisión de 4 restos y una etiqueta de polihistidina de 6 restos.

Un polipéptido que comprende el dominio del factor del crecimiento de zvegf3 (por ejemplo, zvegf3<sub>235-345</sub> o zvegf3<sub>345</sub>) se puede fusionar a un dominio CUB no zvegf3. Un polipéptido zvegf3 que comprende el factor del crecimiento de zvegf3 y dominios CUB se puede fusionar a un dominio CUB no zvegf3, tal como un dominio CUB que comprende polipéptido neuropilina.

En la presente memoria se describen fusiones polipeptídicas que comprenden el dominio CUB de zvegf3 (por ejemplo, zvegf3<sub>45-163</sub>). El dominio CUB, con su homología a neuropilina-1, se puede usar para dirigir zvegf3 u otras proteínas que lo contienen a células que tienen semaforinas en superficie celular, incluyendo células endoteliales, células neuronales, linfocitos y células tumorales. El dominio CUB de zvegf3 se puede unir por tanto a otros restos,

5 incluyendo polipéptidos (por ejemplo, otros factores del crecimiento, anticuerpos y enzimas) y restos no peptídicos (por ejemplo, radionúclidos, agentes de contraste y similares), para dirigirlos a células que expresan semaforinas en superficie celular. Los sitios dibásico y similar a furina entre los dominios CUB y de factor del crecimiento de zvegf3 pueden permitir la liberación proteolítica del dominio del factor del crecimiento u otro resto a través de proteasas locales que existen dentro de tejidos o mediante proteasas añadidas a partir de fuentes exógenas. La liberación del resto dirigido puede proporcionar efectos biológicos más localizados.

Las proteínas que comprenden el dominio CUB de zvegf3 de tipo silvestre y variantes del mismo se pueden usar para modular actividades mediadas por semaforinas de superficie celular. Aunque sin el deseo de limitarse por ninguna teoría, zvegf3 se puede unir a semaforinas a través de su dominio CUB. La observación de que semaforina III está implicada en el desarrollo vascular sugiere que miembros de la familia de proteínas del factor del crecimiento

15 vascular también pueden estar implicados, especialmente debido a la actividad de cunión de VEGF y semaforina III a neuropilina-1. Por tanto, zvegf3 se puede usar para diseñar agonistas y antagonistas de interacciones de neuropilina-semaforina. Por ejemplo, la secuencia de zvegf3 divulgada en la presente memoria proporciona un punto de partida para el diseño de moléculas que antagonizan actividades estimuladas por semaforina, incluyendo crecimiento de neuritas, desarrollo cardiovascular, desarrollo de cartílago y extremidades y función de células T y B.

20 Las aplicaciones adicionales incluyen intervención en diversas patologías, incluyendo artritis reumatoide, diversas formas de cáncer, enfermedad autoinmune, inflamación, retinopatías, hemangiomas, acontecimientos isquémicos dentro de tejidos incluyendo el corazón, el riñón y las arterias periféricas, neuropatías, daño nervioso agudo y enfermedades de los sistemas nerviosos central y periférico.

25 Se realizan cambios de secuencia de aminoácidos en polipéptidos zvegf3 de forma de minimizar la alteración de la estructura de orden superior esencial para actividad biológica. En general, se prefieren cambios de aminoácidos conservativos. Los cambios en restos de aminoácidos se realizarán de forma de no alterar el nudo de cistina y la disposición de "corbata de lazo" de bucles en el dominio del factor del crecimiento que es característico de la familia de proteínas. Los motivos conservados también se mantendrán. Los efectos de cambios de secuencias de aminoácidos se pueden pronosticar mediante modelado por ordenador como se ha divulgado anteriormente o determinarse mediante análisis de la estructura cristalina (véase, por ejemplo, Lapthorn y col., *ibid.*). Un perfil de hidrofobicidad de SEC ID Nº: 2 se muestra en la Figura 1. Los expertos en la técnica reconocerán que esta hidrofobicidad se tendrá en cuenta cuando se diseñen alteraciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido zvegf3, de forma de no alterar el perfil global. La guía adicional en la selección de las sustituciones de aminoácidos se proporciona mediante el alineamiento de secuencias de zvegf3 de ratón y de humano mostradas en la Figura 6.

30 Los polipéptidos descritos en la presente memoria también pueden comprender restos de aminoácidos de origen no natural. Los aminoácidos de origen no natural incluyen, sin limitación, *trans*-3-metilprolina, *cis*-4-metanoprolina, *cis*-4-hidroxiprolina, *trans*-4-hidroxiprolina, *N*-metilglicina, *alo*-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido pipecólico, *terc*-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. En la técnica se conocen diversos procedimientos para incorporar restos de aminoácidos de origen no natural en las proteínas. Por ejemplo, se puede emplear un sistema *in vitro* en el que las mutaciones sin sentido se suprime usando ARNt supresores químicamente aminoacilados. Los procedimientos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar ARNt se conocen en la técnica. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido se lleva a cabo en un sistema sin células que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas y otros reactivos disponibles en el mercado. Las proteínas se purifican mediante cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson y col., J. Am. Chem. Soc. 113: 2722, 1991; Ellman y col., Methods Enzymol. 202: 301, 1991; Chung y col., Science 259: 806-809, 1993; y Chung y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 90: 10145-10149, 1993). En un segundo procedimiento, la producción se lleva a cabo en oocitos de *Xenopus* mediante microinyección de ARNm mutado y ARNt supresor químicamente aminoacilado (Turcatti y col., J. Biol. Chem. 271: 19991-19998, 1996). Dentro de un tercer método, células de *E. coli* se cultivan en ausencia de un aminoácido natural que se tiene que reemplazar (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia del aminoácido o aminoácidos de origen no natural deseados (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido de origen no natural se incorpora en la proteína en lugar de su homólogo natural. Véase, Koide y col., Biochem. 33: 7470-7476, 1994. Los restos de aminoácidos de origen natural se pueden convertir en especies de origen no natural mediante modificación química *in vitro*. La modificación química se puede combinar con mutagénesis dirigida a sitio para expandir adicionalmente el intervalo de sustituciones (Wynn y Richards, Protein Sci. 2: 395-403, 1993).

35 Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos descritos en la presente memoria se pueden identificar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediante alanina (Cunningham y Wells, Science 244, 1081-1085, 1989; Bass y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 88: 4498-4502, 1991). En la última técnica, se introducen mutaciones de alanina únicas en cada resto en la molécula y las moléculas mutantes resultantes se ensayan para determinar actividad biológica de otras propiedades para identificar restos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula.

- Se pueden realizar y ensayar múltiples sustituciones de aminoácidos usando procedimientos conocidos de mutagénesis y exploración, tales como los divulgados por Reidhaar-Olson y Sauer (Science 241: 53-57, 1988) o Bowie y Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 86: 2152-2156, 1989). En resumen, estos autores divultan procedimientos para aleatorizar de forma simultánea dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionando un polipéptido funcional y después secuenciando los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permisibles en cada posición. Otros procedimientos que se pueden usar incluyen presentación en fago (por ejemplo, Lowman y col., Biochem. 30: 10832-10837, 1991; Ladner y col., Patente de Estados Unidos Nº 5.223.409; Huse, Publicacion OMPI WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a región (Derbyshire y col., Gene 46: 145, 1986; Ner y col., DNA 7: 127, 1988).
- Las variantes del ADN de zvegf3 divulgadas y secuencias polipeptídicas se pueden generar a través de barajado de ADN como se divultan Stemmer, Nature 370: 389-391, 1994 y Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 91: 10747-10751, 1994. En resumen, se generan genes variantes mediante recombinación homóloga *in vitro* mediante fragmentación aleatoria de un gen parental seguido por reensamblaje usando PCR, dando como resultado mutaciones puntuales introducidas de forma aleatoria. Esta técnica se puede modificar usando una familia de genes parentales, tales como variantes alélicas o genes de diferentes especies, para introducir variabilidad adicional en el procedimiento. La selección o exploración de la actividad deseada, seguida por repeticiones adicionales de mutagénesis y ensayo proporciona una "evolución" rápida de secuencias seleccionando las mutaciones deseables a la vez que se selecciona de forma simultánea contra los cambios dañinos.
- Los procedimientos de mutagénesis como se han divulgado anteriormente se pueden combinar con procedimientos de exploración de alto volumen o de alto rendimiento para detectar actividad biológica de polipéptidos variantes de zvegf3, en particular actividad biológica en la modulación de la proliferación celular o diferenciación celular. Por ejemplo, ensayos de mitogénesis que miden la incorporación de colorante o la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina se pueden llevar a cabo en un gran número de muestras, al igual que ensayos basados en células que detectan la expresión de un gen informador (por ejemplo, un gen de luciferasa). La mutagénesis del dominio CUB se puede usar para modular su unión a miembros de la familia de semaforina, incluyendo potenciar o inhibir la unión a miembros de familias seleccionados. Un espectro de actividad de unión modificado puede ser deseable para optimizar utilidad terapéutica y/o de diagnóstico de proteínas que comprenden un dominio CUB de zvegf3. La unión directa usando proteína CUB marcada se puede usar para supervisar cambios en la actividad de unión del dominio CUB a miembros de familia de semaforina seleccionados. Las semaforinas de interés a este respecto incluyen proteínas aisladas, proteínas presentes en membranas celulares y proteínas presentes en superficies celulares. El dominio CUB se puede marcar mediante diversos procedimientos incluyendo marcación radiactiva con isótopos, tales como <sup>125</sup>I, conjugación a enzimas tales como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, conjugación con biotina y conjugación con diversos marcadores fluorescentes incluyendo FITC. Estos y otros ensayos se divultan con mayor detalle más adelante. Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos zvegf3 activos se pueden recuperar a partir de las células huésped y secuenciarse rápidamente usando equipo moderno. Estos procedimientos permiten la determinación rápida de la importancia de restos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.
- Mediante el uso de los procedimientos analizados anteriormente, un experto en la técnica puede identificar y/o preparar diversos polipéptidos que son homólogos a los polipéptidos zvegf3 divulgados anteriormente en la Tabla 1 y que conservan las propiedades biológicas de la proteína de tipo silvestre. Tales polipéptidos también pueden incluir segmentos polipeptídicos adicionales como se ha divulgado de forma general anteriormente.
- En la presente memoria se describen moléculas polinucleotídicas, incluyendo moléculas de ADN y ARN, que codifican los polipéptidos zvegf3 divulgados anteriormente. Los polinucleótidos descritos en la presente memoria incluyen la cadena sentido; la cadena antisentido; y el ADN como bicatenario, teniendo tanto la cadena sentido como la cadena antisentido hibridadas mediante enlaces de hidrógeno. Una secuencia de ADN ilustrativa que codifica polipéptidos zvegf3 se muestra en la SEC ID Nº: 1. Las secuencias de ADN adicionales que codifican polipéptidos zvegf3 las pueden generar fácilmente los expertos en la técnica basándose en el código genético. Las secuencias de ARN homólogas se pueden generar mediante sustitución de U por T.
- Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que, en vista de la degeneración del código genético, es posible variación de secuencia considerable entre moléculas polinucleotídicas que codifican polipéptidos zvegf3. La SEC ID Nº: 6 es una secuencia de ADN degenerada que abarca todos los ADN que codifican el polipéptido zvegf3 de SEC ID Nº: 2. Los expertos en la técnica reconocerán que la secuencia degenerada de SEC ID Nº: 6 también proporciona todas las secuencias de ARN que codifican SEC ID Nº: 2 sustituyendo T por U. Por tanto, los polinucleótidos que codifican polipéptidos zvegf3 que comprende los nucleótidos 1 - 1035, 1 - 489, 43 - 489, 136 - 489, 43 - 702, 136 - 702, 43 - 690, 43 - 1035, 136 - 1035 y 703 - 1035 de SEC ID Nº: 6 y sus equivalentes de ARN se describen en la presente memoria. La Tabla 3 expone los códigos de una letra usados dentro de SEC ID Nº: 6 para indicar posiciones de nucleótidos degenerados. "Resoluciones" son los nucleótidos indicados por una letra de código. "Complemento" indica el código del nucleótido o nucleótidos complementarios. Por ejemplo, el código Y indica C o T y su R de complemento indica A o G, A siendo complementario a T y G siendo complementario a C.

# ES 2 432 053 T3

Tabla 3

Nucleótido	Resoluciones	Complemento	Resoluciones
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A G	Y	C T
Y	C T	R	A G
M	A C	K	G T
K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
W	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T
B	C G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T

Los codones degenerados usados en SEC ID N°: 6, que abarcan todos los codones posibles de un aminoácido dado, se exponen en la Tabla 4, más adelante.

Tabla 4

Aminoácido	Código de una letra	Codones	Codón Degenerado
Cys	C	TGC TGT	TGY
Ser	S	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
Thr	T	ACA ACC ACG ACT	CAN
Pro	P	CCA CCC CCG CCT	CCN
Ala	A	GCA GCC GCG GCT	GCN
Gly	G	GGA GGC GGG GGT	GGN
Asn	N	AAC AAT	AAZ
Asp	D	GAC GAT	GAY
Glu	E	GAA GAG	GAR
Gln	Q	CAA CAG	CAR
His	H	CAC CAT	CAY
Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
Lys	K	AAA AAG	AAR
Met	M	ATG	ATG
Ile	I	ATA ATC ATT	ATH
Leu	L	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
Val	V	GTA GTC GTG GTT	GTN
Phe	F	TTC TTT	TTY
Tyr	Y	TAC TAT	TAY
Trp	W	TGG	TGG
Ter		TAA TAG TGA	TRR
Asn Asp	B		RAY
Glu Gln	Z		SAR
Any	X		NNN
Gap	-	---	

- 5 Un experto en la técnica apreciará que se introduce cierta ambigüedad en la determinación de un codón degenerado, representativo de todos los codones posibles que codifican cada aminoácido. Por ejemplo, el codón degenerado de serina (WSN) puede, en algunas circunstancias, codificar arginina (AGR) y el codón degenerado de arginina (MGN) puede, en algunas circunstancias, codificar serina (AGY). Existe una relación similar entre codones que codifican fenilalanina y leucina. Por tanto, algunos polinucleótidos abarcados por las secuencias degeneradas pueden codificar secuencias de aminoácidos variantes pero un experto en la técnica puede identificar fácilmente

tales secuencias variantes por referencia a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 2. Las secuencias variante se pueden ensayar fácilmente para determinar funcionalidad como se ha descrito en la presente memoria.

En la presente memoria se describen polinucleótidos aislados que se hibridarán a regiones del tamaño similar de SEC ID Nº: 1 o una secuencia complementaria a la misma, en condiciones rigurosas. En general, las condiciones

5 rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmica ( $T_m$ ) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La  $T_m$  es la temperatura (en fuerza iónica y pH definido) a la cual el 50 % de la secuencia diana se hibrida a una sonda perfectamente coincidente. Las condiciones rigurosas típicas son aquellas en las cuales la concentración de sal es hasta aproximadamente 0,03 M a pH 7 y la temperatura es aproximadamente 60 °C.

10 Como se ha indicado previamente, los polinucleótidos aislados descritos en la presente memoria incluyen ADN y ARN. Los procedimientos para preparar ADN y ARN se conocen bien en la técnica. Los clones de ADN complementario (ADNc) se preparan a partir de ARN que se aísla a partir de un tejido o célula que produce grandes cantidades de ARN de zvegf3. Tales tejidos y células se identifican mediante transferencia de Northern (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 77: 5201, 1980) e incluyen tiroides, médula espinal, y glándula adrenal. El

15 ARN total se puede preparar usando extracción por guanidina HCl seguido por aislamiento mediante centrifugación en un gradiente de CsCl (Chirgwin y col., Biochemistry 18: 52-94, 1979). ARN Poli (A)+ se prepara a partir de ARN total usando el método de Aviv y Leder (Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 69: 1408-1412, 1972). El ADN complementario (ADNc) se prepara a partir de ARN poli(A)+ usando procedimientos conocidos. En la alternativa, el

20 ADN genómico se puede aislar. Para algunas aplicaciones (por ejemplo, expresión en animales transgénicos) puede ser preferible usar un clon genómico o modificar un clon de ADNc para incluir al menos un intrón genómico. Los procedimientos de identificación y aislamiento de ADNc y clones genómicos se conocen bien y están dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica e incluyen el uso de la secuencia divulgada en la presente memoria, o partes de la misma, para sondear o cavar una biblioteca. Los polinucleótidos que codifican polipéptidos zvegf3 se identifican y aíslan mediante, por ejemplo, hibridación o reacción en cadena de la polimerasa ("PCR", Mullis, Patente de Estados Unidos 4.683.202). Las bibliotecas de expresión se pueden sondear con anticuerpos frente a zvegf3, fragmentos de receptor u otros compañeros de unión específicos.

30 Los expertos en la técnica reconocerán que las secuencias divulgadas en SEC ID Nº: 1 y 2 representan un alelo único de zvegf3 humano. Las variantes alélicas de estas secuencias se pueden clonar sondeando ADNc o bibliotecas genómicas a partir de individuos diferentes de acuerdo con procedimientos convencionales. También se espera que existan las formas de corte y empalme alternativas de zvegf3.

35 La secuencia polinucleotídica de zvegf3 divulgada en la presente memoria se puede usar para aislar polinucleótidos que codifican otras proteínas de zvegf3. Tales otros polinucleótidos incluyen variantes alélicas, ADNc de corte y empalme alternativo y polinucleótidos homólogos de otras especies (ortólogos). Estos polinucleótidos ortólogos se pueden usar, entre otros, para preparar las proteínas ortólogas respectivas. Otras especies de interés incluyen, pero sin limitación, mamíferos, aves, anfibios, reptiles, peces, insectos y otras especies de vertebrados e invertebrados.

40 Los polinucleótidos y las proteínas de zvegf3 de otras especies de mamíferos son de interés particular, incluyendo polinucleótidos y proteínas de primate no humano, murinos, porcinos, ovinos, bovinos, caninos, felinos y equinos. Los polipéptidos y polinucleótidos ztbg1 no humanos, así como los antagonistas de los mismos y otras moléculas relacionadas se pueden usar, entre otros, en medicina veterinaria. Los ortólogos de zvegf3 humano se pueden clonar usando información y composiciones descritas en la presente memoria en combinación con técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, un ADNc se puede clonar usando ARNm obtenido a partir de un tejido o tipo celular que expresa zvegf3 como se divulga en la presente memoria. Las fuentes adecuadas de ARNm se pueden identificar sondeando transferencias de Northern con sondas diseñadas a partir de las secuencias divulgadas en la presente memoria. Posteriormente se prepara una biblioteca a partir de ARNm de un tejido o línea celular positivo.

45 El ADNc que codifica zvegf3 se puede aislar posteriormente mediante diversos procedimientos, tales como sondeando con un ADNc humano completo o parcial o con uno o más conjuntos de sondas degeneradas basándose en las secuencias divulgadas. La hibridación generalmente se llevará a cabo en condiciones de rigurosidad baja, en las que el lavado se lleva a cabo en SSC 1 x con un lavado inicial a 40 °C y con lavados posteriores a intervalos más elevados de 5 °C hasta que se reduce de forma adecuada el fondo. Un ADNc también se puede clonar usando la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Mullis, Patente de Estados Unidos Nº 4.683.202), usando cebadores diseñados a partir de la secuencia de zvegf3 humana representativa divulgada en la presente memoria. Dentro de un procedimiento adicional, la biblioteca de ADNc se puede usar para transformar o transfectar células huésped y la expresión del ADNc de interés se puede detectar con un anticuerpo frente a polipéptido zvegf3. También se pueden aplicar técnicas similares al aislamiento de clones genómicos.

55 Para cualquier polipéptido zvegf3, incluyendo variantes y proteínas de fusión, un experto en la técnica puede generar fácilmente una secuencia polinucleotídica completamente degenerada que codifica esa variante usando la información expuesta en las Tablas 3 y 4, anteriormente.

60 Regiones conservadas de zvegf3, identificadas mediante alineamiento con secuencias de otros miembros de familia, se pueden usar para identificar polinucleótidos de proteínas relacionadas. Por ejemplo, la reacción en cadena de la

polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) y otras técnicas conocidas en la técnica se pueden usar para amplificar secuencias que codifican los motivos conservados presentes en zvegf3 a partir de ARN obtenido de

diversas fuentes de tejido. En particular, cebadores altamente degenerados como se muestra más adelante en la Tabla 5 (diseñados a partir de un alineamiento de zvegf3 con cadenas A y B de PDGF, VEGF, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D) son útiles para clonación de polinucleótidos que codifican dominios del factor del crecimiento homólogos. Los cebadores mostrados en la Tabla 6, diseñados a partir de un alineamiento de zvegf3 con precursor de neuropilina de *X. laevis*, BMP-1 humano y proteína similar a tolloide de *X. laevis*, son útiles para clonar polinucleótidos que codifican dominios CUB. Por tanto, los cebadores de las Tablas 6 y 7 se pueden usar para obtener polinucleótidos adicionales que codifican homólogos de la secuencia de zvegf3 de SEC ID Nº: 1 y Nº 2.

Tabla 5

restos 279-284 de zvegf3	
degenerado:	MGN TGY GGN GGN AAY TG (SEC ID Nº: 7)
consenso:	MGN TGY DSN GGN WRY TG (SEC ID Nº: 8)
complemento:	CAR YWN CCN SHR CAN CK (SEC ID Nº: 9)
restos 270-275 de zvegf3	
degenerado:	TTY TGG CCN GGN TGY YT (SEC ID Nº: 10)
consenso:	NTN DDN CCN NSN TGY BT (SEC ID Nº: 11)
complemento:	AVR CAN SNN GGN HHN AN (SEC ID Nº: 12)
restos 332-337 de zvegf3	
degenerado:	CAY GAR GAR TGY GAY TG (SEC ID Nº: 13)
consenso:	CAY NNN NVN TGY WN TG (SEC ID Nº: 14)
complemento:	CAN BBR CAN BNN NNR TG (SEC ID Nº: 15)
restos 250-255 de zvegf3	
degenerado:	TGY ACN CCN MGN AAY TT (SEC ID Nº: 16)
consenso:	TGY HNN MCN MKN RMN DH (SEC ID Nº: 17)
complemento:	DHN KYN MKN GKN NDR CA (SEC ID Nº: 18)

Tabla 6

restos 104-109 de zvegf3	
consenso:	TGY AAR TAY GAY TWY GT (SEC ID Nº: 19)
complemento:	ACR WAR TCR TAY TTR CA (SEC ID Nº: 20)
restos 120-125 de zvegf3	
consenso:	YWN GGN MRN TDB TGY GG (SEC ID Nº: 21)
complemento:	CCR CAV HAN YKN CCN WR (SEC ID Nº: 22)
restos 63-68 de zvegf3	
consenso:	TDB CCN MAN DVN TAY CC (SEC ID Nº: 23)
complemento:	GGR TAN BHN TKN GGV HA (SEC ID Nº: 24)

10 Las secuencias polinucleotídicas de zvegf3 divulgadas en la presente memoria también se pueden usar como sondas o cebadores para clonar regiones no codificantes 5' de un gen de zvegf3, incluyendo secuencias promotoras. Estas secuencias flanqueantes se pueden usar para dirigir la expresión de zvegf3 y otras proteínas recombinantes. Adicionalmente, las secuencias flanqueantes 5' se pueden usar como sitios de dirección para construcciones reguladoras para activar o aumentar la expresión de genes de zvegf3 endógenos como divulgán Treco y col., Patente de Estados Unidos Nº 5.641.670.

15 Los polinucleótidos descritos en la presente memoria también se pueden preparar mediante síntesis automatizada. El presente procedimiento de elección es el procedimiento de fosforamidita. Si se sintetiza químicamente, se necesita ADN bicatenario, cada cadena complementaria se prepara por separado. La producción de segmentos cortos bicatenarios (60 a 80 pb) es técnicamente sencilla y se puede conseguir sintetizando las cadenas complementarias y después hibridándolas. Segmentos más largos (normalmente > 300 pb) se ensamblan en forma modular a partir de fragmentos monocatenarios que tienen de 20 a 100 nucleótidos de longitud. La síntesis automatizada de polinucleótidos está dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica y están disponibles equipos y reactivos adecuados a partir de proveedores comerciales. Véase, en general, Glick y Pasternak, Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA, ASM Press, Washington, D.C., 1994; Itakura y col., Ann. Rev. Biochem. 53: 323-56, 1984; y Clémie y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 87: 633-7, 1990.

20 Los polipéptidos descritos en la presente memoria, incluyendo polipéptidos de longitud completa, fragmentos

25 Los polipéptidos descritos en la presente memoria, incluyendo polipéptidos de longitud completa, fragmentos

biológicamente activos y polipéptidos de fusión se pueden producir en células huésped modificadas por ingeniería genética de acuerdo con técnicas convencionales. Las células huésped adecuadas son aquellos tipos de células que se pueden transformar o transfectar con ADN exógeno y desarrollar en cultivo e incluyen bacterias, células fúngicas y células eucariotas superiores cultivadas (incluyendo células cultivadas de organismos pluricelulares). Las técnicas

5 para manipular moléculas de ADN clonado e introducir ADN exógeno en diversas células huésped las divultan Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, y Ausubel y col., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Green y Wiley and Sons, NY, 1993.

En general, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido zvegf3 está unida operativamente a otros elementos 10 genéticos necesarios para su expresión, que incluyen en general un promotor y terminador de la transcripción, dentro de un vector de expresión. El vector también contendrá de forma común uno o más marcadores seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque los expertos en la técnica reconocerán que dentro de determinados sistemas se pueden proporcionar marcadores seleccionables en vectores separados y la replicación del ADN exógeno se puede proporcionar mediante integración en el genoma de la célula huésped. La selección de 15 promotores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros elementos es un asunto de diseño de rutina dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica. Muchos de tales elementos se describen en la bibliografía y están disponibles a través de proveedores comerciales.

Para dirigir un polipéptido zvegf3 a la ruta secretora de una célula huésped, se proporciona una secuencia señal 20 secretora (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) en el vector de expresión. La secuencia señal secretora puede ser la de zvegf3 o se puede obtener a partir de otra proteína secretada (por ejemplo, t-PA; véase, Patente de Estados Unidos Nº 5.641.655) o sintetizarse *de novo*. La secuencia señal secretora está unida operativamente a la secuencia de ADN de zvegf3, es decir, las dos secuencias están unidas en la fase de lectura correcta y posicionadas para dirigir el polipéptido recién sintetizado a la ruta secretora de la célula huésped. Las secuencias señal secretoras se colocan comúnmente 5' a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de 25 interés, aunque determinadas secuencias señal se pueden posicionar en otros sitios en la secuencia de ADN de interés (véase, por ejemplo, Welch y col., Patente de Estados Unidos Nº 5.037.743; Holland y col., Patente de Estados Unidos Nº 5.143.830).

La expresión de polipéptidos zvegf3 a través de una ruta secretora de célula huésped se espera que dé como resultado la producción de proteínas multiméricas. Como se ha indicado anteriormente, tales multímeros incluyen tanto homomultímeros como heteromultímeros, incluyendo los últimos proteínas que comprenden únicamente 30 polipéptidos y proteínas de zvegf3 que incluyen polipéptidos zvegf3 y heterólogos. Por ejemplo, un heteromultímero que comprende un polipéptido zvegf3 y un polipéptido a partir de un miembro de familia relacionada (por ejemplo, VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, zvegf4, PIGF, PDGF-A o PDGF-B) se pueden producir mediante co-expresión de los dos polipéptidos en una célula huésped. Las secuencias que codifican estos otros miembros de la familia se conocen. Véase, por ejemplo, Dvorak y col., *ibid.*; Olofsson y col., *ibid.*; Hayward y col., *ibid.*; Joukov y col., *ibid.*; 35 Oliviero y col., *ibid.*; Achen y col., *ibid.*; Maglione y col., *ibid.*; Heldin y col., Patente de Estados Unidos Nº 5.219.759; y Johnsson y col., *ibid.* Si una mezcla de proteínas se produce como resultado a partir de la expresión, especies individuales se aislan mediante procedimientos convencionales. Monómeros, dímeros y multímeros de orden superior se separan, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión. Los heteromultímeros se pueden separar a 40 partir de homomultímeros mediante cromatografía de inmunoadsorción usando anticuerpos específicos para dímeros individuales o mediante etapas de inmunoadsorción secuencial usando anticuerpos específicos para polipéptidos de componentes individuales. Véase, en general, Patente de Estados Unidos Nº 5.094.941. Los multímeros también se pueden ensamblar *in vitro* tras la incubación de polipéptidos componentes en condiciones adecuadas. En general, el ensamblaje *in vitro* incluirá la incubación de la mezcla de proteína en condiciones desnaturalizantes y reductoras seguida por el replegamiento y la reoxidación de los polipéptidos para formar homodímeros y heterodímeros. La recuperación y ensamblaje de proteínas expresadas en células bacterianas se divulga más adelante.

Las células de mamífero cultivadas son huéspedes adecuados descritos en la presente memoria. Los procedimientos para introducir ADN exógeno en células huésped de mamífero incluyen transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler y col., Cell 14: 725, 1978; Corsaro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7: 603, 1981; Graham y Van der Eb, Virology 52: 456, 1973), electroporación (Neumann y col., EMBO J. 1: 841-845, 1982), transfección 50 mediada por DEAE-dextrano (Ausubel y col., *ibid.*) y transfección mediada por liposoma (Felgner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 84: 7413-7, 1987; Mackey y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85: 8027-31, 1988; Hawley-Nelson y col., Focus 15: 73, 1993; Ciccarone y col., Focus 15: 80, 1993). La producción de polipéptidos recombinantes en células de mamífero cultivadas se divulga por, por ejemplo, Levinson y col., Patente de Estados Unidos Nº 4.713.339; Hagen y col., Patente de Estados Unidos Nº 4.784.950; Palmiter y col., Patente de 55 Estados Unidos Nº 4.579.821; y Ringold, Patente de Estados Unidos Nº 4.656.134. Las células de mamífero cultivadas adecuadas incluyen las líneas de células COS-1 (ATCC Nº CRL 1650), COS-7 (ATCC Nº CRL 1651), BHK (ATCC Nº CRL 1632), BHK 570 (ATCC Nº CRL 10314), 293 (ATCC Nº CRL 1573; Graham y col., J. Gen. Virol. 36: 59-72, 1977) y de ovario de hámster chino (por ejemplo CHO-K1; ATCC Nº CCL 61). En la técnica se conocen líneas celulares adecuadas adicionales y están disponibles en depósitos públicos tales como la Colección 60 Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland. Los promotores de transcripción fuertes incluyen promotores de SV-40 o citomegalovirus. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 4.956.288. Otros promotores adecuados incluyen los de los genes de metalotioneína (Patentes de Estados Unidos Nº 4.579.821 y 4.601.978) y el promotor tardío principal de adenovirus. Los vectores de expresión para su uso en células de mamífero incluyen

pZP-1 y pZP-9, que se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD Estados Unidos con los números de acceso 98669 y 98668, respectivamente.

La selección de fármaco se usa generalmente para seleccionar células de mamífero cultivadas en las que se ha insertado ADN extraño. Tales células se denominan comúnmente "transfectantes". Las células que se han cultivado

5 en presencia de un agente selectivo y que son capaces de pasar el gen de interés a su progenie se denominan "transfectantes estables". Un marcador seleccionable ilustrativo es un gen que codifica resistencia al antibiótico neomicina. La selección se lleva a cabo en presencia de un fármaco de tipo neomicina, tal como G-418 o similares. También se pueden usar sistemas de selección para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, un procedimiento denominado "amplificación". La amplificación se lleva a cabo cultivando transfectantes en presencia 10 de un nivel bajo del agente selectivo y después aumentando la cantidad de agente selectivo para seleccionar células que producen niveles elevados de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionable amplificable de forma ilustrativa es dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia a metotrexato. También se pueden usar otros genes de resistencia a fármaco (por ejemplo, resistencia a higromicina, resistencia a multifármaco, puromicina acetiltransferasa). Los marcadores alternativos que introducen un fenotipo alterado, tales como proteína fluorescente 15 verde o proteínas de superficie celular tales como CD4, CD8, CMH de Clase I, fosfatasa alcalina placentaria se pueden usar para separar células transfectadas de células no transfectadas mediante medios tales como separación de FACS o tecnología de separación por perlas magnéticas.

También se pueden usar otras células eucariotas superiores como huéspedes, incluyendo células de insectos, 20 células de plantas y células de aves. El uso de *Agrobacterium rhizogenes* como un vector para expresar genes en células de plantas lo han llevado a cabo Sinkar y col., J. Biosci. (Bangalore) 11: 47-58, 1987. La transformación de células de insectos y la producción de polipéptidos extraños en las mismas lo divulan Guarino y col., Patente de Estados Unidos Nº 5.162.222 y publicación OMPI WO 94/06463.

Células de insectos se pueden infectar con baculovirus recombinante, obtenido comúnmente a partir de virus de 25 poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV). Véase, King y Possee, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Londres, Chapman & Hall; O'Reilly y col., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, Nueva York, Oxford University Press., 1994; y Richardson, Ed., Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa, NJ, 1995. Baculovirus recombinante también se puede producir a través del uso de un sistema basado en transposición descrito por Luckow y col. (J. Virol. 67: 4566-4579, 1993). Este sistema que usa vectores de transferencia, está disponible en el mercado en forma de kit (kit Bac-to-Bac<sup>TM</sup>; Life

30 Technologies, Rockville, MD). El vector de transferencia (por ejemplo, pFastBac1<sup>TM</sup>; Life Technologies) contiene un transposición Tn7 para mover el ADN que codifica la proteína de interés a un genoma de baculovirus mantenido en *E. coli* como un plásmido grande denominado un "bácmido". Véase, Hill-Perkins y Possee, J. Gen. Virol. 71: 971-976, 1990; Bonning y col., J. Gen. Virol. 75: 1551-1556, 1994; y Chazenbalk y Rapoport, J. Biol. Chem. 270: 1543-1549,

35 1995. Adicionalmente, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión en fase con ADN que codifica una ampliación polipeptídica o etiqueta de afinidad como se ha divulgado anteriormente. Mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica, un vector de transferencia que contiene una secuencia codificante de zvegf3 se transforma en células huésped de *E. coli* y las células se exploran para bácmidos que contienen un gen lacZ interrumpido indicativo de baculovirus recombinante. El ADN de bácmido que contiene el genoma de baculovirus recombinante se aísla, usando técnicas comunes y se usa para transfectar células de *Spodoptera frugiperda*, tales como células Sf9. 40 Virus recombinante que expresa proteína de zvegf3 se produce posteriormente. Las reservas virales recombinantes se preparan mediante procedimientos usados comúnmente en la técnica.

Para producción de proteína, el virus recombinante se usa para infectar células huésped, normalmente una línea celular obtenida a partir del gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (por ejemplo, células Sf9 o Sf21) o *Trichoplusia ni* (por ejemplo, células High Five<sup>TM</sup>; Invitrogen, Carlsbad, CA). Véase, en general, Glick y Pasternak, Molecular

45 Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, ASM Press, Washington, D.C., 1994. Véase también, Patente de Estados Unidos Nº 5.300.435. Se usa medio sin suero para cultivar y mantener las células. Las formulaciones de medios adecuadas se conocen en la técnica y se pueden obtener a partir de proveedores comerciales. Las células se cultivan a partir de una densidad de inoculación de aproximadamente  $2-5 \times 10^5$  hasta una densidad de  $1-2 \times 10^6$  células, momento en el cual se añade una reserva viral recombinante a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 a 10, más normalmente cerca de 3. Los procedimientos usados se describen de forma general en manuales de laboratorio disponibles (por ejemplo, King y Possee, *ibid.*; O'Reilly y col., *ibid.*; Richardson, *ibid.*).

En la presente memoria también se describen células fúngicas, incluyendo células de levadura. Las especies de levadura de interés particular a este respecto incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*. Los procedimientos para transformar células de *S. cerevisiae* con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de las mismas se divulan por, por ejemplo, Kawasaki, Patente de Estados Unidos Nº 4.599.311; Kawasaki y col., Patente de Estados Unidos Nº 4.931.373; Brake, Patente de Estados Unidos Nº 4.870.008; Welch y col., Patente de Estados Unidos Nº 5.037.743; y Murray y col., Patente de Estados Unidos Nº 4.845.075. Las células transformadas se seleccionan mediante fenotipo determinado por el marcador seleccionable, comúnmente resistencia a fármaco o la capacidad de crecer en ausencia de un nutriente particular (por ejemplo, leucina). Un sistema de vector ilustrativo para su uso en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema de vector *POT1* divulgado por Kawasaki y col. (Patente de Estados Unidos Nº 4.931.373), que permite que células transformadas se

seleccionen mediante cultivo en medio que contiene glucosa. Los promotores y terminadores adecuados para su uso en levadura incluyen los de los genes de enzimas glicolíticas (véase, por ejemplo, Kawasaki, Patente de Estados Unidos Nº 4.599.311; Kingsman y col., Patente de Estados Unidos Nº 4.615.974; y Bitter, Patente de Estados Unidos Nº 4.977.092) y genes de alcohol deshidrogenasa. Véanse también las Patentes de Estados Unidos

5 Nº 4.990.446; 5.063.154; 5.139.936 y 4.661.454. Los sistemas de transformación para otras levaduras, incluyendo *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guillermondi* y *Candida maltosa* se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Gleeson y col., J. Gen. Microbiol. 132: 3459-3465, 1986; Cregg, Patente de Estados Unidos Nº 4.882.279; y Raymond y col., Yeast 14, 11-23, 1998. Las células de Aspergillus se pueden usar de acuerdo con los 10 procedimientos de McKnight y col., Patente de Estados Unidos Nº 4.935.349. Los procedimientos para transformar *Acremonium chrysogenum* los divulgó Sumino y col., Patente de Estados Unidos 5.162.228. Los procedimientos para transformar Neurospora los divulgó Lambowitz, Patente de Estados Unidos Nº 4.486.533. La producción de proteínas recombinantes en *Pichia methanolica* se divulga en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.716.808, 5.736.383, 5.854.039 y 5.888.768.

15 Las células huésped procariotas, incluyendo cepas de la bacteria *Escherichia coli*, *Bacillus* y otros géneros también son células huésped útiles como se describe en la presente memoria. Las técnicas para transformar estos huéspedes y expresar secuencias de ADN extraño clonadas en las mismas se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y col., *ibid.*). Cuando se expresa un polipéptido zvegf3 en bacterias tales como *E. coli*, el polipéptido se puede conservar en el citoplasma, normalmente como gránulos insolubles o se puede dirigir al espacio periplásmico mediante una secuencia de secreción bacteriana. En el primer caso, las células se lisan y los gránulos se recuperan y desnaturan usando, por ejemplo, isotiocianato de guanidina o urea. El polipéptido desnaturizado posteriormente se puede plegar nuevamente y dimerizar diluyendo el desnaturizante, tal como mediante diálsis frente a una solución de urea y una combinación de glutatión reducido y oxidado, seguido por diálsis frente a una solución salina tamponada. En la alternativa, la proteína se puede recuperar a partir del 20 citoplasma en forma soluble y aislarla sin el uso de desnaturizantes. La proteína se recupera a partir de la célula como un extracto acuoso en, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato. Para capturar la proteína de interés, el extracto se aplica directamente a un medio cromatográfico, tal como un anticuerpo inmovilizado o columna de heparina-Sefarosa. Los polipéptidos secretados se pueden recuperar a partir del espacio periplásmico en una 25 forma soluble y funcional alterada las células (mediante, por ejemplo, sonicación o choque osmótico) para liberar el contenido del espacio periplásmico y recuperar la proteína, obviando de ese modo la necesidad de desnaturización y replegamiento.

30 La producción de proteínas de fusión de zvegf3 en células huésped procariotas es de interés particular. Una proteína de fusión de este tipo ilustrativa comprende un polipéptido zvegf3 fusionado a una proteína de unión a maltosa. Tales fusiones pueden comprender además secuencias adicionales, tales como polihistidina para proporcionar 35 purificación por afinidad de la fusión de polipéptido. Un sitio de escisión enzimática (por ejemplo, un sitio de escisión de trombina) también se puede incluir para permitir la separación de componentes zvegf3 y no zvegf3 de la fusión.

35 Células huésped transformadas o transfectadas se cultivan de acuerdo con procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes necesarios para el crecimiento de las células huésped elegidas. En la técnica se conoce diversos medios adecuados, incluyendo medio definido y medio complejo, y estos 40 incluyen en general una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Los medios pueden también contener componentes tales como factores del crecimiento o suero, según sea necesario. El medio de cultivo generalmente seleccionará células que contienen el ADN añadido exógenamente mediante, por ejemplo, selección de fármaco o deficiencia en un nutriente esencial que se complementa mediante el marcador seleccionable portado en el vector de expresión o cotransfектado en la célula huésped. Por ejemplo, 45 células de *P. methanolica* se cultivan en un medio que comprende fuentes adecuadas de carbono, nitrógeno y nutrientes trazas a una temperatura de aproximadamente 25 °C a 35 °C. Los cultivos líquidos se proveen de aireación suficiente mediante medios convencionales, tales como agitación de matraces pequeños o inyección de fermentadores.

50 Los polipéptidos zvegf3 o fragmentos de los mismos también se pueden preparar a través de síntesis química de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo síntesis en fase sólida exclusiva, procedimientos de fase sólida parcial, condensación de fragmentos o síntesis de solución clásica. Véase, por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963; Stewart y col., Solid Phase Peptide Synthesis (2<sup>a</sup> edición), Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1984; Bayer y Rapp, Chem. Pept. Prot 3: 3, 1986; y Atherton y col., Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1989.

55 Complejos no covalentes que comprenden un polipéptido zvegf3 se pueden preparar incubando un polipéptido zvegf3 y un segundo polipéptido (por ejemplo, un polipéptido zvegf3 u otro péptido de la familia PDGF/VEGF) a pH cercano al fisiológico. En una reacción típica, los polipéptidos a una concentración de aproximadamente 0,1-0,5 µg/µl se incuban a pH ~ 7,4 en un tampón débil (por ejemplo, tampón fosfato o acetato 0,01 M); se puede incluir cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 0,1 M. A 37 °C la reacción se completa básicamente con 60 4-24 horas. Véase, por ejemplo, Weintraub y col., Endocrinology 101: 225-235, 1997.

Los complejos covalentes también se pueden preparar aislando los polipéptidos componentes deseados y

- combinándolos *in vitro*. Los complejos covalentes que se pueden preparar de esta manera incluyen homodímeros de polipéptido zvegf3, heterodímeros de dos polipéptidos zvegf3 diferentes y heterodímeros de un polipéptido zvegf3 y un polipéptido de otro miembro de la familia de la familia de proteínas de VEGF/PDGF. Los dos polipéptidos se mezclan en condiciones desnaturalizantes y reductoras, seguido por renaturalización de las proteínas mediante eliminación de los desnaturalizantes. La eliminación se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo, diálisis o cromatografía de exclusión por tamaño para proporcionar intercambio de tampón. Cuando se combinan dos polipéptidos diferentes las proteínas renaturalizadas resultantes pueden formar homodímeros de los componentes individuales así como también heterodímeros de los dos componentes polipeptídicos. Véase, Cao y col., J. Biol. Chem. 271: 3154-3162, 1996.
- 10 Dependiendo del uso pretendido, los polipéptidos y proteínas descritos en la presente memoria se pueden purificar hasta ≥ 80 % de pureza, hasta ≥ 90 % de pureza, hasta ≥ 95 % de pureza o hasta un estado farmacéuticamente puro, que es más del 99,9 % puro con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos y no poseen agentes infecciosos ni pirógenos.
- 15 Las proteínas de zvegf3 recombinantes expresadas (incluyendo polipéptidos químéricos y proteínas multiméricas) se purifican mediante procedimientos de purificación de proteína convencionales, normalmente mediante una combinación de técnicas cromatográficas. Véase, en general, Affinity Chromatography: Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia, 1988; y Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, Nueva York, 1994. Las proteínas que comprenden una etiqueta de afinidad de polihistidina (normalmente aproximadamente 6 restos de histidina) se purifican mediante cromatografía de afinidad en una resina de quelato de níquel. Véase, por ejemplo, Houchuli y col., BiolTechnol. 6: 1321-1325, 1988. Además, el propio dominio del factor del crecimiento se une a la resina de níquel a pH 7,0-8,0 y fosfato de Na 25 mM, NaCl 0,25 M. La proteína unida se puede eluir con un gradiente de pH descendiente hasta un pH 5,0 o un gradiente de imidazol. Las proteínas que comprenden una etiqueta glu-glu se pueden purificar mediante cromatografía de afinidad de acuerdo con procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Grussenmeyer y col., *ibid*. Las fusiones de proteína de unión a maltosa se purifican en una columna de amilosa de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Como se ha divulgado con mayor detalle más adelante, la proteína del dominio del factor del crecimiento de zvegf3 se puede purificar usando una combinación de cromatografía en un intercambiador catiónico fuerte seguida por cromatografía de interacción hidrófoba. Cuando la proteína se produce en células BHK, la proteína de unión a factor del crecimiento similar a insulina 4 (IGFBP4) se co-purifica con el zvegf3 en estas condiciones. La purificación adicional se puede obtener usando HPLC de fase inversa, intercambio aniónico o un intercambiador catiónico fuerte de amina cuaternaria a fuerza iónica baja y pH desde 7,0 hasta 9,0 o cromatografía de interacción hidrófoba en una resina de feniléter. También se ha observado que zvegf3 se une a diversas matrices de colorantes (por ejemplo, BLUE1, BLUE 2, ORANGE 1, ORANGE 3 y RED3 de Lexton Scientific, Signal Hill, CA) en PBS a pH 6-8, a partir de lo cual la proteína unida se puede eluir en NaCl 1-2 M en tampón de ácido bórico 20 mM a pH 8,8. La proteína eluída a partir de RED3 se puede pasar sobre RED2 (Lexton Scientific) para eliminar contaminantes restantes.
- 30 Usando procedimientos conocidos en la técnica, las proteínas de zvegf3 se pueden preparar como monómeros o multiméricos; glicosiladas o no glicosiladas, pegiladas o no pegiladas; y pueden o no incluir un resto de aminoácido metionina inicial.
- 35 También se describen en la presente memoria polipéptidos que comprenden una parte que porta epítopo de una proteína como se muestra en SEC ID Nº: 2. Un "epítopo" es una región de una proteína a la cual se puede unir un anticuerpo. Véase, por ejemplo, Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 81: 3998-4002, 1984. Los epítopos pueden ser lineales o conformacionales, estando este último compuesto de regiones discontinuas de la proteína que forman un epítopo tras el plegamiento de la proteína. Los epítopos lineales generalmente tienen al menos 6 restos de aminoácidos de longitud. Los péptidos sintéticos relativamente cortos que mimetizan parte de una secuencia de proteína son de forma rutinaria capaces de provocar un antisero que reacciona con la proteína parcialmente mimetizada. Véase, Sutcliffe y col., Science 219: 660-666, 1983. Los anticuerpos que reconocen epítopos cortos lineales son particularmente útiles en aplicaciones analíticas y de diagnóstico que emplean proteínas desnaturalizadas, tales como transferencia de Western (Tobin, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 76: 4350-4356, 1979). Los anticuerpos frente a péptidos cortos también pueden reconocer proteínas en conformación nativa y por tanto serán útiles para supervisar la expresión de proteína y el aislamiento de proteína y para detectar proteínas de zvegf3 en solución, tal como mediante ELISA o en estudios de inmunoprecipitación.
- 40 Los polipéptidos antigenicos que portan epítopo descritos en la presente memoria son útiles para desarrollar anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, que se unen específicamente a una proteína de zvegf3. Los polipéptidos antigenicos que portan epítopo contienen una secuencia de al menos seis, con frecuencia al menos nueve, con mayor frecuencia de 15 a 30 restos de aminoácidos contiguos de una proteína de zvegf3 (por ejemplo, SEC ID Nº: 2). Los polipéptidos que comprenden una parte más larga de una proteína de zvegf3, es decir, de 30 a 50 restos hasta la secuencia completa están incluidos. Se prefiere que la secuencia de aminoácidos del polipéptido que porta epítopo se seleccione para proporcionar solubilidad sustancial en disolventes acuosos, es decir la secuencia incluye restos relativamente hidrófilos y los restos hidrófobos se evitan de forma sustancial. Tales regiones incluyen los restos 43-48, 96-101, 97-102, 260-265 y 330-335 de SEC ID Nº: 2. Como se ha indicado anteriormente, se prefieren de forma general péptidos más largos como inmunógenos, tales como un péptido que comprende restos 80-104, 299-314 y 299-326 de SEC ID Nº: 2. El último péptido se puede preparar con un resto cys

N-terminal adicional para facilitar el acoplamiento.

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno, tales como F(ab')<sub>2</sub> y fragmentos proteolíticos de Fab. Los anticuerpos o fragmentos modificados por ingeniería genética intactos, tales

5 como anticuerpos químicos, fragmentos Fv, anticuerpos de cadena sencilla y similares, así como también péptidos y polipéptidos de unión a antígeno sintéticos, también están incluidos. Los anticuerpos no humanos se pueden humanizar insertando CDR no humanas en regiones flanqueantes y constantes humanas o incorporando los dominios variables no humanos completos (opcionalmente "cubriendolos" con una superficie similar a humano mediante el reemplazo de restos expuestos, donde el resultado es un anticuerpo "revestido"). En algunos casos, los 10 anticuerpos humanizados pueden conservar restos no humanos dentro de los dominios de región flanqueante variable humanos para potenciar características de unión apropiadas. A través de la humanización de los anticuerpos, se puede aumentar la semivida biológica y se reduce el potencial de reacciones inmunes adversas tras la administración a seres humanos. Los anticuerpos monoclonales también se pueden producir en ratones que se han alterado genéticamente para producir anticuerpos que tienen una estructura humana.

15 Los procedimientos para preparar y aislar anticuerpos policlonales y monoclonales se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Cooligan, y col. (eds.), Current Protocols in Immunology, National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor, NY, 1989; y Hurrell, J. G. R. (ed.), Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Inc., Boca Ratón, FL, 1982. Como sería evidente para un experto en la técnica, los anticuerpos policlonales 20 se pueden generar a partir de la inoculación de diversos animales de sangre caliente tales como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones y ratas con un polipéptido zvegf3 o un fragmento del mismo. La inmunogenicidad de un polipéptido zvegf3 se puede aumentar a través del uso de un adyuvante, tal como alumbre (hidróxido de aluminio) o adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para inmunización 25 también incluyen polipéptidos de fusión, tales como fusiones de zvegf3 o una parte del mismo con un polipéptido de inmunoglobulina o con proteína de unión a maltosa. Si la parte polipeptídica es "similar a hapteno", tal parte se puede unir o enlazar de forma provechosa a un transportador macromolecular (tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica bovina (ABS) o toxoide tetánico) para inmunización.

Las técnicas alternativas para generar o seleccionar anticuerpos incluyen exposición *in vitro* de linfocitos a proteína o péptido zvegf3 y selección de bibliotecas de presentación de anticuerpos en fago o vectores similares (por ejemplo, 30 a través del uso de proteína o péptido de zvegf3 marcado o inmovilizado). Las técnicas para crear y explorar tales bibliotecas de presentación de péptidos aleatorias se conocen en la técnica (Ladner y col., Patente de Estados Unidos Nº 5.223.409; Ladner y col., Patente de Estados Unidos Nº 4.946.778; Ladner y col., Patente de Estados Unidos Nº 5.403.484 y Ladner y col., Patente de Estados Unidos Nº 5.571.698) y las bibliotecas de presentación de péptido aleatorias y los kits para explorar tales bibliotecas están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Clontech 35 Laboratories (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Las bibliotecas de presentación de péptidos aleatorias se pueden explorar usando las secuencias de zvegf3 divulgadas en la presente memoria para identificar proteínas que se unen a zvegf3. Estas "proteínas de unión", que interactúan con polipéptidos zvegf3, se pueden usar para etiquetar células o para aislar polipéptidos homólogos mediante purificación por afinidad o las mismas se pueden conjugar directamente 40 o indirectamente a fármacos, toxinas, radionúclidos y similares. Estas proteínas de unión también se pueden usar en procedimientos analíticos, tal como para explorar biblioteca de expresión y actividad neutralizante; dentro de ensayos de diagnóstico, tal como para determinar niveles de polipéptidos en circulación; para detectar o cuantificar polipéptidos solubles como marcadores de patología o enfermedad subyacente; y como antagonistas de zvegf3 para bloquear la unión de zvegf3 y la transducción de señal *in vitro* e *in vivo*.

45 Se determina que los anticuerpos se unen específicamente si los mismos se unen a un polipéptido, péptido o epítopo de zvegf3 con una afinidad de al menos 10 veces mayor que la afinidad de unión a la proteína o polipéptido de control (no zvegf3). A este respecto, un "polipéptido no zvegf3" incluye las moléculas relacionadas VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF, PDGF-A y PDGF-B, pero excluye los polipéptidos zvegf3 de especies no humanas. Debido al nivel elevado de la identidad de secuencia de aminoácidos esperado entre ortólogos de zvegf3, los 50 anticuerpos específicos para zvegf3 humano también pueden unirse a zvegf3 de otras especies. La afinidad de unión de un anticuerpo la puede determinar fácilmente un experto en la técnica, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard (Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949). Los procedimientos para explorar y aislar anticuerpos específicos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Paul (ed.), Fundamental Immunology, Raven Press, 1993; Getzoff y col., Adv. in Immunol. 43: 1-98, 1988; Goding, J.W. (ed.), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Ltd., 1996; Benjamin y col., Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984.

60 Se pueden usar diversos ensayos conocidos por parte de los expertos en la técnica para detectar anticuerpos que se unen específicamente a proteínas o péptidos de zvegf3. Los ensayos ilustrativos se describen en detalle en Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Los ejemplos ilustrativos de tales ensayos incluyen: inmunolectroforesis simultánea, radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, ensayo de inmuonabsorción ligado a enzima (ELISA), ensayo de transferencia puntual o de transferencia de Western, ensayo de inhibición o competición y ensayo de sándwich. Adicionalmente, los anticuerpos se pueden explorar para determinar unión a proteína o polipéptido de zvegf3 de tipo silvestre frente a

mutante.

Los anticuerpos frente a zvegf3 se pueden usar para etiquetar células que expresan zvegf3; para aislar zvegf3 mediante purificación por afinidad; para ensayos de diagnóstico para determinar niveles en circulación de polipéptidos zvegf3; para detectar o cuantificar zvegf3 soluble como un marcador de patología o enfermedad

5 subyacente; en procedimientos analíticos que emplean FACS; para explorar bibliotecas de expresión; para generar anticuerpos antiidiotípicos; y como anticuerpos neutralizantes o como antagonistas para bloquear la actividad de zvegf3 *in vitro* e *in vivo*. Las etiquetas o marcas directas adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares; las etiquetas o marcas indirectas pueden presentar el uso de biotina-avidina u otros pares complemento/anticomplemento como intermediarios. Los anticuerpos también se pueden conjugar directamente o indirectamente a fármacos, toxinas, radionúclidos y similares y estos conjugados usarse para diagnóstico *in vivo* o aplicaciones terapéuticas. Además, los anticuerpos frente a zvegf3 o fragmentos del mismo se pueden usar *in vitro* para detectar zvegf3 desnaturalizado o fragmentos del mismo en ensayos, por ejemplo, transferencias de Western u otros ensayos conocidos en la técnica. Los anticuerpos también se pueden usar para dirigirse a un resto terapéutico 10 o de diagnóstico unido a células que expresan zvegf3 o receptores de zvegf3.

15 Para algunas aplicaciones (por ejemplo, determinadas aplicaciones terapéuticas) se prefiere el uso de anticuerpos neutralizantes. Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo neutralizante" indica un anticuerpo que inhibe al menos el 50 % de la actividad biológica del antígeno afín cuando el anticuerpo se añade a un acceso molar de 1000 veces. Los expertos en la técnica reconocerán que algunas veces es deseable una mayor actividad neutralizante y los anticuerpos que proporcionan el 50 % de la inhibición a un acceso molar de 100 veces o 10 veces 20 se pueden usar de forma provechosa.

25 La actividad de proteínas de zvegf3 y antagonistas de las mismas se puede medir *in vitro* usando células cultivadas o *in vivo* mediante la administración de moléculas descritas en la presente memoria a un modelo animal apropiado. Las células diana para su uso en ensayos de actividad de zvegf3 incluyen células vasculares (especialmente células endoteliales y células de músculo liso), células hematopoyéticas (mieloides y linfoides), células hepáticas (incluyendo hepatocitos, células endoteliales fenestradas, células de Kupffer y células Ito), fibroblastos (incluyendo fibroblastos dérmicos humanos y fibroblastos de pulmón), células de neurita (incluyendo astrocitos, células gliales, células dendríticas y células PC-12), células de Schwann, células de pulmón fetal, sinoviocitos articulares, pericitos, condrocitos, oligodendrocitos, osteoblastos y otras células que expresan receptores de PDGF alfa.

30 Las proteínas de zvegf3 se pueden analizar para actividad de unión a receptor mediante diversos procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo ensayos de competición de receptor (Bowen-Pope y Ross, Methods Enzymol. 109: 69-100, 1985), uso de receptores solubles y uso de receptores producidos como proteínas de fusión de IgG (Patente de Estados Unidos N° 5.750.375). Los ensayos de unión a receptor se pueden llevar a cabo en líneas celulares que contienen receptores de superficie celular conocidos para evaluación. Los receptores pueden 35 estar presentes de forma natural en la célula o pueden ser receptores recombinantes expresados mediante células modificadas por ingeniería genética. Los tipos celulares que son capaces de unirse a zvegf3 se pueden identificar a través del uso de conjugados de zvegf3-toxina, tales como conjugados de una proteína de zvegf3 y saporina. La unión del conjugado zvegf3-toxina mediante células, en cultivo de tejido, en cultivo de órganos o en entornos *in vivo* permitirá la incorporación del conjugado en la célula. Una vez dentro de la célula la saporina tiene un efecto tóxico 40 sobre la célula, destruyéndola de ese modo. Esta actividad se puede usar para identificar tipos de células que son capaces de unirse a e internalizar zvegf3. Además de permitir la identificación de tipos de células sensibles, los conjugados con toxina se pueden usar en estudios *in vivo* para identificar órganos y tejidos en los que zvegf3 tiene una actividad biológica buscando una patología dentro del animal a continuación de la inyección del conjugado.

45 La actividad de proteínas de zvegf3 se puede medir *in vitro* usando células cultivadas. La actividad mitogénica se puede medir usando ensayos conocidos, incluyendo ensayos de incorporación de <sup>3</sup>H-timidina (divulgado por, por ejemplo, Raines y Ross, Methods Enzymol. 109: 749-773, 1985 y Wahl y col., Mol. Cell Biol. 8: 5016-5025, 1988), ensayos de incorporación de colorante (como se divulga por, por ejemplo, Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, 1983 y Raz y col., Acta Trop. 68: 139-147, 1997) o recuentos celulares. Los ensayos de mitogénesis adecuados miden la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en (1) cultivos con una confluencia del 20 % para buscar la capacidad de 50 proteínas de zvegf3 de estimular adicionalmente células en proliferación y (2) células quiescentes mantenidas en confluencia durante 48 horas para buscar la capacidad de proteínas de zvegf3 de superar la inhibición de crecimiento inducida por contacto. Los ensayos de incorporación de colorante adecuados incluyen medición de la incorporación del colorante azul Alamar (Raz y col., *ibid.*) en células diana. Véase también, Gospodarowicz y col., J. Cell. Biol. 70: 395-405, 1976; Ewton y Florini, Endocrinol. 106: 577-583, 1980; y Gospodarowicz y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 86: 7311-7315, 1989. La diferenciación celular se puede ensayar usando células precursoras adecuadas que se pueden inducir para diferenciarse en un fenotipo más maduro. Por ejemplo, las células endoteliales y las células hematopoyéticas se obtienen a partir de una célula ancestral común, el hemangioblasto (Choi y col., Development 125: 725-732, 1998). Las células madre mesenquimales también se 55 pueden usar para medir la capacidad de la proteína de zvegf3 de estimular la diferenciación en osteoblastos. La diferenciación está indicada por la expresión de osteocalcina, la capacidad de las células de mineralizar y la expresión de fosfatasa alcalina, las cuales se pueden medir mediante procedimientos de rutina conocidos en la técnica. Los efectos de las proteínas de zvegf3 sobre el crecimiento de células tumorales y metástasis se pueden 60

analizar usando el modelo de carcinoma de pulmón de Lewis, por ejemplo como lo describe Cao y col., *J. Exp. Med.* 182: 2069-2077, 1995. La actividad de las proteínas de zvegf3 sobre células de origen neuronal se puede analizar usando ensayos que miden los efectos sobre el crecimiento de neurita.

5 La actividad de zvegf3 también se puede detectar usando ensayos diseñados para medir la producción inducida por zvegf3 de uno o más factores del crecimiento adicionales u otras macromoléculas. Tales ensayos incluyen aquellos para determinar la presencia del factor del crecimiento de hepatocitos (HGF), factor del crecimiento epidérmico (EGF), factor del crecimiento transformante alfa (TGF $\alpha$ ), interleuquina-6 (IL-6), VEGF, factor del crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF) y angiogenina. Los ensayos adecuados incluyen ensayos de mitogénesis que usan células diana sensibles a la macromolécula de interés, ensayos de unión a receptor, ensayos de unión por competición, 10 ensayos inmunológicos (por ejemplo ELISA) y otros formatos conocidos en la técnica. La secreción de metaloproteasa se mide a partir de fibroblastos dérmicos, sinoviocitos y condrocitos humanos primarios tratados. Los niveles relativos de colagenasa, gelatinasa y estromelisina producidos como respuesta al cultivo en presencia de una proteína de zvegf3 se mide usando geles de zimograma (Loita y Stetler-Stevenson, *Cancer Biology* 1: 96-106, 1990). La síntesis de procolágeno/collágeno mediante fibroblastos dérmicos y condrocitos como respuesta a una 15 proteína de ensayo se mide usando incorporación de  $^3$ H-prolina en colágeno secretado naciente. El colágeno marcado con  $^3$ H se visualiza mediante SDS-PAGE seguido por autorradiografía (Unemori y Amento, *J. Biol. Chem.* 265: 10681-10685, 1990). La secreción de glicosaminoglicano (GAG) a partir de fibroblastos dérmicos y condrocitos se mide usando un ensayo de unión a colorante de azul de 1,9-dimetilmetileno (Famdale y col., *Biochim. Biophys. Acta* 883: 173-177, 1986). Los ensayos de colágeno y GAG también se llevan a cabo en presencia de IL-1 $\beta$  o TGF- $\beta$  20 para examinar la capacidad de proteína de zvegf3 de modificar las respuestas establecidas a estas citoquinas.

Los ensayos de activación de monocitos se llevan a cabo (1) para buscar la capacidad de proteína de zvegf3 de estimular adicionalmente la activación de monocitos y (2) para examinar la capacidad de las proteínas de zvegf3 de modular la activación de monocitos inducida por unión o inducida por endotoxina (Fuhlbrigge y col., *J. Immunol.* 138: 3799-3802, 1987). Los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  producidos como respuesta a la activación se miden mediante 25 ELISA. (Biosource, Inc. Camarillo, CA). Las células monocíticas/macrófagos, en virtud de CD14 (receptor de LPS), son exquisitamente sensibles a endotoxina y las proteínas con niveles moderados de actividad similar a endotoxina activarán estas células.

La actividad hematopoyética de proteínas de zvegf3 se puede ensayar en diversas células hematopoyéticas en cultivo. Los ensayos adecuados incluyen ensayos de colonias de leucocitos de médula ósea primaria o de sangre 30 periférica y ensayos de colonias restringidas por linaje de etapa tardía, que se conocen en la técnica (por ejemplo, Holly y col., Publicación OMPI WO 95/21920). Células de médula sembradas en placas en un medio semisólido adecuado (por ejemplo, metilcelulosa al 50 % que contiene suero fetal bovino al 15 %, albúmina sérica bovina al 10 % y mezcla de antibiótico PSN al 0,6 %) se incuban en presencia de polipéptido de ensayo, después se examinan microscópicamente para formación de colonias. Se usan factores hematopoyéticos conocidos como controles. La 35 actividad mitogénica de polipéptido zvegf3 sobre líneas de células hematopoyéticas se puede medir usando ensayos de incorporación de  $^3$ H-timidina, ensayos de incorporación de colorante o recuentos celulares (Raines y Ross, *Methods Enzymol.* 109: 749-773, 1985 y Foster y col., Patente de Estados Unidos Nº 5.641.655). Por ejemplo, las células se cultivan en placas de microtitulación multipicollo. Se añaden las muestras de ensayo y  $^3$ H-timidina y las células se incuban durante una noche a 37 °C. El contenido de los pocillos se transfiere a filtros, se seca y se 40 recuenta para determinar la incorporación del marcador. La proliferación celular también se puede medir usando un ensayo colorimétrico basándose en la degradación metabólica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Mosman, *ibid.*). En resumen, una solución de MTT se añade a 100  $\mu$ l de células de ensayo y las células se incuban a 37 °C. Después de 4 horas, se añaden 200 ml de HCl 0,04 N en isopropanol, la solución se mezcla y se mide la absorbancia de la muestra a 570 nm.

45 La migración celular se ensaya esencialmente como divulgán Kähler y col. (*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17: 932-939, 1997). Una proteína se considera que es quimiotáctica si induce la migración de células desde un área de baja concentración de proteínas hasta un área de alta concentración de proteínas. El ensayo se lleva a cabo usando cámaras de Boyden modificadas con una membrana de poliestireno separando las dos cámaras (Transwell; Corning Costar Corp.). La muestra de ensayo, diluida en medio que contiene BSA al 1 %, 50 se añade a la cámara inferior de una placa de 24 pocillos que contiene Transwells. Posteriormente las células se colocan en el inserto de Transwell que se ha tratado previamente con gelatina al 0,2 %. La migración celular se mide después de 4 horas de incubación a 37 °C. Las células que no migran se eliminan de la parte superior de la membrana Transwell y las células unidas a la cara inferior de la membrana se fijan y tiñen con violeta cristal al 0,1 %. Las células teñidas se extraen posteriormente con ácido acético al 10 % y se mide la absorbancia a 600 nm. 55 Posteriormente se calcula la migración a partir de una curva de calibración estándar.

60 La migración de células de músculo liso (SMC) se puede medir en el ensayo de explante aórtico de Kenagy y col. (*Circulation* 96: 3555-3560, 1997). En un protocolo típico, los explantes se preparan a partir de aortas torácicas de babuino y los medios internos se aíslan y cortan en trozos de 1 mm<sup>2</sup>. Los explantes se colocan en matraces de cultivo de tejido que contienen DMEM complementado con 5  $\mu$ g/ml de transferrina, 6  $\mu$ g/ml de insulina, 1 mg/ml ovoalbúmina y el compuesto de ensayo. El número de células que migran se determina diariamente.

La actividad de adhesión celular se ensaya esencialmente como han divulgado LaFleur y col. (*J. Biol. Chem.* 272:

32798-32803, 1997). En resumen, placas de microtitulación se revisten con la proteína de ensayo, sitios inespecíficos se bloquean con BSA y las células (tal como células de músculo liso, leucocitos o células endoteliales) se siembran en placas a una densidad de aproximadamente  $10^4$  -  $10^5$  células/pocillo. Los pocillos se incuban a 37 °C (normalmente durante aproximadamente 60 minutos), después las células no adherentes se eliminan mediante lavado suave. Las células adheridas se cuantifican mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante tinción con violeta cristal, lisado de las células y determinación de la densidad óptica del lisado). Los pocillos de control se revisten con una proteína adhesiva conocida, tal como fibronectina o vitronectina.

Los ensayos para determinar actividad angiogénica también se conocen en la técnica. Por ejemplo, el efecto de proteína de zvegf3 sobre células endoteliales primordiales en angiogénesis se puede ensayar en el ensayo de angiogénesis de membrana coriolantoidea de pollo (Leung, Science 246: 1306-1309, 1989; Ferrara, Ann. NY Acad. Sci. 752: 246-256, 1995). En resumen, se corta una pequeña ventana en la cáscara de un huevo fertilizado de ocho días de edad y se aplica una sustancia de ensayo a la membrana coriolantoidea. Después de 72 horas, la membrana se examina para determinar neovascularización. Otros ensayos adecuados incluyen microinyección de embriones de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) de fase temprana como lo divulgó Drake y col. (Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 92: 7657-7661, 1995); el modelo de roedor de neovascularización corneal divulgado por Muthukkaruppan y Auerbach (Science 205: 1416-1418, 1979), en el que se inserta una sustancia de ensayo en un bolsillo en la córnea de un ratón endogámico; y el ensayo de la bolsa de mejilla del hámster (Höckel y col., Arch. Surg. 128: 423-429, 1993). La inducción de permeabilidad vascular, que es indicativa de la actividad angiogénica, se mide en ensayos diseñados para detectar fuga de proteína a partir de la vasculatura de un animal de ensayo (por ejemplo, ratón o conejillo de indias) después de la administración de un compuesto de ensayo (Miles y Miles, J. Physiol. 118: 228-257, 1952; Feng y col., J. Exp. Med. 183: 1981-1986, 1996). Los ensayos *in vitro* para determinar actividad angiogénica incluyen el modelo de matriz tridimensional de gel de colágeno (Pepper y col. Biochem. Biophys. Res. Comm. 189: 824-831, 1992 y Ferrara y col., Ann. NY Acad. Sci. 732: 246-256, 1995), que mide la formación de estructuras similares a tubo mediante las células endoteliales microvasculares; y modelos de matrigel

(Grant y col., "Angiogenesis as a component of epithelial-mesenchymal interactions" en Goldberg y Rosen, Epithelial-Mesenchymal Interaction in Cancer, Birkhäuser Verlag, 1995, 235-248; Baatout, Anticancer Research 17: 451-456, 1997), que se usan para determinar efectos sobre la migración celular y la formación de tubos mediante células endoteliales sembradas en matrigel, un extracto de membrana basal con alto contenido de laminina. Los ensayos de angiogénesis se pueden llevar a cabo en presencia y ausencia de VEGF para evaluar los efectos combinatorios posibles. VEGF se puede usar como un control dentro de ensayos *in vivo*.

La actividad de zvegf3 también se puede medir usando ensayos que miden guía y crecimiento de axón. Los ensayos que indican cambios en los patrones de crecimiento de neuronas son de interés particular, por ejemplo aquellos divulgados en Hastings, Publicación OMPI WO 97/29189 y Walter y col., Development 101: 685-96, 1987. Los ensayos para medir los efectos sobre el crecimiento neuronal se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, el ensayo C (por ejemplo, Raper y Kapfhammer, Neuron 4: 21-9, 1990 y Luo y col., Cell 75: 217-27, 1993) se puede usar para determinar la actividad colapsante de zvegf3 sobre neuronas en crecimiento. También se conocen otros procedimientos que pueden evaluar los efectos inducidos por zvegf3 sobre la ampliación de neurita. Véase, Goodman, Annu. Rev. Neurosci. 19: 341-77, 1996. Los medios condicionados a partir de células que expresan una proteína de zvegf3, un agonista de zvegf3 o un antagonista de zvegf3 o agregados de tales células, se pueden colocar en una matriz de gel cerca de células neuronales adecuadas, tales como ganglios de la raíz dorsal (DRG) o explantes de ganglios simpáticos, que se han co-cultivado con factor del crecimiento nervioso. En comparación con las células de control, los cambios inducidos por zvegf3 sobre el crecimiento de neuronas se pueden medir (como se divulgó por, por ejemplo, Messersmith y col., Neuron 14: 949-59, 1995 y Puschel y col., Neuron 14: 941-8, 1995). De igual forma, el crecimiento de neuritas se puede medir usando suspensiones de células neuronales cultivadas en presencia de moléculas descritas en la presente memoria. Véase, por ejemplo, O'Shea y col., Neuron 7: 231-7, 1991 y DeFreitas y col., Neuron 15: 333-43, 1995.

Las actividades biológicas de proteínas de zvegf3 se pueden estudiar en animales no humanos mediante la administración de proteína exógena, mediante expresión de polinucleótidos que codifican zvegf3 y mediante supresión de expresión de zvegf3 endógeno a través de técnicas antisentido o knock-out. Las proteínas de zvegf3 se pueden administrar o expresar individualmente, en combinación con otras proteínas de zvegf3 o en combinación con proteínas no vegf3, incluyendo otros factores del crecimiento (por ejemplo, otros VEGF, PIGF o PDGF). Por ejemplo, una combinación de polipéptidos zvegf3 (por ejemplo, una combinación de zvegf3<sub>15-163</sub>, zvegf3<sub>15-230</sub> y zvegf3<sub>235-345</sub>) se puede administrar a un animal de ensayo o expresarse en el animal. Los animales de ensayo se supervisan para determinar cambios en parámetros tales como signos clínicos, peso corporal, recuentos de células sanguíneas, química clínica, histopatología y similares.

Los efectos de zvegf3 y antagonistas de zvegf3 sobre fibrosis hepática y de riñón se pueden ensayar en modelos animales conocidos, tales como el modelo de ratón db/db divulgado por Cohen y col., Diabetologia 39: 270-274, 1996 y Cohen y col., J. Clin. Invest. 95: 2338-2345, 1995 o modelos de animales transgénicos (Imai y col., Contrib. Nephrol. 107: 205-215, 1994).

60 Los efectos sobre la fibrosis también se pueden ensayar en un modelo de ratón usando bleomicina. El agente de quimioterapia bleomicina es un agente causal conocido de fibrosis pulmonar en seres humanos y puede inducir enfermedad pulmonar intersticial en ratones, incluyendo un aumento en el número de fibroblastos, depósitos de

- colágeno potenciados y remodelación de matriz desregulada. Se administra bleomicina a ratones C57Bl/6 mediante minibomba osmótica durante 1 semana. A continuación se presenta un periodo de inflamación, con toxicidad cutánea comenzando aproximadamente 4-7 días después de la administración de bleomicina y continuando durante aproximadamente una semana, después de lo cual los ratones parecen recuperar la salud. Aproximadamente 3-4 semanas después del final de la administración de bleomicina, los ratones se sacrifican y los pulmones se examinan histológicamente para determinar signos de fibrosis. La valoración se basa en el alcance de lesiones fibróticas y su gravedad. El suero se ensaya para determinar deshidrogenasa láctica, una enzima intracelular que se libera en la circulación tras muerte o lesión celular general. El tejido pulmonar se ensaya para hidroxiprolina como una medición del depósito de colágeno.
- 10 La estimulación del crecimiento colateral coronario se puede medir en modelos animales conocidos, incluyendo un modelo de isquemia de extremidades periféricas e isquemia de extremidades posteriores de conejo y un modelo de isquemia miocárdica crónica de cerdo (Ferrara y col., Endocrine Reviews 18: 4-25, 1997). Las proteínas de zvegf3 se ensayan en presencia y ausencia de VEGF, angiopoyetinas y FGF básico para ensayar efectos combinatorios. Estos modelos se pueden modificar mediante el uso de adenovirus o ADN desnudo para administración génica como se divulga con más detalle más adelante, dando como resultado expresión local de la proteína o proteínas de ensayo.
- 15 La eficacia de los polipéptidos zvegf3 en la promoción de la curación de heridas se puede ensayar en modelos animales. Un modelo de este tipo es el modelo de incisión dérmica lineal de Mustoe y col. (Science 237: 1333, 1987). En un procedimiento típico, se realiza una incisión de 6 cm en la piel dorsal de una rata adulta, y después se cierra con clips para heridas. Las sustancias de ensayo y los controles (en solución, gel o forma de polvo) se aplican antes del cierre primario. La administración con frecuencia estará limitada a una aplicación única, aunque se pueden realizar aplicaciones adicionales en días sucesivos mediante inyección cuidadosa en varios sitios bajo la incisión. La fuerza de ruptura de la herida se evalúa entre 3 y 21 días después de la formación de la herida. En un segundo modelo, se realizan escisiones múltiples pequeñas y de espesor total en la oreja de un conejo. El cartílago de la oreja entablilla la herida, eliminando la variable de contracción de herida de la evaluación del cierre. Se aplican los tratamientos experimentales y los controles. La geometría y anatomía del sitio de la herida permiten la cuantificación fiable de crecimiento celular interior y migración epitelial, así como también análisis cuantitativo de la bioquímica de las heridas (por ejemplo, el contenido de colágeno). Véase Mustoe y col., J. Clin. Invest. 87: 694, 1991. El modelo de oreja de conejo se puede modificar para crear un entorno de herida isquémica, que se parece de forma más cercana a la situación clínica (Ahn y col., Ann. Plast. Surg. 24: 17, 1990). Dentro de un tercer modelo, se evalúa la curación de heridas dérmicas de espesor parcial en cerdos o conejillos de indias (LeGrand y col., Growth Factors 8: 307, 1993). Los tratamientos experimentales se aplican diariamente sobre o por debajo de apófisis. Siete días después de la formación de herida, se determina el espesor del tejido de granulación. Este modelo es particularmente útil para estudios de dosis-respuesta, ya que es más cuantitativo que otros modelos *in vivo* de curación de herida.
- 20 También se puede emplear un modelo de escisión de espesor total. Dentro de este modelo, la epidermis y la dermis se retiran hasta el panículo carnoso en roedores o la grasa subcutánea en cerdos. Los tratamientos experimentales se aplican por vía tópica sobre o debajo de un apófisis y se pueden aplicar diariamente si se desea. La herida se cierra mediante una combinación de contracción y crecimiento interior y proliferación celular. Los puntos finales medibles incluyen tiempo para el cierre de herida, valoración histológica y parámetros bioquímicos de tejido de herida. Los modelos de curación de herida alterada también se conocen en la técnica (por ejemplo, Cromack y col., Surgery 113: 36, 1993; Pierce y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 86: 2229, 1989; Greenhalgh y col., Amer. J. Pathol. 136: 1235, 1990). El retraso o la prolongación del proceso de curación de heridas se puede inducir farmacológicamente mediante tratamiento con esteroides, radiación del sitio de herida o mediante patologías concomitantes (por ejemplo, diabetes). Las incisiones lineales o escisiones de espesor total son las más comunitariamente usadas como la herida experimental. Los puntos finales son como se ha divulgado anteriormente para cada tipo de herida. Se pueden usar implantes subcutáneos para evaluar compuestos que actúan sobre las etapas tempranas de la curación de heridas (Broadley y col., Lab. Invest. 61: 571, 1985; Sprugel y col., Amer. J. Pathol. 129: 601, 1987). Los implantes se preparan en un recipiente poroso y relativamente no inflamatorio (por ejemplo, esponjas de polietileno o implantes de polietrafluoroetileno expandido cargados con colágeno bovino) y se colocan por vía subcutánea en ratones o ratas. El interior del implante no tiene células, produciendo un "espacio de herida" que está bien definido y que es separable del tejido preexistente. Esta disposición permite la evaluación del influjo celular y el tipo de células así como también la medición de vasculogénesis/angiogénesis y producción de matriz extracelular.
- 25 La expresión de proteínas de zvegf3 en animales proporciona modelos para estudio de los efectos biológicos de sobreproducción o inhibición de actividad de proteína *in vivo*. Los polinucleótidos que codifican zvegf3 se pueden introducir en animales de ensayo, tales como ratones, usando vectores virales o ADN desnudo o se pueden producir animales transgénicos. En general, una proteína de zvegf3 se expresa con un péptido secretor. Los péptidos secretores adecuados incluyen el péptido secretor de zvegf3 (por ejemplo, restos 1-14 de SEC ID N°: 2) y péptidos secretores heterólogos. Un péptido secretor heterólogo ilustrativo es el de activador de plasminógeno de tejido humano (t-PA). El péptido secretor t-PA puede modificarse para reducir la escisión proteolítica no deseada como se divulga en la Patente de Estados Unidos N° 5.641.655.
- 30 Las proteínas descritas en la presente memoria se pueden ensayar *in vivo* usando sistemas de administración viral. Los virus ilustrativos incluyen adenovirus, herpesvirus, retrovirus, virus vaccinia y virus adenoasociados (AAV). Para
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

una revisión, véase, Becker y col., *Meth. Cell Biol.* 43: 161-89, 1994; y Douglas y Curiel, *Science & Medicine* 4: 44-53, 1997. El adenovirus (revisado por Becker y col., *Meth. Cell Biol.* 43: 161-89, 1994; y Douglas y Curiel, *Science & Medicine* 4: 44-53, 1997) ofrece varias ventajas. El adenovirus puede (i) alojar insertos de ADN relativamente grandes; (ii) cultivarse a títulos altos; (iii) infectar un rango amplio de tipos de células de mamífero; y (iv) usarse con muchos promotores diferentes incluyendo promotores ubicuos, específicos de tejido y regulables. Debido a que los adenovirus son estables en el torrente sanguíneo, los mismos se pueden administrar mediante inyección intravenosa. Si el sistema de administración adenoviral tiene una supresión de gen E1, el virus no se puede replicar en las células huésped. Sin embargo, el tejido del huésped (por ejemplo, hígado) expresará y procesará (y, si está presente una secuencia señal secretora, secretará) la proteína heteróloga. Las proteínas secretadas entrarán en circulación en el hígado altamente vascularizado y se pueden determinar los efectos sobre el animal infectado. Los vectores adenovirales que contienen diversas supresiones de genes virales se pueden usar en un intento de reducir o eliminar las respuestas inmunes al vector. Tales adenovirus tienen suprimido E1 y además contienen las supresiones de E2A o E4 (Lusky y col., *J. Virol.* 72: 2022-2032, 1998; Raper y col., *Human Gene Therapy* 9: 671-679, 1998). Adicionalmente, la supresión de E2b se ha informado que reduce las respuestas inmunes (Amalfitano, y col., *J. Virol.* 72: 926-933, 1998). La generación de los adenovirus denominados "vacíos" (gutless) en los que todas las unidades de transcripción virales se suprimen es particularmente provechosa para inserción de insertos grandes de ADN heterólogo. Para una revisión véase Yeh y Perricaudet, *FASEB J.* 11: 615-623, 1997. Los vectores retrovirales los divulan, por ejemplo, Anderson y col., Patente de Estados Unidos Nº 5.399.346; Mann y col., *Cell* 33: 153, 1983; Temin y col., Patente de Estados Unidos Nº 4.650.764; Temin y col., Patente de Estados Unidos Nº 4.980.289; Markowitz y col., *J. Virol.* 62: 1120, 1988; Temin y col., Patente de Estados Unidos Nº 5.124.263; Dougherty y col., Publicación OMPI WO 95/07358; y Kuo y col., *Blood* 82: 845, 1993.

En un procedimiento alternativo, se puede introducir un vector mediante transfección mediada por liposoma, una técnica que proporciona determinadas ventajas prácticas, incluyendo la dirección molecular de liposomas a células específicas. La dirección de la transfección a tipos celulares particulares es particularmente provechosa en un tejido con heterogeneidad celular, tal como el páncreas, hígado, riñón y cerebro. Los lípidos se pueden acoplar químicamente a otras moléculas con el fin de dirección. Los péptidos dirigidos (por ejemplo, hormonas o neurotransmisores), proteínas tales como anticuerpos o moléculas no peptídicas se pueden acoplar a liposomas químicamente.

Dentro de otro procedimiento descrito en la presente memoria las células diana se retiran del animal y se introduce ADN como un plásmido de ADN desnudo. Las células transformadas se implantan nuevamente posteriormente en el organismo del animal. Los vectores de ADN desnudo se pueden introducir en las células huésped deseadas mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato de calcio, uso de una pistola génica o uso de un transportador de vector de ADN. Véase, por ejemplo, Wu y col., *J. Biol. Chem.* 267: 963-7, 1992; Wu y col., *J. Biol. Chem.* 263: 14621-4, 1988.

Los ratones modificados por ingeniería genética para expresar el gen de zvegf3, denominados "ratones transgénicos" y los ratones que muestran una ausencia completa de la función del gen de zvegf3, denominados "ratones inactivados (knock out)", también se pueden generar (Snouwaert y col., *Science* 257: 1083, 1992; Lowell y col., *Nature* 366: 740-42, 1993; Capecchi, *Science* 244: 1288-1292, 1989; Palmiter y col., *Ann. Rev. Genet.* 20: 465-499, 1986). Los experimentos de transgénesis se pueden realizar usando ratones normales o ratones con enfermedades genéticas u otros fenotipos alterados. Los ratones transgénicos que sobreexpresan zvegf3, bien de forma ubicua o bajo un promotor específico de tejido o limitado a tejido, se pueden usar para determinar si la sobreexpresión provoca o no un cambio fenotípico. Los promotores adecuados incluyen promotores génicos de metalotioneína, de albúmina (Pinkert y col., *Genes Dev.* 1(3): 268-76, 1987) y de queratinocito K-14 (Vassar y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 86(5): 1563-1567, 1989). El promotor de metalotioneína-1 (MT-1) proporciona expresión en hígado y otros tejidos, conduciendo con frecuencia a niveles elevados de proteína en circulación. La sobreexpresión de un polipéptido zvegf3 de tipo silvestre, fragmento polipeptídico o un mutante del mismo puede alterar procesos celulares normales, dando como resultado un fenotipo que identifica un tejido en el cual la expresión de zvegf3 es funcionalmente pertinente y puede indicar una diana terapéutica para el zvegf3, sus agonistas o antagonistas. Por ejemplo, un ratón transgénico se puede modificar por ingeniería genética para sobreexpresar una secuencia de zvegf3 de longitud completa, lo cual puede dar como resultado un fenotipo que muestra similitud con enfermedades humanas. De forma similar, los ratones inactivados para zvegf3 se pueden usar para determinar si zvegf3 es absolutamente necesario *in vivo*. El fenotipo de ratones inactivados es predictivo de los efectos *in vivo* de los antagonistas de zvegf3. Los ratones inactivados también se pueden usar para estudiar los efectos de proteínas de zvegf3 en modelos de enfermedad, incluyendo, por ejemplo, cáncer, aterosclerosis, artritis reumatoide, isquemia y enfermedad cardiovascular. El ADNc de zvegf3 humano se puede usar para aislar ARNm de zvegf3 murino. ADNc y ADN genómico, como se han divulgado anteriormente, que se usan posteriormente para generar ratones inactivados. Estos ratones se pueden emplear para estudiar el gen de zvegf3 y la proteína codificada por el mismo en un sistema *in vivo* y se pueden usar como modelos *in vivo* para enfermedades humanas correspondientes. Además, los ratones transgénicos que expresan polinucleótidos antisentido de zvegf3 o ribozimas dirigidas frente a zvegf3, descritos en la presente memoria, se pueden usar de forma análoga a los ratones inactivados descritos anteriormente.

La relación funcional entre zvegf3 y ligandos de PDGF se puede investigar a través de experimentos de eliminación

(knockin). Por ejemplo, el gen de PDGF A o PDGF B en un animal se puede reemplazar eliminando un gen de zvegf3 o ADNc en el locus genómico de un ligando de PDGF en células madre embrionarias (ES), que después se usan para generar los ratones knockin, en los cuales la proteína de zvegf3 se expresa mediante el locus genómico de PDGF (reemplazado). Tales ratones knockin se pueden usar para abordar diversas cuestiones, tal como si

- 5 zvegf3 puede sustituir la función de PDGF durante el desarrollo; si zvegf3 tiene funciones únicas; y, usando líneas celulares establecidas a partir de los ratones, el mecanismo de transducción de señal de zvegf3. Véase, por ejemplo, Wang y col., Development 124: 2507-2513, 1997; Zhuang y col., Mol. Cell Biol. 18: 3340-3349, 1998; Geng y col., Cell 97: 767-777, 1999. En una aplicación adicional de esta tecnología, dominios individuales de zvegf3 se pueden suprimir o modificar específicamente mediante eliminación en una secuencia de zvegf3 modificada o una 10 versión de corte y empalme específica de zvegf3, proporcionado de ese modo un modelo transgénico para el estudio de dominios funcionales de la proteína. Véase, por ejemplo, Zhuang y col. (*ibid.*) y Baudoin y col. (Genes Dev. 12: 1202-1216, 1998). En otra aplicación, tipos de tejidos y células que expresan el gen de zvegf3 se pueden identificar mediante silenciamiento de un gen informador sensible (por ejemplo, *LacZ*) dentro del locus de zvegf3. Véase, por ejemplo, Monroe y col., Immunity 11: 201-212, 1999; Zhuang y col., *ibid.*; Geng y col., *ibid.*

- 15 Se puede usar metodología antisentido para inhibir la transcripción del gen de zvegf3 para examinar los efectos de tal inhibición *in vivo*. Los polinucleótidos que son complementarios a un segmento de un polinucleótido que codifica zvegf3 (por ejemplo, un polinucleótido como el expuesto en SEC ID N°: 1) se diseñan para unirse a ARNm que codifica zvegf3 y para inhibir la traducción de tal ARNm. Tales oligonucleótidos antisentido también se pueden usar para inhibir la expresión de genes que codifican el polipéptido zvegf3 en cultivo celular.

- 20 Los expertos en la técnica reconocerán que los ensayos divulgados en la presente memoria se pueden adaptar fácilmente para estudiar la actividad de proteínas de zvegf3, anticuerpos anti-zvegf3 y otros antagonistas, y sustancias de ensayo obtenidas a partir de diversas fuentes.

- 25 Las proteínas de zvegf3 se pueden usar terapéuticamente para estimular el desarrollo o la reparación de tejido o la diferenciación o proliferación celular. Se ha observado que zvegf3 se une a receptor de PDGF alfa y que estimula los procesos celulares mediados por receptor alfa. Por lo tanto, la proteína se puede usar como un agonista del receptor de PDGF alfa. Las aplicaciones posibles podrían incluir, sin limitación: el tratamiento de heridas de piel de espesor total, incluyendo úlceras por estasis venosa y otras heridas crónicas que no sanan, particularmente en casos de curación de herida comprometida debido a diabetes mellitus, enfermedad de tejido conectivo, hábito de fumar, bultos y otras afecciones agravantes; reparación de fracturas, injerto de piel; dentro de cirugía reconstructiva para promover la neovascularización y aumentar la supervivencia de colgajo de piel; para establecer redes vasculares en 30 tejidos y células trasplantados, tales como islotes de Langerhans trasplantados; para tratar trastornos del tracto reproductor femenino, incluyendo insuficiencia placentaria aguda o crónica (un factor importante que provoca morbilidad y mortalidad perinatal) y hemorragia prolongada, para promover el crecimiento de tejido dañado por enfermedad periodontal; para promover la reparación de tejido hepático dañado; en el tratamiento de lesiones 35 agudas y crónicas del tracto gastrointestinal, incluyendo úlceras duodenales, que se caracterizan por una deficiencia de microvasos; para promover la angiogénesis y evitar la degeneración neuronal debido a isquemia cerebral crónica; para acelerar la formación de vasos sanguíneos colaterales en extremidades isquémicas; para promover la reparación de vasos y el desarrollo de circulación colateral a continuación de infarto de miocardio de forma de limitar la lesión isquémica; y para estimular la hematopoyesis; los polipéptidos también son aditivos útiles en adhesivos de 40 tejido para promover la revascularización del tejido en curación.

- 45 Sería de particular interés el uso de zvegf3 o antagonistas de zvegf3 para el tratamiento o reparación de daño hepático, incluyendo daño debido a enfermedad hepática crónica, incluyendo hepatitis activa crónica (incluyendo hepatitis C) y muchos otros tipos de cirrosis. La necrosis extensa y masiva, incluyendo la destrucción de prácticamente todo el hígado, puede estar causada por, entre otros, hepatitis viral fulminante; sobredosis del analgésico acetaminofeno; exposición a otros fármacos y agentes químicos tales como halotano, inhibidores de monoamino oxidasa, agentes empleados en el tratamiento de tuberculosis, fósforo, tetracloruro de carbono y otros agentes químicos industriales. Las afecciones asociadas con lesiones ultraestructurales que no producen necesariamente necrosis de células hepáticas obvia incluyen síndrome de Reye en niños, toxicidad por tetraciclina e 50 hígado graso agudo del embarazo. La cirrosis, un proceso difuso caracterizado por fibrosis y una conversión de la arquitectura en nódulos estructuralmente anormales, se puede producir por diversas razones incluyendo abuso de alcohol, cirrosis postnecrótica (habitualmente debida a hepatitis activa crónica), cirrosis biliar, cirrosis pigmentaria, cirrosis criptogénica, enfermedad de Wilson y deficiencia de alfa-1-antitripsina. Zvegf3 también puede ser útil para el 55 tratamiento de congestión pasiva crónica hepática (CPC) y necrosis hemorrágica central (CHN), que son dos cambios circulatorios que representan un continuo encontrado en la insuficiencia cardíaca del lado derecho. Otros trastornos circulatorios que se pueden tratar con zvegf3 incluyen trombosis venosa hepática, trombosis de vena porta y esclerosis cardíaca. En los casos de fibrosis hepática puede ser beneficioso administrar un antagonista de zvegf3 para suprimir la activación de células estrelladas, que han estado implicadas en la producción de matriz extracelular en hígado fibrótico (Li y Friedman, J. Gastroenterol. Hepatol. 14: 618-633, 1999).

- 60 Los polipéptidos zvegf3 se pueden administrar en solitario o en combinación con otros agentes vasculogénicos o angiogénicos, incluyendo VEGF. Por ejemplo, se ha observado que los FGF y VEGF básico y ácido desempeñan un papel en el desarrollo de circulación colateral y el uso combinado de zvegf3 con uno o más de estos factores puede ser provechoso. VEGF también ha estado implicado en la supervivencia de células de islotes trasplantadas (Gorden

y col. Transplantation 63: 436-443, 1997; Pepper, Arteriosclerosis, Throm. and Vascular Biol. 17: 605-619, 1997). FGF básico ha demostrado inducir angiogénesis y acelerar la curación de úlceras en animales experimentales (revisado por Folkman, Nature Medicine 1: 27-31, 1995). VEGF ha demostrado promover la reendotelización vascular y reducir la hiperplasia de la íntima en modelos animales de reestenosis (Asahara y col., Circulation 91: 2802-2809, 1995; Callow y col., Growth Factors 10: 223-228, 1994); la eficacia de los polipéptidos zvegf3 se puede ensayar en estos y otros modelos conocidos. Cuando se usa zvegf3 en combinación con un agente adicional, los dos compuestos se pueden administrar simultáneamente o secuencialmente según sea apropiado para la afección específica que se esté tratando.

Las proteínas de zvegf3 se pueden usar en solitario o en combinación con otros factores hematopoyéticos tales como IL-3, GCSF, GM-CSF o factor de células madre para potenciar la expansión y movilización de células madre endoteliales precursoras. Las células que se pueden expandir de esta manera incluyen células aisladas a partir de médula ósea o células aisladas a partir de la sangre. Las proteínas de zvegf3 también se pueden proporcionar directamente a un individuo para mejorar la producción de células madre endoteliales y la diferenciación dentro del individuo tratado. Las células madre, bien sea desarrolladas dentro de un paciente o proporcionadas nuevamente a un paciente, pueden posteriormente jugar un papel en las áreas de modulación de isquemia dentro del organismo proporcionando de ese modo un efecto terapéutico. Estas células también pueden ser útiles en la mejora de la reendotelización de áreas desprovistas de revestimiento endotelial, tales como injertos vasculares, endoprótesis vasculares y áreas en las que el revestimiento endotelial se ha dañado o retirado (por ejemplo, áreas de angioplastia). Las proteínas de zvegf3 también pueden usarse en combinación con otros factores del crecimiento y diferenciación tales como angiopoyetina-1 (Davis y col., Cell 87: 1161-1169, 1996) para ayudar a crear y estabilizar nueva formación de vasos en áreas que requieren neovascularización, incluyendo áreas de isquemia (isquemia cardíaca o periférica), trasplantes de órganos, curación de heridas e injerto de tejidos.

Las proteínas, agonistas y antagonistas de zvegf3 se pueden usar para modular el crecimiento y desarrollo de neuritas y para demarcar estructuras del sistema nervioso. Como tales, las proteínas, agonistas o antagonistas de zvegf3 pueden ser útiles en el tratamiento de neuropatías periféricas mediante el aumento de la ampliación de neuritas de médula espinal y sensoriales y como parte de un tratamiento terapéutico para la regeneración de extensiones de neuritas a continuación de apoplejías, daño cerebral causado por lesiones craneales y parálisis causada por lesiones espinales. La aplicación también se puede realizar en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. La aplicación también se puede llevar a cabo en la mediación del desarrollo y el patrón de inervación del tejido estomacal.

Para uso farmacéutico, las proteínas de zvegf3 se formulan para administración tópica o parenteral, particularmente intravenosa o subcutánea de acuerdo con procedimientos convencionales. En general, las formulaciones farmacéuticas incluirán un polipéptido zvegf3 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada, dextrosa al 5 % en agua o similares. Las formulaciones pueden incluir además uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes de tamponamiento, albúmina para prevenir la pérdida de proteína en superficies de viales, etc. Los procedimientos de formulación se conocen bien en la técnica y se divulan, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 19<sup>a</sup> ed., 1995. Zvegf3 se usará de forma habitual en una concentración de aproximadamente 10 a 100 µg/ml de volumen total, aunque se pueden usar concentraciones en el intervalo de 1 ng/ml a 1000 µg/ml. Para administración tópica, tal como para la promoción de curación de heridas, la proteína se aplicará en el intervalo de 0,1-10 µg/cm<sup>2</sup> de área de herida, determinándose la dosis exacta por el clínico de acuerdo con las normas aceptadas, teniendo en cuenta la naturaleza y gravedad de la afección que se tiene que tratar, los rasgos de paciente, etc. La determinación de dosis está dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica. Las formulaciones terapéuticas generalmente se administrarán a lo largo del periodo necesario para la neovascularización, normalmente de uno a varios meses y, en tratamiento de afecciones crónicas, durante un año o más. La dosificación se realiza diariamente o intermitentemente a lo largo del periodo de tratamiento. La administración intravenosa será mediante inyección de bolo o infusión a lo largo de un periodo típico de una a varias horas. Las formulaciones de liberación sostenida también se pueden emplear. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz de zvegf3 es una cantidad suficiente para producir un cambio clínicamente significativo en la afección tratada, tal como una reducción clínicamente significativa en el tiempo necesario para el cierre de la herida, una reducción significativa en el área de la herida, una mejora significativa en la vascularización, una reducción significativa en la morbilidad o una valoración histológica significativamente aumentada.

Las proteínas descritas en la presente memoria son útiles para modular la proliferación, diferenciación, migración o metabolismo de tipos de células sensibles, que incluyen tanto células primarias como líneas de células cultivadas. A este respecto las células hepáticas, células hematopoyéticas (incluyendo células madre y células mieloides y linfoides maduras), células endoteliales, células neuronales y células mesenquimales (incluyendo fibroblastos y células de músculo liso) son de interés particular. Los polipéptidos zvegf3 se añaden a medio de cultivo de tejido para estos tipos celulares a una concentración de aproximadamente 10 pg/ml a aproximadamente 1000 ng/ml. Los expertos en la técnica reconocerán que las proteínas de zvegf3 se pueden combinar de forma provechosa con otros factores del crecimiento en medios de cultivo.

Dentro del campo de investigación de laboratorio, las proteínas de zvegf3 también se pueden usar como patrones de

peso molecular; como reactivos en ensayos para determinar niveles en circulación de la proteína, tal como en el diagnóstico de trastornos caracterizados por producción excesiva o deficiente de proteína de zvegf3; o como patrones en el análisis de fenotipo celular.

5 Las proteínas de zvegf3 también se pueden usar para identificar inhibidores de su actividad. Los compuestos de ensayo se añaden a los ensayos divulgados anteriormente para identificar compuestos que inhiben la actividad de proteína de zvegf3. Además de estos ensayos divulgados anteriormente, se pueden ensayar muestras para determinar la inhibición de la actividad de zvegf3 dentro de diversos ensayos diseñados para medir la unión a receptor o la estimulación/inhibición de respuestas celulares dependientes de zvegf3. Por ejemplo, líneas celulares sensibles a zvegf3 se pueden transfectar con una construcción de gen informador que es sensible a una ruta celular estimulada por zvegf3. Las construcciones de gen informador de este tipo se conocen en la técnica y generalmente comprenderán un elemento de respuesta de suero activado por zvegf3 (SRE) unido operativamente a un gen que codifica una proteína ensayable, tal como luciferasa. Los compuestos, soluciones, mezclas o extractos candidatos se ensayan para determinar la capacidad de inhibir la actividad de zvegf3 sobre las células diana como se evidencia por una reducción en la estimulación de zvegf3 de la expresión de gen informador. Los ensayos de este tipo detectarán compuestos que bloquean directamente la unión de zvegf3 a receptores de superficie celular, así como también compuestos que bloquean procesos en la ruta celular posteriormente a la unión de receptor-ligando. En la alternativa, los compuestos u otras muestras se pueden ensayar para bloqueo directo de unión de zvegf3 a receptor usando zvegf3 marcado con un marcador detectable (por ejemplo, <sup>125</sup>I, biotina, peroxidasa de rábano picante, FITC y similares). Dentro de ensayos de este tipo, la capacidad de una muestra de ensayo de inhibir la unión de zvegf3 marcado al receptor es indicativa de actividad inhibidora, la cual se puede confirmar a través de ensayos secundarios. Los receptores usados dentro de ensayos de unión pueden ser receptores celulares o receptores aislados inmovilizados.

25 La actividad de proteínas de zvegf3 se puede medir con un microfisiómetro biosensor basado a base de silicio que mide el índice de acidificación extracelular o excreción protónica asociada con unión al receptor y respuestas celulares fisiológicas posteriores. Un dispositivo ilustrativo de este tipo es el microfisiómetro Cytosensor™ fabricado por Molecular Devices, Sunnyvale, CA. Mediante este procedimiento se puede medir diversas respuestas celulares, tales como proliferación celular, transporte iónico, producción de energía, respuesta inflamatoria, activación reguladora y de receptor y similares. Véase, por ejemplo, McConnell y col., Science 257: 1906-1912, 1992; Pitchford y col., Meth. Enzymol. 228: 84-108, 1997; Arimilli y col., J. Immunol. Meth. 212: 49-59, 1998; y Van Liefde y col., Eur. J. Pharmacol. 346: 87-95, 1998. El microfisiómetro se puede usar para ensayar células eucariotas o procariotas adherentes o no adherentes. Mediante la medición de los cambios de acidificación extracelular en el medio celular a lo largo del tiempo, el microfisiómetro mide directamente las respuestas celulares frente a diversos estímulos, incluyendo proteínas de zvegf3, sus agonistas y antagonistas. El microfisiómetro se puede usar para medir respuestas de una célula eucariota sensible a zvegf3 en comparación con una célula eucariota de control que no responde a polipéptido zvegf3. Las células eucariotas sensibles a zvegf3 comprenden células en las cuales se ha transfectado un receptor para zvegf3 creando una célula que es sensible a zvegf3, así como también células sensibles de forma natural a zvegf3 tales como células obtenidas a partir de tejido vascular o neuronal. Las diferencias, medidas mediante un cambio, por ejemplo, un aumento o disminución en la acidificación extracelular, en la respuesta de células expuestas a polipéptido zvegf3, con relación a un control no expuesto a zvegf3, son una medición directa de respuestas celulares moduladas por zvegf3. Además, tales respuestas moduladas por zvegf3 se pueden ensayar bajo diversos estímulos. Por tanto, en la presente memoria se describen procedimientos de identificación de agonistas y antagonistas de proteínas de zvegf3, que comprenden proporcionar células sensibles a un polipéptido zvegf3, cultivar una primera parte de las células en ausencia de un compuesto de ensayo, cultivar una segunda parte de las células en presencia de un compuesto de ensayo y detectar un cambio, por ejemplo, un aumento o disminución en una respuesta celular de la segunda parte de las células en comparación con la primera parte de las células. El cambio en respuesta celular se muestra como un cambio medible en el índice de acidificación extracelular. El cultivo de una tercera parte de las células en presencia de una proteína de zvegf3 y la ausencia de un compuesto de ensayo proporciona un control positivo para las células sensibles a zvegf3 y un control para comparar la actividad agonista de un compuesto de ensayo con la del polipéptido zvegf3. Los antagonistas de zvegf3 se pueden identificar exponiendo las células a proteínas de zvegf3 en presencia y ausencia del compuesto de ensayo, mediante lo cual una reducción en la actividad estimulada por zvegf3 es indicativa de actividad antagonista en el compuesto de ensayo.

55 Las proteínas de zvegf3 también se pueden usar para identificar células, tejidos o líneas celulares que responden a una ruta estimulada por zvegf3. El microfisiómetro, descrito anteriormente, se puede usar para identificar de forma rápida células sensibles a ligando, tales como células sensibles a proteína de zvegf3. Las células se cultivan en presencia o ausencia de polipéptido zvegf3. Aquellas células que provocan un cambio medible en la acidificación extracelular en presencia de zvegf3 son sensibles a zvegf3. Las células sensibles que se pueden usar para identificar antagonistas y agonistas de polipéptido zvegf3 se describen anteriormente.

Los inhibidores de actividad de zvegf3 (antagonistas de zvegf3) incluyen anticuerpos anti-zvegf3, receptores de zvegf3 solubles (incluyendo receptor de PDGF alfa soluble, véase, por ejemplo, Herren y col., J. Biol. Chem. 268: 15088-15095, 1993), anticuerpos anti-receptor y otros agentes peptídicos y no peptídicos, incluyendo ribozimas, inhibidores de molécula pequeña y fragmentos de unión a receptor angiogénicamente o mitogénicamente inactivos de polipéptidos zvegf3. Tales antagonistas se pueden usar para bloquear los efectos mitogénicos, quimiotácticos o angiogénicos de zvegf3. Por lo tanto, estos antagonistas pueden ser útiles en la reducción del crecimiento de tumores sólidos mediante la inhibición de la neovascularización del tumor en desarrollo, bloqueando directamente el crecimiento de las células tumorales o promoviendo la apoptosis a través de la inhibición de procesos mediados por receptor de PDGF alfa. Por ejemplo, la evidencia experimental indica que zvegf3 se produce por células de glioblastoma, sugiriendo que la inhibición de actividad de zvegf3 puede ser útil en el tratamiento de estos tumores. Otros usos de antagonistas de zvegf3 incluyen el tratamiento de retinopatía diabética, psoriasis, artritis y escleroderma; y reducción de fibrosis, incluyendo formación de cicatrices, queloides, fibrosis hepática, fibrosis de pulmón (por ejemplo, silicosis, asbestosis), fibrosis de riñón (incluyendo nefropatía diabética) y glomeruloesclerosis. Los inhibidores de zvegf3 también pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos vasculares proliferativos en los que la actividad de zvegf3 es patógena. Tales trastornos pueden incluir aterosclerosis y reestenosis hiperplásica de la íntima a continuación de angioplastia, endarterectomía, injerto vascular, trasplante de órgano o reemplazo de endoprótesis vascular. Estas afecciones implican respuestas mediadas por factores del crecimiento complejas en las que determinados factores pueden ser beneficiosos para el resultado clínico y otros pueden ser patógenos.

Los inhibidores de zvegf3 también pueden ser útiles en el tratamiento de neovascularización ocular, incluyendo retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad. La evidencia experimental sugiere que estas afecciones se producen como resultado de la expresión de factores angiogénicos inducidos por hipoxia en la retina. Los antagonistas de zvegf3 también son de interés en el tratamiento de trastornos inflamatorios, tales como artritis reumatoide y psoriasis. En artritis reumatoide, los estudios sugieren que VEGF desempeña un importante papel en la formación de pannus, un tejido vascularizado de forma extensa que invade y destruye el cartílago. Las lesiones psoriáticas son hipervasculares y sobreexpresan el polipéptido angiogénico IL-8. Los antagonistas de zvegf3 también pueden ser útiles en el tratamiento de hemangiomas infantiles, que muestran sobreexpresión de VEGF y bFGF durante la fase proliferativa. Los inhibidores se formulan para uso farmacéutico como se ha divulgado de forma general anteriormente, teniendo en cuenta el agente químico preciso y la naturaleza física del inhibidor y la afección que se tiene tratar. Las determinaciones pertinentes están dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica de formulación. Otros factores angiogénicos y vasculogénicos, incluyendo VEGF y bFGF, han estado implicados en neovascularización patológica. En tales casos puede ser provechoso combinar un inhibidor de zvegf3 con uno o más inhibidores de estos factores diferentes.

Los polipéptidos, ácidos nucleicos y anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden usar en el diagnóstico o tratamiento de trastornos asociados con pérdida celular o proliferación celular anormal, incluyendo cáncer, vasculogénesis o angiogénesis deteriorada o excesiva y enfermedades del sistema nervioso. Los polipéptidos zvegf3 marcados se pueden usar para formación de imágenes de tumores u otros sitios de proliferación de células anormales. En vista de la unión de zvegf3 al receptor de PDGF alfa, los antagonistas de zvegf3 pueden ser útiles en el tratamiento de tumores que expresan este receptor (por ejemplo, glioblastomas, melanomas malignos). Debido a que la angiogénesis en animales adultos está generalmente limitada a la curación de heridas y el ciclo reproductor femenino, es un indicador muy específico de procesos patológicos. La angiogénesis es indicativa de, por ejemplo, desarrollo de tumores sólidos, retinopatías y artritis. Los polipéptidos zvegf3 y los anticuerpos anti-zvegf3 se pueden conjugar directamente o indirectamente a fármacos, toxinas, radionúclidos y similares y estos conjugados usarse para diagnóstico *in vivo* o aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, los polipéptidos descritos en la presente memoria o anticuerpos de la presente invención se pueden usar para identificar o tratar tejidos u órganos que expresan una molécula anticomplementaria correspondiente (receptor o antígeno, respectivamente, por ejemplo). Más específicamente, los polipéptidos zvegf3 o anticuerpos anti-zvegf3 o fragmentos bioactivos o partes de los mismos, se pueden acoplar a moléculas detectables o citotóxicas y administrarse a un mamífero que tiene células, tejidos u órganos que expresan la molécula anticomplementaria. Por ejemplo, el dominio CUB de zvegf3 se puede usar para dirigir restos peptídicos y no peptídicos a semaforinas como se ha divulgado anteriormente. Las moléculas detectables adecuadas se pueden unir directamente o indirectamente al polipéptido o anticuerpo e incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las moléculas citotóxicas adecuadas se pueden unir directamente o indirectamente al polipéptido o anticuerpo e incluyen toxinas bacterianas o de plantas (por ejemplo, toxina de difteria, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina, saporina y similares), así como también radionúclidos terapéuticos, tales como yodo-131, renio-188 o itrio-90. Estos se pueden unir directamente al polipéptido o anticuerpo o unirse indirectamente de acuerdo con procedimientos conocidos, tal como a través de un resto quelante. Los polipéptidos o anticuerpos también se pueden conjugar a fármacos citotóxicos, tales como adriamicina. Para la unión indirecta de una molécula detectable o citotóxica, la molécula detectable o citotóxica se

puede conjugar con un miembro de un par complementario/anticomplementario, donde el otro miembro está unido al polipéptido o parte de anticuerpo. Para estos fines, biotina/estreptavidina es un par complementario/anticomplementario ilustrativo.

- 5 Las proteínas de fusión de polipéptido-toxina o proteínas de fusión de anticuerpo/fragmento-toxina descritas en la presente memoria se pueden usar para inhibición o ablación de célula o tejido dirigida, tal como en terapia contra el cáncer. A este respecto los conjugados de un polipéptido zvegf3 y una citotoxina son de interés particular, los cuales se pueden usar para dirigir la citotoxina a un tumor u otro tejido que está experimentando la replicación y modificación celular indeseada.
- 10 Las proteínas de fusión de zvegf3-citoquina o proteínas de fusión de anticuerpo/fragmento-citoquina descritas en la presente memoria se pueden usar para potenciar la citotoxicidad *in vitro* (por ejemplo, aquella mediada por anticuerpos monoclonales frente a dianas tumorales) y para potenciar destrucción *in vivo* de tejidos diana (por ejemplo, cánceres sanguíneo y de médula ósea). Véase, de forma general, Hornick y col., Blood 89: 4437-4447, 1997). En general, las citoquinas son tóxicas si se administran por vía sistémica. Las proteínas de fusión descritas posibilitan la dirección de una citoquina a un sitio de acción deseado, tal como una célula que tiene sitios de unión para zvegf3, proporcionando de ese modo una concentración local elevada de citoquina. Las citoquinas adecuadas para este fin incluyen, por ejemplo, interleuquina-2 y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Tales proteínas de fusión se pueden usar para provocar destrucción inducida por citoquina de tumores y otros tejidos que muestran replicación celular indeseada.
- 15 Un polipéptido zvegf3 descrito en la presente memoria o un anticuerpo anti-zvegf3 de la invención se pueden conjugar con un radionúclido, particularmente con un radionúclido beta emisor o gamma emisor, y usarse para reducir reestenosis. Por ejemplo, cintas impregnadas de iridio-192 colocadas en vasos con endoprótesis vasculares de pacientes hasta que la dosis de radiación necesaria era administrada, dieron como resultado crecimiento de tejido reducido en el vaso y un diámetro luminal mayor que en el grupo de control, que recibieron cintas placebo. Además, la revascularización y la trombosis por endoprótesis vascular fueron significativamente menores en el grupo de tratamiento. Resultados similares se prevén con la dirección de un conjugado bioactivo que contiene un radionúclido, como se describe en la presente memoria.
- 20 Los conjugados polipeptídicos o de anticuerpo bioactivos descritos en la presente memoria se pueden administrar por vía intravenosa, por vía intraarterial o por vía intraductal o se pueden introducir por vía local en el sitio de acción pretendido.
- 25 Los polinucleótidos que codifican polipéptidos zvegf3 son útiles dentro de aplicaciones de terapia génica donde se desea aumentar o inhibir la actividad de zvegf3. Por ejemplo, Isner y col., The Lancet (*ibid.*) informaron que la terapia génica de VEGF promovía el crecimiento de vasos sanguíneos en una extremidad isquémica. Las aplicaciones adicionales de terapia génica de zvegf3 incluyen estimulación de curación de herida, repoblación de injertos vasculares, estimulación del crecimiento de neuritas e inhibición del crecimiento de cáncer y metástasis.
- 30 En la presente memoria también se describen reactivos polinucleotídicos para uso de diagnóstico. Por ejemplo, un gen de zvegf3, una sonda que comprende ADN o ARN de zvegf3 o una subsecuencia del mismo se puede usar para determinar si el gen de zvegf3 está presente en el cromosoma 4 de un paciente humano o si ha ocurrido una mutación. Las aberraciones cromosómicas detectables en el locus del gen de zvegf3 incluyen, pero sin limitación, aneuploidía, cambios en el número de copias génicas, inserciones, supresiones, cambios en el sitio de restricción y rearreglos. Tales aberraciones se pueden detectar usando polinucleótidos descritos en la presente memoria empleando técnicas de genética molecular, tales como análisis de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), análisis de repetición de tandem corto (STR) empleando técnicas de PCR y otras técnicas de análisis de enlace genético conocidas en la técnica (Sambrook y col., *ibid.*; Ausubel et. al., *ibid.*; A.J. Marian, Chest 108: 255-265, 1995).
- 35 La cartografía híbrida por radiación es una técnica genética de células somáticas desarrollada para construir mapas de alta resolución contiguos de cromosomas de mamífero (Cox y col., Science 250: 245-250, 1990). El conocimiento parcial o completo de una secuencia de un gen permite diseñar cebadores de PCR adecuados para su uso con paneles de cartografía híbrida por radiación cromosómica. Los paneles de cartografía híbrida por radiación disponibles en el mercado que cubren el genoma humano completo, tales como el Panel Stanford G3 RH y el Panel GeneBridge 4 RH (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL) están disponibles. Estos paneles posibilitan las localizaciones cromosómicas basadas en PCR rápidas y el ordenamiento de genes, sitios marcados por secuencia (STS) y otros marcadores no polimórficos y polimórficos dentro de una región de interés. Esta técnica permite establecer directamente distancias físicas proporcionales entre genes descubiertos recientemente de interés y marcadores cartografiados previamente. El conocimiento preciso de la posición de un gen puede ser útil para varios fines, incluyendo: 1) determinar las relaciones entre secuencias cortas y obtener secuencias genéticas circundantes adicionales en diversas formas, tales como YAC, BAC o clones de ADNc; 2) proporcionar un posible gen candidato para una enfermedad heredable que muestra unión a la misma región cromosómica; y 3) realizar referencias cruzadas de organismos modelo, tales como ratón, que pueden ayudar a determinar qué función puede tener un gen particular.

## DATOS EXPERIMENTALES

**Ejemplo 1**

Los clones que comprenden partes de la secuencia codificante de zvegf3 se identificaron en bases de datos públicas y de propietario de etiquetas de secuencias expresadas (EST). Se obtuvo un primer clon, que corresponde a una EST en una base de datos de propietario, y se secuenció. El mismo contenía un inserto de 2350 pb con una fase de lectura abierta de aproximadamente 800 pb. El extremo 5' de la ORF no estaba presente. Un segundo clon, que corresponde a una EST en una base de datos pública, se secuenció posteriormente, pero el mismo no extendió la secuencia obtenida a partir del primer clon. Un tercer clon, de una base de datos de propietario, se secuenció posteriormente. Este clon contenía aproximadamente 156 pb más que el primer clon, pero también le faltaba el extremo 5'.

Se realizaron transferencias de Northern usando una serie de transferencias de Northern (Multiple Tissue Northern Blots, Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA). Una sonda de ADN de 400 pb aproximadamente, basada directamente en la EST identificada, se generó mediante digestión de un clon que corresponde a la primera EST patentada con EcoRI y BgIII. La sonda de ADN se purificó en gel usando una columna spin que contenía una membrana de gel de sílice (Kit de Extracción QIAquick™; Qiagen, Inc., Valencia, CA). La sonda se marcó radiactivamente con <sup>32</sup>P usando un kit de marcación de cebado aleatorio disponible en el mercado (Rediprime™ II, Amersham Corp., Arlington Heights, IL) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La sonda se purificó usando una columna de empuje (columna NucTrap®; Stratagene, La Jolla, CA; véase Patente de Estados Unidos Nº 5.336.412). Una solución de hibridación disponible en el mercado (Solución de hibridación ExpressHyb™; Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) se usó para hibridación previa y como una solución de hibridación para las transferencias de Northern. La hibridación tuvo lugar durante una noche a 65 °C y las transferencias se lavaron posteriormente 4 veces en SSC 2X y SDS al 0,1 % a temperatura ambiente, seguido por dos lavados en SSC 0,1X y SDS al 0,1 % a 50 °C y un lavado en SSC 0,1X y SDS al 0,1 % a 56 °C. Posteriormente las transferencias de Northern se expusieron a película durante una noche a -80 °C y durante tres días a -80 °C. Se observó un tamaño de transcripto en todos los tejidos a aproximadamente 4,0 kb. La intensidad de señal fue más elevada en tiroides, médula espinal y glándula adrenal. La intensidad de señal fue promedio en corazón, riñón, páncreas, próstata, ovario, estómago y tráquea. La intensidad de señal fue débil en todos los otros tejidos.

El análisis de transferencia de Northern se realizó usando Transferencias de Tejido Múltiple de Ratón (Mouse Multiple Tissue Blots) obtenidas a partir de Clontech Laboratories e Invitrogen (Carlsbad, CA). Una sonda de ADN de 400 pb aproximadamente, en base directamente a la EST identificada, se generó mediante digestión de un clon que correspondía a la primera EST de propietario con EcoRI y BgIII. La sonda de ADN se purificó en gel usando una columna spin como se ha divulgado anteriormente. La sonda se marcó radiactivamente con <sup>32</sup>P mediante cebado aleatorio como se ha divulgado anteriormente. La sonda se purificó usando una columna de empuje NucTrap®. Las condiciones de hibridación fueron como se ha divulgado anteriormente. Las transferencias se lavaron cuatro veces en SSC 2X, SDS al 0,1 %, después dos veces en SSC 1X a 50 °C, después se expusieron a película durante una noche a -80 °C y durante tres días a -80 °C. Se observó un tamaño de transcripto de aproximadamente 3,0 kb en embriones de 7 días. La exposición de tres días mostró bandas de menos intensidad en embriones de 11, 15 y 17 días. La intensidad disminuyó con la edad del embrión. Las transferencias puntuales mostraron un punto en el embrión de 17 días y con exposición de tres días en la glándula submaxilar. Se observó una banda potencial de aproximadamente 2,0 kb en testículos después de tres días.

El análisis de transferencia de Southern se llevó a cabo usando una transferencia de Southern preparada previamente que contenía ADN genómico digerido por EcoRI a partir de nueve especies eucariotas diferentes (ZOO-BLOT de Clontech Laboratories). Una sonda de ADN de 400 pb aproximadamente, en base directamente a la primera base de datos de propietario EST, se generó mediante digestión del clon correspondiente con EcoRI y BgIII. La sonda de ADN se purificó en gel usando una columna spin. La sonda se marcó radiactivamente con <sup>32</sup>P mediante cebado aleatorio y se purificó usando una columna de empuje. Las condiciones de hibridación y lavado fueron como se ha divulgado anteriormente para las transferencias Transferencias de Tejido Múltiple de Ratón (Mouse Multiple Tissue Blots). Las transferencias de Northern se expusieron posteriormente a película durante una noche a -80 °C y durante tres días a -80 °C. Se observaron bandas fuertes en conejo, ratón, rata y mono.

**Ejemplo 2**

Se exploró una biblioteca de glándula salival humana para un clon de longitud completa de zvegf3 mediante PCR. Esta biblioteca era una biblioteca ordenada que representa 9,6 X 10<sup>5</sup> clones preparados en el vector pZP5x. El vector pZP5x es el mismo que el vector pZP-9 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Blvd., Manassas, VA con Número de Acceso 986668), pero contiene un promotor de citomegalovirus en lugar de un promotor de metalotioneína entre los sitios Asp718 y BamHI. Por tanto el plásmido comprende un gen de dihidrofolato reductasa bajo el control del promotor temprano SV40 y sitio de poliadenilación SV40 y un sitio de clonación para insertar el gen de interés bajo el control del promotor CMV y el sitio de poliadenilación del gen de hormona de crecimiento humano (hGH). La placa de trabajo que contiene 80 grupos de 12.000 colonias cada uno se exploró mediante PCR usando los cebadores oligonucleotídicos ZC19,045 (SEC ID Nº: 25) y ZC19,047 (SEC ID Nº: 26) con una temperatura de hibridación de 60 °C durante 35 ciclos. Hubo dos positivos fuertes, los grupos 58 (T-8

F1-F12) y 77 (T-7 H1-H12). Los grupos correspondientes en la placa de transferencia se exploraron posteriormente mediante PCR usando las mismas condiciones. Se obtuvieron dos positivos a nivel de la transferencia. Los positivos fueron T-7 H11 y T-8 F10. Se llevaron a cabo reacciones RACE 5' en los grupos de placa de transferencia y los fragmentos se secuenciaron para comprobar la secuencia de zvegf3 y determinar si estaba presente un clón de longitud completa. Para PCR, se usaron los cebadores oligonucleotídicos ZC12,700 (SEC ID N°: 27) y ZC19,045 (SEC ID N°: 25) a una temperatura de hibridación de 61 °C durante 5 ciclos, después 55 °C durante 30 ciclos. La secuenciación mostró que el grupo T-7 H11 tuvo un cambio de fase. La secuencia F10 del grupo de placa de transferencia 8 parecía ser correcta, de forma que este grupo de ADN se usó en transferencias a filtro.

El grupo F10 de la placa de transferencia 8 se sembró en placa y se transfirió a filtro usando membranas de nylon (Hybond-N™; Amersham Corporation). Aproximadamente 1200 colonias por placa en cada uno de 5 filtros se transfirieron para un total de aproximadamente 6000 colonias. Los filtros se marcaron con una aguja caliente para orientación, después se desnaturizaron durante 6 minutos en NaOH 0,5 M y Tris-HCl 1,5 M, pH 7,2. Posteriormente los filtros se neutralizaron en NaCl 1,5 M y Tris-HCl 0,5 M, pH 7,2 durante 6 minutos. El ADN se fijó a los filtros usando un reticulador UV (Stratalinker®, Stratagene, La Jolla, CA) a 1200 joules. Los filtros se lavaron previamente a 65 °C en tampón de prelavado que consistía en SSC 0,25X, SDS al 0,25 % y EDTA 1 mM. La solución se cambió un total de tres veces a lo largo de un periodo de 45 minutos para eliminar los detritos celulares. Los filtros se hibridaron previamente durante aproximadamente 3 horas a 65 °C en 25 ml de ExpressHyb™. La sonda se generó usando un fragmento de aproximadamente 400 pb producido mediante digestión del primer clón de la base de datos de propietario con EcoRI y BgIII y se purificó en gel usando una columna spin como se ha divulgado anteriormente. La sonda se marcó radiactivamente con <sup>32</sup>P mediante cebado aleatorio como se ha divulgado anteriormente y se purificó usando una columna de empuje. Se usó solución ExpressHyb™ para la solución de hibridación para los filtros. La hibridación tuvo lugar durante una noche a 65 °C. Las transferencias se enjuagaron 2X en solución 1 a 65 °C (SSC 2X, SDS al 0,1 %), después se lavaron 4 veces en solución 1 a 65 °C. Los filtros se expusieron a película durante una noche a -80 °C. Hubo 14 positivos en los filtros. Se eligieron 85 clones a partir de las áreas positivas y se exploraron mediante PCR usando cebadores oligonucleotídicos ZC19,045 (SEC ID N°: 25) y ZC19,047 (SEC ID N°: 26) y una temperatura de hibridación de 60 °C. Se obtuvieron trece positivos y se sembraron en estrías para clones individuales. Se eligieron veinticuatro colonias y se comprobaron mediante PCR como se ha descrito previamente. Se obtuvieron seis positivos, dos de los cuales se secuenciaron. Ambas secuencias fueron iguales y de longitud completa. La secuencia se muestra en SEC ID N°: 1.

### 30 Ejemplo 3

El gen de zvegf3 humano se cartografió para el cromosoma 4 usando el Panel de Híbridos de Radiación GeneBridge 4 disponible en el mercado (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). El Panel de Híbridos de Radiación GeneBridge 4 contiene ADN PCRable a partir de cada uno de los 93 clones de híbridos de radiación, más dos ADN de control (el HFL donador y el A23 receptor). Un servidor WWW disponible al público (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhMapper.pl>) permite la cartografía con relación al mapa de híbrido de radiación del Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research's del genoma humano (el mapa de híbridos de radiación "WICGR"), que se ha construido con el Panel de Híbridos de Radiación GeneBridge 4.

Para la cartografía del Zvegf3 con el Panel GeneBridge 4 RH, reacciones de 20 µl se configuraron en una placa de microtitulación de 96 pocillos PCRable (Stratagene, La Jolla, CA) y se usaron en un termociclador (RoboCycler® Gradient 96; Stratagene). Cada una de las 95 reacciones de PCR contenía 2 µl de tampón de reacción de PCR 10X (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA), 1,6 µl de mezcla dNTP (2,5 mM cada una, PERKIN-ELMER, Foster City, CA), 1 µl de cebador sentido ZC 20,368 (SEC ID N°: 28), 1 µl de cebador antisentido ZC 20,369 (SEC ID N°: 29), 2 µl de un agente de aumento de densidad y colorante de seguimiento (RediLoad, Research Genetics, Inc., Huntsville, AL), 0,4 µl de una mezcla de ADN polimerasa/anticuerpo disponible en el mercado (50X Advantage™ KlenTaq Polymerase Mix, obtenido en Clontech Laboratories, Inc.), 25 ng de ADN a partir de un clón híbrido individual o control y x µl ddH<sub>2</sub>O para un volumen total de 20 µl. Las mezclas se reacción se revistieron con una cantidad igual de aceite mineral y se sellaron. Las condiciones de ciclado de PCR fueron las siguientes: una desnaturización de 4 minutos inicial a 94 °C; 35 ciclos de 45 segundos de desnaturización a 94 °C, 45 segundos de hibridación a 56 °C y 75 segundos de ampliación a 72 °C; seguido por una ampliación final de 7 minutos a 72 °C. Los productos de reacción se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 % (Life Technologies, Gaithersburg, MD).

Los resultados mostraron que zvegf3 cartografía 3.56 cR\_3000 del marcador flanqueante CHLC.GATA72A08 en el mapa del híbrido de radiación WICGR del cromosoma 4. Los marcadores flanqueantes proximal y distal fueron CHLC.GATA72A08 y WI-3936, respectivamente. El uso de marcadores circundantes posiciona el gen de zvegf3 en la región 4q28.3 en el mapa del cromosoma 4 LDB integrado (The Genetic Location Database, University of Southampton, servidor WWW: [http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public\\_html/](http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/)).

Usando sustancialmente los mismos procedimientos, el gen de zvegf3 de ratón se cartografió para el cromosoma 3, unido al marcador flanqueante D3Mit212 localizado en 39.7 cM. Esta región es sintética con el locus de zvegf3 humano.

**Ejemplo 4**

Se exploró un panel de PCR para ADN de zvegf3 de ratón. El panel contenía 8 muestras de ADNc de bibliotecas de cerebro, médula ósea, embrión de 15 días, testículos, glándula salival, placenta, embrión de 15 días (Clontech Laboratories) y embrión de 17 días (Clontech Laboratories).

5 Mezclas de PCR contenían los cebadores oligonucleotídicos zc21,222 (SEC ID Nº: 38) y zc21,224 (SEC ID Nº: 39). La reacción se desarrolló a una temperatura de hibridación de 66 °C con un tiempo de ampliación de 2 minutos durante un total de 35 ciclos usando ADN polimerasa Ex Taq™ (PanVera, Madison, WI) más anticuerpo. Muestras de ADN que se encontró que eran positivas para zvegf3 mediante PCR y que se confirmaron mediante secuenciación incluían ADNc de grupo total de biblioteca de embrión de 15 días de ratón, embrión de 15 días de ratón (Clontech Laboratories) y embrión de 17 días (ambos obtenidos de Clontech Laboratories), ADNc de grupo total de biblioteca de glándula salival de ratón y ADNc de grupo total de biblioteca de testículo de ratón. Fragmentos de aproximadamente 600 pb de cada uno de los productos de PCR de ADNc de grupo total de biblioteca de embrión de 15 días, ADNcm de embrión de 15 días de ratón y ADNcm de embrión de 17 días de ratón se secuenciaron. La secuencia de ADNmc de embrión de 17 días de ratón y productos de ADNc de grupo total de biblioteca de embrión de 15 días de ratón confirmaron que los fragmentos eran de ADN de zvegf3 de ratón.

10 La biblioteca de embrión de 15 días de ratón se exploró para ADN de zvegf3 de longitud completa. Esta biblioteca era una biblioteca ordenada que representa 9,6 X 10<sup>5</sup> clones en el vector pCMV•SPORT 2 (Life Technologies, Gaithersburg, MD). La placa de trabajo, que contenía 80 grupos de 12.000 colonias cada uno, se exploró mediante PCR usando los cebadores oligonucleotídicos zc21,223 (SEC ID Nº: 40) y zc21,224 (SEC ID Nº: 39) con una temperatura de hibridación de 66 °C durante 35 ciclos. Se obtuvieron dieciocho positivos. Los fragmentos de cuatro grupos (A2, A10, B2 y C4) se secuenciaron; se confirmó que todos codificaban zvegf3. Rondas adicionales de exploración usando las mismas condiciones de reacción y grupos de las placas de trabajo y de fuente identificaron un grupo positivo (5D).

15 Colonias positivas se exploraron mediante hibridación. El grupo 5D de la placa de fuente original Nº 5 se sembró en placas a aproximadamente 250 colonias por placa y se transfirió a membranas de nylon (Hybond-N™; Amersham Corporation, Arlington Heights, IL). Cinco filtros se transfirieron para un total de ~1250 colonias. Los filtros se marcaron con una aguja caliente para orientación, después se desnaturalizaron durante 6 minutos en NaOH 0,5 M y Tris-HCl 1,5 M, pH 7,2. Los filtros se neutralizaron posteriormente en NaCl 1,5 M y Tris-HCl 0,5 M, pH 7,2 durante 6 minutos. El ADN se fijó a los filtros usando un reticulador UV (Stratalinker®, Stratagene, La Jolla, CA) a 1200 joules.

20 25 Se generó una sonda mediante PCR usando los cebadores oligonucleotídicos zc21,223 (SEC ID Nº: 40) y zc21,224 (SEC ID Nº: 39) y un molde de embrión de 15 días de ratón a una temperatura de hibridación de 66 °C durante 35 ciclos. El fragmento de PCR se purificó en gel usando una columna spin que contenía una membrana de gel de sílice (Kit de Extracción de Gel QIAquick™; Qiagen, Inc., Valencia, CA). El ADN se marcó radiactivamente con <sup>32</sup>P usando un kit disponible en el mercado (Rediprime™ II random-prime labeling system; Amersham Corp., Arlington Heights, IL) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La sonda se purificó usando una columna de empuje disponible en el mercado (columna NucTrap®; Stratagene, La Jolla, CA; véase Patente de Estados Unidos Nº 5.336.412). Los filtros se lavaron previamente a 65 °C en tampón de prelavado que consistía en SSC 0,25X, SDS al 0,25 % y EDTA 1 mM. La solución se cambió un total de tres veces a lo largo de un periodo de 45 minutos para eliminar detritos celulares. Los filtros se hibridaron previamente durante una noche a 65 °C en 25 ml de una solución 30 de hibridación (ExpressHyb™ Hybridization Solution; Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA), después se hibridaron durante una noche a 65 °C en la misma solución. Los filtros se enjuagaron dos veces a 65 °C en tampón de prelavado (SSC 0,25X, SDS al 0,25 % y EDTA 1 mM), después se lavaron dos veces en tampón de prelavado a 65 °C. Los filtros se expusieron a película durante 2 días a -80 °C. Hubo 10 positivos en los filtros. Se escogieron 3 clones a partir de las áreas positivas. Se separaron en estrías y 15 colonias individuales a partir de estos tres 35 positivos se exploraron mediante PCR usando los cebadores zc21,223 (SEC ID Nº: 40) y zc21,334 (SEC ID Nº: 41) a una temperatura de hibridación de 66 °C. Se recuperaron y secuenciaron dos positivos. Se observó que ambas secuencias eran iguales y que codificaban zvegf3 de ratón de longitud completa (SEC ID Nº: 42).

40 45 La secuencia de aminoácidos está altamente conservada entre zvegf3 de ratón y humano, con una identidad de secuencia de aminoácidos global del 87 %. El péptido secretor, el dominio CUB, el interdominio y el dominio del factor del crecimiento tienen una identidad de aminoácidos del 82 %, el 92 %, el 79 % y el 94 %, respectivamente.

**Ejemplo 5**

50 55 La transferencia de Northern se realizó usando Transferencias de Tejido Múltiple de Ratón (Mouse Multiple Tissue Blots) de Origene, Rockville, MD y Clontech, Palo Alto, CA. Se generó una sonda de ADN de aproximadamente 800 pb mediante PCR usando el cebador zc21,223 (SEC ID Nº: 40) para el extremo 5' y el cebador zc21,224 (SEC ID Nº: 39) para el extremo 3'. La reacción se desarrolló durante 35 ciclos a una temperatura de hibridación de 66 °C usando ADN polimerasa Ex Taq™ (PanVera). El producto de reacción se purificó en gel usando una columna spin que contenía una membrana de gel de sílice y se marcó con <sup>32</sup>P usando un kit de marcaje disponible en el mercado (Multiprime™ DNA labeling system, Amersham Corp.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La sonda marcada se purificó usando una columna de empuje. Se usó una solución de hibridación disponible en el mercado

(ExpressHyb™ Hybridization Solution; Clontech Laboratories, Inc.) para prehibridación y como una solución de hibridación para las transferencias de Northern. La hibridación tuvo lugar durante una noche a 65 °C, después las transferencias se lavaron 4 veces en SSC 2X y SDS al 0,05 % a temperatura ambiente, seguido por dos lavados en SSC 0,1X y SDS al 0,1 % a 50 °C. Posteriormente las transferencias se expusieron a película dos días y durante una noche a -80 °C. Se observaron múltiples tamaños de transcripto. Los transcriptos de ~3,5 y ~4,0 kb se observaron en embriones de 7, 11, 15 y 17 días, con el más fuerte a los 7 días y disminuyendo a los 17 días. Se observó un transcripto de ~3,0 kb en riñón, hígado, cerebro y posiblemente testículos. Se observó un transcripto de ~1,0 kb en testículos, músculo y bazo. Las transferencias puntuales correspondieron a las transferencias de northern.

#### Ejemplo 6

- 10 Para preparar animales transgénicos que expresan genes de zvegf3 se requieren machos fértiles adultos (sementales) (B6C3f1, 2-8 meses de edad (Taconic Farms, Germantown, NY)), machos vasectomizados (inútiles) (B6D2f1, 2-8 meses, (Taconic Farms)), hembras prepúberes fértiles (donantes) (B6C3f1, 4-5 semanas, (Taconic Farms)) y hembras fértiles adultas (receptoras) (B6D2f1, 2-4 meses, (Taconic Farms)).
- 15 Las donantes se aclimatan durante 1 semana, después se les inyecta aproximadamente 8 UI/ratón de Gonadotropina Sérica de Yegua Preñada (Sigma, St. Louis, MO) I.P. y 46-47 horas después, 8 UI/ratón de Gonadotropina Coriónica humana (hCG (Sigma)) I.P. para inducir superovulación. Las donantes se aparean con sementales después de las inyecciones de hormonas. La ovulación generalmente ocurre a las 13 horas de la inyección de hCG. La copulación se confirma mediante la presencia de un tapón vaginal la mañana siguiente al apareamiento.
- 20 Se recogen huevos fertilizados bajo un microscopio quirúrgico (Leica MZ12 Stereo Microscope, Leica, Wetzlar, Alemania). Los oviductos se recogen y los huevos se liberan en portaobjetos de urianálisis que contienen hialuronidasa (Sigma Chemical Co.). Los huevos se lavan una vez en hialuronidasa y dos veces en medio de Whitten W640 (Tabla 7; todos los reactivos disponibles en Sigma Chemical Co.) que se habían incubado con CO<sub>2</sub> al 5 %, O<sub>2</sub> al 5 % y N<sub>2</sub> al 90 % a 37 °C. Los huevos se almacenan a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 % en incubadora hasta la 25 microinyección.

Tabla 7

	mg/200 ml	mg/500 ml
NaCl	1280	3200
KCl	72	180
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	32	80
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	60	150
Glucosa	200	500
Lactato de Ca <sup>2+</sup>	106	265
Bencilpenicilina	15	37,5
Estreptomicina SO <sub>4</sub>	10	25
NaHCO <sub>3</sub>	380	950
Piruvato de Na	5	12,5
H <sub>2</sub> O	200 ml	500 ml
EDTA 500 mM	100 µl	250 µl
Rojo fenol al 5 %	200 µl	500 µl
BSA	600	1500

- 30 Se inserta ADNc de zvegf3 en el vector de expresión pHB12-8 (véase Figura 2). El vector pHB12-8 se obtuvo a partir de p2999B4 (Palmeter y col., Mol. Cell Biol. 13: 5266-5275, 1993) mediante inserción de un intrón de insulina II de rata (aproximadamente 200 pb) y poliengarce (Fse I/Pme I/Asc I) en el sitio Nru I. El vector comprende un promotor (aproximadamente 750 pb) de metalotioneína (MT-1) y región no traducida de hormona del crecimiento humano (hGH) y señal de poliadenilación (aproximadamente 650 pb) flanqueada por 10 kb de secuencia flanqueante 5' de MT-1 y 7 kb de secuencia flanqueante 3' de MT-1. El ADNc se inserta entre las secuencias de insulina II y hGH.
- 35 10-20 microgramos de ADN de plásmido se linealizan, se purifican en gel y se resuspenden en Tris 10 mM pH 7,4 EDTA 0,25 mM pH 8,0, a una concentración final de 5-10 nanogramos por microlitro para microinyección.
- El ADN de plásmido se microinyecta en huevos recogidos contenidos en una gota de medio W640 revestido por aceite mineral con CO<sub>2</sub> equilibrado tibio. El ADN se extrae a una aguja de inyección (sacado a partir de un capilar de vidrio de borosilicato o de 1 mm DE y 0,75 mm DI) y se inyecta en huevos individuales. Cada huevo se penetra con la aguja de inyección en uno o ambos pronúcleos haploides.

Picolitros de ADN se inyectan en los pronúcleos y la aguja de inyección se retira sin entrar en contacto con los nucleolos. El procedimiento se repite hasta que se han inyectado todos los huevos. Los huevos microinyectados de forma satisfactoria se transfieren a una placa de cultivo de tejido de órgano con medio W640 pregasificado para almacenamiento durante una noche en una incubadora a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 %.

5 Al día siguiente, embriones de 2 células se transfieren a receptoras pseudopreñadas. Las receptoras se identifican mediante la presencia de tapones de copulación, después de la copulación con individuos inútiles vasectomizados. Las receptoras se anestesian y se afeitan en el lado izquierdo dorsal y se transfieren a un microscopio quirúrgico. Se realiza una incisión pequeña en la piel y a través de la pared muscular en el centro del área abdominal delimitada por la caja torácica, la silla y la pata trasera, a medio camino entre la rodilla y el bazo. Los órganos reproductores se exteriorizan en un paño quirúrgico pequeño. La almohadilla de grasa se estira fuera sobre el paño quirúrgico y se une un serrefine de bebé (Roboz, Rockville, MD) a la almohadilla de grasa y se deja colgando sobre la espalda del ratón, evitando que los órganos se deslicen hacia dentro nuevamente.

10 Con una pipeta de transferencia fina que contiene aceite mineral seguido por la alternancia de W640 y burbujas de aire, 12-17 embriones de 2 células sanos de la inyección del día anterior se transfieren a la receptora. La ampolla inflamada se localiza y sosteniendo el oviducto entre la ampolla y la bursa, se realiza una muesca en el oviducto con una aguja de 28 g cercano a la bursa, asegurándose de no desgarrar la ampolla o la bursa.

15 La pipeta se transfiere a la muesca en el oviducto y los embriones se impulsan hacia dentro, permitiendo que la primera burbuja de aire salga de la pipeta. La almohadilla de grasa se empuja suavemente dentro del peritoneo y se permite que los órganos reproductores se deslicen hacia dentro. La pared peritoneana se cierra con una sutura y la piel se cierra con un clip de herida. Los ratones se recuperan en un calentador de portaobjetos a 37 °C durante un mínimo de 4 horas.

20 Las receptoras se vuelven a colocar en jaulas en pares y se permite una gestación de 19-21 días. Después del nacimiento, se permite un periodo de 19-21 días posparto antes del destete. Las crías destetadas se separan por sexo y se colocan en jaulas separadas por sexo y se toma una biopsia de 0,5 cm (usada para determinación de genotipo) de la cola con tijeras limpias.

25 Se preparara ADN genómico a partir de los cortes de cola usando un kit disponible en el mercado (DNeasy™ 96 Tissue Kit; Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico se analiza mediante PCR usando cebadores diseñados para la parte UTR 3' de la hormona del crecimiento humana (hGH) del vector transgénico. El uso de una región única de la secuencia humana (identificada a partir de un alineamiento de la secuencias de ADN UTR 3' de la hormona del crecimiento humana y de ratón) asegura que la reacción de PCR no amplifica la secuencia de ratón. Los cebadores zc17,251 (SEC ID Nº: 30) y zc17,252 (SEC ID Nº: 31) amplifican un fragmento de 368 pares de bases de hGH. Adicionalmente, los cebadores zc17,156 (SEC ID Nº: 32) y zc17,157 (SEC ID Nº: 33), que se hibridan a secuencias de vector y amplifican el inserto de ADNc, se pueden usar junto con los cebadores de hGH. En estos experimentos, el ADN de animales positivos para el transgen generarán dos bandas, una banda de 368 pares de bases que corresponde al fragmento UTR 3' de hGH y una banda de tamaño variable que corresponde al inserto de ADNc.

30 Una vez que se confirma que los animales son transgénicos (TG), los mismos se cruzan nuevamente en una cepa endogámica mediante la colocación de una hembra TG con un macho de tipo silvestre o un macho TG con una o dos hembras de tipo silvestre. A medida que nacen las crías y se destetan, se separan por sexos y sus colas se cortan para determinación del genotipo.

35 Para comprobar la expresión de un transgen en un animal vivo, se realiza una hepatectomía parcial. Se realiza una preparación quirúrgica del abdomen superior directamente por debajo de los procesos xifoides. Usando una técnica estéril, se realiza una incisión pequeña de 1,5-2 cm por debajo del esternón y se exterioriza el lóbulo lateral izquierdo del hígado. Usando seda 4-0, se realiza un nudo alrededor del lóbulo inferior asegurándolo fuera de la cavidad corporal. Se usa una pinza atraumática para sostener el amarre mientras que se coloca un segundo lazo de Dexon absorbible (American Cyanamid, Wayne, N.J.) proximal al primer amarre. Se realiza un corte distal desde el amarre de Dexon y se colocan aproximadamente 100 mg del tejido hepático extirpado en una placa de Petri estéril. El corte de hígado extirpado se transfiere a un tubo de fondo redondo de polipropileno de 14 ml, se congela de forma instantánea en nitrógeno líquido y se almacena en hielo seco. El sitio quirúrgico se cierra con sutura y clips de heridas y la jaula del animal se coloca en una almohadilla de calentamiento a 37 °C durante 24 horas después de la cirugía. El animal se supervisa diariamente postoperatoriamente y los clips de herida se retiran 7-10 días después de la cirugía.

40 El análisis del nivel de expresión de ARNm de cada transgen se realiza usando un ensayo de hibridación de solución de ARN o PCR en tiempo real en un ABI Prism 7700 (PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

45 Se preparó un vector de adenovirus usando potenciador de gen de albúmina específico de hígado y promotor basal (denominado "promotor AEO"). La construcción de promotor de albúmina (denominada pAEO) se construyó insertando un fragmento de 2,2 kb de Not1/EcoRV a partir de pALBdelta2L (Pinkert y col., Genes Dev. 1: 268-276,

1987) y un segmento de ADN de 850 pb de Nrul/Not1 que comprende el intrón de insulina II de rata, un poliengarce de FseI/Pmel/Ascl y la secuencia poli A de la hormona de crecimiento humano en un vector de fagémido disponible en el mercado (pBluescript® KS(+); Stratagene, La Jolla, CA). Para microinyección, el plásmido se digiere con Not1 para liberar el casete de expresión.

- 5 Se construyó un vector de adenovirus adicional usando un promotor de gen de queratina específico de células epiteliales (K14) (Vassar y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 86: 1563-1567, 1989). La fase de lectura abierta de 1038 pb que codifica zvegf3 humano de longitud completa se amplificó mediante PCR de forma de introducir un codón de inicio optimizado y sitios flanqueantes 5' Pmel y 3' Ascl usando los cebadores ZC20,180 (SEC ID Nº: 34) y ZC20,181 (SEC ID Nº: 35). El fragmento de Pmel/Ascl resultante se subclonó en el poliengarce de pKFO114, un vector transgénico limitado a queratinocitos basales que comprende el promotor de queratina humana 14 (K14) (un fragmento de aproximadamente 2,3 kb amplificado a partir de ADN genómico humano [obtenido en Clontech Laboratories, Inc.] basándose en la secuencia de Staggers y col., "Sequence of the promoter for the epidermal keratin gene, K14", Nº de Acceso de GenBank U11076, 1994), seguido por un intrón heterólogo (un fragmento de BstXI/PstI de 294 pb a partir de pIRE3hyg (Clontech Laboratories, Inc.; véase, Huang y Gorman, Nucleic Acids Res. 18: 937-947, 1990), un poliengarce de Pmel/Ascl y la señal de poliadénilación del gen de la hormona del crecimiento humana (un fragmento SmaI/EcoRI de 627 pb; véase, Seeburg, DNA 1: 239-249, 1982). El inserto de transgen se separó de la estructura principal del plásmido mediante digestión con NotI y purificación en gel de agarosa y óvulos fecundados de apareamientos de ratones B6C3F1Tac o ratones endogámicos FVB/NTac se microinyectaron e implantaron en hembras pseudopreñadas básicamente como se describe por Malik y col., Molec. Cell. Biol. 15: 2349-2358, 1995. Los fundadores transgénicos se identificaron mediante PCR en ADN de cola genómico usando cebadores específicos para la señal poli A de hormona del crecimiento humano (ZC17,252, SEC ID Nº: 31; y ZC17,251, SEC ID Nº: 30) para amplificar un producto de diagnóstico de 368 pb. Las líneas transgénicas se iniciaron cruzando a los fundadores con ratones C57BU6Tac o FVB/NTac.
- 10 25 Se generaron ratones transgénicos básicamente como se ha divulgado anteriormente usando promotores MT-1, K14 y AEO. Se generaron cuatro ratones transgénicos MT-1/zvegf3. En un animal (hembra) se produjeron aproximadamente 800 moléculas de ARNm de zvegf3/célula en el hígado después de inducción de cinc. Este animal tenía agrandamiento del hígado y del bazo. También se observó proliferación de células sinusoidales hepáticas y hematopoyesis extramedular. Un ratón transgénico K14/zvegf3 (hembra) mostró un nivel bajo de expresión con bajo peso corporal, hematocrito bajo y recuento plaquetario bajo. Un ratón transgénico AEO/zvegf3 (macho) con un nivel 30 de expresión bajo mostró proliferación de células sinusoidales hepáticas.

#### Ejemplo 7

Se construye un plásmido de expresión que contiene todo o parte de un polinucleótido que codifica zvegf3 a través de recombinación homóloga. Un fragmento de ADNc de zvegf3 se aísla mediante PCR usando la secuencia polinucleotídica de SEC ID Nº: 1 con regiones flanqueantes en los extremos 5' y 3' correspondientes a las secuencias de vector que flanquean el punto de inserción de zvegf3. Los cebadores de PCR incluyen cada uno desde el extremo 5' a 3': 40 pb de secuencia flanqueante del vector y 17 pb correspondientes a los extremos amino y carboxilo de la fase de lectura abierta de zvegf3.

Diez  $\mu$ l de los 100  $\mu$ l de reacción de PCR se desarrollan en un gel de agarosa de baja temperatura de fusión al 0,8 % (SeaPlaque GTG®; FMC BioProducts, Rockland, ME) con tampón TBE 1 x para análisis. Los 90  $\mu$ l restantes de la reacción de PCR se precipitan con la adición de 5  $\mu$ l de NaCl 1 M y 250  $\mu$ l de etanol absoluto. El plásmido pZMP6 que se ha cortado con SmaI, se usa para recombinación con el fragmento de PCR. El plásmido pZMP6 se construyó a partir de pZP9 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el Nº de Acceso 98668) con los elementos genéticos de levadura tomados a partir de pRS316 (depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el Nº de Acceso 77145), un elemento de sitio de entrada a ribosoma interno (IRES) a partir de poliovirus y el dominio extracelular de CD8 truncado en el extremo C-terminal del dominio transmembrana. pZMP6 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que contiene el promotor temprano inmediato de citomegalovirus, múltiples sitios de restricción para inserción de secuencias codificantes, un codón de parada y un terminador de hormona del crecimiento humano. El plásmido también contiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que comprende un promotor SV40, potenciador y origen de replicación, un gen DHFR y el terminador de SV40; así como también las secuencias URA3 y CEN-ARS necesarias para selección y replicación en *S. cerevisiae*.

Cien microlitros de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) se combinan de forma independiente con 10  $\mu$ l de las diversas mezclas de ADN anteriores y se transfieren a una cubeta de electroporación. Las mezclas de levadura/ADN se someten a electropulsación usando ajustes de potencia de 0,75 kV (5 kV/cm),  $\infty$  ohmios, 25  $\mu$ F. Se añaden 600  $\mu$ l de sorbitol 1,2 M a cada cubeta y la levadura se siembra en placas en dos alícuotas de 300  $\mu$ l en dos placas URA-D y se incuban a 30 °C. Despues de aproximadamente 48 horas, los transformantes de levadura URA+ a partir de una placa única se resuspenden en 1 ml de H<sub>2</sub>O y se centrifugan brevemente para sedimentar las células de levadura. El sedimento celular se resuspende en 1 ml de tampón de lisis (Triton X-100 al 2 %, SDS al 1 %, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Quinientos microlitros de la mezcla de lisis se añaden a un tubo

Eppendorf que contiene 300  $\mu$ l de perlas de vidrio lavadas con ácido y 200  $\mu$ l de fenol-cloroformo, se somete a agitación vortical durante intervalos de 1 minuto dos o tres veces y se centrifuga durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf a velocidad máxima. Trescientos microlitros de la fase acuosa se transfieren a un tubo nuevo y el ADN se precipita con 600  $\mu$ l de etanol (EtOH), seguido por centrifugación durante 10 minutos a 4 °C. El sedimento de ADN se resuspende en 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.

La transformación de células huésped de *E. coli* electrocomponentes (células Electromax DH10B™; obtenidas en Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) se realiza con 0,5-2 ml de ADN prep de levadura y 40  $\mu$ l de células. Las células se someten a electropulsación a 1,7 kV, 25  $\mu$ F y 400 ohmios. A continuación de la electroporación, 1 ml de SOC (Bacto™ Triptona al 2 % (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura al 0,5 % (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, 10 MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM) se siembra en placas en alícuotas de 250  $\mu$ l en cuatro placas AMP LB (caldo LB (Lennox), Agar Bacto™ al 1,8 % (Difco), 100 mg/l de Ampicilina).

Los clones individuales que portan la construcción de expresión correcta para zvegf3 se identifican mediante digestión de restricción para verificar la presencia del inserto de zvegf3 y para confirmar que se han unido correctamente diversas secuencias de ADN entre sí. Los insertos de clones positivos se someten a análisis de secuencia. ADN de plásmido a escala más grande se aísla usando un kit disponible en el mercado (QIAGEN Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La construcción correcta se denomina pZMP6/zvegf3 (Figura 3).

#### Ejemplo 8

Células CHO DG44 (Chasin y col., Som. Cell. Molec. Genet. 12: 555-666, 1986) se siembran en placas de cultivo de tejido de 10 cm y se permite que crezcan a aproximadamente el 50 % al 70 % de confluencia durante una noche a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, en medio de Ham F12/FBS (medio de Ham F12, Life Technologies), suero fetal bovino al 5 % (Hyclone, Logan, UT), L-glutamina al 1 % (JRH Biosciences, Lenexa, KS), piruvato de sodio al 1 % (Life Technologies). Posteriormente las células se transfectan con el plásmido pZMP6/zvegf3 mediante transfección mediada por liposoma usando una formulación de liposoma 3:1 (p/p) del lípido policationico 2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminocarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanimino-trifluoroacetato y el lípido neutro dioleoifosfatidiletanolamina en agua filtrada por membrana (Lipofectamine™ Reagent, Life Technologies), en formulación de medio sin suero (SF) (F12 de Ham, 10 mg/ml de transferrina, 5 mg/ml de insulina, 2 mg/ml de fetuina, L-glutamina al 1 % y piruvato de sodio al 1 %). El plásmido pZMP6/Zvegf3 se diluye en tubos de 15 ml hasta un volumen final total de 640  $\mu$ l con medio SF. 35  $\mu$ l de Lipofectamine™ se mezclan con 605  $\mu$ l de medio SF. La mezcla de Lipofectamine™ se añade a la mezcla de ADN y se permite la incubación a aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se añaden cinco ml de medio SF a la mezcla de ADN:Lipofectamine™. Las células se enjuagan una vez con 5 ml de medio SF, se aspiran y se añade la mezcla de ADN:Lipofectamine™. Las células se incuban a 37 °C durante cinco horas, después se añaden 6,4 ml de medio de Ham F12/FBS al 10 %, PSN al 1 % a cada placa. Las placas se incuban a 37 °C durante una noche y la mezcla de ADN:Lipofectamine™ se reemplaza con medio FBS al 5 %/Ham recién preparado al día siguiente. El día 3 después de la transfección, las células se separan en matraces T-175 en medio de cultivo. El día 7 después de la transfección, las células se tiñen con anticuerpo monoclonal anti-CD8-FITC (Pharmingen, San Diego, CA) seguido por anti-perlas magnéticas conjugadas con FITC (Miltenyi Biotec). Las células CD8 positivas se separan usando columnas disponibles en el mercado (columnas mini-MACS; Miltenyi Biotec) de acuerdo con las direcciones del fabricante y se ponen en DMEM/F12 de Ham/FBS al 5 % sin nucleósidos pero con metotrexato 50 nM (medio de selección).

Las células se siembran para subclonación a una densidad de 0,5, 1 y 5 células por pocillo en placas de 96 pocillos en medio de selección y se permite que se desarrollen durante aproximadamente dos semanas. Los pocillos se comprueban para evaporación del medio y se llevan nuevamente a 200  $\mu$ l por pocillo según sea necesario durante este procedimiento. Cuando un porcentaje grande de las colonias en la placa está cerca de la confluencia, se recogen 100  $\mu$ l de medio de cada pocillo para análisis mediante transferencia puntual y las células se alimentan con medio de selección recién preparado. El sobrenadante se aplica a un filtro de nitrocelulosa en un aparato de transferencia puntual y el filtro se trata a 100 °C en un horno de vacío para desnaturalizar la proteína. El filtro se incuba en Tris-glicina 625 mM, pH 9,1,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM, a 65 °C, 10 minutos, después en Tampón de Western A de leche seca sin grasa al 2,5 % (gelatina al 0,25 %, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Igepal CA-630 al 0,05 %) durante una noche a 4 °C en un agitador giratorio. El filtro se incuba con el conjugado de anticuerpo-HRP en tampón de Western A de leche seca sin grasa al 2,5 % durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador giratorio. El filtro se lava posteriormente tres veces a temperatura ambiente en PBS más Tween 20 al 0,01 %, 15 minutos por lavado. El filtro se desarrolla con reactivos de quimioluminiscencia (kit de marcación directa ECL™; Amersham Corp., Arlington Heights, IL) de acuerdo con las direcciones del fabricante y se expone a película (Hyperfilm ECL, Amersham) durante aproximadamente 5 minutos. Los clones positivos se tratan con tripsina a partir de la placa de 96 pocillos y se transfieren a placas de 6 pocillos en medio de selección para aumento de escala y análisis y mediante transferencia de Western.

**Ejemplo 9**

Se produjo proteína de zvegf3 de longitud completa en células BHK transfectadas con pZMP6/zvegf3 (Ejemplo 7). Células BHK 570 (ATCC CRL-10314) se sembraron en placas de cultivo de tejido de 10 cm y se permitió que se desarrollaran hasta aproximadamente el 50 al 70 % de confluencia durante una noche a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, en medio DMEM/FBS (DMEM, Gibco/BRL High Glucose; Life Technologies), suero fetal bovino al 5 % (Hyclone, Logan, UT), L-glutamina 1 mM (JRH Biosciences, Lenexa, KS), piruvato de sodio 1 mM (Life Technologies). Las células se transfecaron posteriormente con pZMP6/zvegf3 mediante transfección mediada por liposoma (usando Lipofectamine™; Life Technologies), en medio sin suero (SF) (DMEM complementado con 10 mg/ml de transferrina, 5 mg/ml de insulina, 2 mg/ml de fetuina, L-glutamina al 1 % y piruvato de sodio al 1 %). El plásmido se diluyó en tubos de 15 ml hasta un volumen final de 640 µl con medio SF. 35 µl de la mezcla de lípido se mezclaron con 605 µl de medio SF y la mezcla se permitió que se incubara aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Cinco mililitros de medio SF se añadieron a la mezcla de ADN:lípido. Las células se enjuagaron una vez con 5 ml de medio SF, se aspiraron y se añadió la mezcla de ADN:lípido. Las células se incubaron a 37 °C durante cinco horas, después se añadieron 6,4 ml de medio DMEM/FBS al 10 %, PSN al 1 % a cada placa. Las placas se incubaron a 37 °C durante una noche y la mezcla de ADN:lípido se reemplazó con medio FBS al 5 %/DMEM recién preparado al día siguiente. El día 5 después de la transfección, las células se separaron en matraces T-162 en medio de selección (DMEM + FBS al 5 %, L-Gln al 1 %, NaPyr al 1 %, metotrexato 1 µM). Aproximadamente 10 días después de la transfección, dos placas de cultivo de 150 mm de colonias resistentes a metotrexato de cada transfección se trataron con tripsina y las células se combinaron y sembraron en placas en un matraz T-162 y se transfirieron a cultivo a gran escala.

**Ejemplo 10**

Un vector de expresión de células de mamífero para el dominio del factor del crecimiento de zvegf3 se construyó básicamente como se ha divulgado en el Ejemplo 7. La secuencia codificante para el dominio del factor del crecimiento (restos 235-345 de SEC ID Nº: 2), unida a una secuencia que codifica una señal secretora t-PA optimizada (Patente de Estados Unidos Nº 5.641.655) se unió al vector pZMP11 linealizado cadena abajo del promotor CMV. El plásmido pZMP11 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor temprano inmediato de CMV, un intrón de consenso a partir de la región variable del locus de cadena pesada de inmunoglobulina de ratón, secuencias Kozak, sitios de restricción múltiples para inserción de secuencias codificantes, un codón de parada y un terminador de hormona del crecimiento humano. El plásmido también contiene un elemento IRES de poliovirus, el dominio extracelular de CD8 truncado en el extremo C-terminal del dominio transmembrana, un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que tiene un promotor SV40, potenciador y origen de replicación, un gen de DHFR, el terminador de SV40 y las secuencias URA3 y CEN-ARS necesarias para selección y replicación en *S. cerevisiae*. El vector resultante, denominado pZMP11/zv3GF-otPA, se muestra en la Figura 4.

Células BHK 570 se transfecaron con pZMP11/zv3GF-otPA y se cultivaron básicamente como se ha divulgado en el Ejemplo 9.

**Ejemplo 11**

Para construcción de vectores de adenovirus, la región codificante de proteína de zvegf3 humano se amplificó mediante PCR usando cebadores que añadieron sitios de restricción Pmel y Ascl en los extremos 5' y 3' respectivamente. Los cebadores de PCR ZC20,180 (SEC ID Nº: 34) y ZC20,181 (SEC ID Nº: 35) se usaron con un molde de ADNc de zvegf3 en una reacción de PCR de la forma siguiente: un ciclo a 95 °C durante 5 min; seguido por 15 ciclos a 95 °C durante 1 min, 61 °C durante 1 min y 72 °C durante 1,5 min; seguido por 72 °C durante 7 min; seguido por un remojo a 4° C. El producto de reacción de PCR se cargó en un gel de agarosa de baja temperatura de fusión al 1,2 % en tampón TAE (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M). El producto de PCR de zvegf3 se escindió del gel y se purificó usando un kit disponible en el mercado que comprende una columna spin de membrana de gel de sílice (Kit de Purificación de PCR QIAquick PCR y kit de limpieza de gel; Qiagen, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del kit. El producto de PCR se digirió posteriormente con Pmel y Ascl, se extrajo con fenol/cloroformo, se precipitó con EtOH y se rehidrató en 20 ml de TE (Tris/EDTA pH 8). El fragmento de zvegf3 de 1038 pb posteriormente se ligó en los sitios Pmel-Ascl del vector transgénico pTG12-8 (también conocido como pHB12-8; véase el Ejemplo 6) y se transformó en células competentes DH10B™ de *E. coli* mediante electroporación. Los clones que contenían zvegf3 se identificaron mediante ADN de plásmido miniprep seguido por digestión con Pmel y Ascl. Un clon positivo se secuenció para asegurar que no había supresiones u otras anomalías en la construcción. La secuencia de ADNc de zvegf3 se confirmó.

Se preparó ADN usando un kit disponible en el mercado (Maxi Kit, Qiagen, Inc.) y el ADNc de zvegf3 de 1038 pb se liberó a partir del vector pTG12-8 usando las enzimas Pmel y Ascl. El ADNc se aisló en un gel de agarosa de baja temperatura de fusión al 1 % y se escindió del gel. El trozo de gel se fundió a 70 °C y el ADN se extrajo dos veces con un volumen igual de fenol tamponado con Tris y se precipitó con EtOH. El ADN se resuspendió en 10 µl de H<sub>2</sub>O.

El ADNc de zvegf3 se clonó en los sitios EcoRV-Ascl de un pAdTrack-CMV modificado (He, T-C. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 95: 2509-2514, 1998). Esta construcción contiene el gen marcador de proteína

fluorescente verde (GFP). El promotor de CMV que dirige la expresión de GFP se reemplazó con el promotor de SV40 y la señal de poliadenilación de SV40 se reemplazó con la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento humano. Adicionalmente, el poliengarce nativo se reemplazó con sitios FseI, EcoRV y Ascl. Esta forma modificada de pAdTrack-CMV se denominó pZyTrack. El ligamiento se llevó a cabo usando un kit de ligamiento y exploración de ADN disponible en el mercado (kit Fast-Link; Epicentre Technologies, Madison, WI). Los clones que contenían zvegf3 se identificaron mediante digestión de ADN mini prep con FseI y Ascl. Con el fin de linealizar el plásmido, aproximadamente 5 µg del plásmido de zvegf3 pZyTrack resultante se digirieron con Pmel. Aproximadamente 1 µg del plásmido linealizado se cotransformó con 200 ng de pAdEasy superenrollado (He y col., *ibid.*) en células BJ5183 de *E. coli* (He y col., *ibid.*). La co-transformación se realizó usando un Pulsador Génico Bio-Rad a 2,5 kV, 200 ohmios y 25 µFa. La mezcla de co-transformación completa se sembró en 4 placas LB que contenían 25 µg/ml de kanamicina. Las colonias más pequeñas se escogieron y expandieron en LB/kanamicina y el ADN de adenovirus recombinante se identificó mediante procedimientos de ADN miniprep convencionales. La digestión del ADN de adenovirus recombinante con FseI y Ascl confirmó la presencia del inserto de zvegf3. El ADN miniprep de adenovirus recombinante se transformó en células competentes DH10B de *E. coli* y el ADN se preparó usando un Maxi Kit (Qiagen, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del kit.

Aproximadamente 5 µg de ADN adenoviral recombinante se digirieron con enzima Pacl (New England Biolabs) durante 3 horas a 37 °C en un volumen de reacción de 100 µl que contenía 20-30 U de Pacl. El ADN digerido se extrajo dos veces con un volumen igual de fenol/cloroformo y se precipitó con etanol. El sedimento de ADN se resuspendió en 10 µl de agua destilada. Un matraz T25 de células QBI-293A (Quantum Biotechnologies, Inc. Montreal, Qc. Canadá), inoculadas el día antes y cultivadas hasta el 60-70 % de confluencia, se transfecaron con el ADN digerido por Pacl. El ADN digerido por Pacl se diluyó hasta un volumen total de 50 µl con HBS estéril (NaCl 150 mM, HEPES 20 mM). En un tubo separado, se diluyeron 20 µl de 1 mg/ml de sales de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetil-amonio (DOTAP) (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) hasta un volumen total de 100 µl con HBS. El ADN se añadió al DOTAP, se mezcló suavemente mediante pipeteo arriba y abajo y se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El medio se retiró de las células 293A y se lavó con 5 ml de medio esencial mínimo alfa sin suero (MEM) que contenía piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales MEM 0,1 mM y tampón HEPES 25 mM (reactivos obtenidos en Life Technologies, Gaithersburg, MD). 5 ml del MEM sin suero se añadieron a las células 293A y se mantuvieron a 37 °C. La mezcla de ADN/lípido se añadió gota a gota al matraz T25 de células 293A, se mezcló suavemente y se incubó a 37 °C durante 4 horas. Despues de 4 h el medio que contenía la mezcla de ADN/lípido se aspiró y se reemplazó con 5 ml de MEM completo que contenía suero fetal bovino al 5 %. Las células transfecadas se supervisaron para expresión de GFP y formación de focos (placas virales).

Siete días después de la transfección de células 293A con el ADN adenoviral recombinante, las células expresaron la proteína GFP y comenzaron a formar focos ("placas" virales). El lisado viral crudo se recogió usando un raspador de células para recoger todas las células 293A. El lisado se transfirió a un tubo cónico de 50 ml. Para liberar la mayoría de las partículas de virus de las células, se realizaron tres ciclos de congelamiento/descongelamiento en un baño de hielo seco/etanol y un baño de agua a 37 °C.

El lisado crudo se amplificó (amplificación Primaria (1º)) para obtener una "reserva" de trabajo de lisado de rAdV de zvegf3. Diez placas de 10 cm de células 293A casi confluentes (80-90 %) se establecieron 20 horas antes, se añadieron 20 µl de lisado de rAdV crudo a cada placa de 10 cm y se supervisaron durante 48 a 72 horas buscando CPE debajo de la luz blanca del microscopio y expresión de GFP bajo microscopio fluorescente. Cuando todas las células 293A mostraron CPE (efecto citopático) este lisado de 1º reserva se recogió y se realizaron ciclos de congelamiento/descongelamiento como se ha descrito bajo el Lisado de rAdV Crudo.

La amplificación secundaria (2º) de rAdV de zvegf3 se obtuvo de la manera siguiente: veinte placas de cultivo de tejido de 15 cm de células 293A se prepararon de forma que las células eran confluentes al 80-90 %. Se eliminó todo el medio MEM al 5 % excepto 20 ml y cada placa se inoculó con 30-50 µl del 1º lisado de rAdV amplificado. Despues de 48 horas las células 293A se lisaron a partir de la producción de virus, el lisado se recogió en botellas de centrifuga de polipropileno de 250 ml y el rAdV se purificó.

Se añadió detergente NP-40 hasta una concentración final del 0,5 % a las botellas del lisado crudo con el fin de lisar todas las células. Las botellas se colocaron en una plataforma giratoria durante 10 minutos agitándose tan rápido como fuera posible sin que las botellas se cayeran. El detrito se sedimentó mediante centrifugación a 20.000 X G durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a botellas de centrifuga de policarbonato de 250 ml y se añadió una solución de 0,5 volúmenes de PEG8000 al 20 %/NaCl 2,5 M. Las botellas de agitaron durante una noche en hielo. Las botellas se centrifugaron a 20.000 X G durante 15 minutos y, el sobrenadante se descartó en una solución de blanqueo. Usando un raspador de células estéril, el precipitado blanco de virus/PEG de dos botellas se resuspendió en 2,5 ml de PBS. La solución de virus resultante se colocó en tubos de microcentrifuga de 2 ml y se centrifugó a 14.000 X G en la microcentrifuga durante 10 minutos para eliminar cualquier detrito celular adicional. El sobrenadante de los tubos de microcentrifuga de 2 ml se transfirió a un tubo con tapón con cierre de resorte de polipropileno de 15 ml y se ajustó hasta una densidad de 1,34 g/ml con CsCl. El volumen de la solución de virus se estimó y se añadieron 0,55 g/ml de CsCl. El CsCl se disolvió y 1 ml de esta solución pesó 1,34 g. La solución se transfirió a tubos de centrifuga de pared gruesa de policarbonato de 3,2 ml y se centrifugó a 348.000 X G durante 3-

4 horas a 25 °C. El virus formó una banda blanca. Usando las puntas de pipeta de calibre ancho, se recogió la banda de virus.

El virus del gradiente tenía una gran cantidad de CsCl que tuvo que retirarse antes de usarse en las células. Columnas de intercambio iónico disponibles en el mercado (columnas PD-10 preempaquetadas con Sephadex® G-

5 25M; Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) se usaron para desalar la preparación de virus. La columna se equilibró con 20 ml de PBS. El virus se cargó y se permitió que se desarrollara en la columna. Se añadieron 5 ml de PBS a la columna y se recogieron fracciones de 8-10 gotas. Las densidades ópticas de diluciones 1:50 de cada fracción se determinaron a 260 nm en un espectrofotómetro. Un pico de absorbancia transparente claro estuvo presente entre las fracciones 7-12. Estas fracciones se combinaron y se determinó la densidad óptica (DO) de una dilución 1:25. La DO se convirtió en concentración de virus usando la fórmula: (DO a 260 nm)(25)( $1,1 \times 10^{12}$ ) = viriones/ml. La DO de una dilución 1:25 de rAdV de zvegf3 fue 0,145, dando una concentración de virus de  $4 \times 10^{12}$  viriones/ml.

Para almacenar el virus, se añadió glicerol al virus purificado a una concentración final del 15 %, se mezcló suavemente pero de forma eficaz y se almacenó en alícuotas a -80 °C.

15 Se siguió un protocolo desarrollado por Quantum Biotechnologies, Inc. (Montreal, Canadá) para medir la infectividad de virus recombinante. En resumen, dos placas de cultivo de tejido de 96 pocillos se sembraron con  $1 \times 10^4$  células 293A por pocillo en MEM que contenía suero fetal bovino al 2 % para cada virus recombinante que se tenía que ensayar. Después de 24 horas se prepararon diluciones de 10 veces de cada virus desde  $1 \times 10^{-2}$  hasta  $1 \times 10^{-14}$  en MEM que contenía suero fetal bovino al 2 %. 100 µl de cada dilución se colocaron en cada uno de 20 pocillos. Despues de 5 días a 37 °C, los pocillos se leyeron positivos o negativos para Efecto Citopático (CPE) y se calculó un valor de "Unidades Formadoras de Placas/ml" (UFP).

20 La formulación de TCDI<sub>50</sub> usada fue una como la de Quantum Biotechnologies, Inc., anteriormente. El título (T) se determinó a partir de una placa en la que el virus se había diluido de  $10^{-2}$  a  $10^{-14}$  y se leyó 5 días después de la infección. En cada dilución se determinó una relación (R) de pocillos positivos para CPE por el número total de pocillos.

25 Para calcular el título de la muestra de virus no diluida: el factor, "F"  $1+d(S-0,5)$ ; en la que "S" es la suma de las relaciones (R); y "d" es Log10 de la serie de dilución, por ejemplo, "d" es igual a 1 para una serie de dilución de diez veces. El título de la muestra no diluida es  $T = 10^{(1+F)} = TCDI_{50}/ml$ . Para convertir TCDI<sub>50</sub>/ml en ufp/ml, se resta 0,7 del exponente en el cálculo para el título (T).

El adenovirus de zvegf3 tenía un título de  $1,8 \times 10^{10}$  ufp/ml.

### 30 Ejemplo 12

El tratamiento de ratones con adenovirus zvegf3 condujo a cambios en hígado y bazo. Los hígados estaban pálidos y estaban muy agrandados, con vasos agrandados en las puntas de los lóbulos. Los hígados también mostraron proliferación de células sinusoidales. También se observaron cambios en los hepatocitos (hipertrofia, degeneración y necrosis) y lo más probable es que eran efectos inespecíficos de infección por adenovirus. El cambio esplénico consistió en hematopoyesis extramedular aumentada, la cual estaba correlacionada con el tamaño esplénico agrandado.

### Ejemplo 13

Los datos de ratones tratados con adenovirus y transgénicos eran consistentes con hematopoyesis y/o angiogénesis aumentada en los animales de ensayo. Por lo tanto, se llevó a cabo un estudio para ensayar si zvegf3 administrado por vía adenoviral estimulaba las células en los compartimentos hematopoyéticos o linfoides para proliferar, como se determinó mediante el examen de sangre periférica, examen histológico e incorporación de bromodesoxi uridina (BrdU) en los tejidos.

40 Ratones (macho, C57Bl, 7 semanas de edad) se dividieron en tres grupos. El día 0, se administró adenovirus parental o de zvegf3 a los grupos primero (n= 11) y segundo (n= 12), respectivamente, a través de la vena de la cola, recibiendo cada ratón una dosis de  $\sim 1 \times 10^{11}$  partículas en un volumen de 0,1 ml. El tercer grupo (n= 8) no recibió tratamiento. A cada ratón se proporcionaron dos dosis intraperitoneales de 3 mg de solución de BrdU preparada recientemente a aproximadamente 24 y 12 horas antes del sacrificio. Los días 2, 4, 6, 8 y 10, se sacrificaron dos ratones de cada grupo de tratamiento y uno o dos ratones no tratados y se recogieron tejidos y sangre. Las muestras se analizaron para determinar recuento sanguíneo completo (CBC) y química sérica y los portaobjetos se prepararon para análisis diferencial manual de células progenitoras sanguíneas y de médula. Un fémur, pulmón, corazón, timo, hígado, riñón, bazo, páncreas, duodeno y ganglios linfáticos mesentéricos se enviaron para histología convencional y evaluación e incorporación de BrdU. El revestimiento del duodeno sirvió como el tejido de control para incorporación de BrdU.

45 Adicionalmente, dos ratones que recibieron aproximadamente la mitad de la dosis de partículas de adenovirus de zvegf3 y un ratón que recibió la dosis completa de adenovirus parental se sacrificaron y analizaron como se ha descrito anteriormente el día 16.

Un trozo de hígado de cada ratón se guardó para ensayo de ARNm de proteína de adenovirus para examinar la evolución temporal de expresión de las preparaciones de adenovirus.

Comenzando el día 6, la mayoría de los animales tratados con cualquier adenovirus tenían hígados y bazos visiblemente agrandados en comparación con los ratones no tratados. Los hígados de los ratones tratados con adenovirus de zvegf3 tenían tendencia a parecer más pálidos que los animales tratados con el virus parental. La proliferación de células sinusoidales se observó en el hígado. La inspección visual sugirió que estas células eran células estrelladas y/o fibroblastos. El color del bazo era el mismo en ambos grupos. La mayoría de los animales que recibieron el virus zvegf3 tenían ejes femorales más pálidos con la médula de un color más claro.

Los CBC de sangre periférica mostraron una diferencia posible en recuentos plaquetarios, pero no en recuentos de GR o GB entre animales tratados con virus de zvegf3 y parental. En comparación con los grupos tratados con virus parental y los no tratados, el grupo de zvegf3 tenía recuentos plaquetarios más bajos los días 2, 4, 6 y 8, pero no en el día 10. El volumen plaquetario medio (tamaño promedio de las plaquetas individuales) en el grupo de zvegf3 también tuvo tendencia a ser más grande, consistente con un aumento relativo en la población de plaquetas inmaduras más grandes.

La marcación de BrdU mostró proliferación celular aumentada en riñón, principalmente en la médula y a un alcance menor en la corteza. Las células en proliferación parecían ser células intersticiales, que pueden haber incluido fibroblastos y células mesangiales.

#### **Ejemplo 14**

Se analizó zvegf3 en un ensayo de crecimiento de anillo aórtico (Nicosia and Ottinetti, Laboratory Investigation 63(1): 115, 1990; Villaschi y Nicosia, Am. J. Pathology 143(1): 181-190, 1993). Aortas torácicas se aislaron a partir de ratas macho de 1-2 meses de edad SD y se transfirieron a placas de petri que contenían solución salina tamponada de HANK. Las aortas se lavaron con solución salina tamponada de HANK adicional para eliminar la sangre y el tejido adventicio que rodea a la aorta se retiró de forma cuidadosa. Las aortas limpias se transfirieron a placas de petri que contenían medio basal EBM, sin suero (Clonetics, San Diego, CA). Los anillos aórticos se obtuvieron cortando secciones de aproximadamente 1 mm usando una hojilla de bisturí. Los extremos de las aortas usados para mantener a la aorta en su sitio no se usaron. Los anillos se enjuagaron en medio basal EBM recién preparado y se colocaron individualmente en pocillos de una placa de 24 pocillos revestida con Matrigel (Becton Dickinson, Bedford, MA). Los anillos se colocaron en capas con 50 µl adicionales de Matrigel y se colocaron a 37 °C durante 30 minutos para permitir que la matriz gelificara. Las muestras de ensayo se diluyeron en medio sin suero basal EBM complementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y tampón HEPES y se añadieron a 1 ml/pocillo. El control de fondo fue medio sin suero basal EBM en solitario. Se usó FGF básico (R&D Systems, Minneapolis, MN) a 20 ng/ml como un control positivo. El adenovirus pZyTrack de zvegf3 (Ejemplo 11) se añadió a los pocillos, asumiendo un recuento celular de 500.000 células y una multiplicidad de infección de 5000 partículas/célula. Se usó un adenovirus ZyTrack nulo (zPar) como un control. Las muestras se añadieron en un mínimo de cuatro copias. Los anillos se incubaron durante 5-7 días a 37 °C y se analizaron para crecimiento. El crecimiento aórtico se valoró mediante observadores múltiples ciegos usando 0 como no crecimiento y 4 como crecimiento máximo. El adenovirus de zvegf3 produjo un aumento significativo en el crecimiento en comparación con los controles y fue comparable a otros factores de crecimiento potentes (por ejemplo, bFGF). En experimentos adicionales, el dominio del factor del crecimiento de zvegf3 purificado también provocó un aumento significativo en el crecimiento a concentraciones de hasta aproximadamente 50 ng/ml.

Células sensibles a zvegf3 se tiñeron para actina de músculo liso alfa (característica de SMC), factor von Willebrand (característico de células endoteliales), colágeno de tipo I (característico de fibroblastos) y vimentina (tiñe los tres tipos). Los patrones de tinción observados indicaron que las células eran fibroblastos y células de músculo liso, con posible inclusión de pericitos.

#### **Ejemplo 15**

A trece ratones (macho, C57BL6) se les inyectaron a cada uno por vía subcutánea  $2,5 \times 10^5$  células de carcinoma de pulmón de Lewis (obtenidas en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Mannassas, VA). Tres días después del implante de las células, los ratones se separaron en tres grupos de diez y se les inyectó solución salina, adenovirus de zvegf3 ( $1 \times 10^6$  partículas) o adenovirus de control ( $1 \times 10^6$  partículas). El crecimiento de tumores se supervisó mediante medición de las dimensiones el día 14 y mediante peso de tumor bruto en el momento del sacrificio (día 21). Los pulmones, hígado y tumor se examinaron mediante procedimientos histológicos. El tamaño del tumor fue significativamente menor en el grupo tratado con zvegf3 en comparación con el grupo de adenovirus de control ( $p < 0,007$ ), pero no fue significativamente diferente del grupo tratado con solución salina ( $p = 0,6$ ). La incidencia de metástasis fue baja y no difirió entre los grupos.

#### **Ejemplo 16**

La actividad mieloproliferativa de zvegf3 se ensaya en un modelo de ratón de mielosupresión. El día 0, se administra a los ratones (C57BL macho) en los grupos mielosuprimidos, 450 cGy de radiación y 1,2 mg de carboplatino. Un

segundo grupo de ratones permanece sin tratarse. Entre los días 0 y 7, se administran zvegf3 purificado, trombopoyetina o control de vehículo por vía subcutánea. Los días -7, 6, 10, 15 y 20 se toman muestras de sangre de los ratones bajo anestesia mediante punción retroorbital. Las muestras de sangre se analizan para determinar CBC y los portaobjetos se preparan para análisis de células diferenciales e inmaduras manuales.

- 5 Cuando se observa recuperación de linajes de células sanguíneas, los animales se sacrifican. La médula ósea se recoge para análisis microscópico y ensayos de progenitores de médula ósea. Se recogen el bazo y el hígado para examen histológico para determinar hematopoyesis extramedular. El pulmón, timo, corazón, testículos y riñón se analizan para histología.

#### Ejemplo 17

- 10 Anticuerpos policlonales anti-péptido se prepararon inmunizando dos conejos blancos de Nueva Zelanda hembra con los péptidos huzvegf3-1 (restos 80-104 de SEC ID Nº: 2), huzvegf3-2 (restos 299-314 de SEC ID Nº: 2), huzvegf3-3 (restos 299-326 de SEC ID Nº: 2 con un resto cys N-terminal) o huzvegf3-4 (restos 195-225 de SEC ID Nº: 2 con un resto cys C-terminal). Los péptidos se sintetizaron usando un sintetizador de péptidos Applied Biosystems Modelo 431A (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 15 Los péptidos huzvegf3-1, huzvegf3-3 y huzvegf3-4 se conjugaron posteriormente a la proteína transportadora hemocianina de lapa californiana (KLH) activada por maleimida a través de restos de cisteína (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). El péptido huzvegf3-2 se conjugó a la proteína transportadora KLH usando glutaraldehído. A cada uno de los conejos se proporcionó una inyección inicial intraperitoneal (IP) de 200 µg de péptido conjugado en Adyuvante de Freund Completo (Pierce Chemical Co.) seguido por inyecciones IP de refuerzo de 100 µg de péptido conjugado en Adyuvante de Freund Incompleto cada tres semanas. Siete a diez días después de la administración de la tercera inyección de refuerzo, se tomaron muestras de sangre de los animales y se recogió el suero. Los conejos se sometieron a refuerzo y a toma de muestras de sangre cada tres semanas.

Los anticuerpos específicos de péptido huzvegf3 se purificaron por afinidad a partir del suero de conejo usando una columna de péptido CNBr-Sepharose® 4B (Pharmacia Biotech) que se preparó usando 10 mg de los péptidos respectivos por gramo de CNBr-Sepharose®, seguido por diálisis en PBS durante una noche. Los anticuerpos de huzvegf3 específicos de péptidos se caracterizaron mediante una comprobación de título de ELISA usando 1 µg/ml del péptido apropiado como una diana de anticuerpo. Los anticuerpos específicos de péptidos huzvegf3-1 tienen un límite más bajo de detección (LLD) de 500 µg/ml mediante ELISA en su diana de anticuerpo apropiada y reconocen proteínas recombinantes de longitud completa (fusión MBP; véase Ejemplo 28) mediante ELISA. Los anticuerpos específicos de péptidos huzvegf3-2 tenían una LLD de 1 ng/ml mediante ELISA. Los anticuerpos específicos de péptidos huzvegf3-3 tenían una LLD de 50 µg/ml mediante ELISA y reconocían proteínas recombinantes mediante análisis de Transferencia de Western. Los anticuerpos específicos de péptidos huzvegf3-4 tenían una LLD de 50 pg/ml mediante ELISA y reconocían proteínas recombinantes mediante análisis de Transferencia de Western.

#### Ejemplo 18

- 35 Zvegf3 recombinante se analizó mediante transferencia de Western usando anticuerpos frente a los péptidos huzvegf3-1 y huzvegf3-3. La proteína se produjo en células BHK como se ha divulgado anteriormente y en células 293 y MVEC (endoteliales microvasculares) transfectadas con vectores de adenovirus de acuerdo con procedimientos convencionales. Las muestras se sometieron a electroforesis y se transfirieron a nitrocelulosa (0,2 µm; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a temperatura ambiente usando un Instrumento de Transferencia Hoeffer Scientific Instruments (San Francisco, CA) modelo TE22 con agitación de acuerdo con las direcciones proporcionadas en el manual del instrumento. La transferencia se desarrolló a 500 mA durante una hora o 50 mA durante 12 horas en un tampón que contenía base Tris 25 mM, glicina 200 mM y metanol al 20 %. Los filtros se bloquearon posteriormente con leche seca sin grasa al 10 % en tampón A (Tris 50 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM (pH 8,0), Igepal CA-630 al 0,05 %, NaCl 150 mM, gelatina al 0,25 %) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La nitrocelulosa se enjuagó rápidamente, y después se añadió anticuerpo primario en tampón A que contenía leche seca sin grasa al 2,5 %. Las transferencias se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C con agitación suave o balanceo. A continuación de la incubación, las transferencias se lavaron tres veces durante 10 minutos cada una en tampón A. El anticuerpo secundario (anti IgG de conejo de cabra conjugado a peroxidasa de rábano picante, obtenido en Rockland Inc., Gilbertsville, PA) diluido 1:4000 en tampón A que contenía leche seca sin grasa al 2,5 % se añadió y las transferencias se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con agitación o balanceo suave. Las transferencias se lavaron posteriormente tres veces, 10 minutos cada una, en tampón A, después se enjuagaron rápidamente en H<sub>2</sub>O. Las transferencias se desarrollaron usando reactivos de sustrato quimioluminiscente disponibles en el mercado (reactivos 1 y 2 de SuperSignal® ULTRA mezclados 1:1; reactivos obtenidos en Pierce Chemical Co.), y se expusieron a película (Hyperfilm ECL™; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) durante tiempos que variaban de 1 segundo a 5 minutos o según fuera necesario.

Usando el anticuerpo 3-1, zvegf3 de longitud completa producido en células BHK mostró dos bandas ( $M_r \approx 46$  kDa y 30 kDa) en condiciones reductoras. La banda más grande era consistente con el tamaño del monómero de zvegf3 de longitud completa y la banda más pequeña con el dominio CUB + región interdominio. En condiciones no

reductoras, hubo una banda principal a  $M_r \approx 78$  kDa, que parecía ser la molécula de longitud completa dimerizada. También se observaron dos bandas menores más pequeñas. Se obtuvieron resultados similares con el anticuerpo 3-3, pero en condiciones reductoras la banda más pequeña se desarrolló a  $M_r \approx 22$  kDa. El análisis de secuencia de la banda más pequeña mostró que era el dominio del factor del crecimiento aislado.

- 5 El dominio del factor del crecimiento recombinante (producido en células BHK), analizado usando el anticuerpo 3-3, se desarrolló como una banda ancha de  $M_r \approx 18$  kDa en condiciones reductoras. En condiciones no reductoras, la proteína se desarrolló como dos bandas de  $M_r \approx 16$  y 28 kDa, indicando la presencia de formas tanto diméricas como monoméricas del dominio del factor del crecimiento.

- 10 La proteína de zvegf3 producida en células 293 cultivadas en medio sin suero mostró tamaños consistentes con la proteína de longitud completa pronosticada. En condiciones reductoras, la proteína se desarrolló a  $M_r \approx 47$  kDa y en condiciones no reductoras a  $M_r \approx 78$  kDa cuando las transferencias se sondearon con anticuerpo 3-1 o 3-3. La adición de suero al medio dio como resultado escisión de la proteína, como se observa en el material producido por BHK.

- 15 Células MVEC cultivadas en presencia de suero al 1 % produjeron proteína de zvegf3 que se desarrollaba a  $M_r \approx 23$  kDa en condiciones reductoras, y  $M_r \approx 28$  kDa en condiciones no reductoras usando el anticuerpo 3-3. Estos resultados indican escisión de la proteína, con el anticuerpo reconociendo las formas monoméricas y diméricas del dominio del factor del crecimiento. Cuando las células MVEC se adaptaron a medio sin suero, se observó proteína de longitud completa.

#### Ejemplo 19

- 20 Dominio del factor del crecimiento de zvegf3 recombinante se produjo en células BHK 570 cultivadas en fábricas de células. Tres cultivos de 15 litros se recogieron y los medios se filtraron de forma estéril usando un filtro de 0,2  $\mu$ . Los niveles de expresión se estimaron mediante análisis de transferencia de western de muestras de medios concentradas a un punto de corte 20X frente a 5K y se diluyeron en serie dos veces a 1,25X. La intensidad de señal se comparó con una señal en la misma transferencia de una proteína de fusión MBP-zvegf3 convencional (véase el Ejemplo 28) para lo cual la concentración de proteínas se había determinado mediante análisis de aminoácidos. Los niveles de expresión estuvieron de forma consistente entre 0,25 y 0,35 mg/l de medio.

- 25 La proteína se purificó a partir de medio acondicionado mediante una combinación de cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de interacción hidrófoba. El medio de cultivo se diluyó con ácido acético 0,1 M, pH 3,0, que contenía NaCl 0,3 M a una proporción del 60 %:40 %, (medio:ácido acético) para proporcionar una corriente de proceso a 14 ms de conductividad y pH 4,0. Esta corriente se administró a una resina de intercambio catiónico fuerte (Poros® HS; PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) con un volumen de lecho de 50 ml en una columna de 2 cm de diámetro a un caudal de 20 ml/minuto. Un lecho de 50 ml fue suficiente para procesar 45 l de medio y capturar toda la proteína diana. La proteína unida se eluyó, a continuación de lavado de columna durante 10 volúmenes de columna en ácido acético 10 mM con NaCl 0,15 M a pH= 4,0, formando un gradiente lineal para NaCl 2 M en ácido acético 10 mM, pH 4,0. Fracciones de diez ml se capturaron en tubos que contenían 2 ml de Tris 2,0 M, pH 8,0 para neutralizar la acidez. Las muestras de la columna de intercambio catiónico se analizaron mediante SDS PAGE con tinción de plata y transferencia de western para determinar la presencia de zvegf3. El dominio de crecimiento vegf3 se eluyó en NaCl a 0,2 - 0,5 M. Las fracciones que contenían proteínas se agruparon. Un lecho de 25 ml de medio de cromatografía (medio de cromatografía Toso Haas Ether) en una columna de 2 cm de diámetro se equilibró en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,8 M en tampón fosfato de Na 25 mM a pH 7,4. La proteína agrupada a partir de la etapa de intercambio catiónico se ajustó a  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,8 M en fosfato de Na 25 mM, pH 7,0. Esta corriente se hizo fluir sobre la columna a 10 ml/minuto. Una vez que la carga se había completado la columna se lavó durante 10 volúmenes de columna con el tampón de equilibrado antes de eluir con un gradiente de 10 volúmenes de columna formado entre el tampón de equilibrado y ácido bórico 40 mM a pH 8,8. La proteína del dominio del factor del crecimiento zvegf3 se eluyó bastante temprano en el gradiente de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  entre 1,5 y 1,0 M. En este punto la proteína era el 40 - 60 % pura siendo un contaminante principal la proteína de unión a factor del crecimiento similar a insulina 4 (IGFBP4).

30 La proteína de la etapa de cromatografía HIC (Ether) se aplicó a una columna de HPLC de fase inversa C4. La proteína del dominio del factor del crecimiento de zvegf3 se eluyó al 36 % de acetoniitrilo. Este material contenía aún aproximadamente el 20 % (mol/mol) de IGFB4.

#### Ejemplo 20

- 35 El dominio del factor del crecimiento de zvegf3 recombinante se purifica a partir de medio acondicionado para células mediante una combinación de cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía por afinidad a níquel. La proteína se capture en un medio de intercambio catiónico fuerte y se eluye básicamente como se ha divulgado en el Ejemplo 19. La proteína eluída se purifica adicionalmente mediante cromatografía de interacción hidrófoba en una resina de éter (Poros® ET; PerSeptive Biosystems). La proteína de zvegf3 parcialmente purificada posteriormente se une a una resina de quelato de níquel a pH 7,0 - 8,0 en tampón de fosfato de Na 25 mM que contiene NaCl 0,25 M. La proteína unida se eluye con un gradiente de pH descendiente hasta pH 5,0 o un gradiente de imidazol. El eluado de la columna de níquel se ajusta a  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 M, MES 20 mM

(ácido morfolino etanosulfónico) a pH 6,0 y se pasa a través de una columna de cromatografía de interacción hidrófoba de feniléter (Poros® PE, PerSeptive Biosystems) que se ha equilibrado en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 M, MES 20 mM, pH 6,0. IGFBP4 y contaminantes menores se retienen en la columna. La parte que pasa a través, que contiene zvegf3 altamente purificado, se recoge. La proteína recogida se desalada de acuerdo con procedimientos convencionales (por ejemplo, diálisis, cromatografía de intercambio iónico).

#### Ejemplo 21.

El zvegf3 recombinante se analizó para determinar actividad mitogénica en células de músculo liso aórticas humanas (HAoSMC; Clonetics Corp., Walkersville, MD) y células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC; Clonetics Corp.). HAoSMC y HUVEC se sembraron en placas a una densidad de 5.000 células/pocillo en placas de

cultivo de 96 pocillos y se cultivaron durante aproximadamente 24 horas en DMEM que contenía suero fetal de ternera al 10 % a 37 °C. Las células se sometieron a quiescencia mediante incubación de las mismas durante 24 horas en medio DMEM/F12 de Ham sin suero que contenía insulina (5 µg/ml), transferrina (20 µg/ml) y selenio (16 pg/ml) (ITS). Al momento del ensayo, el medio se eliminó y se añadieron las muestras de ensayo a los pocillos por triplicado. Las muestras de ensayo consistían en medio acondicionado (CM) a partir de células de queratinocitos humanos HaCaT infectadas por vía adenoviral (Boukamp y col., J. Cell. Biol. 106: 761-771, 1988) que expresaban zvegf3 de longitud completa, dominio del factor del crecimiento purificado expresado en células BHK o medio de control a partir de células infectadas con adenovirus parental (Zpar). El CM se concentró 10 veces usando un dispositivo de filtro centrífugo de 15 ml con un filtro de membrana de 10K (Ultrafree®; Millipore Corp., Bedford, MA), después se diluyó nuevamente hasta 3x con medio ITS y se añadió a las células. El CM de control se generó a partir de células HaCaT infectadas con un adenovirus que expresa proteína fluorescente verde parental y se trataron de forma idéntica al CM de zvegf3. La proteína purificada en un tampón que contenía BSA al 0,1 % se diluyó en serie en medio ITS a concentraciones de 1 µg/ml a 1 ng/ml y se añadió a la placa de ensayo. Un tampón de control de BSA al 0,1 % se diluyó de forma idéntica hasta la concentración más elevada de proteína de zvegf3 y se añadió a la placa. Para la medición de incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina, se añadieron 20 µl de una reserva de 50 mCi/ml en DMEM directamente a las células, para una actividad final de 1 mCi/pocillo. Después de 24 horas de incubación adicionales, se evaluó la actividad mitogénica midiendo la captación de [<sup>3</sup>H]timidina. Los medios se eliminaron y las células se incubaron con 0,1 ml de tripsina hasta que las células se desprendieron. Las células se recogieron en placas de filtro de 96 pocillos usando un recolector de muestras (recolector FilterMate™; Packard Instrument Co., Meriden, CT). Las placas se secaron posteriormente a 65 °C durante 15 minutos, se sellaron después de añadir 40 µl/pocillo de cóctel de escintilación (Microscint™ O; Packard Instrument Co.) y se recontaron en un contador de escintilación de placa de microtitulación (Topcount®; Packard Instrument Co.).

Los resultados presentados en la Tabla 8 demuestran que el CM de zvegf3 tenía aproximadamente una actividad mitogénica 1,5 veces más elevada sobre células HAoSM con respecto al CM de control y la proteína purificada provocaba un aumento máximo de 1,8 veces en la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina con respecto al tampón control.

35

Tabla 8

Muestra	CPM Incorporado Media	D.T.
zvegf3 (3x CM)	81089	8866
Zpar (3x CM)	58760	2558
dominio GF de zvegf3, 1 µg/ml	63884	3281
dominio GF de zvegf3, 500 ng/ml	57484	9744
dominio GF de zvegf3, 100 ng/ml	70844	10844
dominio GF de zvegf3, 50 ng/ml	61164	2813
dominio GF de zvegf3, 10 ng/ml	60676	1514
dominio GF de zvegf3, 5 ng/ml	60197	2481
dominio GF de zvegf3, 1 ng/ml	49205	5208
Tampón control	39645	9793
PDGF 10 ng/ml (respuesta máxima)	50634	4238
Medio en solitario (respuesta basal)	24220	2463

Los resultados presentados en la Tabla 9 demuestran que el CM de zvegf3 no tenía actividad mitogénica sobre HUVEC en comparación con el CM de control y la proteína purificada causaba un aumento máximo de 1,3 veces en la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina con respecto al tampón control.

Tabla 9

Muestra	CPM Incorporado	
	Media	D.T.
zvegf3 (3x CM)	62723	10716
Zpar (3x CM)	61378	1553
dominio VEGF de zvegf3, 1 µg/ml	44901	6592
dominio VEGF de zvegf3, 500 ng/ml	41921	5330
dominio VEGF de zvegf3, 100 ng/ml	35613	5187
dominio VEGF de zvegf3, 50 ng/ml	31107	525
dominio VEGF de zvegf3, 10 ng/ml	28505	2950
dominio VEGF de zvegf3, 5 ng/ml	29290	988
dominio VEGF de zvegf3 1 ng/ml	28586	2718
Tampón control	33461	404
VEGF 50 ng/ml (respuesta máxima)	53225	5229
Medio en solitario (respuesta basal)	22264	2814

**Ejemplo 22**

La proteína de zvegf3 recombinante se ensayó para estimulación de liberación de calcio intracelular como un indicador de unión a receptor y activación. Las células se cultivaron en portaobjetos con cubreobjetos de borosilicato en cámaras. El día del ensayo, las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en tampón KRW (KrebsRingerWollheim; NaCl 140 mM, KCl 3,6 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2 mM, glucosa 3 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM, HEPES 10 mM pH 7,4) que contenía fura-2 AM 2 µM (obtenido a partir de Molecular Probes Inc., Eugene, OR), se lavaron dos veces con tampón KRW y se permitió que se asentaran a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos antes de la adición del factor del crecimiento o medio de cultivo acondicionado por células (CM) para ensayarse. Los cambios en el calcio citosólico se midieron mediante formación de imágenes de proporción de fluorescencia (excitación a 340 nm dividida por excitación a 380 nm). La formación de imágenes digital se llevó a cabo usando un microscopio fluorescente invertido (Nikon TE300) provisto de un objetivo de aceite (Nikon 40x Plan Fluor). Las imágenes se adquirieron usando una cámara digital CCD Princeton y se analizando con software Universal Imaging Metafluor. Los datos se presentan en la Tabla 10.

15

Tabla 10

Línea celular	CM de zvegf3	CM de control	VEGF	PDGF BB
células de anillo aórtico	+	-	-	+
pericitos	+	-	-	+
células de músculo liso aórtico	+	-	-	+
fibroblastos adventicios aórticos	+	-	-	+

**Ejemplo 23**

El análisis de transferencia de Northern se realizó usando ARN total a partir de líneas de células neuronales y gliales humanas A172 (glioblastoma), NTera 2 (precursor neuronal de teratocarcinoma; obtenidas en Strategene Cloning Systems, La Jolla, CA), U-87 MG (glioblastoma/astrocitoma), U-118 MG (glioblastoma), U138 MG (glioblastoma), U373 MG (glioblastoma). A menos que se indique, las líneas celulares se obtuvieron en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA. Las transferencias se prepararon usando 10 µg de ARN por carril. Se generó una sonda de ADN de aproximadamente 400 pb mediante digestión de ADNc de zvegf3 humano con EcoRI y BglII. La sonda de ADN se sometió a electroforesis en gel seguido por extracción usando una columna spin que contenía una membrana de gel de sílice (Kit de Extracción de Gel QIAquick™; Qiagen, Inc., Valencia, CA). La sonda se marcó radiactivamente con <sup>32</sup>P usando un kit disponible en el mercado (sistema de marcación de cebador aleatorio Rediprime™ II; Amersham Corp., Arlington Heights, IL) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La sonda se purificó usando una columna de empuje. La hibridación tuvo lugar durante una noche a 65 °C en una solución disponible en el mercado (Solución de Hibridación ExpressHyb™; Clontech Laboratories, Inc.).

20 Posteriormente las transferencias se lavaron 4X en SSC 2X y SDS al 0,05 % a temperatura ambiente, seguido por dos lavados en SSC 0,1X y SDS al 0,1 % a 50 °C. Se detectó un tamaño de transcripto a aproximadamente 4 kb en muestras de A172, U-87 MG, U-118 MG, U138 MG y U373 MG. La intensidad de señal fue más elevada para U373 MG, U-118MG y U-87 MG.

25

**Ejemplo 24**

10 µg de proteína de dominio del factor del crecimiento de zvegf3 recombinante se combinaron con 438 µl de PBS que contenía 1 mCi de Na-<sup>125</sup>I (Amersham Corp.). Se añadió una perla de poliestireno no porosa derivatizada (IODO-Beads®; Pierce Chemical Co., Rockford, IL) y la mezcla de reacción se incubó un minuto en hielo. La 5 proteína yodada se separó de <sup>125</sup>I no incorporado mediante filtración en gel, tampón de elución PBS, gelatina al 0,25 %. La fracción activa contenía 4,9 µg/ml de <sup>125</sup>I-zvegf3 con una actividad específica de 4,3 X 10<sup>4</sup> cpm/ng.

Las siguientes líneas celulares se sembraron en placas en los pocillos de una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos y se cultivaron en medio de cultivo durante tres días:

- 10 1. Combinación de anillo aórtico de rata (ARC)
2. Clon 14B de anillo aórtico de rata (ARC#14B)
3. Células endoteliales de vena umbilical humana, pase 5 (HUVEC)
4. Fibroblastos adventiciais aórticos humanos, pase 4 (AOAF)
5. Células de músculo liso aórtico humanas, pase 9 (AOSMC)
6. Pericitos retinianos humanos, pase 4 (pericitos)

15 Las células se lavaron una vez con tampón de unión helado (RPMI que contenía BSA al 0,1 %, Tris:HCl 20 mM, pH 7,2) y después se añadieron 250 µl de la siguientes soluciones a cada uno de los tres pocillos de las placas de cultivo que contenían las células de ensayo.

Las soluciones de unión se prepararon en 5 ml de tampón de unión con 10 ng/ml de <sup>125</sup>I-zvegf3 y:

- 20 1. No adición.
2. Un µg/ml de zvegf3.
3. Un µg/ml de VEGF (R&D Systems, Minneapolis, MN).
4. Un µg/ml de PDGF-BB
5. Cinco µg/ml de receptor α de PDGF (R&D Systems).
6. Cinco µg/ml de receptor β de PDGF (como fusión Fc de IgG -dominio extracelular de receptor).

25 Las mezclas de reacción se incubaron en hielo durante 2 horas, después se lavaron tres veces con un ml de tampón de unión helado. El <sup>125</sup>I-zvegf3 unido se cuantificó mediante recuento gamma de un extracto de NaOH de las células.

Los resultados, mostrados en la Figura 5, indican unión de zvegf3 al receptor α de PDGF. Los datos se grafican como <sup>125</sup>Izvegf3 unido/pocillo. Las barras de error representan desviaciones típicas.

30 El experimento se repitió con la adición de células estrelladas de hígado de rata, pase 6 (Greenwel y col., Laboratory Investigation 69: 210-216, 1993). Las células estrelladas se unieron a zvegf3 a un nivel comparable a pericitos.

**Ejemplo 25**

La unión de zvegf3 recombinante a receptores PDGF alfa y beta se midió mediante espectrometría de masas usando un instrumento de desorción e ionización de láser potenciado por superficie (SELDI) (Proteinchip™, Ciphergen Biosystems, Palo Alto, CA). Para este experimento se usó una disposición de superficie preactivada de 8 puntos. A esta microplaca activada por amina, se añadió proteína-A (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA) a una concentración de 1 mg/ml y la microplaca se incubó a 4 °C durante cuatro horas. Después de bloqueo con etanolamina 1 M pH 8,0 y lavados posteriores (una vez en Triton X-100 al 0,1 % en PBS; una vez en Acetato de Na 100 mM, pH 4,5, NaCl 0,5 M; una vez en Tris-HCl 100 mM, pH 8,5, NaCl 0,5 M; una vez en PBS), se añadieron las 35 proteínas de fusión de Fc de IgG -dominio extracelular de receptor (receptor de PDGF alfa, receptor de PDGF beta o receptor de control no relacionado) y la microplaca se incubó a 4 °C durante una noche. Después de tres lavados en PBS, se añadieron 250 µl de zvegf3 (300 ng/ml), PDGF-AA o PDGF-BB y la microplaca se incubó durante una noche a 4 °C. La microplaca se lavó dos veces con Triton X100 al 0,05 %, HEPES 100 mM pH 7,2, y después dos 40 veces con agua desionizada. Se permitió que la microplaca se seca a temperatura ambiente antes de dos adiciones de 0,3 µl de ácido sinapínico (Ciphergen Biosystems) en una mezcla 50:50 de acetonitrilo y ácido trifluoroacético al 1 %. Los ligandos que se unieron al receptor se retuvieron en la microplaca después de lavado y posteriormente se detectaron mediante espectrometría de masas. La asignación de un + o - para unión se realizó 45 comparando el perfil de espectrometría de masas del receptor de PDGF con el de un control con únicamente Fc para cada ligando. Los datos se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11

	PDGF AA	PDGF AB	PDGF BB	ZVEGF3
PDGFR-alfa/Fc	+	+	+	+
PDGFR-beta/Fc	+/-	+/-	+	-

**Ejemplo 26**

Se realizó análisis de transferencia de Northern con ARN poli(A) a partir de líneas de células vasculares humanas HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana; Cascade Biologics, Inc., Portland, OR), HPAEC (células endoteliales de arteria pulmonar humana; Cascade Biologics), HAEC (células endoteliales aórticas humanas; Cascade Biologics), AoSMC (células de músculo liso aórtico; Clonetics Corporation, Walkersville, MD), UASMC (células de músculo liso de arteria umbilical; Clonetics Corp.), HISM (músculo liso intestinal humano; Colección Americana de Cultivos Tipo, CRL 7130), SK5 (células fibroblásticas dérmicas humanas; obtenidas en Dr. Russel Ross, University of Washington), NHLF (fibroblastos de pulmón humano normales; Clonetics Corp.), NHDF-neo (fibroblasto neonatal dérmico humano normal; Clonetics Corp.); y de células de leucemia Daudi, Raji, Molt-4, K562

5 (todas obtenidas en Clontech Laboratories, Inc.), HL60, Jurkat y Hut 78. Se cargó ARN a 2 µg por carril. Se generó una sonda de ADN de aproximadamente 490 pb mediante digestión de un clon de zVEGF3 de longitud completa con Pvul y Stul. La sonda de ADN se sometió a electroforesis y se purificó usando una columna spin que contenía una membrana de gel de sílice (Kit de Extracción de Gel QIAquick™; Qiagen, Inc., Valencia, CA). La sonda se marcó radiactivamente con <sup>32</sup>P usando un kit disponible en el mercado (sistema de marcación de cebador aleatorio II 10 Rediprime™; Amersham Corp., Arlington Heights, IL) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La sonda se purificó usando una columna de empuje. Se usó solución Expresshyb (Clontech, Palo Alto, Ca) para la solución de hibridación para las transferencias. La hibridación tuvo lugar durante una noche a 65 °C en una solución de hibridación disponible en el mercado (Solución de Hibridación ExpressHyb™; Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA). Posteriormente las transferencias se lavaron cuatro veces en SSC 2X y SDS al 0,1 % a temperatura ambiente, 15 seguido por dos lavados en SSC 0,1X y SDS al 0,1 % a 50 °C. Se detectó un tamaño de transcripto a 20 aproximadamente 4 kb en NHLF, NHDF-neo, SK5, UASMC, HAEC, AoSMC, Jurkat, Hut78. La intensidad de señal fue mayor para UASMC, SK5, NHLF y NHDF-neo.

**Ejemplo 27**

25 Los efectos de zvegf3 sobre regeneración endotelial vascular e hiperplasia de la íntima se ensayan en un modelo de arteria carótida de rata lesionada mediante globo. Se usa adenovirus como el vector de administración.

Para determinar la infectividad del adenovirus y el nivel de expresión génica obtenida en la pared vascular, las ratas 30 se lesionan mediante globo como se divulga más adelante y se infunden con un vector de adenovirus que comprende una unidad de expresión para proteína fluorescente verde (GFP). Cada uno de tres grupos de tres ratas se infunden con dosis de  $1,5 \times 10^{10}$  ufp/ml,  $3 \times 10^{10}$  ufp/ml y  $6 \times 10^{10}$  ufp/ml. Las carótidas lesionadas y no lesionadas se recogen 48 horas después de la infección y se fijan en formalina tamponada al 10 % durante 24 h. El tejido se procesa y se analiza usando un anticuerpo anti-GFP para determinar el % de infectividad.

35 Los efectos de zvegf3 se determinan en un estudio de 14 días usando la dosis óptima determinada a partir del estudio de GFP. Dos grupos de 14 animales cada uno se someten a lesión mediante globo y se infectan con adenovirus de zvegf3 o adenovirus de control. La carótida común izquierda se aísla y se detiene el flujo de sangre a través del vaso atando la carótida interna, la carótida externa y proximalmente, la carótida común. Se realiza una arteriotomía entre el amarre en la carótida externa y la bifurcación y el vaso se enjuaga con Ringer lactato. Se inserta un catéter de embolectomía 2F, se infla y se retira, mientras se gira, para retirar las células endoteliales; este procedimiento se realiza tres veces. Posteriormente el vaso se enjuaga nuevamente y se inyectan aproximadamente 50 µl de solución de adenovirus en el mismo usando un catéter de tubos silásticos. El catéter se amarra en el vaso 40 inmediatamente distal a la bifurcación y se deja en ese lugar durante aproximadamente 20 minutos. Posteriormente el catéter se retira y el vaso se enjuaga brevemente con sangre aflojando el amarre proximal. Se realiza un amarre inmediatamente distal a la bifurcación. El flujo de sangre se restaura retirando el amarre en la carótida interna y el amarre proximal en la carótida común. Los amarres en la carótida externa se mantienen. Para determinar la producción de proteína de zvegf3 en la pared del vaso, se sacrifican dos animales de cada grupo en los días uno y siete. Los tejidos se procesan para análisis inmunohistoquímico y análisis de transferencia de Western. Para análisis 45 inmunohistoquímico, los tejidos se mantienen en formalina durante 24 horas, después se transfieren a alcohol etílico al 70 %. Para el análisis de transferencia de Western, los tejidos se congelan de forma inmediata y se almacenan a -80 °C. A los trece días a los animales se les proporcionan comprimidos de BrdU por vía subcutánea. A los catorce días (24 horas después de la inserción de BrdU) se proporciona por vía intravenosa colorante Azul de Evan para teñir los segmentos no endotelializados y se toman muestras de sangre de los animales y se sacrifican. Posteriormente los animales se desangran y se fijan por perfusión con formalina tamponada al 10 %. Ambas 50 carótidas, hígado, riñón y bazo se recogen. Las carótidas se inspeccionan visualmente y se cuantifica la reendotelización midiendo la distancia desde la bifurcación hasta el límite de colorante distal (blanco/azul). Todo el tejido se mantiene en formalina durante 24 horas y después se transfiere alcohol etílico al 70 %. Las carótidas se 55 cortan en tres trozos cada una y se incrustan en bloques de parafina. El hígado, riñón y bazo se inspeccionan visualmente y se procesan. Se preparan portaobjetos de cortes transversales de las carótidas y se tiñen con hematoxilina y eosina, después se miden usando el programa de diagnóstico SPOT® (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI). Las mediciones incluyen la longitud de la lámina elástica interna y las áreas de la media, íntima y lumen. El análisis de ICC incluye el número de células infectadas (usando anticuerpo anti-gfp), proliferación celular 60 (marcación con BrdU) y % de muerte celular.

Se realiza un tercer estudio para determinar la evolución temporal de la expresión génica de zvegf3 a continuación de lesión mediante globo. Las carótidas se recogen a partir de animales lesionados por balón (5 animales/punto de tiempo) a T= 0 (no lesionados), T= 6 h, 1, 4, 7 y 14 días. Las carótidas se congelan de forma inmediata y se almacenan a -80 °C para análisis de transferencia de Northern.

5      **Ejemplo 28**

Se construyó un plásmido de expresión que contenía un polinucleótido que codifica zvegf3 humano fusionado en el extremo N-terminal a proteína de unión a maltosa (MBP) a través de recombinación homóloga.

Un fragmento de ADNc de zvegf3 humano se aisló usando PCR. Se usaron dos cebadores en la producción del fragmento de zvegf3 humano en una reacción de PCR. El cebador ZC20,572 (SEC ID Nº: 44), contenía 40 pb de secuencia flanqueante de vector y 25 pb correspondientes al extremo amino de zvegf3 humano y el cebador ZC20,573 (SEC ID Nº: 45) contenía 40 pb del extremo 3' correspondientes a la secuencia de vector flanqueante y 25 pb correspondientes al extremo carboxilo de zvegf3 humano. Las condiciones de reacción de PCR fueron 25 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1,5 minutos; seguido por remojo a 4 °C, desarrollo por duplicado. Una alícuota de 2 µl de la mezcla de reacción de 100 µl se desarrolló en un gel de agarosa al 1,0 % con tampón Tris/borato/EDTA para análisis y la banda esperada de aproximadamente 1000 pb se observó. Los restantes 90 µl de la mezcla de reacción se combinaron con el segundo precipitado de tubo de PCR con 400 µl de etanol absoluto que se tenía que usar para recombinación en el vector receptor con Sma1-cortado pTAP98 para producir la construcción que codifica la fusión MBP-zvegf3.

El plásmido pTAP98 se obtuvo a partir de los plásmidos pRS316 (un vector lanzadera de *Saccharomyces cerevisiae*; véase Hieter y Sikorski, Genetics 122: 19-27, 1989) y pMAL<sup>TM</sup>-c2X (New England Biolabs; Beverly, MA). El último vector porta el promotor tac que dirige *MalE* (gen que codifica MBP) seguido por una etiqueta His, un sitio de escisión de trombina, un sitio de clonación y el terminador *rmB*. El vector pTAP98 se construyó usando recombinación homóloga de levadura. 100 ng de pMAL<sup>TM</sup>-c2X con EcoRI-cortado se recombinaron con 1 µg de pRS316 con Pvul-cortado, 1 µg de engarce y 1 µg de pRS316 con Sca1/EcoRI-cortado. El engarce se construyó combinando los oligonucleótidos ZC19,372 (SEC ID Nº: 46) (100 pmol), ZC19,351 (SEC ID Nº: 47) (1 pmol), ZC19,352 (SEC ID Nº: 48) (1 pmol) y ZC19,371 (SEC ID Nº: 49) (100 pmol) en una reacción de PCR durante 10 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos; seguido por remojo a 4 °C. Los productos de PCR se concentraron a través de precipitación con etanol al 100 %.

Un vector que contiene la secuencia de fusión MBP-zvegf3 se construyó mediante recombinación homóloga. Cien microlitros de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) se combinaron con 10 µl de una mezcla que contenía aproximadamente 1 µg del inserto de zvegf3 humano y 100 ng de vector pTAP98 digerido por Sma1, y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La mezcla de levadura/ADN se sometió a electropulsación a 0,75 kV (5 kV/cm), ohmios infinitos, 25 µF. se añadieron 600 µl de sorbitol 1,2 M a cada cubeta. La levadura posteriormente se sembró en placas en dos alícuotas de 300 µl en dos placas URA D y se incubó a 30 °C. Despues de aproximadamente 48 horas, los transformantes de levadura Ura+ a partir de una placa única se resuspendieron en 1 ml de H<sub>2</sub>O y se centrifugaron brevemente para sedimentar las células de levadura. El sedimento celular se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis (Triton X-100 al 2 %, SDS al 1 %, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Se añadieron quinientos microlitros de la mezcla de lisis a un tubo Eppendorf que contenía 300 µl de perlas de vidrio lavadas con ácido y 200 µl de fenol-cloroformo, se sometieron a agitación vortical durante intervalos de 1 minuto dos o tres veces, seguido por una centrifugación de 5 minutos en una microcentrifuga a velocidad máxima. Trescientos microlitros de la fase acuosa se transfirieron a un tubo fresco y el ADN se precipitó con 600 µl de etanol (EtOH), después se centrifugó durante 10 minutos a 4 °C. El sedimento de ADN se resuspendió en 100 µl de H<sub>2</sub>O. Células *E. coli* electrocompetentes (MC1061; Casadaban y col., J. Mol. Biol. 138: 179-207) se transformaron con 1 µl del ADN prep de levadura en un volumen de 40 µl. las células se sometieron a electropulsación a 2,0 kV, 25 µF, 400 ohmios. A continuación de la electroporación, 0,6 ml de SOC (2 % Bacto<sup>TM</sup> Tryptone (Difco Laboratories, Detroit, MI), extracto de levadura al 0,5 % (Difco Laboratories), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM) se sembraron en placa en una alícuota en placas AMP LB (caldo LB (Lennox), agar al 1,8 % (Bacto<sup>TM</sup>; Difco Laboratories), 100 mg/l de ampicilina). Clones individuales que portaban la construcción de expresión correcta para zvegf3 se identificaron mediante expresión. Las células se cultivaron en medio mínimo complementados con ácidos casamino y 100 µg/ml de ampicilina durante una noche. 50 µl de cultivo durante una noche se usó para inocular 2 ml de medio recién preparado. Los cultivos se cultivaron a 37 °C, agitando durante 2 horas. Un ml del cultivo se indujo con IPTG 1 mM. 2-4 horas más tarde 250 µl de cada cultivo se mezclaron con 250 µl de perlas de vidrio lavadas con ácido y 250 µl de tampón Thamer (urea 8 M, Tris 100 mM pH 7,0, glicerol al 10 % EDTA 2 mM, SDS al 5 %) complementado con p-ME al 5 % y colorante. Las muestras se sometieron a agitación vortical durante un minuto y se calentaron a 65 °C durante 5-10 minutos. Se cargaron 20 µl por carril en un gel PAGE al 4 %-12 % (NOVEX, San Diego, CA). Los geles se desarrollaron en tampón MES 1X. Los clones positivos se denominaron pCZR236 y se sometieron a análisis de secuencia. La secuencia polinucleotídica de la fusión MBP-zvegf3 en pCZR236 se muestra en SEC ID Nº: 50.

Para expresar la proteína de fusión, se usó 1  $\mu$ l de ADN de secuenciación para transformar la cepa W3110 de *E. coli* (obtenida en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA). Las células se sometieron a electropulsación a 2,0 kV, 25  $\mu$ F y 400 ohmios. A continuación de la electroporación, 0,6 ml de SOC (Bacto<sup>TM</sup> Triptona al 2 % (Difco Laboratories), extracto de levadura al 0,5 % (Difco Laboratories), NaCl 10 mM, KCl 2,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM) se sembraron en placas en una alícuota en placas AMP LB (caldo LB (Lennox), Bacto<sup>TM</sup> Agar al 1,8 % (Difco Laboratories), 100 mg/l de ampicilina). Las células se eligieron a partir de la placa y se cultivaron en medio mínimo que contenía ácidos casamino durante una noche. Una alícuota de 50  $\mu$ l del cultivo de una noche se usó para inocular 2 ml de medio recién preparado. Los cultivos se cultivaron a 37 °C con agitación durante 2 horas. Un ml del cultivo se indujo con IPTG 1 mM y las células se lisaron básicamente como se ha descrito anteriormente. Alícuotas de veinte  $\mu$ l del lisado se analizaron mediante electroforesis en gel como se ha descrito anteriormente.

#### Ejemplo 29

Zvegf3 recombinante se analizó para determinar actividad mitogénica en células estrelladas de rata (obtenidas en N. Fausto, University Of Washington). Las células estrelladas se sembraron en placas a una densidad de 2000 células/pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos y se cultivaron durante aproximadamente 72 horas en DMEM que contenía suero fetal de ternera al 10 % a 37 °C. Las células se sometieron a quiescencia mediante su incubación durante 20 horas en medio DMEM/F12 de Ham sin suero que contenía insulina (5  $\mu$ g/ml), transferrina (20  $\mu$ g/ml) y selenio (16  $\mu$ g/ml) (ITS). Al momento del ensayo, el medio se retiró, y las muestras de ensayo se añadieron a los pocillos por triplicado. Las muestras de ensayo consistían en medio acondicionado (CM) a partir de células de queratinocitos humanos HaCaT infectadas por adenovirus (Boukamp y col., J. Cell. Biol. 106: 761-771, 1988) que expresan zvegf3 de longitud completa, dominio del factor del crecimiento purificado expresado en células BHK o medio de control de células infectadas con adenovirus parental (Zpar) que contienen una unidad de expresión para proteína fluorescente verde. El CM se concentró 10 veces usando un dispositivo de filtro centrífugo de 15 ml con una membrana de filtro de 10K (Ultrafree®; Millipore Corp., Bedford, MA), después se diluyó nuevamente hasta 3x con medio ITS y se añadió a las células. La proteína purificada en un tampón que contenía BSA al 0,1 % se diluyó en serie en medio ITS a concentraciones de 1  $\mu$ g/ml a 1 ng/ml y se añadió a la placa de ensayo. Un tampón de control de BSA al 0,1 % se diluyó de forma idéntica hasta la concentración más elevada de proteína de zvegf3 y se añadió a la placa. Para la medición de incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina, se añadieron 20  $\mu$ l de una reserva de 50  $\mu$ Ci/ml en DMEM directamente a las células, para una actividad final de  $\mu$ Ci/pocillo. Después de una incubación de 24 horas adicional, se evaluó la actividad mitogénica midiendo la captación de [<sup>3</sup>H]timidina. Los medios se retiraron y las células se incubaron con 0,1 ml de tripsina hasta que las células se desprendieron. Las células se recogieron en placas de filtro de 96 pocillos usando un recolector de muestras (recolector FilterMate<sup>TM</sup>; Packard Instrument Co., Meriden, CT). Las placas se secaron posteriormente a 65 °C durante 15 minutos, se sellaron después de añadir 40  $\mu$ l/pocillo de coctel de escintilación (Microscint<sup>TM</sup> O; Packard Instrument Co.) y se realizó el recuento en un contador de escintilación de placa de microtitulación (Topcount®; Packard Instrument Co.).

Los resultados, presentados en la Tabla 12, demostraron que el CM de zvegf3 tenía una actividad mitogénica aproximadamente 4,4 veces más elevada en células estrelladas con respecto a CM de control y la proteína purificada a 100 ng/ml provocaba un aumento máximo de 14 veces en la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina con respecto al tampón control.

Tabla 12

Muestra	CPM Incorporado	
	Media	D.T.
zvegf3 (2x CM)	42489	1306
Zpar (2x CM)	9629	540
dominio GF de zvegf3, 100 ng/ml	77540	4142
dominio GF de zvegf3, 33,3 ng/ml	74466	18142
dominio GF de zvegf3, 11,1 ng/ml	52462	6239
dominio GF de zvegf3, 3,7 ng/ml	15128	4989
Tampón control	5618	573
PDGF-BB 20 ng/ml	19741	2075
PDGF-AA 20 ng/ml	33133	3325
Medio en solitario (respuesta basal)	6765	226

A partir de lo anterior, se apreciará que, aunque se han descrito realizaciones específicas de la invención en la presente memoria con fines de ilustración, se pueden realizar diversas modificaciones sin alejarse del alcance de la invención como se define por las reivindicaciones. Por consiguiente, la invención no está limitada excepto por las reivindicaciones adjuntas.

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ZymoGenetics. Inc.  
 <120> HOMÓLOGO DEL FACTOR DEL CRECIMIENTO ZVEGF3  
 5 <130> 98-60PC  
 <160> 50  
 10 <170> FastSEQ para Windows Versión 3.0  
 <210> 1  
 <211> 1760  
 <212> ADN  
 15 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (154)...(1191)  
 20 <400> 1

attatgtgga aactaccctg cgattctctg ctgccagagc aggctcggcg cttccacccc agtgcagcct tccccctggcg gtggtgaaag agactcggga gtcgctgctt ccaaagtgcc cgccgtgagt gagctctcac cccagtcagc caa atg agc ctc ttc ggg ctt ctc Met Ser Leu Phe Gly Leu Leu 1                        5	60 120 174
ctg ctg aca tct gcc ctg gcc ggc cag aga cag ggg act cag gcg gaa Leu Leu Thr Ser Ala Leu Ala Gly Gln Arg Gln Gly Thr Gln Ala Glu 10                        15                        20	222
tcc aac ctg agt agt aaa ttc cag ttt tcc agc aac aag gaa cag aac Ser Asn Leu Ser Ser Lys Phe Gln Phe Ser Ser Asn Lys Glu Gln Asn 25                        30                        35	270
gga gta caa gat cct cag cat gag aga att att act gtg tct act aat Gly Val Gln Asp Pro Gln His Glu Arg Ile Ile Thr Val Ser Thr Asn 40                        45                        50                        55	318
gga agt att cac agc cca agg ttt cct cat act tat cca aga aat acg Gly Ser Ile His Ser Pro Arg Phe Pro His Thr Tyr Pro Arg Asn Thr 60                        65                        70	366

ES 2432 053 T3

gtc ttg gta tgg aga tta gta gca gta gag gaa aat gta tgg ata caa	414		
Val Leu Val Trp Arg Leu Val Ala Val Glu Glu Asn Val Trp Ile Gln			
75	80	85	
ctt acg ttt gat gaa aga ttt ggg ctt gaa gac cca gaa gat gac ata	462		
Leu Thr Phe Asp Glu Arg Phe Gly Leu Glu Asp Pro Glu Asp Asp Ile			
90	95	100	
tgc aag tat gat ttt gta gaa gtt gag gaa ccc agt gat gga act ata	510		
Cys Lys Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu Glu Pro Ser Asp Gly Thr Ile			
105	110	115	
tta ggg cgc tgg tgt ggt tct ggt act gta cca gga aaa cag att tct	558		
Leu Gly Arg Trp Cys Gly Ser Gly Thr Val Pro Gly Lys Gln Ile Ser			
120	125	130	135
aaa gga aat caa att agg ata aga ttt gta tct gat gaa tat ttt cct	606		
Lys Gly Asn Gln Ile Arg Ile Arg Phe Val Ser Asp Glu Tyr Phe Pro			
140	145	150	
tct gaa cca ggg ttc tgc atc cac tac aac att gtc atg cca caa ttc	654		
Ser Glu Pro Gly Phe Cys Ile His Tyr Asn Ile Val Met Pro Gln Phe			
155	160	165	
aca gaa gct gtg agt cct tca gtg cta ccc cct tca gct ttg cca ctg	702		
Thr Glu Ala Val Ser Pro Ser Val Leu Pro Pro Ser Ala Leu Pro Leu			
170	175	180	
gac ctg ctt aat aat gct ata act gcc ttt agt acc ttg gaa gac ctt	750		
Asp Leu Leu Asn Asn Ala Ile Thr Ala Phe Ser Thr Leu Glu Asp Leu			
185	190	195	
att cga tat ctt gaa cca gag aga tgg cag ttg gac tta gaa gat cta	798		
Ile Arg Tyr Leu Glu Pro Glu Arg Trp Gln Leu Asp Leu Glu Asp Leu			
200	205	210	215
tat agg cca act tgg caa ctt ctt ggc aag gct ttt gtt ttt gga aga	846		
Tyr Arg Pro Thr Trp Gln Leu Leu Gly Lys Ala Phe Val Phe Gly Arg			
220	225	230	
aaa tcc aga gtg gtg gat ctg aac ctt cta aca gag gag gta aga tta	894		
Lys Ser Arg Val Val Asp Leu Asn Leu Leu Thr Glu Glu Val Arg Leu			
235	240	245	

ES 2 432 053 T3

tac agc tgc aca cct cgt aac ttc tca gtg tcc ata agg gaa gaa cta		942
Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn Phe Ser Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu		
250	255	260
aag aga acc gat acc att ttc tgg cca ggt tgt ctc ctg gtt aaa cgc		990
Lys Arg Thr Asp Thr Ile Phe Trp Pro Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg		
265	270	275
tgt ggt ggg aac tgt gcc tgt tgt ctc cac aat tgc aat gaa tgt caa		1038
Cys Gly Gly Asn Cys Ala Cys Cys Leu His Asn Cys Asn Glu Cys Gln		
280	285	290
295		
tgt gtc cca agc aaa gtt act aaa aaa tac cac gag gtc ctt cag ttg		1086
Cys Val Pro Ser Lys Val Thr Lys Lys Tyr His Glu Val Leu Gln Leu		
300	305	310
aga cca aag acc ggt gtc agg gga ttg cac aaa tca ctc acc gac gtg		1134
Arg Pro Lys Thr Gly Val Arg Gly Leu His Lys Ser Leu Thr Asp Val		
315	320	325
gcc ctg gag cac cat gag gag tgt gac tgt gtg tgc aga ggg agc aca		1182
Ala Leu Glu His His Glu Glu Cys Asp Cys Val Cys Arg Gly Ser Thr		
330	335	340
gga gga tag ccgcattacc accaggagct cttggccaga gctgtgcagt		1231
Gly Gly *		
345		
gcagtggctg attctattag agaacgtatg cgttatctcc atcctaatac tcagttttt		1291
gcttcaagga ctttcatct tcaggattta cagtgcattc tgaaagagga gacatcaaac		1351
agaatttagga gtttgcaac agctctttt agaggaggcc taaaggacag gagaaaaaggt		1411
cttcaatctgtt ggaagaaaa ttaaatgttg tattaaatag atcaccagct agtttcagag		1471
ttaccatgtt cgtattccac tagctgggtt ctgtatttca gttttcgat taccggctt		1531
ggtaatgtca gtacaggaaa aaaactgtgc aagtgagcac ctgattccgt tgccttgctt		1591
aactctaaag ctccatgtcc tgggcctaaa atcgtataaa atctggattt tttttttttt		1651
tttttgcata tattcacata tgtaaaccag aacattctat gtactacaaa cctggttttt		1711
aaaaaqqaac tatqttqcta tqaattaaac ttgtqtcgtq ctgataqqa		1760

<210> 2

<211> 345

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223>motivo de péptido  
 <221> VARIANTE

	<222> (2)...(19)
	<223> Xaa es cualquier aminoácido
5	<221> VARIANTE
	<222> (20)...(34)
	<223> Xaa es cualquier aminoácido o no está presente
10	<221> VARIANTE
	<222> (36)...(36)
	<223> Xaa es cualquier aminoácido
15	<221> VARIANTE
	<222> (38)...(38)
	<223> Xaa es cualquier aminoácido
20	<221> VARIANTE
	<222> (40)...(45)
	<223> Xaa es cualquier aminoácido
25	<221> VARIANTE
	<222> (46)...(72)
	<223> Xaa es cualquier aminoácido o no está presente
30	<221> VARIANTE
	<222> (74)...(93)
	<223> Xaa es cualquier aminoácido
35	<221> VARIANTE
	<222> (94)...(113)
	<223> Xaa es cualquier aminoácido no está presente
	<221> VARIANTE
	<222> (115)...(115)
	<223> Xaa es cualquier aminoácido
	<400> 3
	Cys Xaa Xaa 1                         5                                     10                             15
	Xaa Xaa 20   25                                     30
	Xaa Xaa Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa 35   40                                     45
	Xaa Xaa 50                                     55                                     60
	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa 65                                     70                                     75                             80
	Xaa Xaa 85                                     90                                     95
	Xaa Xaa 100                                     105                                     110
	Xaa Cys Xaa Cys 115
40	<210> 4
	<211> 24
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
45	<220>
	<223> motivo de péptido



	atgwsnytnt tyggnytnty nytnytnacn wsngcnytng cnggnacnrg ncarggnacn cargcngarw snaayytnws nwsnaartty carttywsnw snaayaarga rcaraayggn gtncargayc cncarcayga rmgnathath acngtrwsna cnaayggwns nathcaywsn ccnmgnntyc cncayacnta yccnmgnaay acngtntyng tntggmgnyt ngtngcngtn gargaraayg tntggathca rytnacntt gaygarmgnt tyggnytnga rgayccngar	60 120 180 240 300
	gaygayatht gyaartayga yttygtngar gtngargarc cnwsngaygg nacnathytn gnmgnntgg gyggnwsgg nacngtnccn gnaarcara thwsnaargg naaycarath mgnathmgnt tygtwsnga ygartaytty ccnwsngarc cnggnnttytg yathcaytay aayathgtta tgccncartt yacngargcn gtnwsnccnw sngtntytncc nccnwsngcn ytnccnytng ayytnynaa yaaygcnath acngcnntyw snacnytnga rgayytnath mgnaytng arccngarmg ntggcarytn gayytnarg ayytntaymg nccnacntgg carytnytng gnaargcntt ygtnttyggm mnnaarwsnm gngtngtnga yytnaayyt ytnacngarg argtnmgnyt ntaywsntgy acnccnmgna aytywsngt nwsnathmgn gargarytna armgnaacnnga yacnathtta tggccngngt gyytnytngt naarmgnntgy gngngnaayt gygcntgytg yytncayaay tgyaaygart gycartgygt nccnwsnaar gtnacnaara artaycayga rgtnytnear ytnmgnccna aracnggnnt mngnggnyt cayaarwsny tnacngaygt ngcnytngar caycaygarg artgygaytg ygtntgymgn gnwsnacng gnggn	360 420 480 540 600 660 720 780 840 900 960 1020 1035
5	<210> 7 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
15	<221> misc_feature <222> (1)...(17) <223> n = A, T, C o G	
20	<400> 7 mgntgyggng gnaaytg 17	
25	<210> 8 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
35	<221> misc_feature <222> (1)...(17) <223> n = A, T, C o G	
40	<400> 8 mgntgydsng gnwrytg 17	
	<210> 9 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
	<221> misc_feature <222> (1)...(17)	

<223> n = A, T, C o G  
 <400> 9  
 carywnccns hrcanck 17  
 5 <210> 10  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 15 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A, T, C o G  
 20 <400> 10  
 ttytgccng gntgyt 17  
 25 <210> 11  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A, T, C o G  
 35 <400> 11  
 ntndnccnn sntgybt 17  
 40 <210> 12  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A, T, C o G  
 50 <400> 12  
 avrcansnng gnhhnan 17  
 55 <210> 13  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 <400> 13  
 caygargart gygaytg 17  
 65 <210> 14  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 5       <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A, T, C o G  
 <400> 14  
 caynnnnvnt gyvvntg      17  
 10      <210> 15  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15      <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 20      <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A, T, C o G  
 <400> 15  
 canbrcanb nnnnrtg      17  
 25      <210> 16  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30      <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 35      <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A, T, C o G  
 <400> 16  
 tgyacnccnm gnaaytt      17  
 40      <210> 17  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45      <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 50      <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A, T, C o G  
 <400> 17  
 tgyhnnmcnm knrmndh      17  
 55      <210> 18  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60      <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 65      <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A, T, C o G

<400> 18  
 dhnkynmkng knndrca 17  
 5 <210> 19  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 <400> 19  
 tgyaartayg aytwygt 17  
 15 <210> 20  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 <400> 20  
 acrwartcrt ayttrca 17  
 25 <210> 21  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 35 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A, T, C o G  
 <400> 21  
 ywnggnmrnt dbtgygg 17  
 40 <210> 22  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 50 <221> misc\_ifeature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A, T, C o G  
 <400> 22  
 ccrcavhany knccnwr 17  
 55 <210> 23  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 65 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(17)  
 <223> n = A, T, C o G

	<400> 23 tdbccnmand vntaycc	17
5	<210> 24 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
15	<221> misc_feature <222> (1)...(17) <223> n = A, T, C o G	
15	<400> 24 ggrtanbhnt knngvha	17
20	<210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
30	<400> 25 agcagggtcca gtggcaaagc	20
35	<210> 26 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
40	<400> 26 cgtttgatga aagatttggg c	21
45	<210> 27 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
50	<400> 27 ggaggtctat ataagcagag c	21
55	<210> 28 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador oligonucleotídico	
60	<400> 28 taacagagga ggttaagat	18
65	<210> 29 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 5       <400> 29  
 tcggttctt ttagttct           18  
 <210> 30  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 10      <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 15      <400> 30  
 tctggacgtc ctccgtctt tata   25  
 <210> 31  
 <211> 25  
 20      <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 25      <400> 31  
 ggtatggagc caggggcaag ttggg   25  
 <210> 32  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 30      <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 35      <400> 32  
 gagtggaac ttccaggggcc aggagag   27  
 <210> 33  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 40      <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico  
 45      <400> 33  
 cttttgctt cctcaaccct gactatc   27  
 <210> 34  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 50      <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC20.180  
 55      <400> 34  
 cgcgccgtt aaacgccacc atgagcctt tcggg   35  
 <210> 35  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 60      <213> Secuencia artificial  
 <220>

ES 2 432 053 T3

<220>  
<223> Cebador oligonucleotídico ZC20.181

5           <400> 35  
cgtatggcg cgccctatcc tccttgctc cc           32

10          <210> 36  
<211> 1882  
<212> ADN  
10          <213> Homo sapiens

15          <220>  
<221> CDS  
<222> (226)...(1338)

15          <400> 36

ccgtcaccat ttatcagclc agcaccacaa ggaagtgcgg caccacacg cgctcgaaa       60  
gttcagcatg caggaagttt ggggagagct cggcgattag cacagcgacc cgggccagcg   120

## ES 2 432 053 T3

cagggcgagc gcaggcgccg agagcgcagg gcggcgccgc gtcggtcccgg ccggctttt cttggagcga cgctgtctct agtcgtat cccaa atg cac cgg ctc	180 237
	Met His Arg Leu 1
atc ttt gtc tac act cta atc tgc gca aac ttt tgc agc tgt cgg gac Ile Phe Val Tyr Thr Leu Ile Cys Ala Asn Phe Cys Ser Cys Arg Asp	285
5 10 15 20	
act tct gca acc ccg cag agc gca tcc atc aaa gct ttg cgc aac gcc Thr Ser Ala Thr Pro Gln Ser Ala Ser Ile Lys Ala Leu Arg Asn Ala	333
25 30 35	
aac ctc agg cga gat gag agc aat cac ctc aca gac ttg tac cga aga Asn Leu Arg Arg Asp Glu Ser Asn His Leu Thr Asp Leu Tyr Arg Arg	381
40 45 50	
gat gag acc atc cag gtg aaa gga aac ggc tac gtg cag agt cct aga Asp Glu Thr Ile Gln Val Lys Gly Asn Gly Tyr Val Gln Ser Pro Arg	429
55 60 65	
ttc ccg aac agc tac ccc agg aac ctg ctc ctg aca tgg cgg ctt cac Phe Pro Asn Ser Tyr Pro Arg Asn Leu Leu Leu Thr Trp Arg Leu His	477
70 75 80	
tct cag gag aat aca ccg ata cag cta gtg ttt gac aat cag ttt gga Ser Gln Glu Asn Thr Arg Ile Gln Leu Val Phe Asp Asn Gln Phe Gly	525
85 90 95 100	
tta gag gaa gca gaa aat gat atc tgt agg tat gat ttt gtg gaa gtt Leu Glu Glu Ala Glu Asn Asp Ile Cys Arg Tyr Asp Phe Val Glu Val	573
105 110 115	
gaa gat ata tcc gaa acc agt acc att att aga gga cga tgg tgt gga Glu Asp Ile Ser Glu Thr Ser Thr Ile Ile Arg Gly Arg Trp Cys Gly	621
120 125 130	
cac aag gaa gtt cct cca agg ata aaa tca aga acg aac caa att aaa His Lys Glu Val Pro Pro Arg Ile Lys Ser Arg Thr Asn Gln Ile Lys	669
135 140 145	
atc aca ttc aag tcc gat gac tac ttt gtg gct aaa cct gga ttc aag Ile Thr Phe Lys Ser Asp Asp Tyr Phe Val Ala Lys Pro Gly Phe Lys	717
150 155 160	

## ES 2 432 053 T3

att tat tat tct ttg ctg gaa gat ttc caa ccc gca gca gct tca gag Ile Tyr Tyr Ser Leu Leu Glu Asp Phe Gln Pro Ala Ala Ala Ser Glu	165                    170                    175                    180	765
acc aac tgg gaa tct gtc aca agc tct att tca ggg gta tcc tat aac Thr Asn Trp Glu Ser Val Thr Ser Ser Ile Ser Gly Val Ser Tyr Asn	185                    190                    195	813
tct cca tca gta acg gat ccc act ctg att gcg gat gct ctg gac aaa Ser Pro Ser Val Thr Asp Pro Thr Leu Ile Ala Asp Ala Leu Asp Lys	200                    205                    210	861
aaa att gca gaa ttt gat aca gtg gaa gat ctg ctc aag tac ttc aat Lys Ile Ala Glu Phe Asp Thr Val Glu Asp Leu Leu Lys Tyr Phe Asn	215                    220                    225	909
cca gag tca tgg caa gaa gat ctt gag aat atg tat ctg gac acc cct Pro Glu Ser Trp Gln Glu Asp Leu Glu Asn Met Tyr Leu Asp Thr Pro	230                    235                    240	957
cgg tat cga ggc agg tca tac cat gac cgg aag tca aaa gtt gac ctg Arg Tyr Arg Gly Arg Ser Tyr His Asp Arg Lys Ser Lys Val Asp Leu	245                    250                    255                    260	1005
gat agg ctc aat gat gat gcc aag cgt tac agt tgc act ccc agg aat Asp Arg Leu Asn Asp Asp Ala Lys Arg Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn	265                    270                    275	1053
tac tcg gtc aat ata aga gaa gag ctg aag ttg gcc aat gtg gtc ttc Tyr Ser Val Asn Ile Arg Glu Glu Leu Lys Leu Ala Asn Val Val Phe	280                    285                    290	1101
ttt cca cgt tgc ctc ctc gtg cag cgc tgt gga gga aat tgt ggc tgt Phe Pro Arg Cys Leu Leu Val Gln Arg Cys Gly Gly Asn Cys Gly Cys	295                    300                    305	1149
gga act gtc aac tgg agg tcc tgc aca tgc aat tca ggg aaa acc gtg Gly Thr Val Asn Trp Arg Ser Cys Thr Cys Asn Ser Gly Lys Thr Val	310                    315                    320	1197
aaa aag tat cat gag gta tta cag ttt gag cct ggc cac atc aag agg Lys Lys Tyr His Glu Val Leu Gln Phe Glu Pro Gly His Ile Lys Arg	325                    330                    335                    340	1245

agg ggt aga gct aag acc atg gct cta gtc gac atc cag ttg gat cac 1293  
 Arg Gly Arg Ala Lys Thr Met Ala Leu Val Asp Ile Gln Leu Asp His  
 345 350 355

cat gaa cga tgc gat tgt atc tgc agc tca aga cca cct cga taa 1338  
 His Glu Arg Cys Asp Cys Ile Cys Ser Ser Arg Pro Pro Arg \*  
 360 365 370

gagaatgtgc acatccctac attaaggcctg aaagaacctt tagtttaagg agggttagat 1398  
 aagagaccctt tttccatcca gcaaccacaa ttactactag cctgcaatgc aatgaacaca 1458  
 agtggttgcg gagtctcagc cttgctttgt taatgccatg gcaagtagaa aggtatata 1518  
 tcaacttcta tacctaagaa tataggattt catttaataa tagtgttga ggtttatata 1578  
 gcacaaaacac acacagaaat atattcatgt ctatgtgtat atagatcaa 1638  
 ttttggtata tataaccagg tacaccagag gttacatatg tttgagttag actcttaaaa 1698  
 tcctttgcca aaataagggta tggtaaataa tatgaaacat gtcttttagaa aatttaggag 1758  
 ataaatttat ttttaaattt tgaaacacga aacaattttg aatcttgctc tcttaaagaa 1818  
 agcatcttgt atattaaaaaa tcaaaaagatg aggcttctt acatatacat ctttgtat 1878  
 tatt 1882

<210> 37  
 <211> 370  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 37

Met His Arg Leu Ile Phe Val Tyr Thr Leu Ile Cys Ala Asn Phe Cys  
 1 5 10 15  
 Ser Cys Arg Asp Thr Ser Ala Thr Pro Gln Ser Ala Ser Ile Lys Ala  
 20 25 30  
 Leu Arg Asn Ala Asn Leu Arg Arg Asp Glu Ser Asn His Leu Thr Asp  
 35 40 45  
 Leu Tyr Arg Arg Asp Glu Thr Ile Gln Val Lys Gly Asn Gly Tyr Val  
 50 55 60  
 Gln Ser Pro Arg Phe Pro Asn Ser Tyr Pro Arg Asn Leu Leu Thr  
 65 70 75 80  
 Trp Arg Leu His Ser Gln Glu Asn Thr Arg Ile Gln Leu Val Phe Asp  
 85 90 95  
 Asn Gln Phe Gly Leu Glu Glu Ala Glu Asn Asp Ile Cys Arg Tyr Asp  
 100 105 110  
 Phe Val Glu Val Glu Asp Ile Ser Glu Thr Ser Thr Ile Ile Arg Gly  
 115 120 125  
 Arg Trp Cys Gly His Lys Glu Val Pro Pro Arg Ile Lys Ser Arg Thr  
 130 135 140  
 Asn Gln Ile Lys Ile Thr Phe Lys Ser Asp Asp Tyr Phe Val Ala Lys  
 145 150 155 160

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

<210> 38  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC21.222

<400> 38  
 tgagccctcg ccccagtcaag 20

<210> 39  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC21.224

<400> 39  
 acatacagga aagcctgcc caaaa 25

<210> 40  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico ZC21.223  
 <400> 40  
 aaactaccct gcgattctct gctgc 25  
 5 <210> 41  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC21.334  
 <400> 41  
 15 ggttaaatggaa gcttggctga g 21  
 <210> 42  
 <211> 3571  
 <212> ADN  
 20 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1049)...(2086)  
 25 <400> 42

gaattccccgg	gtcgacccac	gcgtccgggc	gcccaaggaa	aaggaagctg	ggggccgcct	60
ggcggcattc	ctcgccgcag	tgtgggctcc	gtctgccgcg	gggcccgcag	tgccccctgt	120
ctgcgcggcagc	acctgttggc	ccgcccagctg	gccgccccgcg	ccccccgcgc	cccccgcgcc	180
cggccggccg	ccagccccgc	gccccgcgcg	ccgccccgtg	ggggaaaagtg	gagacgggaa	240
ggggacaaga	gcgatcctcc	aggccagcca	ggccttcctt	tagccgcggc	tgcttagccg	300
ccacccctcc	tcagccctgc	gtcctgcctt	gccttagggc	aggcatccga	gcgctcgccg	360
ctcccgagccg	cccaagctct	cccggtttcc	cgcagcactt	cgccggtaacc	cgagggaact	420

## ES 2 432 053 T3

tcgggtggcca ccgactgcag caaggaggag gctccgcgt ggatccggc cagtcccgag	480
tcgtccccgc ggcctctctg cccgccccgg acccgccgcgg cactcgcagg gcacggtccc	540
ctccccccca gttgggggtgg ggcgcgcgcct gccgcggcga tcagcagctt tgtcatgtat	600
cccaagggtgc tcgcctcgct gccgacctgg ctccagctt ggcttggcgg gaccccgagt	660
cctcgccctgt gtcctgtccc cccaaactgac aggtgctccc tgcgagtcgc cacgactcat	720
ccgcgcgtcccc cccgcgtcccc acccccttctt tcctccctcg cctaccccca ccccccgcac	780
tgcggcacag ctcagattt gtttaaacct tgggaaactg gtcaggtcc aggtttgtct	840
ttgatccctt tcaaaaaactg gagacacaga agagggctct agaaaaaaact tttggatggg	900
attatgtgaa aactaccctg cgattctctg ctgccagagc cgcccaggcg cttccaccgc	960
agcgcagcct ttccccggct gggctgagcc ttggagtcgt cgctcccca gtgccccccg	1020
cgagtgagcc ctgcggccag tcagccaa atg ctc ctc ggc ctc ctc ctg	1072
Met Leu Leu Leu Gly Leu Leu Leu	
1 5	
ctg aca tct gcc ctg gcc ggc caa aga acg ggg act cgg gct gag tcc	1120
Leu Thr Ser Ala Leu Ala Gly Gln Arg Thr Gly Thr Arg Ala Glu Ser	
10 15 20	
aac ctg agc agc aag ttg cag ctc tcc agc gac aag gaa cag aac gga	1168
Asn Leu Ser Ser Lys Leu Gln Leu Ser Ser Asp Lys Glu Gln Asn Gly	
25 30 35 40	
gtg caa gat ccc cgg cat gag aga gtt gtc act ata tct ggt aat ggg	1216
Val Gln Asp Pro Arg His Glu Arg Val Val Thr Ile Ser Gly Asn Gly	
45 50 55	
agc atc cac agc ccg aag ttt cct cat aca tac cca aga aat atg gtg	1264
Ser Ile His Ser Pro Lys Phe Pro His Thr Tyr Pro Arg Asn Met Val	
60 65 70	
ctg gtg tgg aga tta gtt gca gta gat gaa aat gtg cgg atc cag ctg	1312
Leu Val Trp Arg Leu Val Ala Val Asp Glu Asn Val Arg Ile Gln Leu	
75 80 85	
aca ttt gat gag aga ttt ggg ctg gaa gat cca gaa gac gat ata tgc	1360
Thr Phe Asp Glu Arg Phe Gly Leu Glu Asp Pro Glu Asp Asp Ile Cys	
90 95 100	
aag tat gat ttt gta gaa gtt gag gag ccc agt gat gga agt gtt tta	1408
Lys Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu Glu Pro Ser Asp Gly Ser Val Leu	
105 110 115 120	
gga cgc tgg tgt ggt tct ggg act gtg cca gga aag cag act tct aaa	1456
Gly Arg Trp Cys Gly Ser Gly Thr Val Pro Gly Lys Gln Thr Ser Lys	
125 130 135	

## ES 2 432 053 T3

gga aat cat atc agg ata aga ttt gta tct gat gag tat ttt cca tct Gly Asn His Ile Arg Ile Arg Phe Val Ser Asp Glu Tyr Phe Pro Ser 140 145 150	1504
gaa ccc gga ttc tgc atc cac tac agt att atc atg cca caa gtc aca Glu Pro Gly Phe Cys Ile His Tyr Ser Ile Ile Met Pro Gln Val Thr 155 160 165	1552
gaa acc acg agt cct tcg gtg ttg ccc cct tca tct ttg tca ttg gac Glu Thr Thr Ser Pro Ser Val Leu Pro Pro Ser Ser Leu Ser Leu Asp 170 175 180	1600
ctg ctc aac aat gct gtg act gcc ttc agt acc ttg gaa gag ctg att Leu Leu Asn Asn Ala Val Thr Ala Phe Ser Thr Leu Glu Glu Leu Ile 185 190 195 200	1648
cgg tac cta gag cca gat cga tgg cag gtg gac ttg gac agc ctc tac Arg Tyr Leu Glu Pro Asp Arg Trp Gln Val Asp Leu Asp Ser Leu Tyr 205 210 215	1696
aag cca aca tgg cag ctt ttg ggc aag gct ttc ctg tat ggg aaa aaa Lys Pro Thr Trp Gln Leu Leu Gly Lys Ala Phe Leu Tyr Glu Lys Lys 220 225 230	1744
agc aaa gtg gtg aat ctg aat ctc ctc aag gaa gag gta aaa ctc tac Ser Lys Val Val Asn Leu Asn Leu Leu Lys Glu Glu Val Lys Leu Tyr 235 240 245	1792
agc tgc aca ccc cgg aac ttc tca gtg tcc ata cgg gaa gag cta aag Ser Cys Thr Pro Arg Asn Phe Ser Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys 250 255 260	1840
agg aca gat acc ata ttc tgg cca ggt tgt ctc ctg gtc aag cgc tgt Arg Thr Asp Thr Ile Phe Trp Pro Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg Cys 265 270 275 280	1888
gga gga aat tgt gcc tgt tgt ctc cat aat tgc aat gaa tgt cag tgt Gly Gly Asn Cys Ala Cys Cys Leu His Asn Cys Asn Glu Cys Gln Cys 285 290 295	1936
gtc cca cgt aaa gtt aca aaa aag tac cat gag gtc ctt cag ttg aga Val Pro Arg Lys Val Thr Lys Lys Tyr His Glu Val Leu Gln Leu Arg 300 305 310	1984

cca aaa act gga gtc aag gga ttg cat aag tca ctc act gat gtg gct	2032	
Pro Lys Thr Gly Val Lys Gly Leu His Lys Ser Leu Thr Asp Val Ala		
315	320	325
ctg gaa cac cac gag gaa tgt gac tgt gtg tgt aga gga aac gca gga	2080	
Leu Glu His His Glu Glu Cys Asp Cys Val Cys Arg Gly Asn Ala Gly		
330	335	340
ggg taa ctgcagccctt cgttagcagca cacgtgagca ctggcattct gtgtacccccc	2136	
Gly *		
345		
acaaggcaacc ttcatccccca ccagcgttgg ccgcagggct ctcagctgct gatgctggct	2196	
atggtaaaga tcctactcg tccaaaccaa attctcagtt gtttgctca atagccttcc	2256	
cctgcaggac ttcaagtgtc ttctaaaaga ccagagggcac caagaggagt caatcacaaa	2316	
gcactgcctt ctagaggaag cccagacaat ggtcttctga ccacagaaaac aaatgaaatg	2376	
aatgtagatc gctagcaaac tctggagtga cagcatttct tttccactga cagaatggtg	2436	
tagcttagtt gtcttgatat gggcaagtga tgtcagcaca agaaaaatggt gaaaaaacaca	2496	
cacttgattt tgaacaatgc agaaaatactt ggatttctcc aacctgtttt catagataga	2556	
cagatgctct gttttctaca aactcaaagc ttttagagag cagctatgtt aataggaatt	2616	
aaatgtgcca tgctgaaaagg aaagactgaa gtttcaatg cttggcaact tctccgcaat	2676	
ttggaggaaa ggtgcgtca tggtttggag aaagcacacc tgcacagagg agtggccttc	2736	
ccttcccttc cctctgaggt ggcttctgt tttcattgt tatattttt tattctcatt	2796	
ttgacatttat aactgttggc ttttctaattc ttgttaaata tttctatattt taccaaaggt	2856	
attnaatatt cttttttatg acaacctaga gcaatttattt ttagcttgat aattttttt	2916	
tctaaacaaa attgttatacg ccagaagaac aaagatgatt gatataaaaaa tcttggct	2976	
ctgacaaaaaa catatgtatt tcttcattgt atgggtctag agcttagcgt catctgcatt	3036	
tggaaaagatg gaatggggaa gtttttagaa ttggtaggtc gcagggacag tttgataaca	3096	
actgtactat catcaatttcc caattctgtt ctttagagcta cgaacagaac agagcttgag	3156	
taaatatgaa gccattgcta acctccccct tctatggaa aataggagta tagctcagag	3216	
aagcacgtcc ccagaaaacct cgaccatttc taggcacagt gttctgggct atgctgcgt	3276	
gtatggacat atcctattta tttcaataact agggttttat taccttaaa ctctgctcca	3336	
tacacttgta ttaatacatg gatattttt tgtacagaag tatatcattt aaggagttca	3396	
cttattatac tctttggcaa ttgcaaagaa aatcaacata atacattgct tgtaaaatgct	3456	
taatctgtgc ccaagtttg tggtgactat ttgaattaaa atgtattgaa tcatcaaata	3516	
aaataatctg gctattttgg gaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaaaaggcg gccc	3571	

<210> 43  
 <211> 345  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

&lt;400&gt; 43

Met Leu Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Thr Ser Ala Leu Ala Gly Gln			
1	5	10	15

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

<210> 44  
 <211> 65  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador oligonucleotídico ZC20.572

## ES 2 432 053 T3

	tcaccacgcg aattcggtac cgctggttcc gcgtggatcc ggccagagac aggggactca	60
	ggcgg	65
5	<210> 45	
	<211> 65	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC20.573	
	<400> 45	
	tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcatc cgccaaaaca ctatcctcct gtgctccctc	60
	tgcac	65
15	<210> 46	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC19.372	
	<400> 46	
	tgtcgatgaa gccctgaaag acgcgcagac taattcgagc	40
25	<210> 47	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC19.351	
	<400> 47	
	acgcgcagac taattcgagc tcccaccatc accatcacca cgcgaattcg gtaccgctgg	60
35	<210> 48	
	<211> 60	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC19.352	
	<400> 48	
	actcactata gggcgaattg cccggggat ccacgcggaa ccagcggtac cgaattcgcg	60
45	<210> 49	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico ZC19.371	
	<400> 49	
55	acggccagtg aattgtataa cgactcacta tagggcgaat tg	42
	<210> 50	
	<211> 1095	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

&lt;223&gt; ADN fusionado

&lt;400&gt; 50

ctgaaaagacg	cgcagactaa	ttcgagctcc	caccatcacc	atcaccacgc	gaattcgta	60
ccgctggttc	cgcgtggatc	cggccagaga	caggggactc	aggcggaaatc	caacctgagt	120
agtaaaattcc	agttttccag	caacaaggaa	cagaacggag	tacaagatcc	tcagcatgag	180
agaattatta	ctgtgtctac	taatgaaagt	attcacagcc	caaggtttcc	tcatacttat	240
ccaagaaaata	cggtcttggt	atggagatta	gtagcagtag	aggaaaatgt	atggatacaa	300
cttacgtttt	atgaaagatt	tgggcttcaa	gacccagaag	atgacatatg	caagtatgat	360
ttttagaaag	ttgaggaacc	cagtgatgga	actatattag	ggcgctgggt	tggttctgg	420
actgtaccag	gaaaacagat	ttctaaagga	aatcaaatta	ggataagatt	tgtatctgat	480
gaatattttc	cttctgaacc	agggttctgc	atccactaca	acattgtcat	gccacaattc	540
acagaagctg	tgagtcccttc	agtgtacccc	ccttcagctt	tgccactgga	cctgcttaat	600
aatgtataaa	ctgcctttag	taccttggaa	gaccttattc	gatatcttga	accagagaga	660
tggcagttgg	acttagaaga	tcttatatagg	ccaaacttggc	aacttcttgg	caaggcttt	720
gtttttggaa	gaaaatccag	agtgggtggat	ctgaaccttc	taacagagga	ggtaagatta	780
tacagctgca	cacctcgtaa	cttctcagtg	tccataaggg	aagaactaaa	gagaaccgat	840
accatttct	ggccaggtt	tctcctggtt	aaacgctgt	gtgggaactg	tgcctgtt	900
ctccacaatt	gcaatgaatg	tcaatgtgtc	ccaaagcaaag	ttactaaaaa	ataccacgag	960
gtccttcagt	tgagacccaa	gaccgggtgtc	aggggattgc	acaaaatca	caccgacgt	1020
gccctggagc	accatgagga	gtgtgactgt	gtgtgcagag	ggagcacagg	aggatagtgt	1080
tttggcggat	gagat					1095

**REIVINDICACIONES**

1. Un antagonista de zvegf3 para su uso en la reducción de fibrosis en un sujeto, en donde el antagonista de zvegf3 es un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo de un polipéptido como se muestra en los restos 235-345 o 226-345 de SEC ID Nº: 2.
- 5      2. El antagonista de zvegf3 de la reivindicación 1 para el uso de la reivindicación 1, en el que la fibrosis es fibrosis hepática.
3. El antagonista de zvegf3 de la reivindicación 1 o 2 para el uso de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 10     4. El antagonista de zvegf3 de la reivindicación 1 o 2 para el uso de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla.
5. Un antagonista de zvegf3 para su uso en la supresión de la activación de células estrelladas en un sujeto, en donde el antagonista de zvegf3 es un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo de un polipéptido como se muestra en los restos 235-345 o 226-345 de SEC ID Nº: 2.
- 15    6. El antagonista de zvegf3 de la reivindicación 5 para el uso de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
7. El antagonista de zvegf3 de la reivindicación 5 para el uso de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla.

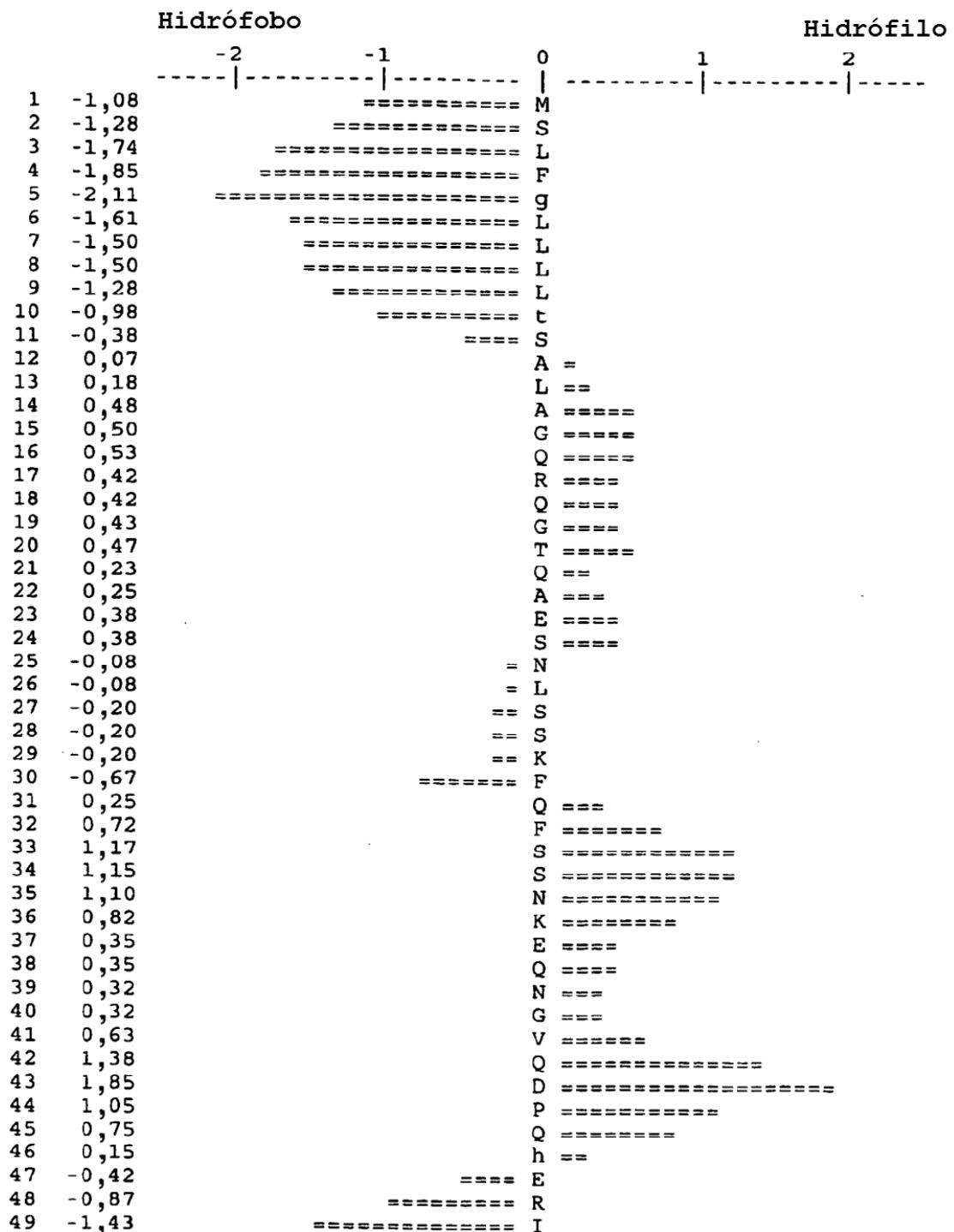


Fig. 1

# ES 2 432 053 T3

50	-1,10	===== I
51	-0,80	===== t
52	-0,18	== V
53	-0,23	== S
54	-0,37	==== T
55	-0,25	==== N
56	-0,28	==== G
57	0,22	S ==
58	-0,25	==== I
59	0,05	H
60	0,05	S
61	-0,07	= P
62	-0,05	R
63	-0,55	===== F
64	0,37	P =====
65	0,40	H =====
66	0,42	T =====
67	0,23	Y ==
68	-0,08	= P
69	-0,33	==== R
70	-1,40	===== N
71	-0,93	===== T
72	-1,17	===== V
73	-1,17	===== L
74	-0,95	===== V
75	-0,95	===== W
76	0,12	R =
77	0,12	L =
78	0,45	V =====
79	0,45	A =====
80	-0,03	V
81	-0,08	= E
82	-0,55	===== E
83	-1,35	===== N
84	-1,45	===== V
85	-1,62	===== W
86	-0,55	===== I
87	0,25	Q ===
88	0,72	L =====
89	0,60	T =====
90	0,67	F =====
91	0,78	D =====
92	0,78	E =====
93	0,78	R =====
94	0,28	F ===
95	1,20	G =====
96	1,70	L =====
97	2,50	E =====
98	1,70	D =====
99	1,03	P =====
100	1,53	E =====
101	0,65	D =====
102	0,65	D =====
103	-0,27	== I
104	-0,22	== C
105	0,45	K =====

## ES 2 432 053 T3

106	-0,30	==== Y
107	0,58	D =====
108	0,58	F =====
109	1,00	V =====
110	1,30	E =====
111	1,30	V =====
112	1,55	E =====
113	0,98	E =====
114	0,18	P ==
115	-0,12	= S
116	-0,17	== D
117	-0,17	== G
118	-0,73	===== T
119	-0,83	===== I
120	-0,53	===== L
121	-0,80	===== G
122	-0,80	===== R
123	-1,37	===== W
124	-1,05	===== C
125	-0,88	===== G
126	-0,88	===== S
127	0,18	G ==
128	0,22	T ==
129	-0,02	V
130	0,28	P ===
131	0,78	G =====
132	0,78	K =====
133	0,32	Q ===
134	0,32	I ===
135	0,32	S ===
136	0,77	K =====
137	-0,03	G
138	0,47	N =====
139	0,02	Q
140	-0,27	== I
141	0,08	R =
142	0,08	I =
143	0,88	R =====
144	0,00	F
145	0,00	V
146	0,25	S ===
147	0,25	D ===
148	0,25	E ===
149	-0,25	== Y
150	0,13	F =
151	0,13	P =
152	-0,03	S
153	-0,38	==== E
154	-0,97	===== P
155	-1,35	===== G
156	-1,32	===== F
157	-1,20	===== C
158	-1,28	===== I
159	-1,20	===== H
160	-1,12	===== Y
161	-0,70	===== N

## ES 2 432 053 T3

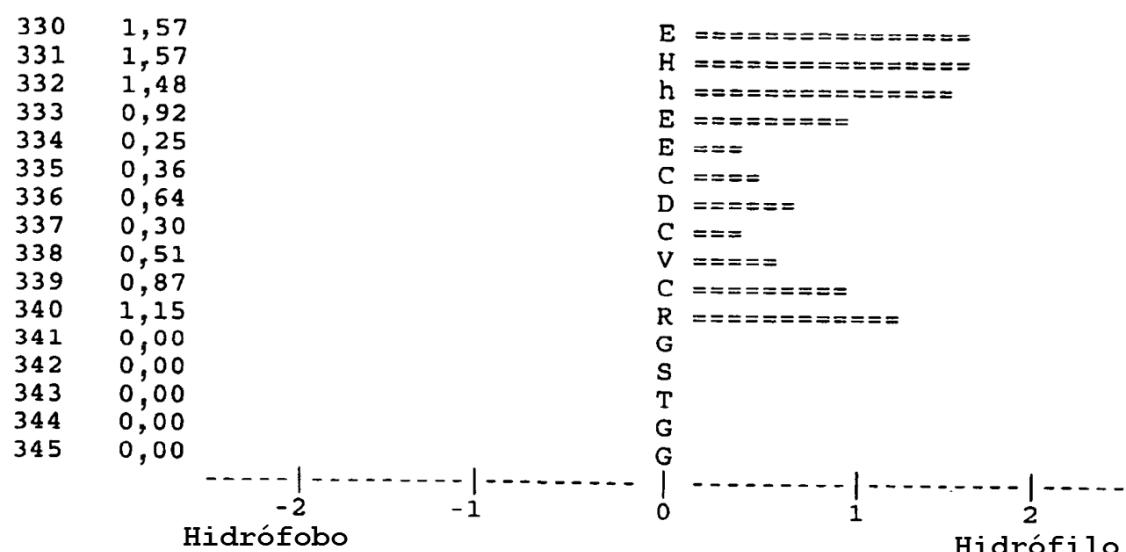
162	-1,15	===== I
163	-0,92	===== V
164	-0,17	== M
165	-0,03	P
166	-0,28	== Q
167	-0,27	== F
168	0,15	T =
169	0,27	E ===
170	-0,48	==== A
171	-0,70	===== V
172	-0,45	==== S
173	-0,50	==== P
174	-0,45	==== S
175	-0,58	===== V
176	-0,63	===== L
177	-0,33	== P
178	-0,63	===== P
179	-0,13	= S
180	-0,48	===== A
181	-0,70	===== L
182	-0,37	==== P
183	-0,33	== L
184	-0,12	= D
185	-0,92	===== L
186	-1,18	===== L
187	-0,97	===== N
188	-1,42	===== N
189	-2,02	===== A
190	-2,00	===== I
191	-2,00	===== t
192	-0,93	===== A
193	-0,35	==== F
194	-0,23	== s
195	0,03	T
196	0,60	L =====
197	0,52	E =====
198	-0,28	== D
199	-0,28	== L
200	0,02	I
201	0,82	R =====
202	0,82	Y =====
203	1,03	L =====
204	1,37	E =====
205	0,57	P =====
206	1,07	E =====
207	0,27	R ===
208	0,27	w ===
209	0,93	Q =====
210	0,60	L =====
211	0,52	D =====
212	0,52	L =====
213	0,82	E =====
214	0,25	D ===
215	-0,42	==== L
216	-0,08	= Y
217	0,00	R

# ES 2 432 053 T3

218	-0,80	===== P
219	-0,80	===== T
220	-0,23	== w
221	-0,15	= Q
222	-0,60	===== L
223	-0,55	===== L
224	-0,67	===== G
225	-0,67	===== K
226	-0,67	===== A
227	-0,08	= F
228	0,38	V =====
229	1,13	F =====
230	1,30	G =====
231	1,05	R =====
232	1,05	K =====
233	0,25	S ===
234	0,23	R ==
235	-0,57	===== V
236	-0,62	===== V
237	-0,43	==== D
238	-0,43	==== L
239	0,37	N =====
240	0,08	L =
241	0,88	L =====
242	0,88	T =====
243	0,57	E =====
244	0,12	E =
245	-0,55	===== V
246	-0,37	==== R
247	-0,87	===== L
248	-0,07	= Y
249	0,35	S =====
250	-0,12	= C
251	0,10	T =
252	-0,08	= P
253	-0,03	R
254	-0,83	===== N
255	-0,37	==== F
256	0,55	S =====
257	1,00	V =====
258	0,95	S =====
259	1,40	I =====
260	2,20	R =====
261	1,63	E =====
262	1,63	E =====
263	1,07	L =====
264	1,07	K =====
265	0,15	R =
266	-0,92	===== T
267	-0,85	===== D
268	-1,35	===== T
269	-1,45	===== I
270	-1,45	===== F
271	-1,33	===== W
272	-1,02	===== P
273	-0,52	===== G

# ES 2 432 053 T3

274	-0,02	C
275	-0,02	L
276	0,28	L ===
277	0,58	V =====
278	0,87	K ======
279	0,20	R ==
280	-0,38	==== C
281	-0,38	==== G
282	-0,55	===== G
283	-0,85	===== N
284	-0,97	===== C
285	-0,77	===== A
286	-0,85	===== C
287	-0,65	===== C
288	0,02	L
289	0,15	H ==
290	0,27	N ===
291	0,07	C =
292	-0,02	N
293	-0,05	E
294	-0,50	==== C
295	0,17	Q ==
296	-0,12	= C
297	-0,02	V
298	0,73	P =====
299	1,23	S =====
300	1,20	K =====
301	0,62	V =====
302	1,37	T =====
303	1,18	K =====
304	0,38	K ===
305	-0,08	= Y
306	-0,40	==== H
307	0,18	E ==
308	-0,32	== V
309	0,43	L ===
310	0,67	Q =====
311	0,63	L =====
312	0,68	R =====
313	0,68	P =====
314	0,68	K =====
315	-0,12	= T
316	-0,13	= G
317	0,37	V ===
318	0,67	R =====
319	-0,13	= G
320	-0,20	== L
321	0,60	H =====
322	0,43	K ===
323	-0,15	= S
324	-0,50	==== L
325	0,30	T ===
326	0,28	D ===
327	0,10	V =
328	0,85	A =====
329	1,43	L =====



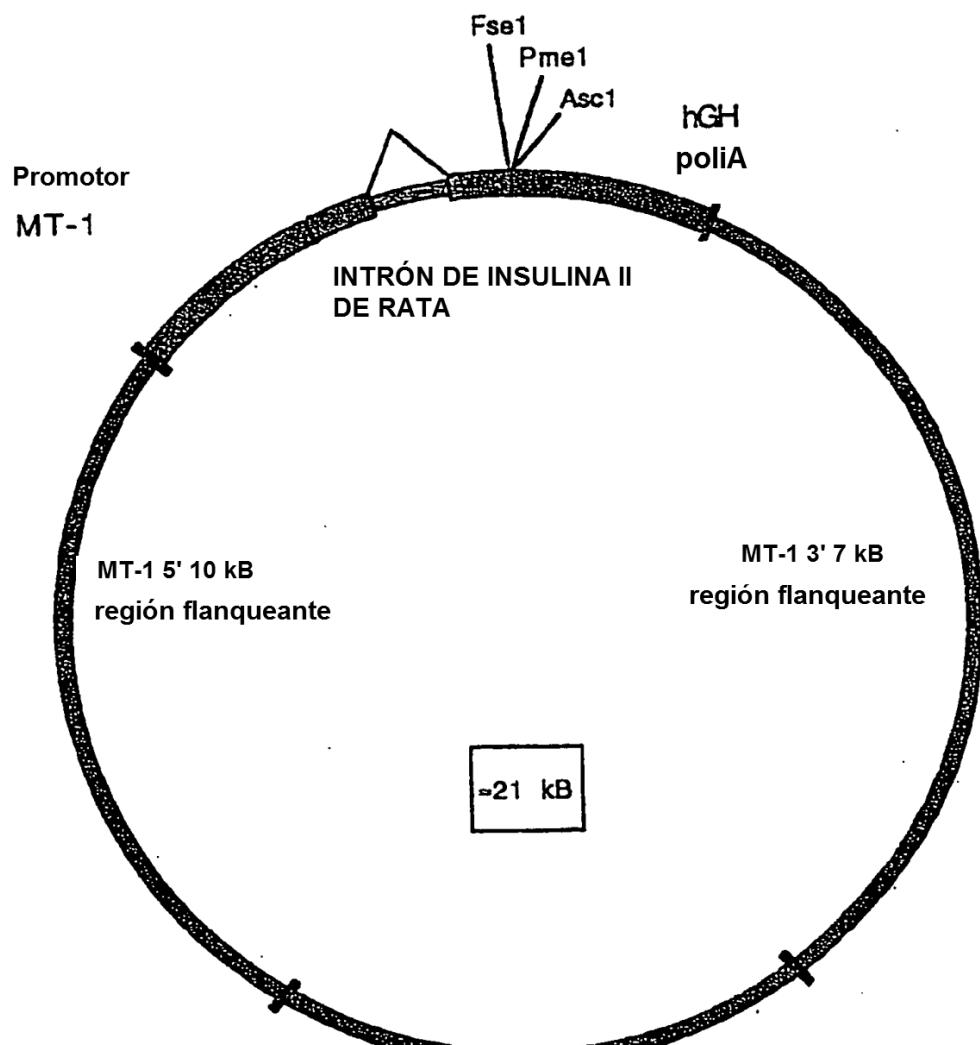
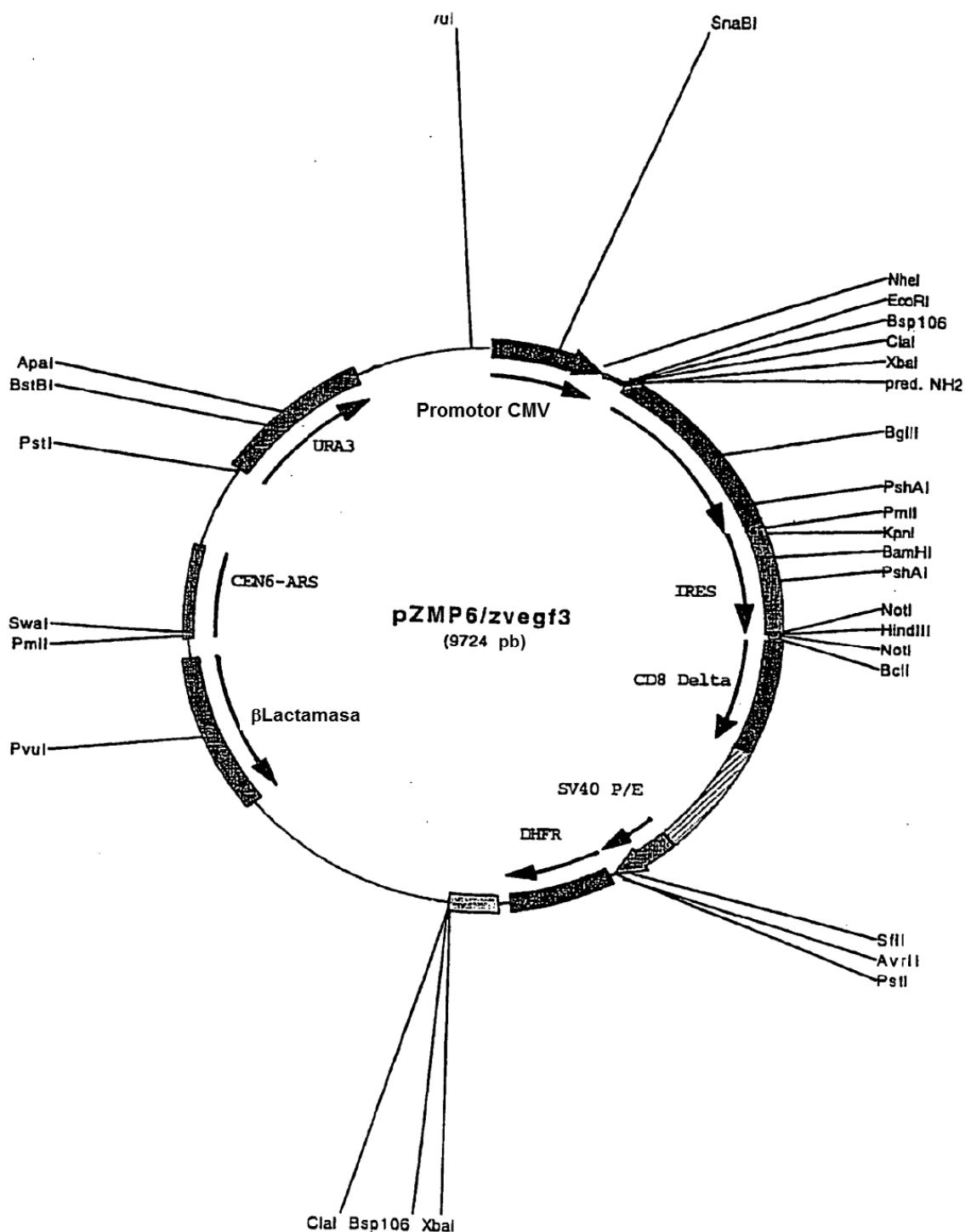
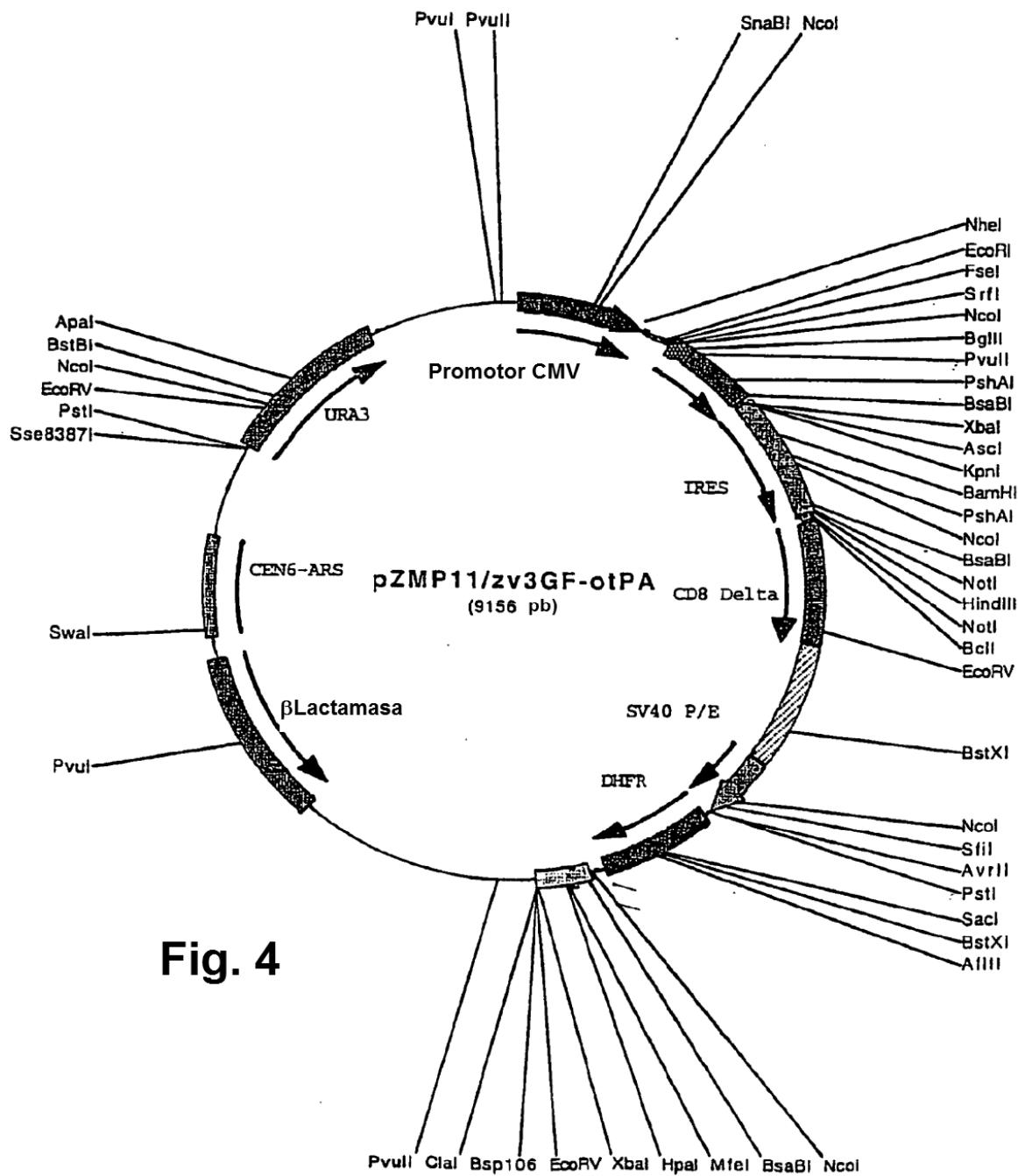


Fig. 2

**Fig. 3**

**Fig. 4**

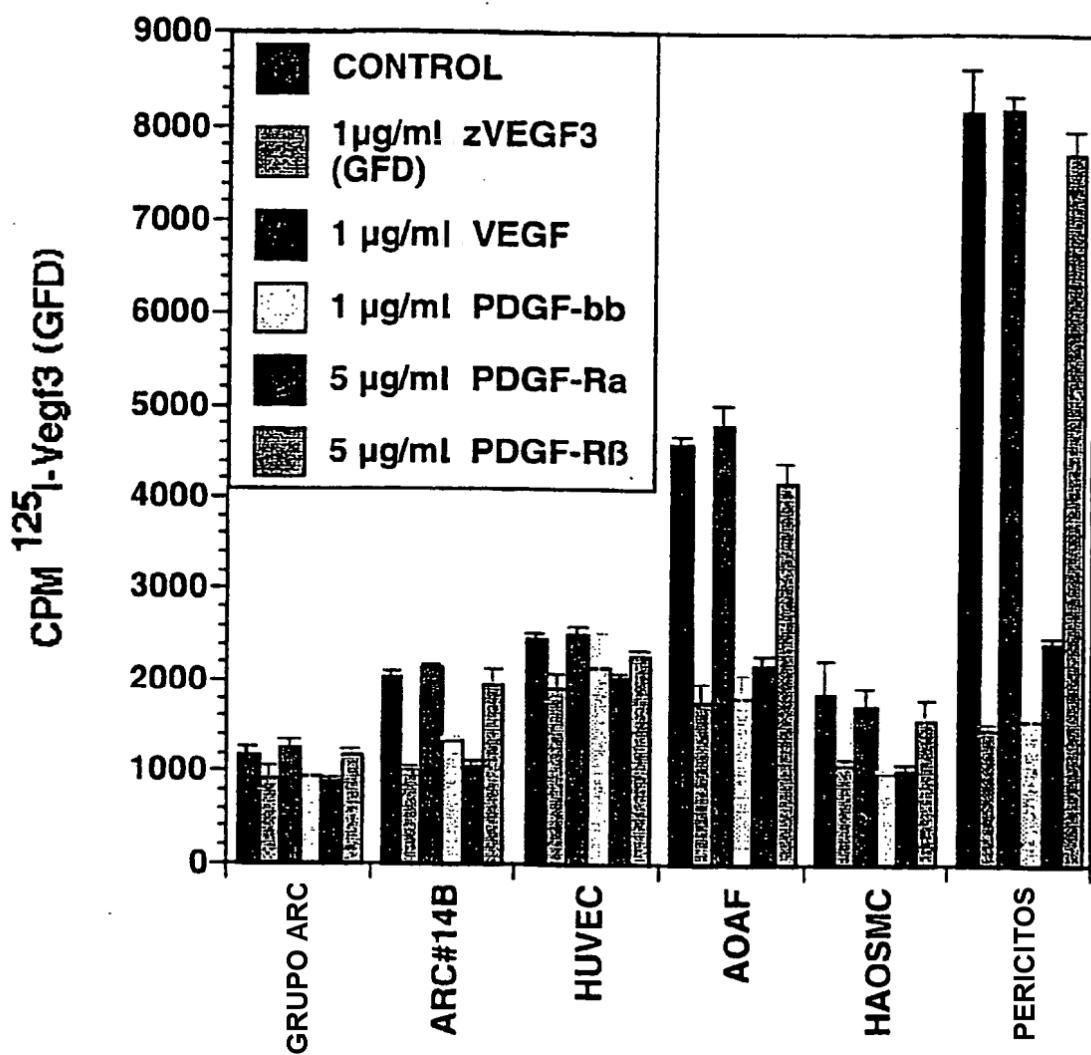


Fig. 5

MSLFGLLLTSALAGQRQGTQAESNLSSKFQFSSNKEQNGVQDPQHERIITVSTNGSIHS  
 MLLLGLLLLTSALAGQRTGTRAESNLSSKLQLSSDKEQNGVQDPRHERVVTISGNGSIHS  
     10             20             30             40             50             60

PRFPHTYPRNTVLWRLVAVEENVWIQLTFDERFGLEDPEDDICKYDFVEVEEPPSDGTIL  
 PKFPHTYPRNMVLWRLVAVDENVRIQLTFDERFGLEDPEDDICKYDFVEVEEPPSDGSVL  
     70             80             90             100            110            120

GRWCGSGTVPGKQISKGNQIRIRFVSDEYFPSEPGFCIHYNIVMPQFTEA VSPSVLPPSA  
 GRWCGSGTVPGKQTSKGNHIRIRFVSDEYFPSEPGFCIHYSIIMPQVTETTSPSVLPPSS  
     130            140            150            160            170            180

LPLDLLNNAITAFSTLEDLIRYLEPERWQLDLEDLYRPTWQLLGKA FVFGRKS RSVVDLNL  
 LS LDLLNNAVTAFSTLEELIRYLEPDRWQVDLDSL YKPTWQLLGKAFLY GKKSKV VNLNL  
     190            200            210            220            230            240

LTEEVRLYSCTPRNF SVSIREELKRTDTIFWPGCLLVKRCGGNCACCLHNCNECQCVP SK  
 LKEEVKLYSCTPRNF SVSIREELKRTDTIFWPGCLLVKRCGGNCACCLHNCNECQCVP RK  
     250            260            270            280            290            300

VTKKYHEVLQLRPKTGVRLHKSLTDVALEHH EECDCVCRGSTGG (SEC ID N°: 2)  
 VTKKYHEVLQLRPKTGVKGLHKSLTDVALEHH EECDCVCRGNAGG (SEC ID N°: 43)  
     310            320            330            340

Fig. 6