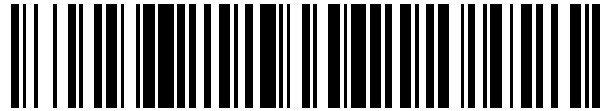


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 497 496**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/85** (2006.01)

**C07K 14/71** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2007 E 07855314 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2099920**

54 Título: **Ratones transgénicos que expresan VEGF humanizado**

30 Prioridad:

**22.12.2006 US 871736 P**

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

**23.09.2014**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)  
1 DNA WAY  
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**FERRARA, NAPOLEONE**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 497 496 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

Ratones transgénicos que expresan VEGF humanizado

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a animales transgénicos también útiles para estudiar terapias relacionadas con VEGF. En concreto, la invención se refiere a animales transgénicos con VEGF humanizado y no humanos que lo expresan.

10

**Antecedentes de la invención**

La angiogénesis es un suceso celular importante en el que las células endoteliales proliferan, se cortan y reorganizan para formar vasos a partir de la red vascular preexistente. Hay pruebas convincentes de que el desarrollo de un suministro vascular es esencial para procesos proliferativos normales y patológicos (Folkman y Klagsbrun (1987) *Science* 235:442-447). La angiogénesis también está implicada en la patogénesis de varios trastornos incluyendo, pero sin limitación, tumores, retinopatías proliferativas, degeneración macular asociada a la edad, artritis reumatoide (AR) y psoriasis. La angiogénesis es esencial para el crecimiento de la mayoría de tumores primarios y su posterior metástasis.

15

A la vista de la destacable importancia fisiológica y patológica de la angiogénesis, se ha dedicado mucho trabajo a la dilucidación de los factores capaces de regular este proceso. Se sugiere que el proceso de angiogénesis se regula por un equilibrio entre moléculas pro- y anti- angiogénicas, y está desajustada en varias enfermedades, especialmente en cáncer. Carmeliet y Jain (2000) *Nature* 407:249-257.

20

Se ha informado que el factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF), que también se llama VEGF-A o factor de permeabilidad vascular (VPF), es un regulador fundamental de la angiogénesis tanto normal como anormal. Ferrara y Davis-Smyth (1997) *Endocrine Rev.* 18:4-25; Ferrara (1999) *J. Mol. Med.* 77:527-543. En comparación con otros factores de crecimiento que contribuyen a los procesos de formación vascular, VEGF es único en su elevada especificidad para células endoteliales en el sistema vascular. VEGF es esencial para la vasculogénesis y angiogénesis embrionaria. Carmeliet et al. (1996) *Nature* 380:435-439; Ferrara et al. (1996) *Nature* 380:439-442. Además, se necesita VEGF para la proliferación cíclica de los vasos sanguíneos en el tracto reproductivo femenino y para el crecimiento óseo y formación de cartílago. Ferrara et al. (1998) *Nature Med.* 4:336-340; Gerber et al. (1999) *Nature Med.* 5:623-628.

25

Además de ser un factor angiogénico en la angiogénesis y vasculogénesis, VEGF, como factor de crecimiento pleiotrópico, muestra múltiples efectos biológicos en otros procesos fisiológicos, como supervivencia de células endoteliales, permeabilidad vascular y vasodilatación, quimiostasis de monocitos y entrada de calcio. Ferrara y Davis-Smyth (1997), anteriormente citado. Además, se ha comunicado en estudios recientes el efecto mitogénico de VEGF en unos pocos tipos de células no endoteliales, como células epiteliales de pigmento retiniano, células de los conductos pancreáticos y células de Schwann. Guerrin et al. (1995) *J. Cell Physiol.* 164:385-394; Oberg-Welsh et al. (1997) *Mol. Cell. Endocrinol.* 126:125-132; Sondell et al. (1999) *J. Neurosci.* 19:5731-5740.

30

Pruebas sustanciales también implican el papel crucial de VEGF en el desarrollo de afecciones o enfermedades que incluyen angiogénesis patológica. El ARN de VEGF se sobreexpresa por la mayoría de tumores humanos examinados (Berkman et al. *J Clin Invest* 91:153-159 (1993); Brown et al. *Human Pathol.* 26:86-91 (1995); Brown et al. *Cancer Res.* 53:4727-4735 (1993); Mattern et al. *Brit. J. Cancer.* 73:931-934 (1996); y Dvorak et al. *Am J. Pathol.* 146:1029-1039 (1995)). También, la concentración de VEGF en fluidos oculares está muy correlacionada con la presencia de proliferación activa de vasos sanguíneos en pacientes con retinopatía diabética y otras retinopatías asociadas a isquemia (Aiello et al. *N. Engl. J. Med.* 331:1480-1487 (1994)). Además, los estudios han demostrado la localización de VEGF en membranas neovasculares coroidales en pacientes afectados por DMAE (Lopez et al. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:855-868 (1996)).

35

Debido a su papel principal en la promoción del crecimiento tumoral, VEGF proporciona una diana atractiva para intervención terapéutica. De hecho, se están desarrollando varias estrategias terapéuticas dirigidas a bloquear VEGF o su sistema de señalización de receptor para el tratamiento de enfermedades neoplásicas. Rosen (2000) *Oncologist* 5:20-27; Ellis et al. (2000) *Oncologist* 5:11-15; Kerbel (2001) *J. Clin. Oncol.* 19: 45S-51S. El anticuerpo anti VEGF "bevacizumab", también conocido como "rhuMAB VEGF" o "Avastin®", es un anticuerpo monoclonal anti VEGF recombinante humanizado generado de acuerdo con Presta et al. (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599. Bevacizumab está aprobado para el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico y cáncer microcítico de pulmón y se está investigando clínicamente para tratar varios otros cánceres.

40

A pesar de los papeles significativos de VEGF en la angiogénesis normal y patológica, se carece de modelos animales que puedan usarse para estudiar el VEGF humano. Por tanto, existe una necesidad para modelos animales relevantes para el estudio de enfermedades y desarrollo de fármacos.

45

**Sumario de la invención**

La invención proporciona un ratón transgénico que expresa VEGF humanizado, según se define en las reivindicaciones.

- 5 La invención también proporciona una célula o tejido derivado del ratón transgénico de la invención.
- La invención también proporciona métodos y usos relacionados, también definidos en las reivindicaciones.
- 10 También se divulgan a continuación otros animales transgénicos que expresan VEGF humanizado o de humano, incluyendo ratones que expresan otro VEGF humanizado o VEGF humano, y materia objeto relacionada.

También se divulgan a continuación ácidos nucleicos que codifican determinados VEGF humanos, polipéptidos codificados de este modo, y vectores relacionados, células hospedadoras y métodos de producción.

15 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1A muestra una comparación de secuencias entre VEGF-A de ratón (SEC ID N°: 1) y humano (SEC ID N°: 2). Los aminoácidos que son distintos entre VEGF164 murino y VEGF165 humano están sombreados en gris. Se mutaron 10 aminoácidos (recuadrados y en gris) de VEGF de ratón a los restos de humano mediante mutagénesis dirigida para generar la secuencia de VEGF hum-X.

La Figura 1B muestra una representación esquemática de los vectores de direccionamiento para generar ratones knock-in (ki) hum-I y hum-X. Las mutaciones se introdujeron en los exones 3 a 5 de los vectores de direccionamiento, dando como resultado ratones que expresaban la forma de VEGF hum-I o hum-X. La proteína VEGF hum-I consiste en la mutación muVEGF-S87G. La proteína VEGF hum-X consiste en las mutaciones siguientes: muVEGF-R26H, A57G, A64G, S71E, S87G, S99N, R100K, T110A, K111R, P112Q. Esta nomenclatura parte de la secuencia madura.

La Figura 2A muestra las curvas de crecimiento de tumores Calu-6. El tratamiento comenzó tres días después de la implantación bien con Mab control, B20-4.1, G6-31, bevacizumab o Y0317 (5 mg/kg, IP, dos veces a la semana)

La Figura 2B muestra los pesos de tumores terminales de tumores Calu-6 en el día 64 de tratamiento como se describe en la Figura 2A. Los tumores tratados con B20-4.1 y G6-31 fueron significativamente más pequeños que los tratados con bevacizumab.

La Figura 2C muestra las curvas de crecimiento de células de carcinoma colorrectal humano (HT29) tratadas en el día 3 tras la implantación con bien con control, B20-4.1, G6-31, bevacizumab o Y0317 (5 mg/kg dos veces a la semana, IP). Los tumores tratados con B20-4.1 y G6-31 fueron significativamente más pequeños en relación a los tumores tratados con bevacizumab a determinados puntos de tiempo durante el tratamiento.

La Figura 2D muestra los pesos de los tumores terminales de tumores de HT29 en el día 67 del tratamiento como se describe en la Figura 2C.

La Figura 2E muestra las curvas de crecimiento tumoral de tumores de Calu-6 tratados después de que los volúmenes tumorales alcanzasen 500 mm<sup>3</sup> (experimento de regresión) bien con control, B20-4.1, G6-31, bevacizumab o Y0317 Mab (5 mg/kg, IP, dos veces a la semana). Los tumores tratados con B20-4.1 y G6-31 fueron significativamente más pequeños que los tumores tratados con bevacizumab.

La Figura 2F muestra los pesos de los tumores terminales de tumores de Calu-6 en el día 63 de tratamiento con varios Mab anti VEGF. Los tumores tratados con B20-4.1 y G6-31 mostraron un peso significativamente reducido en comparación con los tumores tratados con bevacizumab.

La Figura 2G muestra las curvas de crecimiento tumoral de tumores humanos colorrectales (HM7) tratados después de que los volúmenes tumorales alcanzasen 500 mm<sup>3</sup> (experimento de regresión) bien con control, B20-4.1, G6-31, bevacizumab o anticuerpo Y0317 (5 mg/kg, IP, dos veces a la semana).

La Figura 2H muestra los pesos de tumores terminales de tumores HM7 en el día 58 de tratamiento con varios Mab anti VEGF.

**Descripción detallada**

55 Los siguientes términos tienen los significados adscritos a ellos a continuación a menos que se especifique lo contrario.

Los términos "VEGF" y "VEGF-A" se usan de manera intercambiable para referirse al factor de crecimiento de células endoteliales vasculares de 165 aminoácidos y los factores de crecimiento de células endoteliales vasculares asociados de 121, 189 y 206 aminoácidos, como se describe por Leung et al. Science, 246:1306 (1989), y Houck et al. Mol. Endocrin., 5:1806 (1991), junto con las formas alélicas de origen natural y procesadas de los mismos. El término "VEGF" también se usa para referirse a formas truncadas del polipéptido que comprende los aminoácidos 8 a 109 o 1 a 109 del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humano de 165 aminoácidos. Las referencias a cualquiera de estas formas de VEGF se identifican en la presente solicitud mediante, por ejemplo, "VEGF (8-109)", "VEGF (1-109)" o "VEGF165". Las posiciones de aminoácidos para un VEGF nativo "truncado" se numeran como se indica en la secuencia nativa de VEGF. Por ejemplo, la posición de aminoácido 17 (metionina) en

el VEGF nativo truncado es también la posición 17 (metionina) en el VEGF nativo. El VEGF nativo truncado tiene una afinidad de unión a los receptores KDR y Flt-1 comparable a la de VEGF nativo.

5 Un "anticuerpo anti VEGF" es un anticuerpo que se une a VEGF con suficiente afinidad y especificidad. Un anticuerpo anti VEGF puede usarse como agente terapéutico para dirigirse e interferir con enfermedades o afecciones en las que interviene la actividad de VEGF. Un anticuerpo anti VEGF no se unirá generalmente a otros homólogos de VEGF como VEGF-B o VEGF-C, ni a otros factores de crecimiento como PIGF, PDGF o bFGF.

10 Un "antagonista de VEGF" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de VEGF incluyendo su unión a uno o más receptores de VEGF. Los antagonistas de VEGF incluyen determinados anticuerpos anti VEGF y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, moléculas de receptor y derivados que se unen específicamente a VEGF secuestrando por tanto su unión a uno o más receptores, anticuerpos anti receptor de VEGF y antagonistas de VEGF como inhibidores de molécula pequeña de las tirosín quinazas de VEGFR.

15 El término "construcción" o la expresión "construcción de direccionamiento" se refiere a una molécula de polinucleótido que comprende una región de direccionamiento. Una región de direccionamiento comprende una secuencia que es sustancialmente homóloga a una secuencia endógena en un tejido, célula o animal diana y que proporciona integración de la construcción de direccionamiento en el genoma del tejido, célula o animal diana. Normalmente, la construcción de direccionamiento también incluirá un gen o una secuencia de ácido nucleico de interés particular, un gen marcador y secuencias de control apropiadas.

20 La "disrupción" de un gen sucede cuando un fragmento de ADN se sitúa y recombina con una secuencia homóloga endógena. Estas disrupciones o modificaciones de secuencia pueden incluir inserciones, sentidos erróneos, desplazamiento de marcos de lectura, eliminaciones o sustituciones, o reemplazos de secuencia de ADN, o cualquier combinación de estas. Las inserciones incluyen la inserción de genes completos, que pueden ser de origen animal, vegetal, fúngico, de insecto, procariontario o viral. La disrupción, por ejemplo, puede alterar el producto génico normal inhibiendo parcial o completamente su producción o potenciando la actividad normal del producto génico o alterando su secuencia.

25 La expresión "locus endógenos" pretende incluir los locus genéticos de origen natural encontrados en el animal hospedador que va a convertirse en transgénico.

30 El término "heterólogo", cuando se usa junto con polipéptido o gen, se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos o a un ADN que codifica el polipéptido que no se encuentra en los animales hospedadores no humanos transgénicos. Por tanto, un ratón transgénico que tiene un gen VEGF humanizado puede describirse como un ratón que tiene un gen VEGF heterólogo. El transgén puede detectarse usando varios métodos incluyendo PCR, transferencia de Western o transferencia de Southern.

35 La expresión "animales no humanos" pretende incluir cualquier vertebrado como mamíferos, aves, reptiles, y anfibios. Los mamíferos adecuados incluyen, por ejemplo, roedores, primates no humanos, ovejas, perros y vacas. Las aves adecuadas incluyen, por ejemplo, pollos, ocas y pavos. Los animales no humanos preferentes se seleccionan de la familia de los roedores incluyendo ratas y ratones, más preferentemente ratones.

40 La expresión "de origen natural" o la expresión "asociado de forma natural", como se usa en el presente documento aplicada a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo un virus) que puede aislarse a partir de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente por el hombre en laboratorio es de origen natural.

45 Una "secuencia reguladora transcripcional" se refiere a secuencias polinucleótidos, como señales de iniciación, potenciadores y promotores, que inducen o controlan la transcripción de secuencias codificantes de proteínas con las que se unen operativamente. En realizaciones preferentes, la transcripción de un transgén recombinante está bajo el control de una secuencia de promotor (u otra secuencia reguladora transcripcional), la cual controla la expresión del gen recombinante en un tipo celular en el que se pretende la expresión. También se entenderá que el gen recombinante puede estar bajo el control de secuencias reguladoras transcripcionales que son iguales o distintas de esas secuencias, las cuales controlan la transcripción de una forma de origen natural de VEGF.

50 Como se usa en el presente documento, el término "transgén" significa una secuencia de ácido nucleico (que codifica, por ejemplo, VEGF humanizado) que se ha introducido en una célula por medio de intervención humana, como por medio de los métodos descritos en el presente documento. Un transgén podría ser parcial o completamente heterólogo, es decir, extraño para el animal transgénico o célula en la que se introduce. Un transgén puede incluir una o más secuencias reguladoras transcripcionales y cualquier otro ácido nucleico, como intrones, que pueden ser necesarios para la expresión óptima de un ácido nucleico seleccionado.

60

"Animal transgénico" o "Tg<sup>+</sup>" se usan intercambiamente y pretenden incluir cualquier animal no humano de origen natural en el que una o más de las células del animal contienen ácido nucleico heterólogo que codifica VEGF humano o humanizado, que se ha introducido por medio de intervención humana, como por medio de técnicas transgénicas bien conocidas en la técnica. El ácido nucleico se introduce en la célula, directa o indirectamente, mediante la introducción en un precursor de la célula, mediante manipulación genética deliberada, como mediante microinyección, o mediante infección con un virus recombinante. La expresión "manipulación genética" no incluye cruzamientos clásicos, sino que se dirige a la introducción de una molécula de ADN recombinante. Esta molécula puede integrarse en un cromosoma, o puede ser un ADN de replicación extracromosómica. El término "Tg<sup>+</sup>" incluye animales que son heterocigóticos y/o homocigóticos para VEGF humano o humanizado.

Una "enfermedad asociada a VEGF" se refiere a enfermedades o trastornos que se han asociado con la expresión de VEGF o que pueden tratarse con un antagonista de VEGF. Por ejemplo, se ha usado un anticuerpo quimérico anti VEGF para tratar a pacientes con determinados cánceres. Un ejemplo adicional es el uso de terapia anti VEGF para tratar la degeneración macular asociada a la edad.

#### **A. Modos de la invención**

La presente invención proporciona un ratón transgénico que expresa VEGF hum-X. Estos animales pueden usarse para estudiar las propiedades de eficacia, farmacocinética, farmacodinámica y seguridad de terapias dirigidas a VEGF. Estos modelos animales pueden usarse para evaluar agentes que incluyen, por ejemplo, antagonistas de VEGF, incluyendo pero sin limitación anticuerpos contra VEGF.

#### **B. Construcciones de ADN**

También se divulgan ácidos nucleicos aislados que codifican un VEGF humano o humanizado, vectores y células hospedadoras que comprenden el ácido nucleico, y técnicas recombinantes para su producción.

Para la producción de una proteína recombinante, el ácido nucleico que la codifica se aísla e inserta en un vector replicable para clonación posterior (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el VEGF humano o humanizado se aísla y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican la variante de polipéptido). Hay disponibles muchos vectores. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

##### (i) Componente de secuencia señal

Un polipéptido de esta divulgación puede producirse de manera recombinante, no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga es preferentemente una que se reconoce y procesa (es decir, escinde por una peptidasa de señal) por la célula hospedadora. Para las células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal variante del polipéptido natural, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinasasa, lpp, o líderes de la enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal nativa puede sustituirse por, por ejemplo, el líder de la invertasa de levadura, líder del factor  $\alpha$  (incluyendo los líderes de factor  $\alpha$  de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/134646. En la expresión en células de mamífero, están disponibles las secuencias señal de mamífero así como líderes secretores virales, por ejemplo, la señal gD de *Herpes simplex*. El ADN para dicha región precursora se liga en marco de lectura al ADN que codifica el polipéptido.

##### (ii) Componente de origen de replicación

Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que le permite al vector replicarse en una o más células hospedadoras seleccionadas. En general, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite al vector replicarse de manera independiente del ADN cromosómico, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias se conocen bien para varias bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido de 2 $\mu$  es adecuado para levaduras, y varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. En general, el componente de origen de replicación no se necesita para los vectores de expresión en mamíferos (el origen SV40 puede usarse normalmente solo porque contiene el promotor temprano).

(iii) Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también llamado marcador de selección. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) proporcionan nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para bacilos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Aquellas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y, por tanto, sobrevive al régimen de selección. Ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico variante del polipéptido, como DHFR, timidín quinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosín desaminasa, ornitín descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primeramente cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora apropiada cuando se usa DHFR de tipo silvestre es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad DHFR.

Como alternativa, las células hospedadoras (en particular hospedadoras de tipo silvestre que contienen DHFR endógeno) transformadas con secuencias de ADN que codifican variantes del polipéptido, proteína DHFR de tipo silvestre, y otro marcador de selección como aminoglicosido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador de selección como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la Patente de los Estados Unidos N° 4.965.199.

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

Además, pueden usarse los vectores derivados del plásmido pKD1 circular de 1,6 µm para la transformación de levaduras de *Kluyveromyces*. Como alternativa, se comunicó un sistema de expresión para producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). También se han divulgado vectores de expresión multicopia estables para la secreción de seroalbúmina humana recombinante madura en cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer et al., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

(iv) Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación contienen normalmente un promotor que se reconoce por el organismo hospedador y se une operativamente al ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención. Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariontes incluyen el promotor *phoA*, los sistemas de promotor β-lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*), y promotores híbridos como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica a la variante de polipéptido.

Se conocen secuencias de promotor para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente a entre 25 y 30 bases cadena arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada a entre 70 y 80 bases cadena arriba del inicio de transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en donde N puede ser cualquier nucleótido (SEC ID N°: 3). En el extremo 3' de la mayor parte de los genes eucariotas está una secuencia AATAAA (SEC ID N°: 4) que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de manera adecuada en los vectores de expresión eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa u otras encima glicolíticas, como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, tiosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

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

La transcripción de polipéptidos a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos a partir de los genomas de virus como virus de polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y lo más preferentemente virus de simio 40 (SV40), a partir de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, a partir de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de la célula hospedadora.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. En la Patente de los Estados Unidos N° 4.419.446 se divulga un sistema para expresar ADN en un hospedador de mamífero usando el virus del papiloma bovino como vector. Una modificación de este sistema se describe en la patente de los Estados Unidos N° 4.601.978. Véase también Reyes et al., Nature 297:589-601 (19982) acerca de la expresión de ADNc de  $\beta$ -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidín quinasa del virus *Herpes simplex*. Como alternativa, puede usarse la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

#### (v) Componente de elemento potenciador

La transcripción de un ADN que codifica el polipéptido de esta invención por eucariotas superiores se aumenta normalmente insertando una secuencia potenciadora en el vector. Hoy en día se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) acerca de elementos potenciadores para la activación de promotores eucarióticos. El potenciador puede empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia que codifica el polipéptido, pero se coloca preferentemente en un sitio 5' del promotor.

#### (vi) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (levadura, hongo, insecto, planta, animal, humano, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles de manera común en las regiones 5' y, ocasionalmente, 3' no traducidas de ADN o ADNc de eucariota o vírico. Estas regiones contienen segmentos de nucleótido transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica la variante de polipéptido. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO 94/11026 y el vector de expresión divulgado en este.

#### (vii) Selección y transformación de células hospedadoras

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento son células procariotas, levaduras o células eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen eubacterias, como organismos Gram-positivos y Gram-negativos, por ejemplo, Enterobacteriaceae como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgado en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación de *E. coli* preferente es *E. coli* 294 (ATCC® 31.446), aunque son adecuadas otras cepas como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC® 31.537), y *E. coli* W3110 (ATCC® 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes.

Además de procariotas, los microbios eucariotas como hongos o levaduras filamentosos son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican variantes de polipéptido. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura común de panadero, es el más usado entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, varios otros géneros, especies y cepas están disponibles de forma común y útil en el presente documento, como *Schizosaccharomyces pombe*; los hospedadores de *Kluyveromyces* como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC® 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC® 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC® 24.178), *K. waltii* (ATCC® 56.500), *K. drosophilum* (ATCC® 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244,234); *Neurospora crassa*;

*Schwanniomyces* como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospedadores de *Aspergillus* como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de variantes de polipéptido glicosiladas proceden de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insecto. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y sus correspondientes células hospedadoras de insecto permisivas de hospedadores como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombix mori*. Están disponibles varias cepas virales para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombix mori* NPV, y dichos virus pueden usarse como el virus en el presente documento de acuerdo con la presente invención, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco como hospedadores.

Sin embargo, ha sido mayor el interés en células de vertebrado, y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo tisular) ha llegado a ser un procedimiento rutinario. Los ejemplos de células hospedadoras de mamífero útiles son línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC® 1651); línea de riñón humano embrionario (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC® CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC® CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC® CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC® CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC® CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC® CRL 1442); células de pulmón humano (W 138, ATCC® CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); células mamarias humanas (HEK293), tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC® CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

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

#### (viii) Cultivo de las células hospedadoras

Las células hospedadoras usadas para producir un polipéptido de esta invención pueden cultivarse en varios medios. Son adecuados los medios comerciales disponibles como medio de Ham F10 (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma). Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), Patentes de los Estados Unidos Nº 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655, o 5.122.469, los documentos WO 90/03430 y WO 87/00195, o la Patente de los Estados Unidos Re. 30.985 pueden usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (como HEPES), nucleótidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como el fármaco GENTAMICINA™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes en concentraciones finales a escala micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También pueden incluirse cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que sean conocidas para los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, como temperatura, pH y similares son las usadas anteriormente con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y serán evidentes para el experto en la materia.

#### **C. Producción de animales transgénicos**

Los métodos para generar animales transgénicos de la presente invención son bien conocidos en la técnica (véase, de manera general, Gene Targeting: A Practical Approach, Joyner, ed., Oxford University Press, Inc (2000)). De acuerdo con la invención, la generación del ratón transgénico incluye la disrupción de VEGF murino y la introducción del gen que codifica VEGF humanizado en el genoma murino, en la misma ubicación que el VEGF endógeno. De acuerdo con la invención, se genera un modelo de ratón transgénico donde los aminoácidos específicos de VEGF humano se han introducido en el VEGF murino para proporcionar VEGF hum-X (SEC ID Nº: 12).

Los ratones transgénicos de la invención se producen preferentemente introduciendo transgenes en la línea germinal del animal. Pueden usarse células diana embrionarias en varios estadios de desarrollo para introducir transgenes. Se usan distintos métodos dependiendo del estadio de desarrollo de la célula embrionaria diana. La(s) línea(s) concreta(s) de un animal usado para poner en práctica esta invención se seleccionan en función de la salud general, buenas producciones de embriones, buena visibilidad pronuclear en el embrión, y buena salud reproductiva. Cuando se quieren producir ratones transgénicos, se usan con frecuencia cepas como C57BL/6 o C57BL/6 x DBA/2 F<sub>1</sub>, o líneas FVB (disponibles comercialmente a través de Charles River Labs, Boston, Mass., The Jackson



Laboratory, Bar Harbor, ME, o Taconic Labs). Además, pueden usarse ratones desnudos para la introducción de células tumorales humanas en el ratón transgénico. La cría y mantenimiento de ratones desnudos transgénicos son más difíciles debido a que los ratones son más proclives a infecciones y enfermedades.

5 La introducción del transgén en el embrión puede lograrse por cualquiera de los medios conocidos en la técnica como, por ejemplo, microinyección, electroporación o lipofección. Por ejemplo, el transgén puede introducirse en un mamífero mediante microinyección de la construcción en los pronúcleos de los óvulos de mamífero fertilizados para hacer que una o más copias de la construcción queden retenidas en las células del (los) animal(es) en desarrollo. Después de la introducción de la construcción del transgén en el óvulo fertilizado, se puede incubar el óvulo *in vitro* durante periodos de tiempo variables, o reimplantarse en el hospedador subrogado, o ambos. La incubación *in vitro* hasta la madurez se encuentra dentro del ámbito de esta invención. Un método común es incubar los embriones *in vitro* durante aproximadamente 1-7 días, dependiendo de las especies, y después reimplantarlos en el hospedador subrogado.

15 La reimplantación se efectúa usando métodos estándar. Generalmente, se anestesia al hospedador subrogado y los embriones se insertan dentro del oviducto. El número de embriones implantados en un hospedador concreto variará entre especies, pero será generalmente comparable al número de descendencia que produce la especie de manera natural.

20 También puede usarse infección retroviral para introducir transgenes en un animal no humano. El embrión no humano en desarrollo puede cultivarse *in vitro* hasta el estadio de blastocisto. Durante este tiempo, los blastómeros pueden ser dianas para infección retroviral (Jaenich, R. (1976) PNAS 73:1260-1264). La infección eficiente de los blastómeros se obtiene mediante tratamiento enzimático para retirar la zona pelúcida (Manipulating the Mouse Embryo, Hogan eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1986)). El sistema de vector viral usado para introducir el transgén es generalmente un retrovirus de replicación defectuosa que porta al transgén (Jahner et al. (1985) PNAS 82:6927-6931; Van der Putten et al. (1985) PNAS 82:6148-6152). La transfección se obtiene de forma fácil y eficiente mediante el cultivo de los blastómeros sobre una monocapa de células productoras de virus (Van der Putten, anteriormente citado; Stewart et al. (1987) EMBO J. 6:383-388). Como alternativa, la infección puede llevarse a cabo en un estadio tardío. Pueden inyectarse virus o células productoras de virus en el blastocelo (Jahner et al. (1982) Nature 298:623-628). La mayoría de los fundadores serán mosaicos para el transgén ya que la incorporación sucede únicamente en un subconjunto de las células que formaron al animal transgénico no humano. Además, el fundador puede contener varias inserciones retrovirales del transgén en distintas posiciones en el genoma que generalmente segregarán en la descendencia. Además, también es posible introducir transgenes en la línea germinal mediante infección retroviral intrauterina del embrión en gestación (Jahner et al., (1982) anteriormente citado).

Un tercer tipo de célula diana para la introducción del transgén es la célula madre embrionaria. Los transgenes pueden introducirse de manera eficiente en las células ES mediante transfección de ADN o mediante transducción mediada por retrovirus. Dichas células ES transformadas pueden combinarse a continuación con blastocistos procedentes de un animal no humano. Las células ES a continuación colonizan el embrión y contribuyen a la línea germinal del animal quimérico resultante.

De acuerdo con la invención, un gen de VEGF endógeno en un hospedador no humano se rompe funcionalmente mediante integración homóloga de VEGF humanizado heterólogo (incluyendo VEGF humano completo), de tal forma que el gen de VEGF heterólogo reemplaza sustancialmente al gen VEGF endógeno, y preferentemente reemplaza por completo la secuencia codificante del gen VEGF endógeno. Preferentemente, el gen VEGF humanizado heterólogo se une, como consecuencia de la integración homóloga, a secuencias reguladoras (por ejemplo un potenciador/promotor) del gen VEGF endógeno, respectivamente, de tal forma que el gen heterólogo se expresa bajo el control transcripcional de elementos reguladores del locus génico de VEGF endógeno. Los ratones hospedadores que son homocigotos para dicho alelo de sustitución se producen de acuerdo con métodos descritos en el presente documento. Dichos hospedadores no humanos homocigotos expresan el VEGF humanizado heterólogo pero no expresan la proteína VEGF endógena. Generalmente, el patrón de expresión del gen VEGF humanizado heterólogo imitará sustancialmente el patrón de expresión del gen VEGF endógeno, en el hospedador no humano de origen natural (no transgénico).

Por ejemplo, puede generarse un ratón transgénico que tiene secuencias de gen VEGF en lugar de secuencias del gen VEGF murino endógeno y que se controlan transcripcionalmente por las secuencias reguladoras murinas endógenas. El VEGF humanizado se expresará generalmente de manera similar al VEGF murino en ratones no transgénicos de origen natural.

Generalmente se emplea una construcción de direccionamiento de tipo reemplazo para el reemplazo de genes homólogos. La recombinación homóloga de sobrecruzamiento doble entre las secuencias endógenas del gen VEGF de la construcción da como resultado una integración dirigida de los segmentos del gen VEGF heterólogos. Normalmente, las regiones de direccionamiento de homología del transgén comprenden secuencias que flanquean a los segmentos génicos de VEGF endógenos, de tal forma que la recombinación homóloga da como resultado una eliminación concomitante del VEGF endógeno y la integración homóloga de los segmentos génicos heterólogos. Se

puede reemplazar sustancialmente un gen VEGF endógeno completo con un VEGF heterólogo mediante un único evento de direccionamiento o mediante múltiples eventos de direccionamiento (por ejemplo, reemplazo secuencial de exones individuales). Uno o más marcadores de selección, generalmente en forma de casetes de expresión de selección positiva o negativa, pueden posicionarse en la construcción de direccionamiento. Se prefiere generalmente que los marcadores de selección se ubiquen en regiones de intrón de la región de reemplazo heteróloga.

Los animales transgénicos que comprenden VEGF humanizado de transgén pueden cruzarse con otros animales. En una realización, un ratón transgénico comprende el VEGF humano y carece del RAG2 murino. Una forma de preparación es generar una serie de mamíferos, conteniendo cada uno una de las construcciones o transgenes knockout. Dichos mamíferos se crían mediante una serie de cruzamientos, retrocruzamientos y selecciones, para en última instancia generar un único animal que contiene todas las construcciones génicas knockout o transgenes, en donde el mamífero es por lo demás congénico (idéntico genéticamente) al tipo silvestre excepto por la presencia de las construcciones knockout y/o transgén (transgenes).

Normalmente, el cruzamiento y retrocruzamiento se lleva a cabo emparejando hermanos o una cepa parental con una descendencia, dependiendo de la meta de cada etapa particular en el proceso de cría. En determinados casos, puede ser necesario generar un gran número de descendientes para generar una descendencia única que contiene cada una de las construcciones knockout y/o transgenes en la localización cromosómica adecuada. Además, puede ser necesario cruzar o retrocruzar a lo largo de varias generaciones para obtener finalmente el genotipo deseado.

#### **D. Verificación de la presencia de transgenes**

Puede evaluarse la descendencia transgénica del hospedador subrogado para determinar la presencia y/o expresión del transgén en el tejido, célula o animal deseado mediante cualquier método adecuado. La evaluación se lleva a cabo a menudo mediante análisis por transferencia de Western o de transferencia de Northern, usando una sonda que es complementaria a al menos una porción del transgén. Puede emplearse el análisis por transferencia de Western usando un anticuerpo contra la proteína codificada por el transgén como un método alternativo o adicional para evaluar la presencia del producto transgénico. Normalmente, se prepara el ADN a partir del tejido de la cola y se analiza mediante análisis de Southern o PRC para el transgén. Como alternativa, los tejidos o células que se cree que expresan el transgén a mayores niveles se ensayan para la presencia y expresión del transgén usando análisis de Southern o PCR, aunque pueden usarse cualquier tejido o tipos celulares para este análisis.

Los métodos alternativos o adicionales para evaluar la presencia del transgén incluyen, sin limitación, ensayos bioquímicos adecuados como ensayos inmunológicos, análisis por citometría de flujo y similares.

#### **E. Usos de animales transgénicos**

Los ratones transgénicos de la presente invención representan modelos de expresión y función de VEGF en humanos. Por consiguiente, estos animales son útiles para el estudio de los mecanismos detrás de la función de VEGF y los eventos relacionados, y para generar y ensayar productos (por ejemplo anticuerpos, biespecíficos, multiespecíficos, etc.) útiles en el tratamiento y diagnóstico de enfermedades humanas asociadas con VEGF, incluyendo cáncer y otras afecciones relacionadas con la angiogénesis.

En algunas realizaciones, el VEGF humanizado expresado de manera transgénica mantiene propiedades funcionales similares a las que se muestran en humanos. Por ejemplo, el VEGF humanizado heterólogo reemplaza funcionalmente al VEGF homólogo del animal y además se reconoce mediante anticuerpos anti VEGF humano. En consecuencia, en una realización, los animales transgénicos de la invención se usan para ensayar agentes como anticuerpos, moléculas multi o biespecíficas, inmunoadhesinas (por ejemplo para seguridad y eficacia en humanos) para unirse a epítomos diana, como una región de un VEGF humano. Otros agentes pueden incluir fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos con o sin regiones Fc, anticuerpos de cadena sencilla, minicuerpos (anticuerpos de únicamente cadena pesada), inmunoadhesinas heteromultiméricas con uno de los multímeros de región de unión a antígeno anti VEGF humano. Otros agentes pueden incluir antagonistas de VEGF de molécula pequeña. Por tanto, la presente invención proporciona métodos de identificación de agentes capaces de tratar una enfermedad relacionada con VEGF.

Un ratón transgénico de la presente invención puede además proporcionar una indicación de la seguridad de un agente concreto para su administración en un ser humano. Por ejemplo, puede administrarse un anticuerpo humanizado u otro agente al animal transgénico y puede evaluarse o identificarse cualquier efecto tóxico o adverso como resultado de la administración del agente al animal como una indicación de la seguridad y tolerabilidad del anticuerpo o agente humanizado para uso en seres humanos *in vivo*. Los sucesos adversos que pueden suceder en un corto plazo incluyen dolor de cabeza, infección, fiebre, escalofríos, dolor, náuseas, astenia, faringitis, diarrea, rinitis, reacciones a la infusión y mialgia. Los sucesos adversos a corto plazo se miden en días transcurridos desde el tratamiento. Los efectos adversos a largo plazo incluyen citotoxicidad de ciertos tipos celulares, eventos de sangrado, liberación de mediadores debido a reacciones inflamatorias y/o alérgicas, inhibición del sistema inmunitario y/o desarrollo de un anticuerpo anti agente terapéutico, toxicidad en el órgano diana, y mayor incidencia de infección o malignidad. Los sucesos adversos a largo plazo se miden en semanas o meses transcurridos desde

el tratamiento.

Otro aspecto de la invención incluye un método para determinar la eficacia de un agente anti VEGF. La eficacia puede terminarse administrando un intervalo de dosis del agente a un conjunto de ratones transgénicos de la invención y determinando al menos una dosis que muestra el efecto deseado.

Los ratones transgénicos de la presente invención, incluyendo células, tejidos u otros materiales derivados de estos pueden utilizarse como modelos para enfermedades, en concreto enfermedades asociadas o mediadas por VEGF. Estos sistemas pueden usarse en varias aplicaciones. Dichos ensayos pueden utilizarse como parte de estrategias de evaluación diseñadas para identificar agentes, como compuestos que son capaces de aliviar los síntomas de la enfermedad. Por tanto, los modelos basados en animales y células pueden usarse para identificar fármacos, agentes farmacéuticos, terapias e intervenciones que puedan ser efectivas en el tratamiento de enfermedades.

Los sistemas basados en células pueden usarse para identificar compuestos que pueden actuar para aliviar síntomas de enfermedad. Por ejemplo, dichos sistemas celulares pueden exponerse a un compuesto sospechoso de mostrar una capacidad para aliviar síntomas de enfermedad, a una concentración suficiente durante un tiempo suficiente para suscitar dicha mejora de los síntomas de enfermedad en las células expuestas. Después de la exposición, las células se examinan para determinar si uno o más de los fenotipos celulares de enfermedad se han alterado para asemejarse a un fenotipo más normal o más tipo silvestre de no enfermedad.

Otros usos serán fácilmente evidentes para un experto en la materia.

Los siguientes ejemplos no limitativos son ilustrativos de la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Este ejemplo describe la generación de VEGF humanizado y de ratones transgénicos (Tg+) que lo expresan.

Bevacizumab se une al VEGF humano, pero no al VEGF murino. Con los datos de la estructura de rayos X, en combinación con la mutagénesis dirigida, se identificaron 3 regiones diferentes localizadas dentro de los exones 3 y 4 de VEGF-A que están en contacto directo con bevacizumab. La mayoría de estos contactos están formados por restos del bucle  $\beta 5\text{-}\beta 6$  (aproximadamente en el resto 80), con 2 restos adicionales de la hélice N-terminal y 2 restos del bucle  $\alpha 1\text{-}\beta 2$  (aproximadamente en el resto 40) que interactúan en el margen de la interfase (Muller et al. PNAS 94:7292-97 (1997), Muller et al. Structure 6:1153-67 (1998)) (Figura 1A). Con la excepción de un resto, todos los aminoácidos del VEGF humano que están en contacto con bevacizumab están conservados en el VEGF murino. El resto no conservado, la Gly88 humana, corresponde a la Ser87 en la secuencia del VEGF murino y se localiza en el núcleo de la interfase proteína:anticuerpo. La estructura cristalina del VEGF-A humano complejo con bevacizumab-Fab reveló que la interfase entre ambas moléculas está firmemente compactada. El modelado de la cadena lateral de serina presente en el VEGF murino, revela que no existe espacio suficiente para acomodar los dos átomos distintos al hidrógeno adicionales que se introducen mediante el intercambio de Gly88→Ser. Estudios previos demostraron que la mutación de la glicina 88 a alanina (Gly88Ala) en VEGF-A humano redujo sustancialmente la unión del Mab A4.6.1 al precursor murino de bevacizumab (Muller et al. Structure 6:1153-67 (1998)). Estas observaciones sugirieron que la introducción de una mutación puntual Ser87Gly en el VEGF murino podría ser suficiente para restaurar la unión a y la neutralización mediante A4.6.1. Sin embargo, la estructura cristalina del complejo y el análisis de mutagénesis se realizaron usando una variante truncada de VEGF-A (8-109) (Muller et al. Structure 6:1153-67 (1998)). Por lo tanto, se desconocía la contribución de otros restos, no presentes en VEGF8-109, a la unión de VEGF-A nativo con bevacizumab. Además, se conocía que anticuerpos derivados de fagos tales como G6 (G6-31) o B20-4 contactaban con restos adicionales no conservados (Fuh et al. J. Biol. Chem. 281:6625-31 (2006)). Estas observaciones sugirieron diseñar un VEGF-A murino humanizado más extensivamente, que se pudiera reconocer con anticuerpos adicionales, y por lo tanto permitiera ensayar una variedad más amplia de compuestos terapéuticos dirigidos a la señalización de VEGF. Por lo tanto, se generaron dos versiones de proteínas VEGF "humanizadas". Una mutante que contenía la mutación puntual ser87gly, importante para la unión de bevacizumab (hum-I VEGF), y una segunda forma, VEGF hum-X, en la que los 10 restos, que son diferentes entre el VEGF-A murino y el humano en el dominio de unión al receptor, se reemplazan por los aminoácidos respectivos de la secuencia humana (Fig. 1A). Por lo tanto, las secuencias de hum-I VEGF y VEGF hum-X, incluyendo la secuencia señal, son las siguientes:

hum-I VEGF (SEQ ID N°: 11):

MNLLSWVHWTLALLLYLHHAKWSQAAPTTEGEQKSHEVIKFMVDVYQRS 22  
 YCRPIETLVDIFQEYYPDEIEYIFKPSCVPLMRCAGCCNDEALECVPTSES 72  
 NITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHSRCECRPKKDRTPENHCEPCSERR 122  
 KHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR 164

5 VEGF hum-X (SEC ID N°: 12):

MNLLSWVHWTLALLLYLHHAKWSQAAPTTEGEQKSHEVIKFMVDVYQRS 22  
 YCHPIETLVDIFQEYYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTSES 72  
 NITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENHCEPCSERR 122  
 KHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR 164

10 En primer lugar se ensayó si VEGF hum-X conservaba las funciones normales de VEGF. Se expresaron las proteínas VEGF hum-X recombinante, VEGF-A de tipo silvestre humano y murino en *E. coli* y se purificaron. Los precipitados de las células bacterianas que expresan VEGF hum-X se resuspendieron en 10 volúmenes Tris 25 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5, con un homogeneizador Polytron®. Se lisaron las células pasando la suspensión celular a través de un Microfluidizer® (Microfluidics International) y la solución se clarificó mediante centrifugación. El precipitado se resuspendió en tampón de extracción que contenía urea 7 M, Hepes 50 mM, DTT 10 mM, pH 8, y la solución se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 1 h. La solución se centrifugó a 33.000 x g durante 30 minutos para eliminar los residuos celulares y el sobrenadante, que contenía VEGF hum-X desnaturalizado y reducido, se diluyó diez veces en tampón de replegamiento (urea 1 M, Hepes 50 mM, 15 mg/l de sulfato de dextrano 8.000, Triton® X-100 al 0,05 %, pH 8,2). La muestra de replegamiento se agitó magnéticamente durante toda la noche a temperatura ambiente y después se centrifugó para eliminar la proteína precipitada. Se añadió sulfato de amonio a una concentración de 1 M antes de cargar la muestra en una columna de TSK de grupos fenilo equilibrada con sulfato de amonio 1 M, Tris 25 mM, pH 7,5; el VEGF hum-X se eluyó con un gradiente decreciente de sulfato de amonio en este tampón hasta 0 M. Las fracciones que contenían VEGF hum-X se agruparon y después se purificaron en una columna de fase inversa C4 (Vydac). Las fracciones que contenían el VEGF hum-X dimérico se agruparon y se liofilizaron.

25 Se determinaron las afinidades relativas de bevacizumab y de tres anticuerpos anti VEGF humano de segunda generación para VEGF-A nativo humano, VEGF-A murino y la proteína VEGF hum-X. La afinidad de unión del anticuerpo se ensayó mediante la medición por resonancia de plasmones de superficie (RPS) con un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Los chips biosensores de Dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) se activaron con clorhidrato de N-étil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. Se inmovilizaron el VEGF-A humano, VEGF-A murino y VEGF hum-X hasta alcanzar aproximadamente 60 unidades de respuesta (UR). Se inyectaron diluciones seriadas de dos veces de IgG (0,78-500 nM) en PBS con Tween® 20 al 0,05 % (PBST) a 37 °C a una velocidad de flujo de 25 µl/min. Las tasas de asociación ( $k_{on}$ ) y las tasas de disociación ( $k_{off}$ ) se calcularon usando el modelo de unión uno a uno de Langmuir (Programa informático de evaluación BIAcore, versión 3.2) mediante ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de equilibrio de disociación (Kd) se obtuvo como la proporción  $k_{off}/k_{on}$ .

40 Según la hipótesis, la sustitución de 10 aminoácidos humanos en el VEGF-A murino da como resultado una proteína reconocida por todos los Mab anti-humanos ensayados, con un pequeño cambio en la afinidad relativa para el VEGF-A humano de tipo silvestre (Tabla 1; cada medición representa un promedio de tres ensayos independientes que varían < 20 %).

	bevacizumab	Y0317	B20-4.1	G6-31
huVEGF <sub>165</sub>	4,3	0,01	1,7	0,3
Hum-X VEGF	3,2	0,02	2,3	0,2
muVEGF <sub>164</sub>	NB	479	1,1	0,4

A continuación, se evaluaron las potencias de cada variante de VEGF-A para estimular la proliferación de las células primarias endoteliales en cultivo. Se sembraron células endoteliales microvasculares de retina bovinas a una densidad de 500 células por pocillo en placas de 96 pocillos en medio de cultivo (DMEM bajo en glucosa, suplementado con 10 % de suero bovino fetal, glutamina 2 mM, y antibióticos). Después de 6-7 días, se ensayó el crecimiento celular mediante el uso de Alamar Blue™ (BioSource). La fluorescencia se controló a una longitud de onda de excitación de 530 nm y a una longitud de onda de emisión de 590 nm.

HuVEGF-A, muVEGF-A y VEGF hum-X estimularon la proliferación de las células endoteliales capilares bovinas a la mitad de las concentraciones máximas de 1,5, 0,6 y 0,9 ng/ml, respectivamente. Se obtuvieron resultados similares con células HUVEC. Estos hallazgos indicaron que la variante VEGF hum-X tiene una potencia comparable a la de las proteínas VEGF-A humana y murina de tipo silvestre en la estimulación de la proliferación de EC *in vitro*.

Finalmente, se compararon las potencias de los diversos anticuerpos anti VEGF-A para interferir con la proliferación de las células endoteliales inducida por las diversas proteínas VEGF-A recombinantes. Para el ensayo de inhibición, se añadieron anticuerpos al experimento anterior a las concentraciones indicadas antes de la adición de VEGF y después de 0,5-1 h, se añadieron hVEGF-A, mVEGF-A o MutX a una concentración final de 6 ng/ml. Los valores de CI<sub>50</sub> se calcularon usando KaleidaGraph®. Tal como se esperaba, bevacizumab y Y0317 fallaron al bloquear VEGF-A, mientras que los valores de CI<sub>50</sub> de los pares ligando/anticuerpo se correlacionaron bien con las afinidades de los anticuerpos (Tabla 2; los datos que se muestran son medias de experimentos por triplicado que variaron menos del 20 %).

	bevacizumab CI <sub>50</sub> , (ng/ml)	Y0317 CI <sub>50</sub> , (ng/ml)	B20-4.1 CI <sub>50</sub> , (ng/ml)	G6-31 CI <sub>50</sub> , (ng/ml)
huVEGF165	32	0,75	52	4,9
Hum-X VEGF	55	2,7	76	6,1
muVEGF164	NA	NA	500	3,8

Estos datos confirmaron que las proteínas VEGF-A hum-X, murina de tipo silvestre y humana de tipo silvestre tienen propiedades biológicas y bioquímicas comparables, y que la capacidad de los anticuerpos para interferir con la variante hum-X en relación con el VEGF-A humano de tipo silvestre se correlaciona con sus respectivas afinidades por la proteína humana de tipo silvestre.

## Ejemplo 2

Este ejemplo describe la generación de ratones transgénicos (Tg<sup>+</sup>) que expresan VEGF hum-X.

Habiendo establecido la equivalencia cercana entre VEGF hum-X y VEGF murino de tipo silvestre *in vitro*, se procedió a generar vectores de direccionamiento genético para introducir 1 o 11 aminoácidos humanos en la línea germinal murina (Figura 1F; hum-I VEGF y VEGF hum-X, respectivamente). Se mutaron 10 aminoácidos dentro del vector de direccionamiento genético para VEGF-A, que consisten en los exones 3, 4 y 5 del VEGF-A murino (Gerber. Et al. Development 126:1146-59 (1999)), de las secuencias humanas a las murinas. Para la mutagénesis dirigida de los restos localizados dentro de los exones 3, 4 y 5, se usaron los siguientes oligonucleótidos:

Para el exón 3:

Exón3-R/H: AGCGAAGCTACTGCCATCCGATTGAGACC (SEC ID N°: 5),

Exón3-A/G,A/G: TGATGCGCTGTGGAGGCTGCTGTAACGATGAAG  
GCCTG (SEC ID N°: 6),

Exón3-A/G, S/E:

TGTAACGATGAAGGCCTGGAGTGCCTGCGTGCCACGGA AGAGAGCAAC  
(SEC ID N°: 7).

Para el exón 4:

Exón4-S/G: ATCAAACCTCACCAAGGCCAGCACATAGGAG

AGATG (SEC ID N°: 8),

Exón4-S/N, R/K: TGAGCTTCCTACAGCACAAACAAATGTGAATGCAG

GTG (SEC ID N°: 9)

5

Exón5-T/A, K/R, P/Q:

TGCAGACCAAAGAAAGACAGAGCACGGCAAGAAA AGTAAGTGG (SEC ID N°: 10).

10 Los aminoácidos correspondientes son: muVEGF-R26H, A57G, A64G, S71E, S87G, S99N, R100K, T110A, K111R, P112Q. Los eventos de recombinación correctos en las células ES se identificaron por análisis por PCR y se confirmaron mediante transferencia de Southern, tal como se describe anteriormente. En resumen, en las células ES diana correctas, el marcador para resistencia a la neomicina flanqueado por sitios Lox-P se suprimió mediante expresión con Cre recombinasa. Los productos de recombinación génica correctos se identificaron mediante PCR genómica y se confirmaron mediante transferencia de Southern de las regiones flanco 3' y 5'. Los experimentos de ELISA confirmaron la unión de A4.6.1 a la proteína VEGF hum-X presente en el medio acondicionado de las células ES diana. Además, el ADN genómico aislado de los clones de células ES seleccionados se digirió con *EcoRI* y se analizó por transferencia de Southern tal como se describe previamente (Gerber et al. (1999) anteriormente citado) y mediante secuenciación génica para ensayar los la corrección de los eventos de recombinación. Un derivado de tres clones de células ES parentales diferentes, que contenía el alelo floxed de VEGF, se usó para generar ratones quiméricos mediante microinyección dentro de la cavidad del blastocelo de blastocistos C57BL/6N del día 3,5 (Hogan et al. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1994)). Los machos quiméricos se emparejaron con hembras C57BL/6N y la progenie de agutí se crió para la transmisión de la línea germinal mediante análisis por PCR para los alelos de VEGF que contenían los sitios loxP-1 y loxP-3 tal como se describe anteriormente. La corrección de los eventos de recombinación en las células madre embrionarias (ES) se verificó por medio de experimentos de transferencia de Southern, PCR genómica, secuenciación génica y mediante la determinación de la expresión de VEGF-A en las células ES diana por medio de ELISA.

30 El análisis de la frecuencia genotípica de >500 ratones knock-in (ki) reveló las proporciones mendelianas esperadas de ratones simples mutantes homocigotos o mutantes en 10 aminoácidos (VEGF hum-X), y no se encontraron cambios en la viabilidad y la supervivencia de los ratones adultos durante un periodo de observación de un año. Basándose en el desarrollo normal y la viabilidad de ambas cepas, se tomó la decisión de realizar todos los experimentos posteriores en los ratones ki para VEGF hum-X humanizado más extensivamente.

### 35 Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra el uso de ratones transgénicos VEGF hum-X para la evaluación farmacocinética y terapéutica.

40 Las proteínas VEGF-A recombinante murino y VEGFR1 y VEGFR2 murinos y humanos se adquirieron en R&D systems. El VEGF-A recombinante humano (isoformas de 165 aminoácidos) se purificó a partir de *E. coli* en Genentech. El 125-I-VEGF-A se adquirió en Amersham.

45 Los Mab Y0317, G6-31 y B20-4.1 se obtuvieron a partir de bibliotecas de fagos de Fab humanizadas tal como se describe (Liang et al. *J. Biol. Chem.* 281:951-61 (2006)). Los anticuerpos humanos de longitud completa (hY0317, etc.) se generaron insertando los dominios variables VH y VL de estos Fab en los dominios constantes de la IgG1 (kappa) humana. Para la administración prolongada en ratones inmunocompetentes o para los experimentos control, se generaron anticuerpos murinos quiméricos inversos de longitud completa mediante la inserción de los dominios variables VH y VL en los dominios constantes de la IgG2a (kappa) murina.

50 Formato de recubrimiento de VEGF-a para determinar los anticuerpos anti VEGF-A libres. Se recubrieron placas de ELISA MaxiSorp™ (Nunc, Roskilde, Dinamarca) de 96 pocillos durante toda la noche con 0,5 µg/ml de VEGF-A<sub>165</sub> en carbonato de sodio 50 mM, pH 9,6 a 100 µl/pocillo. Se lavaron las placas con PBS que contenía polisorbato 20 al 0,05 % y se bloquearon con 150 µl/pocillo de albúmina de suero bovino al 0,5 %, 10 ppm de Proclin® 300 (Hyclone, Logan, UT) en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadieron diluciones seriadas de dos veces de los patrones (0,0625 -8 ng/ml de IgG2a anti VEGF anti-ratón, IgG1 humana anti VEGF, o IgG1 trap-humana) en BSA al 0,05 %, µ-globulinas bovinas al 0,2 % (Sigma, St. Louis, MO), 0,25 % CHAPS, EDTA 5 mM, NaCl 0,35 M, polisorbato 20 al 0,05 % en PBS, pH 7,4 (tampón de muestra) y muestras (mínimo una dilución 1:20) a las placas a 100 µl/pocillo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas y se lavaron. Los anticuerpos IgG2a murina e IgG1 humana anti VEGF-A unidos se detectaron mediante la adición de 100 µl/pocillo de IgG2a-HRP anti-

60

ratón (Pharming, San Diego, CA) y FcHRP humana (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pensilvania), respectivamente. Después de una hora de incubación, se lavaron las placas y se añadió el sustrato 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (Kirkegaard and Perry Laboratories, MD) (100  $\mu$ l por pocillo). Se detuvo la reacción mediante la adición de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M (100  $\mu$ l/pocillo). Se leyó la absorbancia a 450 nm usando un lector de microplacas SpectraMax® 250 (Molecular Devices Corp., CA). Las curvas de titulación se ajustaron usando programa de ajuste de curvas de regresión de 4 parámetros (KaleidaGraph®, Synergy software, Reading, PA). Los puntos de datos dentro del intervalo de la curva patrón se usaron para calcular las concentraciones de anticuerpo anti VEGF-A en las muestras.

Se comparó el aclaramiento de bevacizumab, Y0317, y hG6-31 después de una única administración intravenosa en ratones VEGF hum-X ki homocigóticos y en camadas control de tipo silvestre (VEGF hum-X de tipo silvestre). El aclaramiento sistémico de bevacizumab en ratones VEGF hum-X ki fue aproximadamente 3 veces más rápido que el que se observó en las camadas control de VEGF hum-X de tipo silvestre. Además, el aclaramiento de ambos anticuerpos de mayor afinidad (Y0317, G6-31) se incrementó aproximadamente 3 veces en relación a bevacizumab en ratones VEGF hum-X ki. Sin embargo, el aclaramiento de G6-31 fue similar entre los ratones de tipo silvestre y los hum-X VEGF ki, lo que es coherente con la reactividad cruzada para ambas especies. En contraste con las tasas de aclaramiento correlacionadas con las afinidades que se observan después de una dosis única de anticuerpo, la administración dos veces por semana de un anticuerpo durante 2 a 10 semanas se asoció con niveles comparables de anticuerpos circulantes en suero, pero no se encontró correlación entre el epítipo del anticuerpo o la afinidad. Se hipotetizó que la discrepancia en los niveles séricos de anticuerpo entre los experimentos de dosis única y los de dosis múltiple puede deberse a la rápida unión de los Mab de mayor afinidad al VEGF-A unido a la superficie celular o la matriz extracelular (MEC), actuando como un sumidero, y que dicho mecanismo es saturable por encima de una dosis repetida.

Se generaron ratones dobles homocigóticos inmunocomprometidos RAG2 ko; VEGF hum-X ki mediante apareamiento de hembras VEGF hum-X heterocigóticas (B6.129) con machos Rag2.ko {B6 (H2b) (Taconic, #RAGN12-M)}. Los animales dobles heterocigóticos se entrecruzaron para producir animales dobles homocigóticos VEGF hum-X.ki;Rag2.ko. La cepa se mantiene como conjuntos de cría de dobles mutantes. Estos se usaron para evaluar la potencia y la eficacia de bevacizumab, hY0317, hG6-31 y 20-4.1 para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de tumores Calu-6 (carcinoma pulmonar), HT29 o HM7 (carcinoma colorrectal). Tal como se muestra en la Figura 2, cuando se administraban a la dosis de 5 mg/kg dos veces por semana, bevacizumab y hY0317 interferían en grados similares con el crecimiento de los tumores de carcinoma pulmonar humano Calu-6, a pesar de las diferencias significativas en sus afinidades de unión relativas para VEGF-A. De manera similar, B20-4.1 y G6-31 fueron igualmente eficaces en la inhibición del crecimiento de las células de carcinoma pulmonar Calu-6 (Fig. 2A, 2B). Se observó una respuesta similar cuando los anticuerpos se ensayaron en tumores HM7 (Fig. 2C, 2D). En la mayoría de los experimentos de intervención de tumores, cuando se administraron los anticuerpos anti VEGF 3 días después de la implantación de la célula tumoral, se vio una tendencia hacia la mejora de la inhibición del crecimiento tumoral mediada por los Mab B20-4.1 y G6-31 en relación a bevacizumab o Y0317 (por ejemplo, Fig.2 A-D). Estos hallazgos sugieren que el incremento de la afinidad de unión por si solo es insuficiente para mejorar la eficacia en estudios de xenoinjertos de tumor, y que el epítipo reconocido por los anticuerpos anti VEGF-A podría jugar un papel en la determinación de la eficacia terapéutica. La administración de dosis más bajas (0,5 mg/kg dos veces a la semana) no mostró una clara ventaja ligada a una mayor afinidad y a la potencia *in vitro*. De hecho, a esta dosis, la actividad más alta del Mab Y0317 dió como resultado paradójicamente el grado más bajo de inhibición del crecimiento tumoral de entre los otros Mab ensayados.

Finalmente, se ensayó la capacidad de los anticuerpos anti VEGF-A para inducir la regresión de los tumores ya establecidos. Se obtuvieron células humanas HT29 (carcinoma colorrectal) y Calu-6 (carcinoma pulmonar) a partir de la "American Type Culture Collection". La línea celular de carcinoma colorrectal humano HM-7 procede de LS 174T (46). Las células tumorales se mantuvieron en cultivo en el medio DMEM/F12, suplementado con FBS al 10 %. Las células se dejaron crecer a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % hasta la confluencia, se recogieron y se resuspendieron en Matrigel™ estéril a 25 x 10<sup>6</sup> células por ml. Los xenoinjertos se establecieron en ratones hembras Beige Nude XID de 6 a 8 semanas de edad mediante inyección s.c. en el flanco dorsal de 5 x 10<sup>6</sup> células/ratón y se les permitió crecer. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de ~400 mm<sup>3</sup> (regresión) o 150-200 mm<sup>3</sup> (intervención), se seleccionó una cohorte aleatoriamente (n = 10) como controles de día 0. Los ratones restantes se dividieron en grupos de 10 ratones y se les administraron los anticuerpos i.p. a la misma dosis para cada grupo. Los tamaños y los pesos tumorales se midieron tal como se describe anteriormente (Gerber et al. Cancer Res. 60:6253-58 (2000)). Para este fin, se administraron bevacizumab, Hy0317, hB20-41 y Hg6-31 a los ratones en los que se habían implantado tumores Calu-6 (Fig. 2 E, F) o HT29 (Fig. 2 G, H) cuando el tumor alcanzó un tamaño medio de ~400 mm<sup>3</sup>. Todos los anticuerpos suprimieron el crecimiento tumoral de forma potente, indicando una eficacia similar en el ajuste de la regresión. Sin embargo, de manera similar que en las observaciones hechas a partir de los experimentos de intervención, había una tendencia hacia el incremento de la eficacia de los Mab B20-4.1 y G6-31.

#### **Ejemplo 4**

Este ejemplo demuestra el uso de ratones VEGF hum-X para ensayar la seguridad de la terapia dirigida con VEGF.

Se trató a los ratones VEGF hum-X-ki cuando alcanzaron los 3, 6 o 9 meses de edad durante periodos prolongados de tiempo. Los ratones VEGF hum-X-ki de 8 a 9 meses de edad se trataron dos veces a la semana, IP, con 10 mg/kg de anticuerpo durante 90 días. De manera alternativa, se les administraron 5 mg/kg, IP, una vez a la semana. Los pesos corporales se evaluaron semanalmente, se extrajo suero por medio de sangrado retro-orbital y se entregaron para los análisis farmacocinéticos y de química sanguínea. Se sacrificó a los ratones cuando los cambios en el peso corporal excedían el 20 % y/o la formación de ascitis fue prominente.

Se fijaron tejidos tumorales en formalina neutra tamponada al 10 % durante las 12-26 h anteriores a embeberlos en parafina. Se tiñeron secciones histológicas de 4-5 micrómetros de espesor con hematoxilina y eosina. El VEGF-A murino se detectó usando 0,5 micro-gramos/ml de anticuerpo policlonal de cabra de R&D Systems (AF-493-NA); los tejidos rehidratados embebidos en parafina se trataron con solución de recuperación de dianas (DAKO, S 1700) a 99 grados C durante 20 minutos, seguido de 20 minutos a temperatura ambiente. Se detectó el anticuerpo primario con complejo de anti-cabra de conejo conjugado con avidina, avidina-biotina (Vectastain® Elite ABC, Vector Labs) y diaminobencidina mejorada con metal (Pierce). El complemento C3 se detectó mediante inmunofluorescencia directa en secciones congeladas usando F(ab')<sub>2</sub> anti-complemento conjugado con FITC (Cappel Labs). Los anticuerpos monoclonales anti-VEGF se detectaron mediante inmunofluorescencia directa usando Fc de conejo anti-humano conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch). Las secciones embebidas en metacrilato de 1 micrómetro de espesor se tiñeron con azul de toluidina o tinción de plata de Jones para membrana basal. Las secciones ultrafinas se tiñeron con uranil acetato/citrato de plomo y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM12. Los anticuerpos se administraron a los ratones VEGF hum-X ki a dosis bajas (5 mg/kg, IP, una vez a la semana) o altas (10mg/kg, IP, dos veces a la semana) durante 12 semanas consecutivas. El tratamiento con Mab de mayor afinidad se asoció frecuentemente con la formación de ascitis, la cual era dependiente de la dosis. El efecto se observó pocas veces a dosis <5 mg/kg semanales pero era frecuente a dosis mayores. Por el contrario, la administración de los Mab A4.6.1 o mB20-4.1 de menor afinidad no dio como resultado la formación de ascitis. La química sérica y el análisis de orina en los días 84 -90 (A4.6.1, B20-4.1, G6-31) o cuando los animales estaban moribundos (Y0317) reveló ALT, AST y niveles de BUN, coherentes con daño hepático y daño renal.

En los análisis histológicos de todos los órganos principales no se identificaron cambios significativos en corazón, bazo, páncreas y pulmón en ninguno de los grupos de tratamiento. Sin embargo, hubo cambios sutiles en el hígado y cambios más significativos en riñón, ambos de los cuales eran más prominentes en ratones tratados con Mab anti VEGF de mayor afinidad durante un periodo prolongado. En animales tratados con anticuerpos anti VEGF, las muestras de hígado teñidas con H&E mostraron números incrementados de células mononucleares adheridas a las venas centrales, mientras que las venas portas tenían un aspecto normal. Las células adheridas fueron positivas para F4/80 y MAC-2, lo que es coherente con los macrófagos de células Kupffer; algunas contenían glóbulos rojos fagocitados. El incremento de la señal de la tinción de VEGF-A estaba presente en las células endoteliales sinusoidales. Por inmunofluorescencia directa, no se pudo observar anticuerpo anti VEGF-A detectable o depósitos de C3 del complemento en muestras congeladas procedentes de las mismas muestras de hígado.

Los hígados de los animales tratados durante intervalos extensos con anti VEGF mostraron glomeruloesclerosis, que generalmente era más severa en animales tratados con anticuerpos anti VEGF de alta afinidad. Los glomérulos en los animales más afectados mostraron esclerosis difusa severa global. La inmunotinción para el VEGF-A murino mostró diferencias marcadas entre los animales control y los animales tratados con anti VEGF: los glomérulos control mostraron una señal moderada en los cuerpos celulares de los podocitos, con una pequeña señal detectable en las asas capilares. Por el contrario, los glomérulos tratados con anti VEGF mostraron un incremento de la tinción mesangial y de las asas capilares, aproximadamente proporcional con la afinidad de los respectivos anticuerpos. Además, los glomérulos yuxtamedulares mostraron una tinción más intensa y extendida que los glomérulos periféricos corticales correspondientes del mismo animal. La inmunofluorescencia directa con el Fc anti-humano mostró un incremento de los depósitos de anti VEGF (difuso, patrón granular fino) en los glomérulos, que fue más prominente con anticuerpos de afinidad incrementada. De manera similar, la tinción con C3 del complemento se incrementó prominentemente en los animales tratados con anticuerpos anti VEGF de mayor afinidad. La inmunohistoquímica con MAC-2 no mostró una infiltración significativa de monocitos/macrófagos en los glomérulos de los animales tratados con anti VEGF. El azul de toluidina y la tinción de plata de las secciones de 1 micrómetro embebidas en metacrilato confirmaron las observaciones procedentes de las secciones en parafina y las congeladas, mostrando una celularidad mesangial incrementada, y una ampliación de la matriz mesangial y asas capilares con material que se tiñó de una manera diferente a la membrana basal nativa. El examen por microscopía electrónica mostró depósitos subendoteliales focales en las asas capilares, hinchazón endotelial, y aumento de la matriz mesangial y del número de células mesangiales. Por el contrario, los procesos de los pies de los podocitos estaban relativamente ausentes, aunque fue evidente una fusión focal de procesos de los pies en los glomérulos afectados más severamente. En conjunto, estas observaciones son más coherentes con la presencia de complejos VEGF-anti VEGF depositados en el glomérulo.

Listado de secuencias

<110> Genentech, Inc. Ferrara, Napoleone

<120> RATONES TRANGÉNCIOS QUE EXPRESAN VEGF



<130> P2448R1 WO  
 <150> US 60/871,736 <151> 2006-12-22

5 <160> 12

<210> 1  
 <211> 190  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 1

10

```

Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Thr Leu Ala Leu Leu
  1           5           10           15

Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Thr Thr
           20           25           30

Glu Gly Glu Gln Lys Ser His Glu Val Ile Lys Phe Met Asp Val
           35           40           45

Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys Arg Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile
           50           55           60

Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser
           65           70           75

Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Ala Gly Cys Cys Asn Asp Glu Ala
           80           85           90

Leu Glu Cys Val Pro Thr Ser Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
           95           100          105

Met Arg Ile Lys Pro His Gln Ser Gln His Ile Gly Glu Met Ser
           110          115          120

Phe Leu Gln His Ser Arg Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg
           125          130          135

Thr Lys Pro Glu Asn His Cys Glu Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys
           140          145          150

His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys
           155          160          165

Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu
           170          175          180

Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
           185          190
    
```

15 <210> 2  
 <211> 191  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 2

ES 2 497 496 T3

```

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

```

```

5 <210> 3
   <211> 6
   <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

10 <220>
   <223> la secuencia es sintetizada

15 <220>
   <221> CAAT_signal modified_base
   <222> 2
   <223> n en la posición 2 puede ser A, G, C o T

20 <400> 3
   cncaat      6

25 <210> 4
   <211> 6
   <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

   <220>
   <223> la secuencia es sintetizada

```

# ES 2 497 496 T3

<220>  
<221> poliA\_signal  
<222> completa  
<223> señal de poliadenilación  
5  
<400> 4  
aataaa 6  
  
<210> 5  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
10  
  
<220>  
<223> la secuencia es sintetizada  
15  
  
<400> 5  
agcgaagcta ctgccatccg attgagacc 29  
20  
  
<210> 6  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
25  
  
<220>  
<223> la secuencia es sintetizada  
30  
  
<400> 6  
tgatgcgctg tggaggctgc tgtaacgatg aaggcctg 38  
35  
  
<210> 7  
<211> 49  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
40  
  
<220>  
<223> la secuencia es sintetizada  
45  
  
<400> 7  
tgtaacgatg aaggcctgga gtgcgtgcgt gccacggaa gagagcaac 49  
50  
  
<210> 8  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
55  
  
<220>  
<223> la secuencia es sintetizada  
60  
  
<400> 8  
atcaaacctc accaaggcca gcacatagga gagatg 36  
65  
  
<210> 9  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
70  
  
<220>  
<223> la secuencia es sintetizada  
75  
  
<400> 9  
tgagcttct acagcacaac aaatgtgaat gcaggtg 37  
80  
  
<210> 10  
<211> 43  
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> la secuencia es sintetizada

5

<400> 10

tgacagaccaa agaaagacag agcacggcaa gaaaagtaag tgg 43

<210> 11

10

<211> 190

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> la secuencia es sintetizada

<400> 11

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

20

<210> 12

<211> 190

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> la secuencia es sintetizada

<400> 12

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

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un ratón transgénico que expresa VEGF hum-X, de acuerdo con SEC ID N°: 12, en donde el ratón es homocigoto para la disrupción funcional del alelo de VEGF endógeno mediante integración homóloga de ácido nucleico que codifica VEGF hum-X (SEC ID N°: 12), y por tanto no expresa VEGF endógeno.
2. El ratón transgénico de la reivindicación 1, el cual carece de RAG2 murino.
- 10 3. Una célula o un tejido derivados del ratón transgénico de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2.
4. Un método para identificar un compuesto como un posible agente para tratar una enfermedad mediada por VEGF, comprendiendo dicho método:
- 15 a) medir el nivel de VEGF en el ratón transgénico de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2;  
b) administrar dicho compuesto al ratón; y  
c) medir el nivel de VEGF en el ratón;
- en donde una alteración en el nivel de VEGF tras la administración del agente identifica el compuesto como un posible agente para tratar una enfermedad mediada por VEGF.
- 20 5. Un método para identificar un antagonista de VEGF como un posible agente para tratar un cáncer humano, comprendiendo dicho método:
- 25 a) administrar dicho agente al ratón transgénico de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde dicho ratón tiene un xenoinjerto de tumor de células cancerosas; y  
b) evaluar el crecimiento de dicho xenoinjerto;
- en donde una reducción en la tasa de crecimiento o en el tamaño de dicho xenoinjerto identifica al antagonista de VEGF como un posible agente para tratar un cáncer humano.
- 30 6. Un método para ensayar la seguridad de un antagonista de VEGF, comprendiendo dicho método:
- 35 a) administrar dicho antagonista de VEGF al ratón transgénico de las reivindicaciones 1 o 2; y  
b) evaluar al ratón para efectos adversos a corto o largo plazo.
7. El método de la reivindicación 5 o de la reivindicación 6, en donde dicho antagonista de VEGF es un anticuerpo anti VEGF o un fragmento de unión a antígeno del mismo, una molécula de receptor de VEGF o un derivado que se une específicamente a VEGF secuestrando de esta manera su unión a uno o más receptores de VEGF, o un anticuerpo anti receptor de VEGF.
- 40 8. El método de las reivindicaciones 5 o 6, en donde dicho antagonista de VEGF es un anticuerpo.
9. El uso de un ratón transgénico de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para estudiar las propiedades de seguridad de una terapia dirigida a VEGF.
- 45

Fig.1A

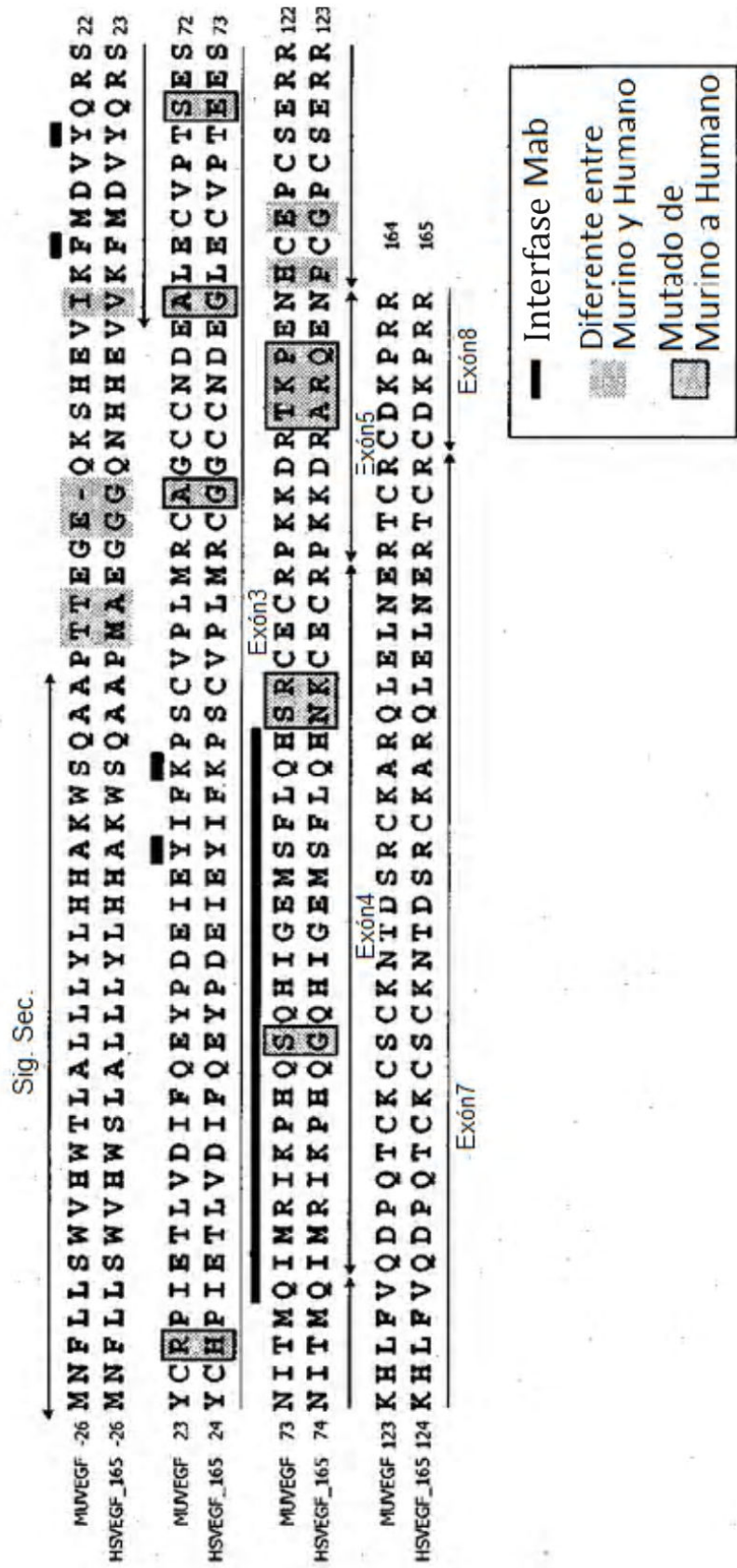


Fig.1B

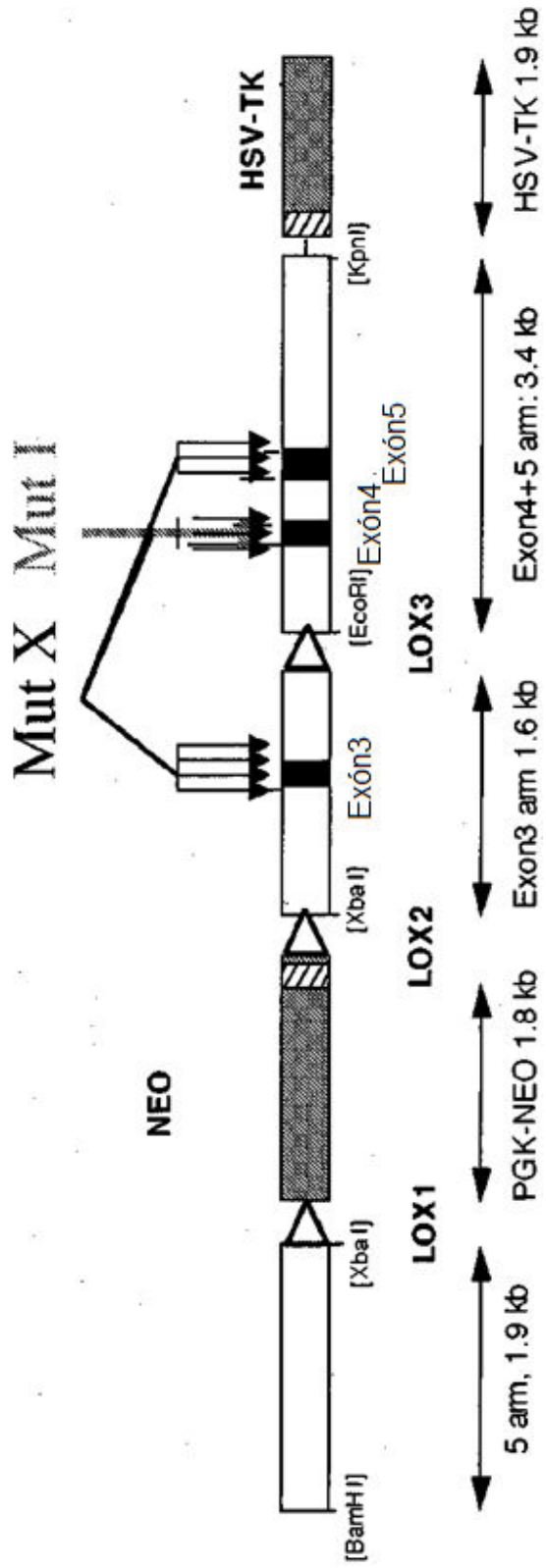




Fig.2A

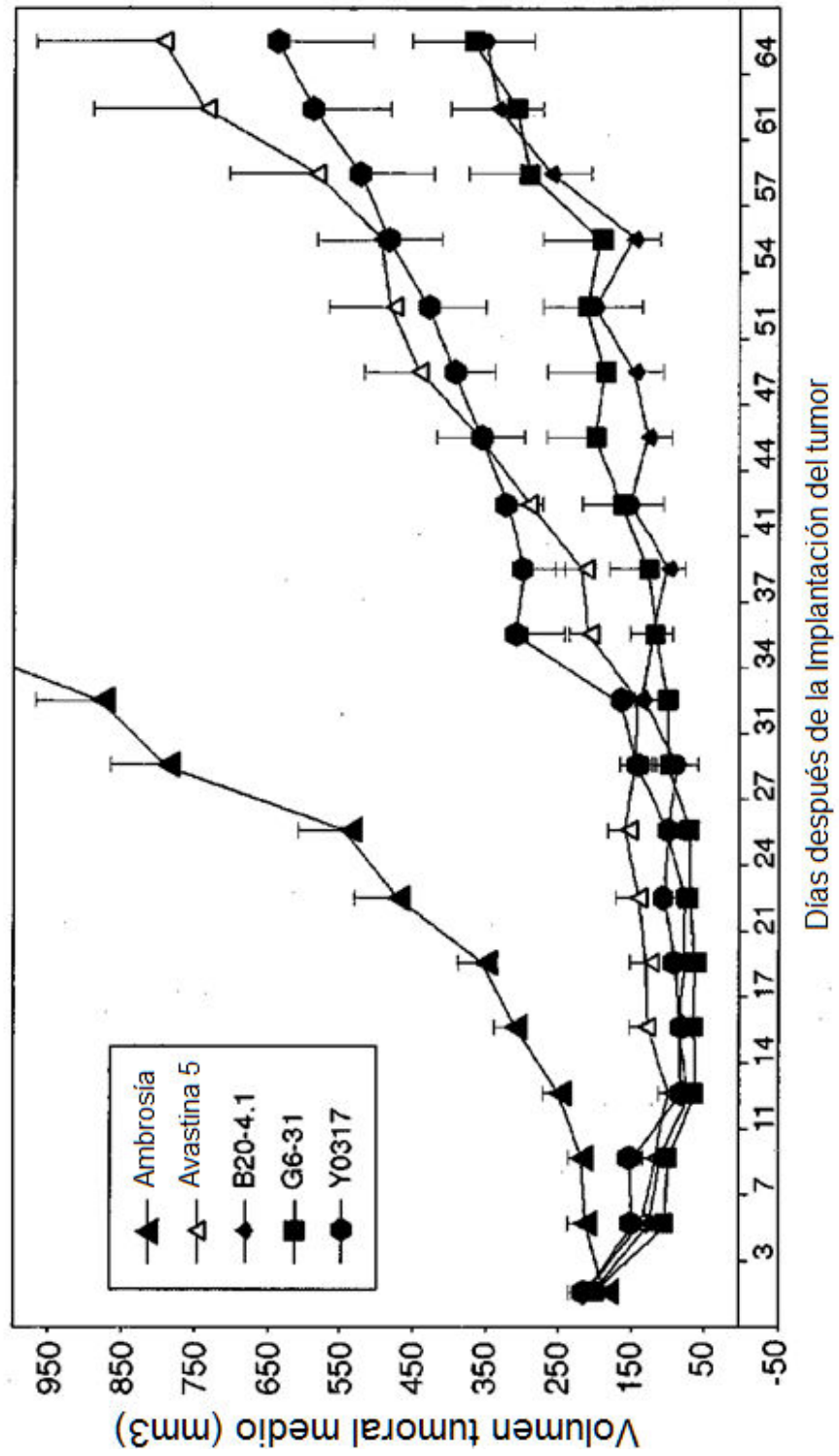
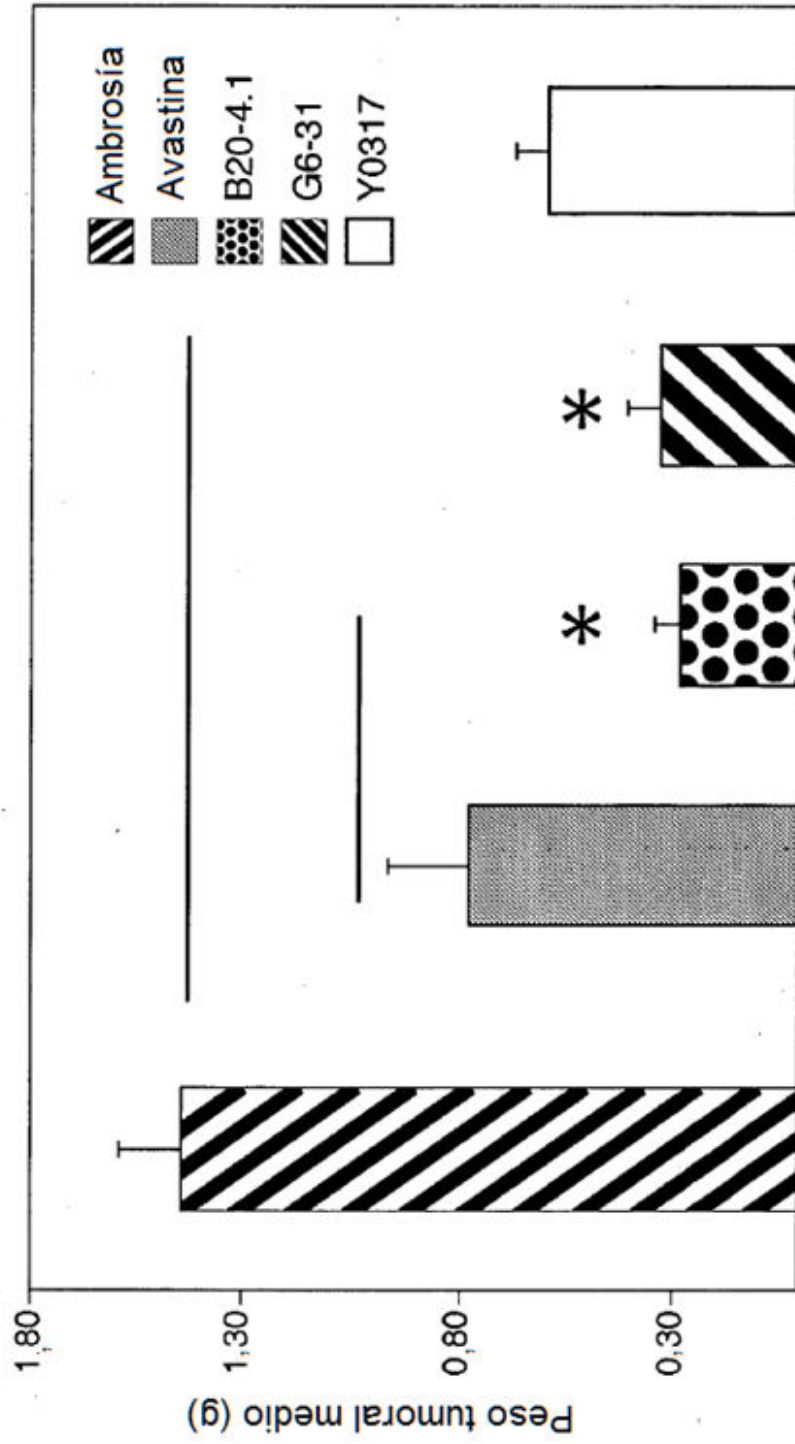


Fig. 2B



( Control: día 38 )  
( Ensayo: día 64 )

Fig. 2C

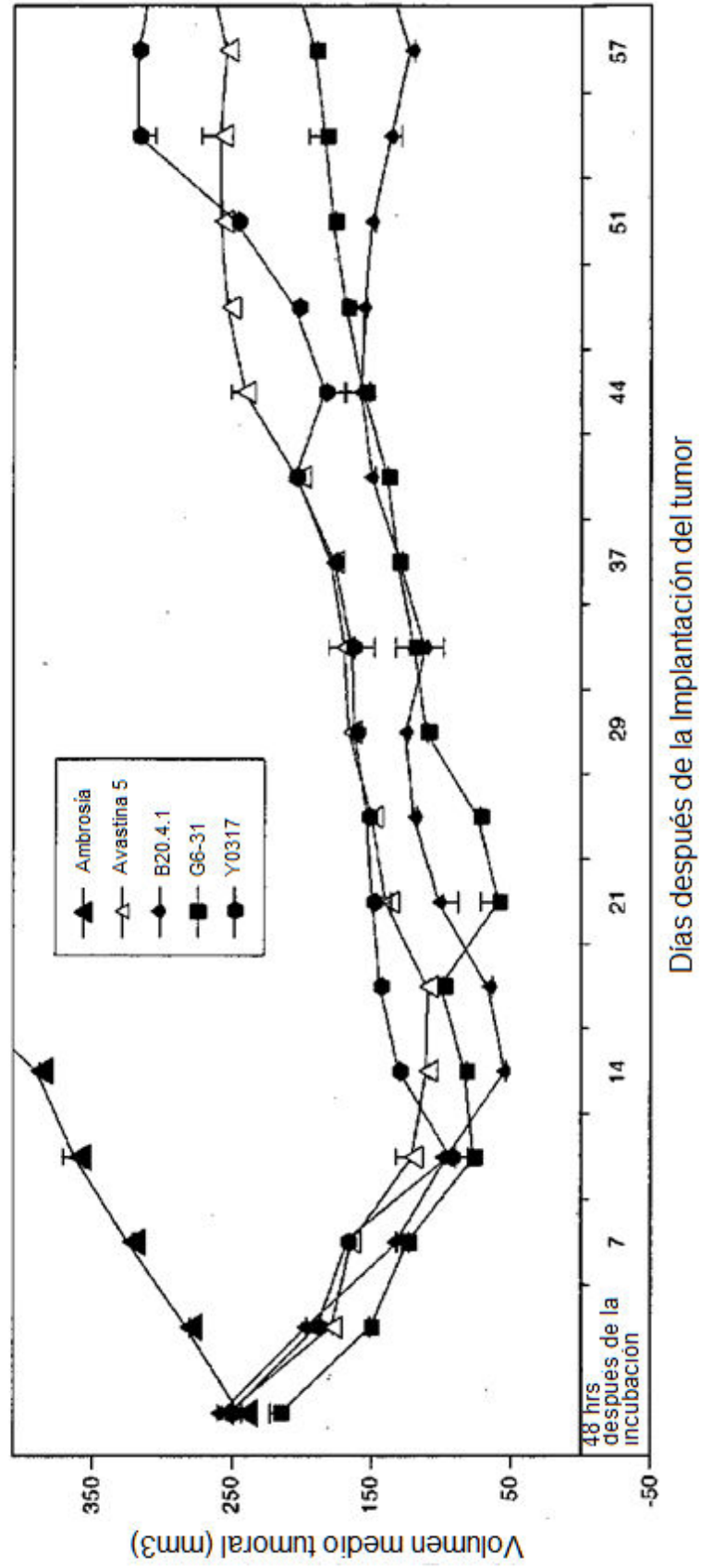
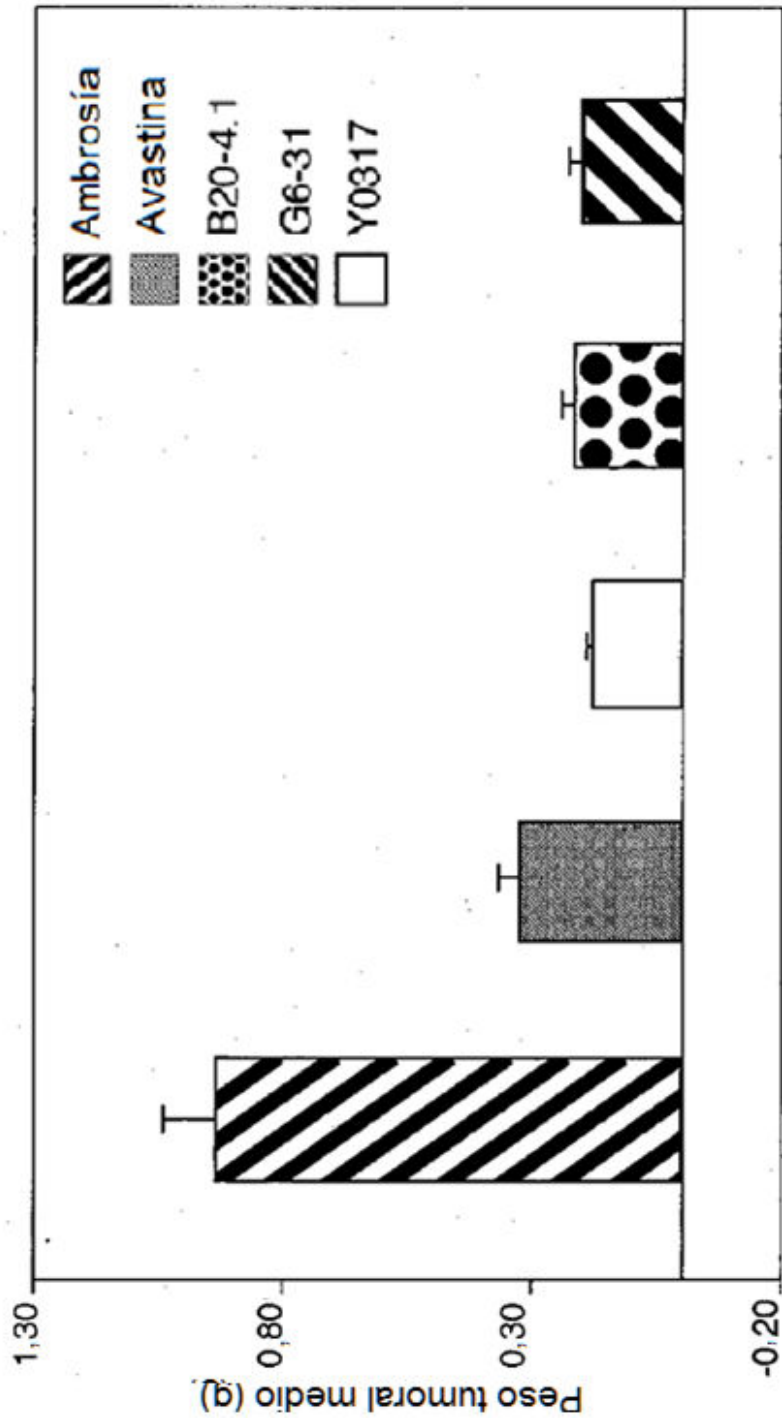


Fig. 2D



( Control: día 33 )  
( Ensayo: día 64 )

Fig. 2E

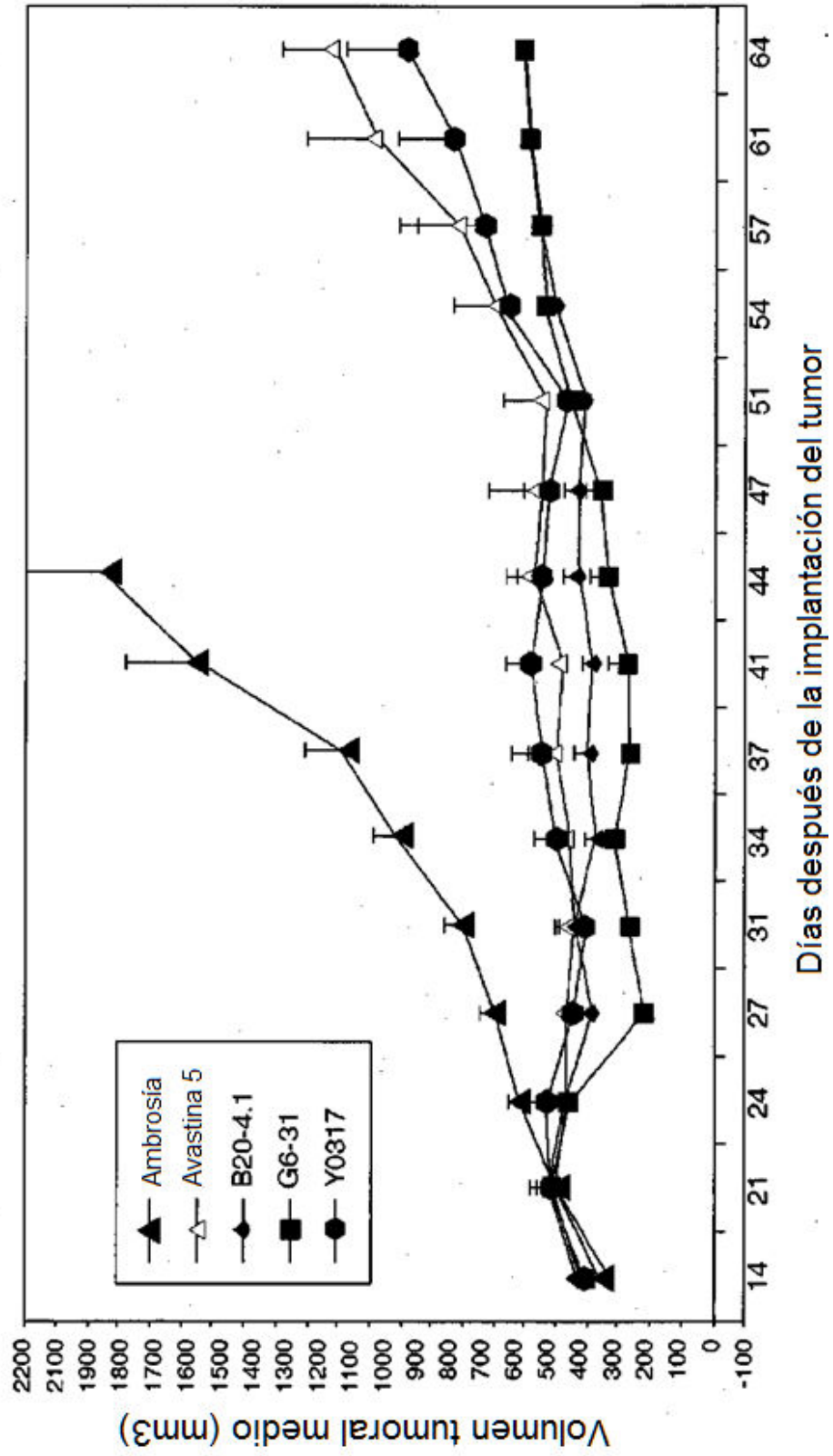
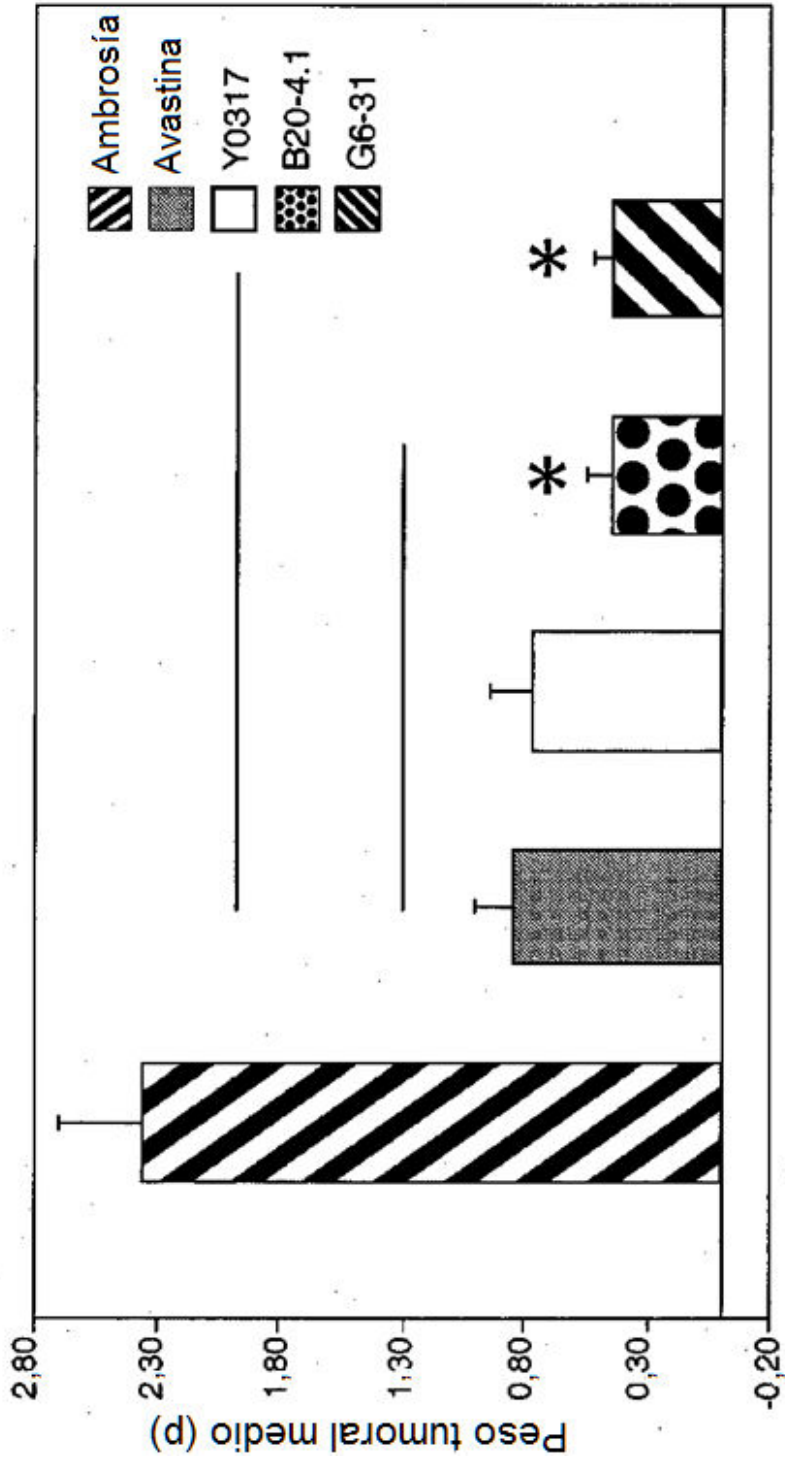


Fig. 2F



( Control: día 45 )  
( Ensayo: día 63 )

Fig. 2G

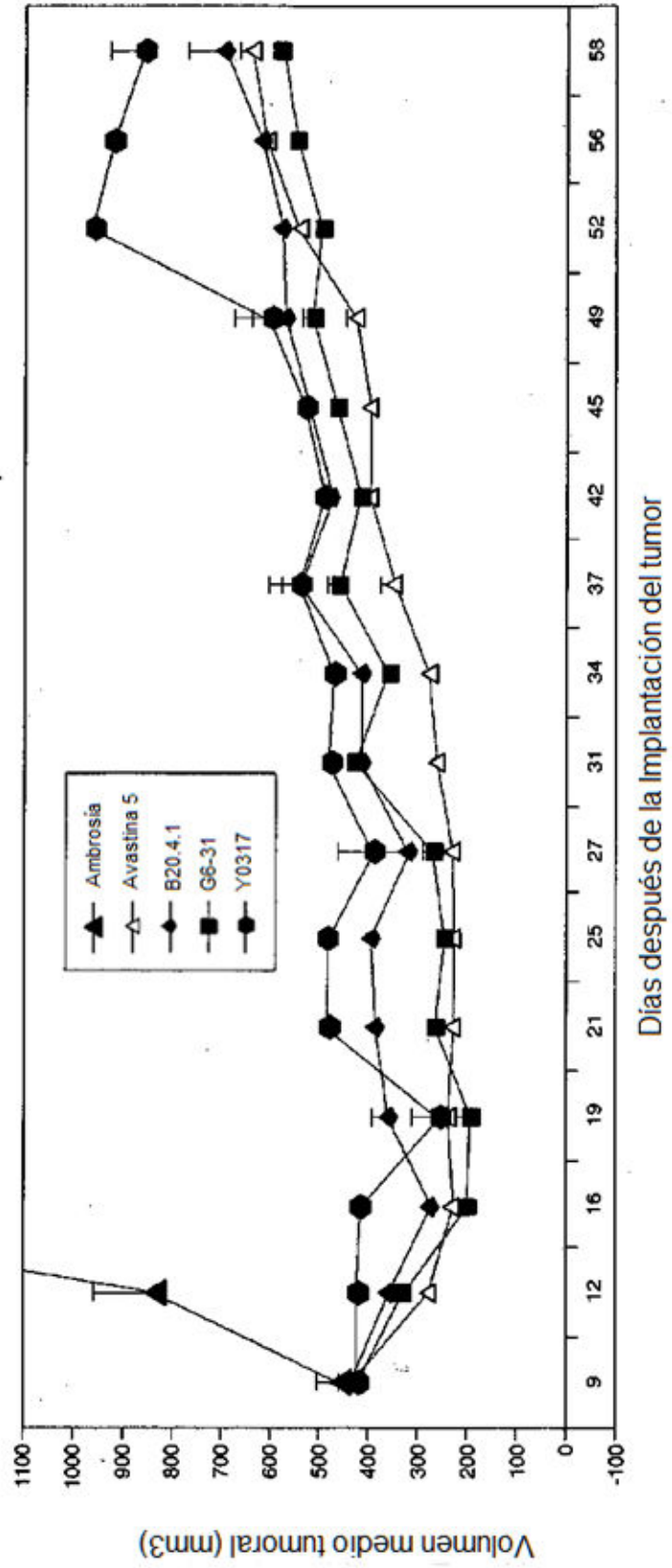
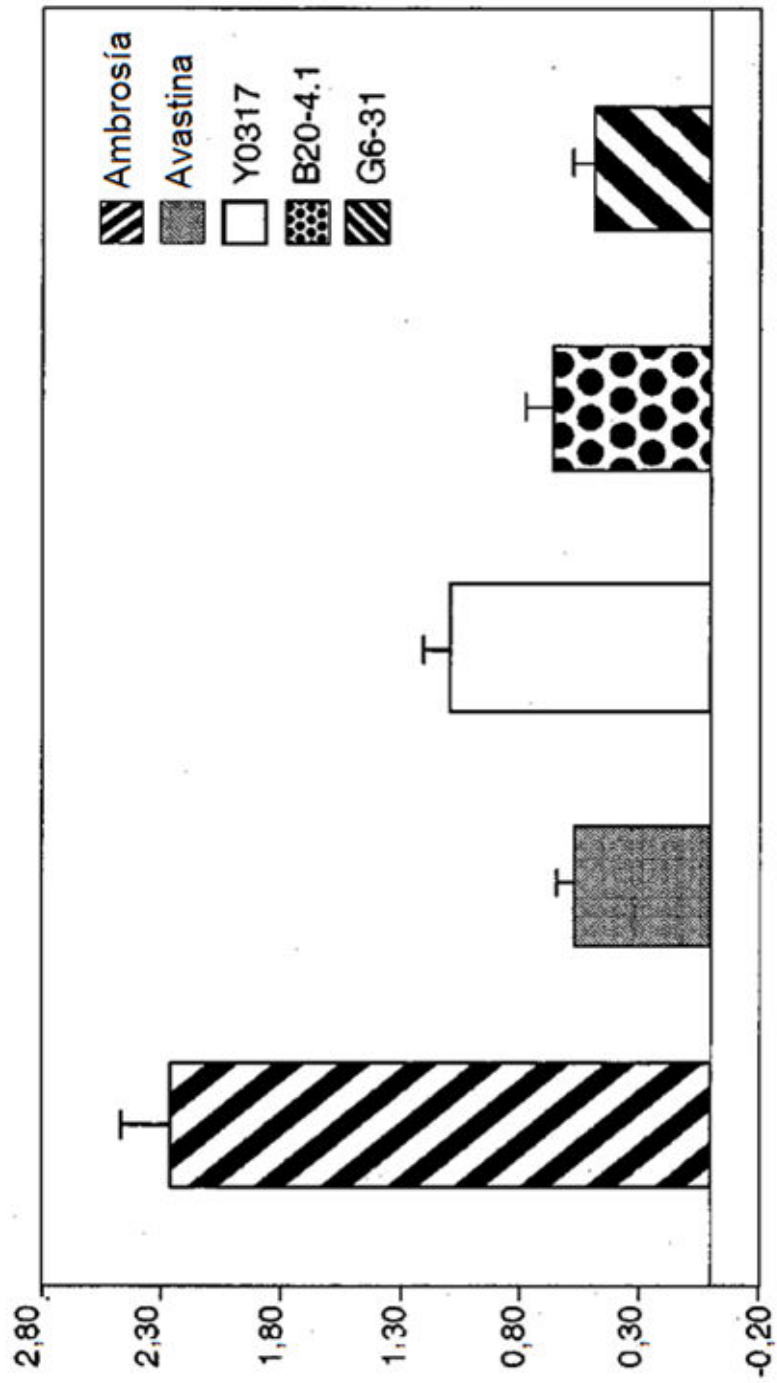


Fig. 2H



( Control: día 19 )  
( Ensayo: día 58 )