(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 312 223**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **99966032 .7**
(96) Fecha de presentación : **07.12.1999**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1137773**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2001**

(54) Título: **zvegf3 homólogo de factor de crecimiento.**

(30) Prioridad: **07.12.1998 US 207120**
06.07.1999 US 142576 P
21.10.1999 US 161653 P
12.11.1999 US 165255 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2009

(73) Titular/es: **ZymoGenetics, Inc.**
1201 Eastlake Avenue East
Seattle, Washington 98102, US

(72) Inventor/es: **Gao, Zeren;**
Hart, Charles, E.;
Piddington, Christopher, S.;
Sheppard, Paul, O.;
Shoemaker, Kimberly, E.;
Gilbertson, Debra, G. y
West, James, W.

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

zvegf3 homólogo de factor de crecimiento.

Antecedentes de la invención

En los animales pluricelulares, el crecimiento celular, la diferenciación y la migración son controlados por factores de crecimiento de polipéptidos. Estos factores de crecimiento desempeñan una función tanto en el desarrollo normal como en la patogénesis, incluyendo el desarrollo de tumores sólidos.

Los factores de crecimiento de polipéptidos influyen en los episodios celulares mediante la fijación a receptores de la superficie celular, muchos de los cuales son tirosina cinasas. La fijación se inicia en una cadena de episodios de señalización en la célula, que por último producen cambios fenotípicos, tales como la división celular, la producción de proteasa y la migración celular.

Los factores de crecimiento pueden clasificarse en familias basándose en similitudes estructurales. Una de dichas familias, la familia PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), está caracterizada porque presenta una estructura dimérica estabilizada por enlaces disulfuro. Esta familia incluye la PDGF, los factores de crecimiento de la placenta (PIGF) y los factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Las cadenas individuales de polipéptido de estas proteínas forman estructuras características de orden superior que tienen una configuración de lazada alrededor de un nudo de cistina, formado por el enlace disulfuro entre pares de restos de cisteína. Las interacciones hidrófobas entre los bucles contribuyen a la dimerización de los dos monómeros. Véase, Daopin *et al*., *Science* 257:369, 1992; Lapthorn *et al*., *Nature* 369:455, 1994. Los miembros de esta familia son activos como homodímeros y como heterodímeros. Véase, por ejemplo, Heldin *et al*., *EMBO J.* 7:1387-1393, 1988, Cao *et al*., *J. Biol. Chem.* 271:3154-3162, 1996. El motivo del nudo de cistina y el pliegue de la lazada son también característicos de los factores de crecimiento que transforman el factor beta de crecimiento (TGF-β) y factor de crecimiento de nervios (NGF) y las hormonas de glucoproteína. Aunque sus secuencias de aminoácidos son muy divergentes, todas estas proteínas contienen los seis restos de cisteína conservados del nudo de cistina.

Se han identificado cuatro factores de crecimiento endoteliales vasculares: VEGF, conocido también como factor de permeabilidad vascular (Dvorak *et al*., *Am. J. Pathol.* 146:1029-1039, 1995); VEGF-B (Olofsson *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2567-2581, 1996; Hayward *et al*., publicación WO 96/27007 de WIPO); VEGF-C (Joukov *et al*., *EMBO J.* 15:290-298, 1996); y VEGF-D (Oliviero, documento WO 97/12972; Achen *et al*., documento WO 98/07832). Cinco polipéptidos VEGF (de 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos) surgen del corte y empalme alternativo del ARNm de VEGF.

Los VEGF estimulan el desarrollo del sistema vascular mediante un proceso conocido como angiogénesis, en el que las células endoteliales vasculares se reintroducen en el ciclo celular, degradan la membrana de la base subyacente y migran para formar nuevos brotes capilares. Estas células se diferencian a continuación y se forman vasos maduros. Este proceso de crecimiento y diferenciación está regulado por un equilibrio de factores proangiógenos y antiangiógenos. La angiogénesis es básica para la formación normal y para la reparación del tejido, que se produce en el desarrollo del embrión y en la cicatrización de heridas. La angiogénesis es también un factor en el desarrollo de determinadas enfermedades, incluyendo tumores sólidos, artritis reumatoide, retinopatía diabética, degeneración macular y aterosclerosis.

Se han identificado numerosas proteínas de vertebrados e invertebrados que influyen en el desarrollo neural. Entre esas moléculas están los miembros de la familia de la neuropilina y la familia de semaforina/colapsina. Las excrecencias celulares neuronales, conocidas como procesos, se desarrollan fuera del cuerpo celular para formar conexiones sinápticas. Los procesos largos y finos que transportan información fuera del cuerpo de la célula se denominan axones y los procesos cortos, más gruesos que transportan información a y desde el cuerpo de la célula se denominan dendritas. Los axones y las dendritas se denominan en conjunto neuritas. Las neuritas se extienden mediante conos de crecimiento, las puntas de crecimiento de las neuritas, que son muy móviles y son por último responsables del aumento y la extensión de la red neuronal en el cuerpo.

Se han identificado tres receptores para VEGF: KDR/Flk-1 (Matthews *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9026-9030, 1991), Fit-1 (de Vries *et al*., *Science* 255:989-991, 1992) y neuropilina-1 (Soker *et al*., *Cell* 92:735-745, 1998). La neuropilina-1 es una glucoproteína de la superficie celular que se identificó inicialmente en los tejidos nerviosos del renacuajo Xenopus, a continuación en el pollo, el ratón y el hombre. La estructura primaria de la neuropilina-1 está muy conservada entre estas especies de vertebrados. Se ha demostrado que la neuropilina-1 es un receptor para varios miembros de la familia de la semaforina que incluye la semaforina III (Kolodkin *et al*., *Cell* 90:753-762, 1997), Sema E y Sema IV (Chen *et al*., *Neuron* 19:547-559, 1997). Se ha asociado una variedad de actividades a la fijación de la neuropilina-1 a sus ligandos. Por ejemplo, la fijación de semaforina III a la neuropilina-1 puede provocar colapso neuronal del cono de crecimiento y repulsión de las neuritas *in vitro* (Kitsukawa *et al*., *Neuron* 19:995-1005, 1997).

En los ratones, la neuropilina-1 se expresa en el sistema cardiovascular, en el sistema nervioso y en los miembros en etapas de desarrollo específicas. Los ratones híbridos que sobreexpresan a neuropilina-1 se descubrió que eran embriónicos letales (Kitsukawa *et al*., *Development* 121:4309-4318, 1995). Los embriones híbridos presentaban va-

rias anomalías morfológicas incluyendo capilares y vasos sanguíneos en exceso, dilatación de los vasos sanguíneos, corazones malformados, germinación ectópica y desfasciculación de las fibras nerviosas y dedos de más. Todas estas anomalías se produjeron en los órganos en los que se expresa la neuropilina-1 en el desarrollo normal. Los ratones que carecen del gen neuropilina-1 presentan anomalías cardiovasculares graves, incluyendo la anomalía de la formación de la red vascular en los sistemas nerviosos central y periférico (Takashima *et al*., American Heart Association 1998 Meeting, resumen nº 3178).

La neuropilina-1 ha sido identificada como un receptor de la superficie celular para VEGF (Soker *et al*., *ibid.*) y presenta actividad de fijación selectiva para $VEGF_{165}$ sobre $VEGF_{121}$. Se ha demostrado que se expresa en las células endoteliales vasculares y en las células tumorales *in vitro*. Cuando la neuropilina-1 se expresa conjuntamente en células con KDR, la neuropilina-1 mejora la fijación de $VEGF_{165}$ para la quimiotaxia mediada por KDR y $VEGF_{165}$. Por el contrario, la inhibición de la fijación de $VEGF_{165}$ a la neuropilina-1 inhibe su fijación a KDR y su actividad mitógena para las células endoteliales (Soker *et al*., *ibid.*). La neuropilina-1 es también un receptor para PIGF-2 (Migdal *et al*., *J. Biol. Chem.* 273: 22272-22278, 1998). Un segundo receptor de semaforina, la neuropilina-2, presenta homología con la neuropilina-1 pero se diferencia en la especificidad de flujo (Chen *et al*., *Neuron* 19: 547-559, 1997).

Las semaforinas son una gran familia de moléculas que comparten la definición del dominio de semaforina de aproximadamente 500 aminoácidos. Esta familia puede subdividirse en múltiples subfamilias que contienen proteínas tanto segregadas como unidas a la membrana. Los miembros selectos de estas subfamilias, clase III (SemD) y clase IV (SemD), forman homodímeros ligados por puentes disulfuro. En el caso de SemD, existe un tratamiento proteolítico adicional que crea una isoforma de 65 kDa que carece de la secuencia en el terminal carboxilo de 33 kDa. Se cree que la dimerización es importante para la actividad funcional (Klostermann *et al*., *J. Biol. Chem.* 273:7326-7331, 1998). La colapsina-1, el primer miembro de los vertebrados identificado de la familia de la semaforina de las proteínas con conducción por axón, se ha demostrado también que forman dímeros covalentes, con dimerización necesaria para la actividad de colapso (Koppel *et al*., *J. Biol. Chem.* 273: 15708-15713, 1998).

La semaforina III se ha asociado *in vitro* a la regulación del colapso del clon de crecimiento y a la quimiorrepulsión de las neuritas. *In vivo* se ha demostrado también que se requiere para una inervación aferente sensible correcta y otros aspectos del desarrollo, incluyendo los defectos del esqueleto y cardiacos (Fehar *et al*., *Nature* 383:525-528, 1996). Otros miembros de la familia de la semaforina se ha demostrado que están asociados a otras formas de biología. El gen de la semaforina E humana se expresa en las células reumatoides sinoviales y se cree que desempeña una función inmunosupresora por inhibición de las citocinas (Mangasser-Stephan *et al*., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 234:153-156, 1997). CD100, una semaforina de leucocitos, estimula la agregación y diferenciación de los linfocitos B (Hall *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11780-11785, 1996). Se ha demostrado también que CD100 se expresa en muchos linfomas de linfocitos T y puede ser un marcador de los neoplasmas de linfocitos T malignos (Dorfman *et al*., *Am. J. Pathol.* 153:255-262, 1998). Se han identificado también homólogos de la semaforina en el adenovirus (Lang, *Genomics* 51:340-350, 1998) y en virus de la viruela (Corneau, *et al*. *Immunity* 8:473-482, 1998). La transcripción del gen de semaforina de ratón, M-semaH, se correlaciona con la capacidad metastásica de las estirpes celulares del tumor de ratón (Christensen *et al*., *Cancer Res.* 58:1238-1244, 1998).

La función de los factores de crecimiento, de otras moléculas reguladoras y de sus receptores en los procesos de control celular les hace probablemente candidatos y dianas para la intervención terapéutica. El factor de crecimiento derivado de plaquetas, por ejemplo, se ha dado a conocer para el tratamiento de la periodontopatía (patente U.S. nº 5.124.316), de las úlceras gastrointestinales (patente U.S. nº 5.234.908) y de las úlceras dérmicas (Robson *et al*., *Lancet* 339:23-25, 1992; Steed *et al*., *J. Vasc. Surg.* 21:71-81, 1995). Se ha demostrado que la inhibición de la actividad del receptor de PDGF para reducir la hiperplasia de la íntima en arterias lesionadas de mandril (Giese *et al*., *Restenosis Summit VIII*, Poster Session nº 23, 1996; patente U.S. nº 5.620.687). Se ha demostrado que los factores de crecimiento vasculares endoteliales (VEGF) activan el crecimiento de los vasos sanguíneos en miembros isquémicos (Isner *et al*., *The Lancet* 348:370-374, 1996) y se han propuesto para su utilización como agentes cicatrizadores de heridas, para el tratamiento de la periodontopatía, para activar la endotelialización en la cirugía vascular por injerto y para estimular la circulación secundaria después del infarto de miocardio (Publicación de WIPO nº WO 95/24473; patente U.S. nº 5.219.739). Los VEGF son también útiles para estimular el crecimiento de las células endoteliales vasculares en cultivo. Un receptor de VEGF soluble (fit-1 soluble) se ha descubierto que bloquea la fijación de VEGF a los receptores de la superficie celular e inhibe el crecimiento del tejido vascular *in vitro* (*Biotechnology News* 16(17):5-6, 1996).

En vista de la utilidad clínica probada de las hormonas, hay necesidad en la técnica de dichas moléculas adicionales para su utilización como agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico y herramientas y reactivos de investigación. Estas y otras necesidades se estudian en la presente invención.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un polipéptido aislado de por lo menos 15 restos de aminoácidos que comprenden una parte que lleva el epítopo de una proteína de al SEC. ID. nº: 2. En determinadas formas de realización, el polipéptido comprende un segmento que es por lo menos 90% idéntico a los restos 46-163 de la SEC. ID. nº: 2 o a los restos 235-345 de la SEC. ID. nº: 2. En otras formas de realización, el polipéptido se selecciona de entre el grupo

constituido por los restos 15-163 de la SEC. ID. nº: 2, los restos 46-163 de la SEC. ID. nº: 2, los restos 15-170 de la SEC. ID. nº: 2, los restos 46-170 de la SEC. ID. nº: 2, los restos 15-234 de la SEC. ID. nº: 2, los restos 46-234 de la SEC. ID. nº: 2, los restos 15-229 de la SEC. ID. nº: 2, los restos 15-230 de la SEC. ID. nº: 2, los restos 15-345 de la SEC. ID. nº: 2, los restos 46-345 de la SEC. ID. nº: 2, los restos 235-345 de la SEC. ID. nº: 2 y los restos 226-345 de la SEC. ID. nº: 2.

La invención proporciona también un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula $R1_x$-$R2_y$-$R3_z$, en la que R1 comprende un polipéptido de 100 a 120 restos de longitud que es por lo menos 90% idéntico a los restos 46-163 de la SEC. ID. nº: 2 y comprende un motivo de la secuencia C[KR]Y[DNE][WYF] X{11,15}G[KR][WYF]C (SEC. ID. nº: 4) correspondiente a los restos 104-124 de la SEC. ID. nº: 2; R2 es un polipéptido de por lo menos 90% idéntico a los restos 164-234 de la SEC. ID. nº: 2; R3 es un polipéptido por lo menos 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos a los restos 235-345 de la SEC. ID. nº: 2 y comprende restos de cisteína en las posiciones correspondientes a los restos 250, 280, 284, 296, 335 y 337 de la SEC. ID. nº: 2, un resto de glicina en la posición correspondiente al resto 282 de la SEC. ID. nº: 2 y un motivo de secuencia CX{18,33}CXGXCX{6,33}CX{20,40}CXC (SEC. ID. nº: 3) correspondiente a los restos 250-337 de la SEC. ID. nº: 2; y cada uno de x, y y z es individualmente 0 ó 1, sujetos a las limitaciones de por lo menos uno de x y z es 1, y, si x y z son cada uno 1, entonces y es 1. De este modo se proporcionan polipéptidos aislados de la fórmula anterior en la que (a) x=1, (b) z=1 y (c) x=1 y z=1. En determinadas formas de realización, x=1 y R1 es por lo menos 90% idéntico a los restos 18-163 de la SEC. ID. nº: 2. En las formas de realización relacionadas X=1 y R1 comprende los restos 46-163 de la SEC ID nº 2. En otras formas de realización, z=1 y R3 comprende los restos 235-345 de la SEC. ID. nº: 2. En formas de realización adicionales, x=1, z=1 y el polipéptido comprende los restos 46-229 de la SEC. ID. nº: 2, los restos 164 a 345 de la SEC. ID. nº: 2 o los restos 46-345 de la SEC. ID. nº: 2. El polipéptido aislado puede comprender además restos de cisteína en las posiciones correspondientes a los restos 286, 287, 291 y 294 de la SEC. ID. nº: 2. En otras formas de realización, el polipéptido aislado comprende además una etiqueta de afinidad. En una forma de realización relacionada, el polipéptido aislado comprende un dominio constante de inmunoglobulina.

La presente invención proporciona también una proteína aislada que comprende un primer polipéptido unido funcionalmente a un segundo polipéptido, en el que el primer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula $R1_x$-$R2_y$-$R3_z$ como se dio a conocer anteriormente. La proteína modula la proliferación la diferenciación, el metabolismo o la migración celulares. En una forma de realización, la proteína es un heterodímero. En las formas de realización relacionadas, el segundo polipéptido se selecciona de entre el grupo constituido por VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, zvegf4, PlGF, PDGF-A y PDGF-B. En otra forma de realización, la proteína es un homodímero.

Se proporciona también una proteína aislada producida por un procedimiento que comprende las etapas siguientes: (a) cultivar una célula hospedadora que contiene un vector de expresión que comprende los elementos siguientes funcionalmente unidos: un activador de transcripción; un segmento de ADN que codifica un polipéptido seleccionado de entre el grupo constituido por (i) los restos 46-345 de la SEC. ID. nº: 2, (ii) los restos 46-234 de la SEC. ID. nº: 2, (iii) los restos 164-345 de la SEC. ID. nº: 2 y (iv) los restos 235-345 de la SEC. ID. nº: 2; y un terminador de la transcripción, en condiciones en las que se expresa el segmento de ADN; y (b) recuperar de la célula el producto proteico de expresión del montaje de ADN.

En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido aislado de hasta aproximadamente 4 kb de longitud, en el que dicho polinucleótido codifica un polipéptido como se dio a conocer anteriormente. En una forma de realización de la invención, el polinucleótido es ADN.

En un aspecto más de la invención se proporciona un vector de expresión que comprende los siguientes elementos funcionalmente unidos: (a) un activador de transcripción; (b) un polinucleótido de ADN como se dio a conocer anteriormente; y (c) un terminador de la transcripción. El vector puede comprender además una secuencia señal secretora funcionalmente unida al polinucleótido del ADN.

También la invención proporciona una célula cultivada en la que se ha introducido un vector de expresión como se dio a conocer anteriormente, en la que la célula expresa al polipéptido codificado por el segmento de ADN. La célula cultivada puede utilizarse en un procedimiento de producción de un polipéptido, el procedimiento que comprende cultivar la célula y recuperar el polipéptido expresado.

Las proteínas proporcionadas en la presente memoria pueden combinarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable para proporcionar una composición farmacéutica.

La invención también proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un epítopo de un polipéptido como se dio a conocer anteriormente. Los anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, anticuerpos monoclonales y anticuerpos monocatenarios y pueden estar unidos a una molécula indicadora.

La invención proporciona además un procedimiento para detectar una anomalía genética en un paciente, que comprende las etapas siguientes: (a) extraer una muestra genética de un paciente, (b) incubar la muestra genética con un polinucleótido que comprende por lo menos 14 nucleótidos contiguos de SEC. ID. nº: 1 o el complemento de la SEC. ID. nº: 1, en condiciones en las que dicho polinucleótido se hibridará con la secuencia polinucleotídica complemen-

taria, para producir un primer producto de reacción, y (c) comparar el primer producto de reacción con un producto de reacción de referencia, en el que una diferencia entre el primer producto de reacción y el producto de reacción de referencia es indicadora de una anomalía genética en el paciente.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de estimulación del crecimiento de fibroblastos o de las células del músculo liso que comprende aplicar a las células una cantidad eficaz de una proteína como se dio a conocer anteriormente.

En otro aspecto la invención proporciona procedimientos para modular el crecimiento celular u otros procesos celulares. En una forma de realización se proporciona un procedimiento de estimulación del crecimiento de fibroblastos o de las células del músculo liso que comprende aplicar a las células una cantidad eficaz de una proteína como se dio a conocer anteriormente. En otra forma de realización se proporciona un procedimiento de activación de un receptor alfa de PDGF de la superficie celular, que comprende exponer una célula que comprende un receptor alfa de PDGF de la superficie celular a un polipéptido o proteína como se dio a conocer anteriormente, con lo cual el polipéptido o la proteína se une al receptor y le activa. En una forma de realización adicional se proporciona un procedimiento de inhibición del proceso celular mediado por el receptor alfa de PDGF, que comprende exponer a una célula que comprende un receptor alfa de PDGF de la superficie celular a un compuesto que inhibe la fijación de un polipéptido o proteína como se dio a conocer anteriormente para el receptor.

En otro procedimiento de la invención se proporciona un procedimiento de inhibición de la actividad de zvegf3 en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de un antagonista de zvegf3. En determinadas formas de realización el antagonista es un anticuerpo, un receptor, un fragmento del receptor de fijación del ligando o un receptor de la proteína de fusión IgG-Fc.

En otro aspecto de la invención se proporciona un polinucleótido antisentido, aislado que es el complemento de un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de fórmula $R1_x$-$R2_y$-$R3_z$, en la que R1 comprende un polipéptido de 100 a 120 restos de longitud que es por lo menos 90% idéntico a los restos 46-163 de la SEC. ID. nº: 2 y comprende un motivo de la secuencia C[KR]Y[DNE][WYF]X{11,15}G[KR][WYF]C (SEC. ID. nº: 4) correspondiente a los restos 100 a 124 de la SEC. ID. nº: 2; R2 es un polipéptido por lo menos 90% idéntico a los restos 164-234 de la SEC. ID. nº: 2; R3 es un polipéptido por lo menos 90% idéntico a los restos 235-345 de la SEC. ID. nº: 2 y comprende restos de cisteína en las posiciones correspondientes a los restos 250, 280, 284, 296, 335 y 337 de la SEC. ID. nº: 2, un resto de glicina en una posición correspondiente al resto 282 de la SEC. ID. nº: 2 y un motivo de la secuencia CX{18,33}CXGXCX{6,33}CX{20,40}CXC (SEC. ID. nº: 3) correspondiente a los restos 250 a 337 de la SEC. ID. nº: 2; y cada x, y y z es individualmente 0 ó 1, sometido a las limitaciones de que por lo menos uno de entre x y z es 1, y, si x y z son cada uno 1, entonces y es 1. En una forma de realización el polinucleótido antisentido comprende además las secuencias activadora y terminadora de la transcripción funcionalmente unidas. El polinucleótido antisentido puede utilizarse en un procedimiento de inhibición de la producción de zvegf3 en una célula que comprende administrar a la célula el polinucleótido antisentido.

Estos y otros aspectos de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente de la invención y a los dibujos adjuntos. En los dibujos:

La Fig. 1 es un perfil de hidrofilia de Hopp/Woods de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. nº: 2. El perfil se basa en una ventana de seis restos deslizable. Los restos G, S y T enterrados y los restos H, Y y W expuestos se ignoraron. Estos restos se indican en la figura mediante letras en la casilla inferior.

La Fig. 2 es una ilustración del vector pHB12-8 para su utilización en los ADNc que se expresan en animales transgénicos.

La Fig. 3 es una ilustración del vector pZMP6/zvegf3.

La Fig. 4 es una ilustración del vector pZMP11/zv3GF-otPA.

La Fig. 5 presenta los resultados de un ensayo de fijación del receptor para zvegf3.

La Fig. 6 es una alineación de las secuencias de aminoácidos humana (SEC. ID. nº: 2) y de ratón (SEC. ID. nº: 43).

En la presente memoria la expresión “etiqueta de afinidad” se utiliza para indicar un segmento de polipéptido que puede unirse a un segundo polipéptido para proporcionar purificación o detección del segundo polipéptido o proporcionar puntos para acoplamiento del segundo polipéptido a un sustrato. Principalmente, cualquier péptido o proteína para el que está disponible un anticuerpo u otro agente de fijación específico puede utilizarse como una etiqueta de afinidad. Las etiquetas de afinidad incluyen una zona de polihistidina, proteína A (Nilsson *et al*., *EMBO J.* 4:1075, 1985; Nilsson *et al*., *Methods Enzymol.* 198:3, 1991), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, *Gene* 67:31, 1988), proteína de fijación a la maltosa (Kellerman y Ferenci, *Methods Enzymol.* 90:459-463, 1982; Guan *et al*., *Gene* 67:21-30, 1987), etiqueta de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7952-4, 1985; véase la SEC. ID. nº: 5), sustancia P, péptido Flag™ (Hopp *et al*., *Biotechnology* 6:1204-10, 1988), péptido de fijación a la estreptavidina, tiorredoxina, ubiquitina, péptido de fijación a la celulosa, T7 polimerasa u otro epítopo antigénico o dominio de fijación. Ver, en general, Ford *et al*., *Protein Expression and Purification* 2: 95-107, 1991.

Las etiquetas de afinidad que codifican los ADN y otros reactivos están disponibles en los proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; New England Biolabs, Beverly, MA; y Eastman Kodak, New Haven, CT).

La expresión "variante alélica" se utiliza en la presente memoria para indicar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica aparece de manera natural por mutación, y puede producir polimorfismo fenotípico en poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser imperceptibles (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen alterada la secuencia de aminoácidos. La expresión variante alélica se utiliza también en la presente invención para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

En la presente invención las expresiones "amino-terminal" y "carboxilo-terminal" se utilizan para indicar posiciones en los polipéptidos. Cuando lo permita el contexto, estas expresiones se utilizan con relación a una determinada secuencia o parte de un polipéptido para indicar la proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una determinada secuencia carboxi-terminal colocada a una secuencia de referencia en un polipéptido se localiza próxima al terminal carboxilo de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el terminal carboxilo del polipéptido completo.

Una "zona similar a la cadena beta" es una zona de una proteína caracterizada por determinadas combinaciones de los ángulos diédricos phi (φ) y psi (ψ) del eje central polipeptídico. Las zonas en las que φ es inferior a -60ºC y ψ es superior a 90ºC son similares a la cadena beta. Los expertos en la materia apreciarán que los límites de una cadena β son algo imprecisos y pueden variar con los criterios utilizados para definirlos. Véase, por ejemplo, Richardson y Richardson en Fasman, ed., Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation, Plenum Press, New York, 1989; y Lesk, *Protein Architecture: A Practical Approach*, Oxford University Press, Nueva York, 1991.

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

"Correspondiente a", cuando se utiliza con relación a una secuencia nucleotídica o de aminoácidos, indica la posición en una segunda secuencia que se alinea con la posición de referencia cuando las dos secuencias se alinean óptimamente.

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

La expresión "vector de expresión" se utiliza para indicar una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés funcionalmente unido a segmentos adicionales que proporcionan su transcripción. Dichos segmentos adicionales incluyen las secuencias activadora y terminadora, y pueden también incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación, etc. Los vectores de expresión derivan generalmente del ADN plásmico o vírico o pueden contener elementos de ambos.

El término "aislado", cuando se aplica a un polinucleótido, indica que el polinucleótido ha sido extraído de su medio natural genético y de este modo está libre de otras secuencias de codificación extrañas o innecesarias, y está en una forma adecuada para su utilización en los sistemas de producción de proteínas modificados genéticamente. Dichas moléculas aisladas son las que se separan de su medio natural e incluyen los clones de ADNc y genómicos. Las moléculas de ADN aisladas de la presente invención están exentas de otros genes con los que se asocian de manera ordinaria, pero pueden incluir zonas no traducidas 5' y 3' naturales tales como activadores y terminadores. La identificación de zonas asociadas serán obvias para cualquier experto en la materia (véase por ejemplo, Dynan y Tijan, *Nature* 316:774-78, 1985).

Un polipéptido o proteína "aislado" es un polipéptido o proteína que se encuentra en un estado distinto de su entorno natural, tal como aparte de la sangre y del tejido animal. En una forma, el polipéptido o proteína aislado está sustancialmente exento de otros polipéptidos o proteínas, particularmente de otros polipéptidos o proteínas de origen animal. Los polipéptidos y proteínas pueden proporcionarse en forma muy purificada, es decir más del 95% de pureza o más del 99% de pureza. Cuando se utiliza en este contexto, el término "aislado" no excluye la presencia del mismo polipéptido o proteína en formas físicas alternativas, tales como dímeros o formas alternativamente glucosiladas o derivadas.

Un "motivo" es una serie de posiciones de aminoácidos en una secuencia proteica para la cual se requieren restos de aminoácidos. Un motivo define la serie de posibles residuos en cada dicha posición.

"Funcionalmente unido" significa que dos o más entidades se unen de modo que funcionan en común para sus finalidades deseadas. Cuando se refiere a los segmentos de ADN, la frase indica, por ejemplo, que las secuencias de

codificación están unidas en el marco de lectura correcto y la transcripción se inicia en el activador y procede mediante el/los segmento(s) de codificación para el terminador. Cuando se refiere a polipéptidos, "funcionalmente unidas" incluyen secuencias unidas tanto por enlace covalente (por ejemplo, por enlace disulfuro) como no covalente (por ejemplo, por enlace de hidrógeno, interacciones hidrófobas o interacciones de puente salino), en las que se conservan la(s) función o funciones deseadas de las secuencias.

El término "ortólogo" indica un polipéptido o proteína obtenido de una especie que es la contrapartida funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencia entre ortólogos son el resultado de la aplicación.

Un "proceso celular mediado por el receptor PDGF alfa" es un proceso celular que se produce en respuesta a la activación de un receptor PDGF alfa. Dichos procesos incluyen, sin limitación, la división celular, la quimiotaxia, la diferenciación celular y la producción o liberación de macromoléculas.

Un "polinucleótido", es un polímero mono o bicatenario de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas leídas del extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen el ARN y el ADN, y pueden aislarse de fuentes naturales, sintetizarse *in vitro* o prepararse a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. Los tamaños de los polinucleótidos se expresan como pares de bases (en abreviatura "bp"), nucleótidos ("nt") o kilobases ("kb"). Cuando lo permita el contexto, las dos últimas expresiones pueden describir polinucleótidos que son monocatenarios o bicatenarios. Cuando el término se aplica a moléculas bicatenarias se utiliza para indicar la longitud total y debe entenderse que es equivalente a la expresión "pares de bases". Los expertos en la materia apreciarán que las dos cadenas de un polinucleótido bicatenario pueden diferenciarse ligeramente en longitud y que sus extremos pueden escalonarse como resultado de la escisión enzimática; de este modo todos los nucleótidos en una molécula de polinucleótido bicatenario pueden no estar emparejados. Dichos extremos no emparejados no excederán en general de 20 nt de longitud.

Un "polipéptido" es un polímero de restos de aminoácidos unido por enlaces peptídicos, ya sea producido natural o sintéticamente. Los polipéptidos inferiores a aproximadamente 10 restos de aminoácidos se denominan frecuentemente "péptidos".

El término "activador" se utiliza en la presente memoria por su significado reconocido en la materia para indicar una parte de un gen que contiene secuencias de ADN que proporcionan la fijación de la ARN polimerasa y la iniciación de la transcripción. Las secuencias activadoras frecuentemente, pero no siempre, se encuentran en las zonas 5' no codificadoras de los genes.

Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína puede comprender también componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden ser añadidos a una proteína por la célula en la que se produce la proteína y variará con el tipo de célula. Las proteínas se definen en la presente memoria desde el punto de vista de sus estructuras del eje central de aminoácidos; los sustituyentes tales como los grupos carbohidrato no están generalmente especificados, pero no obstante pueden estar presentes.

Una "secuencia señal secretora" es una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un "péptido secretor") que, como componente de un polipéptido mayor, dirige el polipéptido mayor a través de una vía secretora de una célula en la que se sintetiza. El polipéptido mayor se escinde habitualmente para eliminar el péptido secretor durante el tránsito a través de la vía secretora.

Un "segmento" es una parte de una molécula mayor (por ejemplo, polinucleótido o polipéptido) con atributos especificados. Por ejemplo, un segmento de ADN que codifica un polipéptido especificado es una parte de una molécula de ADN mayor, tal como un plásmido o fragmento de plásmido, que, cuando se lee en la dirección de 5' a la 3', codifica la secuencia de los aminoácidos del polipéptido especificado.

Los pesos moleculares y las longitudes de los polímeros determinados por los métodos analíticos imprecisos (por ejemplo, electroforesis en gel) debe entenderse que son valores aproximados. Cuando dicho valor se expresa como "alrededor de" X o "aproximadamente" X, el valor expresado de X debe entenderse que es aproximado a ±20%.

Todas las referencias mencionadas en la presente memoria están incorporadas como referencia en su totalidad.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de una nueva molécula de ADN que codifica un polipéptido que comprende un dominio del factor de crecimiento y un dominio de CUB. El dominio del factor de crecimiento se caracteriza por una disposición de los restos de cisteína y de las cadenas beta que se caracteriza por la estructura "nudo de cisteína" de la familia PDGF. El dominio CUB presenta las homologías de secuencia con los dominios CUB en las neuropilinas (Takagi *et al*., *Neuron.* 7:295-307, 1991; Soker *et al*., *ibid*.), la proteína morfogénica ósea humana (Wozney *et al*., *Science* 242:1528-1534, 1988), la proteína del plasma seminal porcino y la proteína del fluido seminal ácido bovino (Romero *et al*., *Nat. Struct. Biol.* 4:783-788, 1997), y la proteína pseudo-tolloid *X. laevis* (Lin *et al*., *Dev. Growth Differ.* 39:43-51, 1997). El análisis de la distribución del tejido del ARNm correspondiente a este nuevo ADN demostró que la expresión estaba extendida en tejidos humanos adultos, y que la expresión tenía

lugar hasta el día 15 en el embrión de ratón. El polipéptido se ha denominado "zvegf3" a la vista de su homología con las VEGF en el dominio del factor de crecimiento.

Las predicciones estructurales basadas en la secuencia zvegf3 y su homología con otros factores de crecimiento sugieren que el polipéptido puede formar homopolímeros o heteropolímeros que actúan en los tejidos para controlar el desarrollo de los órganos modulando la proliferación celular, la migración, la diferenciación o el metabolismo. Los polímeros de zvegf3 pueden comprender un polipéptido de otro miembro de la familia PDGF/VEGF de proteínas, que incluyen a VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, zvegf4 (SEC. ID. nº: 36 y nº 37), PIGF (Maglione *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9267-9271, 1991), PDGF-A (Murray *et al*., patente U.S. nº 4.889.919; Heldin *et al*., patente U.S. nº 5.219.759), o PDGF-B (Chiu *et al*., *Cell* 37:123-129, 1984; Johnsson *et al*., *EMBO J.* 3:921-928, 1984). Los miembros de esta familia de polipéptidos regulan el desarrollo y la regeneración de órganos, el crecimiento del órgano después del desarrollo y el mantenimiento del órgano, así como el mantenimiento del tejido y sus procesos de reparación. Estos factores están también implicados en procesos patológicos donde se requieren tratamientos terapéuticos, que incluyen el cáncer, la artritis reumatoide, la retinopatía diabética, la enfermedad del miembro isquémico, la vasculopatía periférica, la isquemia de miocardio, la hiperplasia vascular de la íntima, la ateroesclerosis y la formación de hemangioma. Para tratar estos estados patológicos con frecuencia se requerirá desarrollar compuestos que antagonicen los miembros de la familia PDGF/VEGF de proteínas o sus receptores respectivos. Esto puede incluir el desarrollo de anticuerpos neutralizantes, pequeñas moléculas antagonistas, formas modificadas de los factores de crecimiento que mantienen la actividad de fijación del receptor pero carecen de la actividad de activación del receptor, receptores solubles o moléculas antisentido o de ribozima para bloquear la producción de polipéptidos.

La SEC. ID. nº: 2 es la secuencia de un polipéptido representativo de la presente invención. El análisis de la secuencia de aminoácidos presentado en la SEC. ID. nº: 2 indica que los restos 1 a 14 forman un péptido secretor. El dominio CUB se extiende desde el resto 46 al resto 163. Una secuencia similar a un propéptido se extiende desde el resto 164 al resto 234 e incluye dos zonas potenciales de escisión en su terminal carboxilo, una zona dibásica en los restos 231 a 232 y el punto diana para la furina o psedofurina proteasa en los restos 231 a 234. El dominio del factor de crecimiento se extiende desde el resto 235 al resto 345. Los expertos en la materia apreciarán que los límites del dominio son algo imprecisos y cabe esperar que varíen en hasta ± 5 restos a partir de las posiciones especificadas. Los puntos de escisión proteolítica potenciales se producen en los restos 232 y 234. El tratamiento de zvegf3 recombinante producido en las células BHK se ha descubierto que se produce entre los restos 225 y 226. La escisión del péptido señal se prevé que se produzca después del resto 14 (± 3 restos). Este análisis sugiere que la cadena polipeptídica zvegf3 puede escindirse para producir una diversidad de especies monoméricas como se muestra en la Tabla 1. La escisión después de Arg-234 cabe esperar que produzca la eliminación ulterior de los restos 231 a 234, con la posible conversión de Gly-230 en una amida. La escisión después de Lys-232 es de esperar que produzca la eliminación ulterior del resto 231, otra vez con la posible conversión de Gly-230 en una amida. Además, puede presentar ventajas incluir hasta 7 restos de la zona interdominio en el terminal carboxilo del dominio de CUB. La zona interdominio puede estar truncada en su terminal amino por una cantidad similar. Véase la Tabla 1.

TABLA 1

Monómero	Restos (SEC. ID. nº: 2)
Dominio CUB	15 – 163
	46 – 163
	15 – 170
	46 – 170
Dominio CUB + zona de interdominio	
	15 – 234
	46 – 234
	amida de 15 – 229
	15 – 230
Dominio CUB + zona de interdominio + dominio del factor de crecimiento	15 – 345
	46 – 345
Dominio del factor de crecimiento	235 – 345
	226 – 345
Dominio del factor de crecimiento + zona de interdominio	164 – 345
	171 – 345

También se incluyen en la presente invención polipéptidos que son por lo menos 90% idénticos o por lo menos 95% idénticos a los polipéptidos dados a conocer en la Tabla 1, en la que estos polipéptidos adicionales conservan determinados motivos de las secuencias características como se da a conocer a continuación.

Los polipéptidos zvegf3 se denominan en la presente memoria con un subíndice que indica los restos de aminoácido. Por ejemplo, los polipéptidos del dominio CUB dados a conocer en la Tabla 1 se denominan "zvegf3$_{15-163}$", "zvegf3$_{46-163}$", "zvegf3$_{15-170}$" y "zvegf3$_{46-170}$".

La estructura de orden superior de los polipéptidos zvegf3 puede preverse por alineación de la secuencia con homólogos conocidos y análisis por ordenador utilizando el programa informático disponible (por ejemplo, el visor Insight II® y las herramientas de modelado de homología; MSI, San Diego, CA). El análisis de la SEC. ID. nº: 2 prevé que la estructura secundaria del dominio del factor de crecimiento está dominada por el nudo de cisteína, que liga las zonas y los bucles variables similares a la cadena beta en una estructura de tipo lazada. La alineación de la secuencia indica que los restos de Cys dentro del dominio del factor de crecimiento en las posiciones 250, 280, 284, 296, 335 y 337 y Gly 282 están muy conservados dentro de la familia. El análisis adicional sugiere el emparejamiento (formación del enlace disulfuro) de los restos Cys 250 y 296, 280 y 335 y 284 y 337 para formar el nudo de cisteína. Esta disposición de los restos conservados puede estar representada por la fórmula CX{18,33}CXGXCX{6,33}CX{20,40}CXC (SEC. ID. nº: 3), en la que los restos de aminoácidos están representados por el código convencional de una sola letra, X es un resto de aminoácido e {y,z} indica una zona de restos variables (X) desde los restos y a z de longitud. Una estructura de lazada de consenso está formada de la manera siguiente: terminal amino a nudo de cistina → zona 1 similares a la cadena beta → bucle 1 variable → zona 2 de similar a la cadena beta → nudo de cistina → zona 3 similar a la cadena beta → bucle 2 variable → zona 4 similares a la cadena beta → nudo de cistina → zona 5 similar a la cadena beta → bucle 3 variable → zona 6 similar a la cadena beta → nudo de cistina. Los bucles 1 y 2 variables forman una cara de la lazada, formando el bucle 3 variable la otra cara. La estructura del dominio del factor de crecimiento zvegf3 parece que diverge de la estructura de consenso de los otros miembros de la familia en el bucle 2 y de las zonas 3 y 4 similares a la cadena beta, en donde todos están abreviados y esencialmente sustituidos por un grupo con cisteína que comprende los restos 285 (Ala) hasta 295 (Gln), que incluye los restos de Cys en las posiciones 286, 287, 291 y 294 de la SEC. ID. nº: 2. Los límites aproximados de las zonas similares a la cadena beta en la SEC. ID. nº: 2 son: la zona 1, restos 251 a 259; zona 2, restos 275 a 279; zona 5, restos 297 a 301; zona 6, restos 329 a 334. Los bucles separan las zonas 1 y 2 y las zonas 5 y 6.

El dominio CUB de zveg3 se cree que forma una estructura de barril beta con nueve zonas distintas de pseudocadena beta. Estas zonas comprenden los restos 48 a 51, 55 a 59, 72 a 78, 85 a 90, 92 a 94, 107 a 112, 119 a 123, 139 a 146, y 156 a 163 de la SEC. ID. nº: 2. Una alineación múltiple de dominios CUB del precursor de neuropilina de *Xenopus laevis* (Takagi *et al*., *ibid.*), BMP-1 humana (Wozney *et al*., *ibid.*) y la proteína pseudo tolloid de *X. laevis* (Lin *et al*., *ibid.*) indica la presencia de un motivo conservado correspondiente a los restos 104 a 124 de la SEC. ID. nº: 2. Este motivo está representado por la fórmula C[KR]Y[DNE][WYF]X{11,15}G[KR][WYF]C (SEC. ID. nº: 4), en la que los corchetes indican los restos admisibles en una posición dada y X{y,z} es como se definió anteriormente.

Las proteínas de la presente invención incluyen las proteínas que comprenden los dominios CUB homólogos al dominio CUB de zvegf3. Estos dominios homólogos son desde 100 a 120 restos de longitud y comprenden un motivo de la secuencia C[KR]Y[DNE][WYF]X{11,15}G[KR][WYF]C (SEC. ID. nº: 4) correspondiente a los restos 104 a 124 de la SEC. ID. nº: 2. Estos dominios CUB homólogos son por lo menos 90% idénticos a los restos 46 a 163 de la SEC. ID. nº: 2 o por lo menos 95% idénticos a los restos 46 a 163 de la SEC. ID. nº: 2.

Las proteínas que contienen el dominio CUB de la presente invención pueden incluir además una zona interdominio zvegf3 o un homólogo de la misma. La zona interdominio es por lo menos 90% idéntica a los restos 164 a 234 de la SEC. ID. nº: 2.

Las otras proteínas de la presente invención comprenden el dominio del factor de crecimiento zvegf3 o un homólogo del mismo. Estas proteínas por lo tanto comprenden un segmento de polipéptido que es por lo menos 90% o 95% idéntico a los restos 235 a 345 de la SEC. ID. nº: 2, en la que el segmento de polipéptido comprende los restos de Cys en las posiciones correspondientes a los restos 250, 280, 284, 296, 335 y 337 de la SEC. ID. nº: 2; una glicina en la posición correspondiente al resto 284 de la SEC. ID. nº: 2; y el motivo de la secuencia CX{18,33}CXGXCX{6,33}CX{20,40}CXC (SEC. ID. nº: 3) correspondiente a los restos 250 a 337 de la SEC. ID. nº: 2.

Las proteínas adicionales que comprenden las combinaciones del dominio CUB, la zona interdominio y el dominio del factor de crecimiento se presentan anteriormente en la Tabla 1. En cada caso, la invención también incluye proteínas homólogas que comprenden dominios homólogos como se dio a conocer anteriormente.

El análisis estructural y la homología predice este complejo de polipéptidos zvegf3 con un segundo polipéptido para formar proteínas multiméricas. Estas proteínas incluyen homodímeros y heterodímeros. En este último caso, el segundo polipéptido puede ser un polipéptido truncado u otra variante de polipéptido zvegf3 u otro polipéptido, tal como un polipéptido PIGF, PDGF-A, PDGF-B, VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D o zvegf4. Entre las proteínas diméricas dentro de la presente invención están los dímeros formados por la asociación no covalente (por ejemplo interacciones hidrófobas) con una segunda unidad, un segundo polipéptido zvegf3 u otra segunda subunidad, o por la asociación covalente estabilizada por los enlaces disulfuro intermoleculares entre los restos de cisteína de los monómeros componentes. Dentro de la SEC. ID. nº: 2, los restos Cys en las posiciones 274, 286, 287, 291, 294 y 339 pueden formar enlaces disulfuros intramoleculares o intermoleculares. Es probable que los restos 274 y 287 formen enlaces disulfuro de la intercadena. En los homodímeros, los polipéptidos componentes (denominados A y B) pueden

unirse en una disposición antiparalela con un modelo de enlaces disulfuro de la intercadena A274-B287, A287-B274. Los datos sugieren además que los disulfuros de la intercadena adicionales están formados por el emparejamiento de Cys286 con Cys291 y Cys294 con Cys339, aunque alguno de todos estos cuatro restos puede estar implicado en el emparejamiento de la intercadena.

La presente invención proporciona así una variedad de proteínas multiméricas que comprenden un polipéptido zvegf3 dado a conocer anteriormente. Estos polipéptidos zvegf3 incluyen zvegf3$_{16-234}$, zvegf3$_{46-234}$, amida del zvegf3$_{15-229}$, zvegf3$_{15-230}$, zvegf3$_{15-346}$, zvegf3$_{46-345}$ y zvegf3$_{235-345}$, así como variantes y derivados de estos polipéptidos dados a conocer en la presente memoria.

El porcentaje de identidad de la secuencia se determina por los procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul *et al*., *Bull. Math. Bio.* 48:603-616, 1986, y Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919, 1992. En resumen, dos secuencias de aminoácidos están alineadas para optimizar las puntuaciones de la alineación utilizando una penalización de apertura del hueco de 10, una penalización de prolongación de apertura de 1 y la matriz de puntuación "BLOSUM62" de Henikoff y Henikoff (*ibid*.) como se muestra en la Tabla 2 (los aminoácidos están indicados por los códigos habituales de una letra). La identidad del porcentaje se calcula a continuación de la manera siguiente:

$$\frac{\text{Número total de igualdades idénticas}}{\text{[longitud de la secuencia más larga más el número de huecos introducidos en la secuencia más larga para alinear las dos secuencias]}} \times 100$$

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 2

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	0	-3	-2	0
R	-1	5	0	-2	-3	1	0	-2	0	-3	-2	2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	6	1	-3	0	0	0	1	-3	-3	0	-2	-3	-2	1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	1	6	-3	0	2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	1	0	0	-3	5	2	-2	0	-3	-2	1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	2	-4	2	5	-2	0	-3	-3	1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4	2	-3	1	0	-3	-2	-1	-3	-1	3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4	-2	2	0	-3	-2	-1	-2	-1	1
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5	0	-2	-1	-1	-1	-1	1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6	-4	-2	-2	1	3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7	-1	-1	-4	-3	-2
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4	1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	1	2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

El nivel de identidad entre las secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de búsqueda de similitud "FASTA" dado a conocer por Pearson y Lipman (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988) y por Pearson (*Meth. Enzymol.* 183:63, 1990). En resumen, FASTA en primer lugar caracteriza la similitud de secuencia identificando las zonas compartidas por la secuencia buscada (por ejemplo, la SEC. ID. nº: 2) y la secuencia de ensayo que posee la mayor densidad de identidades (si la variable ktup es 1) o pares de identidades (si ktup=2), sin considerar las sustituciones, inserciones o eliminaciones conservadoras de aminoácidos. Las diez zonas con densidad mayor de las identidades se vuelven a puntuar a continuación comparando la similitud de todos los aminoácidos emparejados utilizando una matriz de sustitución de aminoácidos y los extremos de las zonas se "recortan" para que incluyan solamente aquellos restos que contribuyen a la puntuación mayor. Si existen varias zonas con puntuaciones mayores que la del valor de "corte" (calculadas mediante una fórmula predeterminada basada en la longitud de la secuencia y en el valor ktup), entonces las zonas iniciales recortadas se examinan para determinar si las zonas pueden unirse para formar un alineamiento aproximado con los huecos. Por último, las zonas de puntuación mayor de las secuencias de dos aminoácidos se alinean utilizando una modificación del algoritmo de Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444, 1970; Sellers, *SIAM J. Appl. Math.* 26:787, 1974), lo que permite inserciones y eliminaciones de aminoácidos. Los parámetros preferidos para el análisis FASTA son ktup=1, penalización de la abertura del hueco=10, penalización de la extensión del hueco=1, y matriz de sustitución=BLOSUM62. Estos parámetros pueden introducirse en un programa FASTA modificando el archivo de la matriz de puntuación ("SMATRIX"), como se explica en el Apéndice 2 de Pearson, 1990 (*ibid*.).

FASTA puede utilizarse también para determinar la identidad de la secuencia de las moléculas de ácido nucleico utilizando una relación como la dada a conocer anteriormente. Para las comparaciones de la secuencia de nucleótidos, el valor ktup puede oscilar entre uno y seis, preferentemente de tres a seis, aún más preferentemente tres, con otros parámetros indicados por defecto.

La presente invención incluye polipéptidos que tienen uno o más cambios de aminoácidos conservadores en comparación con la secuencia de aminoácidos SEC. ID. nº: 2. La matriz BLOSUM62 (Tabla 2) es una matriz de sustitución de aminoácidos obtenida de aproximadamente 2.000 alineaciones locales múltiples de los segmentos de la secuencia de proteínas, que representa zonas muy conservadas de más de 500 grupos de proteínas relacionadas (Henikoff y Henikoff, *ibid*.). De este modo, pueden utilizarse las frecuencias de la sustitución de BLOSUM62 para definir las sustituciones de aminoácidos conservadoras que pueden introducirse en las secuencias de aminoácidos de la presente invención. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "sustitución de aminoácidos conservadores" se refiere a una sustitución representada por un valor de BLOSUM62 superior a 1. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos es conservadora si la sustitución se caracteriza por un valor de BLOSUM62 de 0, 1, 2 ó 3. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras preferidas se caracterizan por un valor de BLOSUM62 de por lo menos 1 (por ejemplo, 1, 2 ó 3), mientras que las sustituciones de aminoácidos conservadoras más preferidas se caracterizan por un valor de BLOSUM62 de por lo menos 2 (por ejemplo, 2 ó 3).

Las proteínas de la presente invención pueden comprender además ampliaciones del terminal amino o carboxi, tales como un resto de metionina en el terminal amino, un resto de cisteína en el terminal amino o carboxi para facilitar el posterior enlace a la hemocianina de la lapa californiana activada por maleimida, un pequeño péptido enlazador de hasta aproximadamente 20 a 25 restos, o una prolongación del polipéptido que facilita la purificación (una etiqueta de afinidad) como se dio a conocer anteriormente. Pueden utilizarse dos o más etiquetas de afinidad en combinación. Los polipéptidos que comprenden etiquetas de afinidad pueden comprender además un enlazador de polipéptido y/o un punto de escisión proteolítico entre el polipéptido zvegf3 y la etiqueta de afinidad. Los puntos de escisión a título de ejemplo incluyen puntos de escisión de trombina y los puntos de escisión del factor Xa.

La presente invención proporciona además una variedad de otras fusiones de polipéptido y las proteínas multiméricas relacionadas que comprenden una o más fusiones de polipéptido. Por ejemplo, un polipéptido zvegf3 puede prepararse como una fusión a una proteína de dimerización como se da a conocer en las patentes U.S. nº 5.155.027 y nº 5.567.584. Las proteínas de dimerización a título de ejemplo a este respecto incluyen dominios de la zona constante de inmunoglobulina. La dimerización puede también estabilizarse fusionando un polipéptido zvegf3 a una secuencia de cremallera de leucina (Riley *et al*., *Protein Eng.* 9:223-230, 1996; Mohamed *et al*., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 51:241-250, 1994). Las fusiones del polipéptido inmunoglobulina-zvegf3 y las fusiones de cremallera de leucina pueden expresarse en células modificadas genéticamente para producir una variedad de análogos multiméricos de zvegf3. Los dominios auxiliares pueden fusionarse a los polipéptidos zvegf3 para dirigirlos a células, tejidos o macromoléculas específicos (por ejemplo, colágeno). Por ejemplo, un polipéptido zvegf3 o proteína puede dirigirse a un tipo de célula predeterminado fundiendo un polipéptido zvegf3 a un ligando que se une específicamente a un receptor en la superficie de la célula diana. De esta manera, los polipéptidos y proteínas pueden dirigirse con fines terapéuticos o de diagnóstico. Un polipéptido zvegf3 puede fusionarse a dos o más restos, tal como una etiqueta de afinidad para la purificación y un dominio de dirección. Las fusiones del polipéptido pueden comprender también uno o más puntos de escisión, particularmente entre los dominios. Véase, Tuan *et al*., *Connective Tissue Research* 34:1-9, 1996.

Las fusiones de polipéptidos de la presente invención contendrán generalmente no más de aproximadamente 1.500 restos de aminoácidos, con frecuencia no más de aproximadamente 1.200 restos, a menudo no más de aproximadamente 1.000 restos y en muchos casos serán considerablemente menores. Por ejemplo, un polipéptido zvegf3 de 331 restos (restos 15 a 345 de la SEC. ID. nº: 2) pueden fusionarse a la β-galactosidasa de *E. coli* (1.021 restos; véase Casadaban *et al*., *J. Bacteriol.* 143:971-980, 1980), un espaciador de 10 restos y un punto de escisión del factor Xa de 4 restos para dar un polipéptido de 1.366 restos. En un segundo ejemplo, los restos 235 a 345 de la SEC. ID. nº:

2 pueden fusionarse a la proteína de fijación de la maltosa (aproximadamente 370 restos), un punto de escisión de 4 restos y una etiqueta de polihistidina de 6 restos.

Un polipéptido que comprende el dominio del factor de crecimiento de zvegf3 (por ejemplo, $zvegf3_{235-345}$ o $zvegf3_{164-345}$) puede fusionarse a un dominio CUB distinto de zvegf3. En una forma de realización relacionada de la invención, un polipéptido zvegf3 que comprende el factor de crecimiento zvegf3 y dominios CUB se fusiona con un dominio CUB no de zvegf3, tal como un dominio CUB que comprende el polipéptido neuropilina.

La presente invención proporciona además fusiones de polipéptidos que comprenden el dominio CUB de zvegf3 (por ejemplo, $zvegf3_{46-183}$). El dominio CUB, con su homología con neuropilina-1, puede utilizarse para dirigir zvegf3 u otras proteínas que lo contienen a las células que tienen semaforinas en la superficie de la célula, incluyendo las células endoteliales, las células neuronales, los linfocitos y las células tumorales. El dominio CUB de zvegf3 puede unirse de este modo a otros restos, incluyendo restos de polipéptidos (por ejemplo, otros factores de crecimiento, anticuerpos y enzimas) y restos no peptídicos (por ejemplo, radionucleidos, agentes de contraste y similares), para dirigirlos a las células que expresan las semaforinas de la superficie celular. Las zonas dibásicas y de pseudofurina entre los dominios de CUB y del factor de crecimiento de zvegf3 pueden permitir la liberación proteolítica del dominio del factor de crecimiento u otro resto mediante las proteasas locales existentes en los tejidos o mediante las proteasas añadidas de fuentes exógenas. La liberación del resto dirigido puede proporcionar efectos biológicos más localizados.

Las proteínas que comprenden el dominio CUB de zvegf3 natural y las variantes de las mismas pueden utilizarse para modular las actividades mediadas por las semaforinas de la superficie celular. Aunque no se desea estar ligado por la teoría, zvegf3 puede unirse a las semaforinas por su dominio CUB. La observación de que la semaforina III está implicada en el desarrollo vascular sugiere que los miembros de la familia de proteínas del factor de crecimiento vascular pueden estar también implicados, especialmente debido a la actividad de fijación conjunta de VEGF y semaforina III a la neuropilina-1. zvegf3 puede utilizarse de este modo para diseñar agonistas y antagonistas de las interacciones neuropilina-semaforina. Por ejemplo, la secuencia de zvegf3 dada a conocer en la presente memoria proporciona un punto de partida para el diseño de moléculas que antagonizan las actividades estimuladas por la semaforina, incluyendo el crecimiento de neuritas, el desarrollo cardiovascular, el desarrollo del cartílago y del miembro y la función de los linfocitos T y B. Las aplicaciones adicionales incluyen la intervención en varias patologías, incluyendo la artritis reumatoide, varias formas de cáncer, la enfermedad autoinmunitaria, la inflamación, las retinopatías, los hemangiomas, los episodios isquémicos en los tejidos incluyendo el corazón, riñón y las arterias periféricas, las neuropatías, la lesión aguda de nervios y enfermedades de los sistemas nerviosos central y periférico.

Se realizan cambios en la secuencia de aminoácidos en los polipéptidos zvegf3 con el fin de minimizar la destrucción de la estructura de orden superior esencial para la actividad biológica. En general, se prefieren los cambios de aminoácidos conservadores. Se harán cambios en restos de aminoácidos a fin de no destruir el nudo de cisteína y la disposición de "lazada" de los bucles en el dominio del factor de crecimiento que es característico de la familia de proteínas. Se mantendrán también los motivos conservados. Los efectos de los cambios de la secuencia de aminoácidos pueden preverse por modelado por ordenador como se dio a conocer anteriormente o determinarse por análisis de la estructura cristalina (véase, por ejemplo, Lapthorn *et al*., *ibid.*). Las características de hidrofobia de la SEC. ID. nº: 2 se presentan en la Fig. 1. Los expertos en la materia apreciarán que esta hidrofobia será considerada cuando se diseñen alteraciones en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido zvegf3, a fin de que no destruya el perfil general. Las directrices adicionales en la selección de las sustituciones de aminoácidos se proporcionan mediante la alineación de las secuencias de zvegf3 de ratón y humana mostradas en la Fig. 6.

Los polipéptidos de la presente invención pueden comprender también los restos de aminoácidos artificiales. Los aminoácidos artificiales incluyen, sin limitación, *trans*-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, *cis*-4-hidroxiprolina, *trans*-4-hidroxiprolina, *N*-metilglicina, *allo*-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido pipecólico, terc-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenil-alanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. Son conocidos varios procedimientos en la técnica para incorporar los restos de aminoácidos artificiales en proteínas. Por ejemplo, puede utilizarse un sistema *in vitro* en el que se suprimen las mutaciones sin sentido utilizando los ARNt supresores aminoacilados químicamente. Los procedimientos para sintetizar los aminoácidos y el ARNt aminoacilante son conocidos en la técnica. La transcripción y traducción de los plásmidos que contienen mutaciones sin sentido se realiza en un sistema sin células que comprende un extracto S30 de *E. coli* y enzimas disponibles en el mercado y otros reactivos. Las proteínas se purifican por cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* 113:2722, 1991; Ellman *et al*., *Methods Enzymol.* 202:301, 1991; Chung *et al*., *Science* 259:806-809, 1993; y Chung *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10145-10149, 1993). En un segundo procedimiento, la traducción se realiza en ovocitos de xenopus por microinyección de ARNm mutado y los ARNt del supresor aminoacilados químicamente (Turcatti *et al*., *J. Biol. Chem.* 271:19991-19998, 1996). En un tercer procedimiento, se cultivan células de *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural que ha de remplazarse (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia del o de los aminoácidos artificiales deseados (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido artificial se incorpora a la proteína en lugar de su contrapartida natural. Véase, Koide *et al*., *Biochem.* 33:7470-7476, 1994. Los restos de aminoácidos naturales pueden transformarse en especies artificiales por modificación química *in vitro*. La modificación química puede combinarse con la mutagénesis dirigida al sitio para expandir más el intervalo de sustituciones (Wynn y Richards, *Protein Sci.* 2:395-403, 1993).

Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos de la presente invención pueden identificarse según procedimientos conocidos en la técnica, tal como la mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis por exploración con alanina (Cun-

ningham y Wells, *Science* 244, 1081-1085, 1989; Bass *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4498-4502, 1991). En esta última técnica, las mutaciones con una sola alanina se introducen en cada resto en la molécula y en las moléculas mutantes resultantes se determina la actividad biológica de otras propiedades para identificar los restos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula.

Pueden realizarse sustituciones múltiples de aminoácidos y analizarse utilizando métodos conocidos de mutagénesis e identificación, tales como los dados a conocer por Reidhaar-Olson y Sauer (*Science* 241:53-57, 1988) o Bowie y Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-2156, 1989). En resumen, estos autores dan a conocer procedimientos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar el polipéptido funcional y a continuación secuenciar los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones disponibles en cada posición. Otros procedimientos que pueden utilizarse incluyen la presentación del fago (por ejemplo, Lowman *et al*., *Biochem.* 30:10832-10837, 1991; Ladner *et al*., patente U.S. nº 5.223.409; Huse publicación WIPO WO 92/06204) y la mutagénesis dirigida al sitio (Derbyshire *et al*., *Gene* 46:145, 1986; Ner *et al*., *DNA* 7:127, 1988).

Las variantes del ADN de zvegf3 dadas a conocer y las secuencias de polipéptidos pueden generarse mezclando el ADN como se da a conocer por Stemmer, *Nature* 370:389-391, 1994 y Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751, 1994. En resumen, se generan variantes de genes por recombinación homóloga *in vitro* por fragmentación al azar de un gen original seguido por reensamblado utilizando la PCR, lo que produce mutaciones puntuales introducidas al azar. Esta técnica puede modificarse utilizando una familia de genes originales, tal como las variantes alélicas o genes de diferentes especies, para introducir la variabilidad adicional en el proceso. La selección o identificación de la actividad deseada, seguida de interacciones adicionales de mutagénesis y análisis proporciona la rápida (evolución) de las secuencias seleccionando las mutaciones deseables a la vez que seleccionando simultáneamente contra los cambios perjudiciales.

Los procedimientos de mutagénesis dados a conocer anteriormente pueden combinarse con un gran volumen o con los métodos de identificación de alto rendimiento para detectar la actividad biológica de las variantes de polipéptidos zvegf3, en particular la actividad biológica en la modulación de la proliferación o de la diferenciación celular. Por ejemplo, los ensayos de mitogénesis que miden la incorporación del colorante o la incorporación de ^{3}H-timidina pueden realizarse en un gran número de muestras, como pueden realizarse ensayos basados en células que detectan la expresión de un gen indicador (por ejemplo, un gen de luciferasa). La mutagénesis del dominio CUB puede utilizarse para modular su fijación a los miembros de la familia de la semaforina, incluyendo la potenciación o inhibición de la fijación a miembros seleccionados de la familia. Un espectro modificado de la actividad de fijación puede ser deseable para optimizar la utilidad terapéutica y/o de diagnóstico de las proteínas que comprende un dominio CUB de zvegf3. La fijación directa que utiliza la proteína CUB puede utilizarse para controlar los cambios en la actividad de fijación del dominio de CUB a miembros seleccionados de la familia de la semaforina. Las semaforinas de interés a este respecto incluyen las proteínas aisladas, las proteínas presentes en las membranas celulares y las proteínas presentes en las superficies celulares. El dominio CUB puede estar marcado por una variedad de procedimientos incluyendo el radiomarcado con isótopos, tal como el ^{125}I, la conjugación a enzimas tal como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa del rábano picante, la conjugación con biotina y la conjugación con varios marcadores fluorescentes incluyendo FITC. Estos y otros ensayos se dan a conocer con mayor detalle a continuación. Las moléculas de ADN mutagenizado que codifican polipéptidos activos de zvegf3 pueden recuperarse de las células hospedadoras y secuenciarse rápidamente utilizando un equipo moderno. Estos procedimientos permiten la determinación rápida de la importancia de los restos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés y pueden aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

Utilizando los procedimientos expuestos anteriormente, un experto en la materia puede identificar y/o preparar una variedad de polipéptidos que son homólogos a los polipéptidos zvegf3 dados a conocer anteriormente en la Tabla 1 y conservar las propiedades biológicas de la proteína natural. Dichos polipéptidos pueden incluir también segmentos de polipéptidos adicionales como se dio a conocer en general anteriormente.

La presente invención también proporciona moléculas de polinucleótido que incluyen moléculas de ADN y ARN, que codifican los polipéptidos zvegf3 dados a conocer anteriormente. Los polinucleótidos de la presente invención incluyen la cadena transcrita; la cadena antisentido; y el ADN bicatenario, que tiene tanto la cadena transcrita como la antisentido hibridadas conjuntamente por enlaces de hidrógeno. Unas secuencias de ADN representativas que codifican polipéptidos zvegf3 está publicada en la SEC. ID. nº: 1. Las secuencias adicionales de ADN que codifican los polipéptidos zvegf3 pueden ser generadas fácilmente por un experto en la materia basándose en el código genético. Las secuencias de la contrapartida del ARN pueden generarse por sustitución de U por T.

Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que, en vista de la degeneración del código genético, es posible una variación de secuencias considerable entre las moléculas de polinucleótido que codifican los polipéptidos zvegf3. La SEC. ID. nº: 6 es una secuencia de ADN degenerada que comprende todos los ADN que codifican el polipéptido zvegf3 de la SEC. ID. nº: 2. Los expertos en la materia apreciarán que la secuencia degenerada de la SEC. ID. nº: 6 proporciona también todas las secuencias de ARN que codifican la SEC. ID. nº: 2 sustituyendo U por T. De este modo, los polinucleótidos que codifican el polipéptido zvegf3 que comprenden los nucleótidos 1 a 1035, 1 a 489, 43 a 489, 136 a 489, 43 a 702, 136 a 702, 43 a 690, 43 a 1035, 136 a 1035 y 703 a 1035 de la SEC. ID. nº: 6 y sus ARN equivalentes están contemplados por la presente invención. La Tabla 3 publica los códigos de una letra utilizados en la SEC. ID. nº: 6 para indicar las posiciones de nucleótidos degenerados. “Resoluciones” son los nucleótidos indicados por una letra del código. “Complemento” indica el código para el/los nucleótido(s) complementario(s). Por ejemplo, el código Y indica C o T, y su complemento R indica A o G, siendo A complementario de T y siendo G complementario de C.

TABLA 3

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

Los codones degenerados utilizados en la SEC. ID. nº: 6, que comprenden todos los posibles codones para un aminoácido dado, se publican en la Tabla 4, a continuación.

TABLA 4

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

Un experto en la materia apreciará que se introduce alguna ambigüedad al determinar un codón degenerado, representativo de todos los posibles codones que codifican cada aminoácido. Por ejemplo, el codón degenerado para la serina (WSN) puede, en algunas circunstancias codificar la arginina (AGR) y el codón degenerado para la arginina (MGN) puede, en algunas circunstancias, codificar la serina (AGY). Existe una relación similar entre los codones que codifican la fenilalanina y la leucina. De este modo, algunos polinucleótidos abarcados por las secuencias degeneradas pueden codificar secuencias variantes de aminoácidos, pero cualquier experto en la materia puede identificar fácilmente dichas secuencias variantes con referencia a la secuencia de aminoácidos SEC. ID. nº: 2. La funcionalidad de las secuencias variables puede determinarse fácilmente como se describe en la presente memoria.

En determinadas formas de realización de la invención los polinucleótidos aislados se hibridarán a zonas de tamaño similar de la SEC. ID. nº: 1, o a una secuencia complementaria a ésta, en condiciones severas. En general, las condiciones severas se seleccionan para que sean aproximadamente 5ºC inferiores al punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida a una sonda perfectamente idéntica. Las condiciones severas típicas son aquellas en las que la concentración de la sal es hasta aproximadamente 0,03 M a pH 7 y la temperatura es por lo menos aproximadamente 60ºC.

Tal como se mencionó anteriormente, los polinucleótidos aislados de la presente invención incluyen ADN y ARN. Los procedimientos para la preparación del ADN y ARN son bien conocidos en la técnica. Los clones de ADN complementario (ADNc) se preparan a partir del ARN que se aísla de un tejido o célula que produce grandes cantidades de ARN de zvegf3. Dichos tejidos y células se identifican por inmunotransferencia Northern (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5201, 1980) e incluyen la tiroides, la médula espinal y las glándulas suprarrenales. El ARN completo puede prepararse utilizando extracción con guanidina HCl seguida de aislamiento por centrifugación en un gradiente de CsCl (Chirgwin *et al*., *Biochemistry* 18:52-94, 1979). El poli $(A)^+$ ARN se prepara a partir del ARN completo utilizando el método de Aviv y Leder (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:1408-1412, 1972). El ADN complementario (ADNc) se prepara a partir del poli$(A)^+$ ARN utilizando procedimientos conocidos. Alternativamente puede aislarse el ADN genómico. Para algunas aplicaciones (por ejemplo, la expresión en animales transgénicos) puede ser resultar preferido utilizar un clon genómico o modificar un clon de ADNc que incluya por lo menos un intrón genómico. Los procedimientos para identificar y aislar el ADNc y los clones genómicos son bien conocidos y resultan evidentes para el experto en la materia e incluyen la utilización de la secuencia dada a conocer en la presente memoria, o partes de la misma, para sondar o cebar un banco. Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos zvegf3 se identifican y aíslan, por ejemplo, por hibridación o reacción en cadena de la polimerasa ("PCR", Mullis, patente U.S. nº 4.682.202). Los bancos de expresión pueden ser sondados con anticuerpos contra los fragmentos del receptor zvegf3 u otros acompañantes de fijación específicos.

Los expertos en la materia apreciarán que las secuencias dadas a conocer en las SEC. ID. nº: 1 y nº: 2 representan un solo alelo del zvegf3 humano. Las variantes alélicas de estas secuencias pueden clonarse sondando bancos de ADNc o genómicos de diferentes individuos según los procedimientos habituales. Alternativamente cabe esperar que existan las formas cortadas y empalmadas de zvegf3.

La secuencia polinucleotídica zvegf3 dada a conocer en la presente memoria puede utilizarse para aislar polinucleótidos que codifican otras proteínas de zvegf3. Tales otros polinucleótidos incluyen variantes alélicas, alternativamente los ADNc cortados y empalmados y los polinucleótidos contrapartida de otras especies (ortólogos). Estos polinucleótidos ortólogos pueden utilizarse, entre otros, para preparar las respectivas proteínas ortólogas. Otras especies de interés incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, aves, anfibios, reptiles, peces, insectos y otras especies de vertebrados e invertebrados. Son de particular interés los polinucleótidos y proteínas de zvegf3 de otras especies de mamíferos, incluyendo los polinucleótidos y proteínas de primates no humanos, murinos, porcinos, ovinos, bovinos, caninos, felinos y equinos. Los polipéptidos y polinucleótidos de ztbg1 no humanos, así como los antagonistas de los mismos y otras moléculas relacionadas, pueden utilizarse, entre otros, en medicina veterinaria. Los ortólogos de zvegf3 humano pueden clonarse utilizando información y composiciones proporcionadas por la presente invención en combinación con técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, puede clonarse un ADNc utilizando ARNm obtenido de un tejido o tipo de célula que expresa a zvegf3 tal como se da a conocer en la presente memoria. Las fuentes adecuadas de ARNm pueden identificarse sondando transferencias Northern con sondas diseñadas a partir de las secuencias dadas a conocer en la presente memoria. Se prepara a continuación un banco a partir del ARNm de un tejido positivo o de una estirpe celular. Un ADNc que codifica a zvegf3 puede aislarse a continuación mediante una variedad de procedimientos, tales como sondando con un ADNc humano completo o parcial o con uno o más conjuntos de sondas degeneradas basadas en las secuencias descritas. La hibridación generalmente se hará en condiciones de baja severidad, en las que el lavado se realiza en 1 × SSC con un lavado inicial a 40ºC y con lavados posteriores a 5ºC a intervalos mayores hasta que el fondo se reduzca de manera adecuada. Un ADNc puede clonarse también utilizando la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Mullis, patente U.S. nº 4.683.202), utilizando cebadores diseñados procedente de la secuencia de zvegf3 humana representativa dada a conocer en la presente memoria. En un procedimiento adicional, el banco de ADNc puede utilizarse para transformar o transfectar células hospedadoras, y la expresión del ADNc de interés puede detectarse con un anticuerpo contra el polipéptido zvegf3. También pueden aplicarse técnicas similares para el aislamiento de los clones genómicos.

Para cualquier polipéptido zvegf3, incluyendo las variantes y las proteínas de fusión, cualquier experto en la materia puede generar fácilmente una secuencia polinucleotídica completamente degenerada que codifica esta variante utilizando la información publicada en las Tablas 3 y 4, anteriormente.

Las zonas conservadas de zvegf3, identificadas por alineación con las secuencias de otros miembros de la familia, pueden utilizarse para identificar polinucleótidos y proteínas relacionadas. Por ejemplo, puede utilizarse la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y otras técnicas conocidas en la materia para ampliar las secuencias que codifican los motivos conservados presentes en zvegf3 del ARN obtenido de una variedad de fuentes de tejido. En particular, los cebadores muy degenerados como se muestra a continuación en la Tabla 5 (diseñados a partir de una alineación de zvegf3 con las cadenas A y B de PDGF, VEGF, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D) son útiles para clonar los polipéptidos que codifican los dominios homólogos del factor de crecimiento. Los cebadores representados en la Tabla 6, diseñados a partir de una alineación de zvegf3 con el precursor de neuropilina de *X. laevis*, el BMP-1 humano y la proteína pseudotolloide de *X. laevis*, son útiles para clonar los polipéptidos que codifican los dominios de CUB. Los cebadores de las Tablas 6 y 7 pueden utilizarse de este modo para obtener polinucleótidos adicionales que codifican homólogos de la secuencia zvegf3 de las SEC. ID. nº: 1 y nº: 2.

TABLA 5

restos 279 a 284 de zvegf3

degenerados:	MGN TGY GGN GGN AAY TG	(SEC. ID. nº: 7)
consenso:	MGN TGY DSN GGN WRY TG	(SEC. ID. nº: 8)
complemento:	CAR YWN CCN SHR CAN CK	(SEC. ID. nº: 9)

restos 270 a 275 de zvegf3

degenerados:	TTY TGG CCN GGN TGY YT	(SEC. ID. nº: 10)
consenso:	NTN DDN CCN NSN TGY BT	(SEC. ID. nº: 11)
complemento:	AVR CAN SNN GGN HHN AN	(SEC. ID. nº: 12)

restos 332 a 337 de zvegf3

degenerados:	CAY GAR GAR TGY GAY TG	(SEC. ID. nº: 13)
consenso:	CAY NNN NVN TGY VVN TG	(SEC. ID. nº: 14)
complemento:	CAN BBR CAN BNN NNR TG	(SEC. ID. nº: 15)

restos 250 a 255 de zvegf3

degenerados:	TGY CAN CCN MGN AAY TT	(SEC. ID. nº: 16)
consenso:	TGY HNN MCN MKN RMN DH	(SEC. ID. nº: 17)
complemento:	DHN KYN MKN GKN NDR CA	(SEC. ID. nº: 18)

TABLA 6

restos 104 a 109 de zvegf3

degenerados:	TGY AAR TAY GAY TWY GT	(SEC. ID. nº: 19)
complemento:	ACR WAR TCR TAY TTR CA	(SEC. ID. nº: 20)

restos 120 a 125 de zvegf3

consenso:	YWN GGN MRN TDB TGY GG	(SEC. ID. nº: 21)
complemento:	CCR CAV HAN YKN CCN WR	(SEC. ID. nº: 22)

restos 63 a 68 de zvegf3

consenso:	TDB CCN MAN DVN TAY CC	(SEC. ID. nº: 23)
complemento:	GGR TAN BHN TKN GGV HA	(SEC. ID. nº: 24)

Las secuencias polinucleotídicas de zvegf3 dadas a conocer en la presente memoria pueden utilizarse también como sondas o cebadores para clonar las zonas 5' no codificantes de un gen zvegf3, que incluye secuencias activadoras. Estas secuencias adyacentes pueden utilizarse para dirigir la expresión de zvegf3 y otras proteínas recombinantes. Además, las secuencias adyacentes 5' pueden utilizarse como puntos de dirección para los montajes reguladores para activar o aumentar la expresión de los genes zvegf3 endógenos tal como se da a conocer por Treco *et al*., patente U.S. nº 5.641.670.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden prepararse también por síntesis automática. El procedimiento actual de selección es el procedimiento de la fosforamidita. Si se requiere el ADN bicatenario sintetizado químicamente, cada cadena complementaria se prepara por separado. La producción de segmentos bicatenarios cortos (de 60 a 80 bp) es técnicamente sencilla y puede realizarse sintetizando las cadenas complementarias y a continuación hibridándolas. Los segmentos más largos (por lo general >300 bp) se montan en forma modular a partir de los fragmentos monocatenarios que son de 20 a 100 nucleótidos de longitud. La síntesis automática de los polinucleótidos está comprendida dentro del nivel de experiencia ordinaria en la técnica, y están disponibles el equipo y los reactivos adecuados en los proveedores comerciales. Véase, en general, Glick y Pasternak, *Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA*, ASM Press, Washington, D.C., 1994; Itakura *et al*., *Ann. Rev. Biochem.* 53: 323-56, 1984; y Climie *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:633-7, 1990.

Los polipéptidos de la presente invención, incluyendo los polipéptidos de longitud completa, los fragmentos biológicamente activos y los polipéptidos de fusión pueden producirse en células hospedadoras modificadas genéticamente según las técnicas convencionales. Las células hospedadoras adecuadas son los tipos de células que pueden transformarse o transfectarse con ADN exógeno y se desarrollan en cultivo e incluyen bacterias, células de hongos y células eucarióticas superiores cultivadas (incluyendo las células cultivadas de organismos pluricelulares). Las técnicas de manipulación de las moléculas de ADN clonadas y la introducción del ADN exógeno en una variedad de células hospedadoras son dadas a conocer por Sambrook *et al*., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, y Ausubel *et al*., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green y Wiley and Sons, NY, 1993.

En general, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido zvegf3 está funcionalmente unida a otros elementos genéticos requeridos para su expresión, incluyendo generalmente un activador y terminador de la transcripción, en un vector de expresión. El vector contendrá también frecuentemente uno o más marcadores seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque los expertos en la materia apreciarán que en determinados sistemas pueden proporcionarse marcadores seleccionables en vectores separados y la replicación del ADN exógeno puede proporcionarse por integración en el genoma de la célula hospedadora. La selección de activadores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros elementos es un asunto del diseño rutinario dentro del nivel de experiencia ordinaria en la materia. Muchos de dichos elementos están descritos en la bibliografía y están disponibles a través de los proveedores comerciales.

Para dirigir un polipéptido zvegf3 en la trayectoria secretora de una célula hospedadora, se proporciona una secuencia señal secretora (conocida también como secuencia principal, prepro secuencia o pre secuencia) en el vector de expresión. La secuencia señal secretora puede ser la de zvegf3, o puede obtenerse a partir de otra proteína segregada (por ejemplo, t-PA; véase, la patente U.S. nº 5.641.655) o sintetizada de nuevo. La secuencia señal secretora está unida funcionalmente a la secuencia del ADN de zvegf3, es decir, las dos secuencias se unen en el marco de lectura correcto y se colocan para dirigir el polipéptido recién sintetizado en la trayectoria secretora de la célula hospedadora. La secuencia señal secretoras están normalmente colocadas en 5' de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque determinadas secuencias señal pueden estar colocadas en cualquier parte en la secuencia de ADN de interés (véase, por ejemplo, Welch *et al*., patente U.S. nº 5.037.743; Holland *et al*., patente U.S. nº 5.143.830).

La expresión de los polipéptidos de zvegf3 a través de una trayectoria secretora de la célula hospedadora cabe esperar que proporcione una producción de proteínas poliméricas. Como se mencionó anteriormente, dichos polímeros incluyen tanto homopolímeros como heteropolímeros, estos últimos incluyendo proteínas que comprenden solamente polipéptidos y proteínas de zvegf3 incluyendo polipéptidos zvegf3 y heterólogos. Por ejemplo, un heteropolímero que comprende un polipéptido zvegf3 y un polipéptido de un miembro de la familia relacionada (por ejemplo, VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, zvegf4, PlGF, PDGF-A o PDGF-B) puede producirse por coexpresión de los dos polipéptidos en una célula hospedadora. Son conocidas las secuencias que codifican estos otros miembros de la familia. Véase, por ejemplo, Dvorak *et al*., *ibid.*; Olofsson *et al*., *ibid.*; Hayward *et al*., *ibid.*; Joukov *et al*., *ibid.*; Oliviero *et al*., *ibid.*; Achen *et al*., *ibid.*; Maglione *et al*., *ibid.*; Heldin *et al*., patente U.S. nº 5.219.759; y Johnsson *et al*., *ibid.* Si se obtiene una mezcla de proteínas a partir de la expresión, se aíslan especies individuales por procedimientos convencionales. Los monómeros, dímeros y polímeros de orden superior se separan, por ejemplo, por cromatografía de exclusión de tamaño. Los heteropolímeros pueden separarse de los homopolímeros por cromatografía de inmunoafinidad utilizando anticuerpos específicos para dímeros individuales o por etapas de inmunoafinidad sucesivas utilizando anticuerpos específicos para polipéptidos de componentes individuales. Véase, en general, la patente U.S. nº 5.094.941. Los polímeros pueden ensamblarse también *in vitro* durante la incubación de polipéptidos componentes en condiciones adecuadas. En general, el montaje *in vitro* incluirá la incubación de la mezcla de proteínas en condiciones de desnaturalización y reducción seguidas de replegamiento y reoxidación de los polipéptidos a partir de homodímeros y heterodímeros. La recuperación y montaje de proteínas expresadas en las células bacterianas se da a conocer a continuación.

Las células de mamíferos cultivadas son hospedadores adecuados para su utilización en la presente invención. Los procedimientos para introducir ADN exógeno en células hospedadoras de mamífero incluyen la transfección mediada por el fosfato cálcico (Wigler *et al*., *Cell* 14:725, 1978; Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7:603, 1981: Graham y Van der Eb, *Virology* 52:456, 1973), la electroporación (Neumann *et al*., *EMBO J.* 1:841-845, 1982), la transfección mediada por DEAE-dextrano (Ausubel *et al*., *ibid.*) y la transfección mediada por liposomas (Felgner *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7, 1987; Mackey *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8027-31, 1988; Hawley-Nelson *et al*., *Focus* 15:73, 1993; Ciccarone *et al*., *Focus* 15:80, 1993). La producción de polipéptidos recombinantes en células de mamífero cultivadas se da a conocer, por ejemplo, por Levinson *et al*., patente U.S. nº 4.713.339; Hagen *et al*., patente U.S. nº 4.784.950; Palmiter *et al*., patente U.S. nº 4.579.821; y Ringold, patente U.S. nº 4.656.134. Las células adecuadas cultivadas de mamífero incluyen la COS-1 (ATTCC nº CRL 1650), COS-7 (ATCC nº CRL 1651), BHK (ATCC nº CRL 1632), BHK 570 (ATCC nº CRL 10314), 293 (ATCC nº CRL 1573; Graham *et al*., *J. Gen. Virol.* 36:59-72, 1977) y estirpes celulares de ovario de hámster chino (por ejemplo CHO-K1; ATCC nº CCL 61). Las estirpes celulares adecuadas adicionales son conocidas en la técnica y están disponibles en los depositarios públicos tales como la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Los activadores potentes de transcripción incluyen activadores de SV-40 o citomegalovirus. Véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 4.956.288. Otros activadores adecuados incluyen los de los genes de metalotioneína (patentes U.S. nº 4.579.821 y nº 4.601.978) y el activador tardío mayor del adenovirus. Los vectores de expresión para su utilización en células de mamífero incluyen pZP-1 y pZP-9, que han sido depositados en la American Type Culture Collection, Rockville, MD UEA con los números de registro 98669 y 98668, respectivamente.

La selección del fármaco se utiliza generalmente para seleccionar las células de mamífero cultivadas en las que se ha insertado el ADN extraño. Dichas células se denominan normalmente "transfectantes". Las células que han sido cultivadas en presencia del agente selectivo y son capaces de pasar el gen de interés a su descendencia se denominan "transfectantes estables". Un marcador seleccionable a título de ejemplo es un gen que codifica la resistencia al antibiótico neomicina. La selección se realiza en presencia de un fármaco de tipo neomicina, tal como G-418 o similar. Los sistemas de selección pueden utilizarse también para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, procedimiento denominado "ampliación". La ampliación se realiza cultivando los transfectantes en presencia de una baja concentración de agente selectivo y a continuación aumentando la cantidad de agente selectivo para seleccionar las células que producen grandes concentraciones de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionable ampliable a título de ejemplo es la dihidrofolato reductasa, que proporciona resistencia al metotrexato. También pueden utilizarse otros genes con resistencia al fármaco (por ejemplo, resistencia a la higromicina, resistencia a muchos fármacos, puromicina acetiltransferasa). Los marcadores alternativos que introducen un fenotipo alterado, tal como la proteína verde fluorescente o las proteínas de la superficie celular tales como CD4, CD8, MHC de clase I, la fosfatasa alcalina de la placenta pueden utilizarse para seleccionar células transfectadas a partir de células no transfectadas mediante métodos tales como clasificación por FACS o tecnología de separación de perlas magnéticas.

Pueden utilizarse como hospedadores otras células eucarióticas superiores, incluyendo las células de insecto, las células vegetales y las células de aves. La utilización de *Agrobacterium rhizogenes* como vector para expresar los genes en células vegetales ha sido estudiada por Sinkar *et al*., *J. Biosci.* (Bangalore) 11:47-58, 1987. La transformación de células de insecto y la producción de polipéptidos extraños en la presente memoria es dada a conocer por Guarino *et al*., patente U.S. nº 5.162.222 y publicación WIPO WO 94/06463.

Las células de insectos pueden infectarse con baculovirus recombinante, normalmente procedente del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV). Véase, King y Possee, *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, Londres, Chapman y Hall; O'Reilly *et al*., *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, Nueva York, Oxford University Press., 1994; y Richardson, ed., *Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, NJ, 1995. El baculovirus recombinante puede producirse también mediante la utilización de un sistema basado en transposones descrito por Luckow *et al*. (*J. Virol.* 67:4566-4579, 1993). Este sistema que utiliza vectores de transferencia, está disponible en el mercado en forma de kit (kit Bac-to-Bac™; Life Technologies, Rockville, MD). El vector de transferencia (por ejemplo, pFastBac1™; Life Technologies) contiene un transposón Tn7 para desplazar el ADN que codifica la proteína de interés en un genoma de baculovirus mantenido en *E. coli* como un plásmido largo denominado un "bácmido". Véase, Hill-Perkins y Possee, *J. Gen. Virol.* 71:971-976, 1990; Bonning *et al*., *J. Gen. Virol.* 75:1551-1556, 1994; y Chazenbalk y Rapoport, *J. Biol. Chem.* 270:1543-1549, 1995. Además, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión en el marco con ADN que codifica una extensión del polipéptido o una etiqueta de afinidad como se dio a conocer anteriormente. Utilizando técnicas conocidas en la materia, un vector de transferencia que contiene una secuencia que codifica a zvegf3 se transforma en células hospedadoras de *E. coli* y en las células se identifican bácmidos que contienen un gen lacZ interrumpido indicador de baculovirus recombinante. El ADN del bácmido que contiene el genoma del baculovirus recombinante se aísla, utilizando técnicas habituales y se utiliza para transfectar las células de *Spodoptera frugiperda*, tales como las células Sf9. El virus recombinante que expresa la proteína zvegf3 se produce posteriormente. Las existencias víricas recombinantes se preparan por los procedimientos utilizados habitualmente en la técnica.

Para la producción de proteínas, se utiliza virus recombinante para infectar las células hospedadoras, por lo general una estirpe celular procedente del gusano de la polilla de otoño, *Spodoptera frugiperda* (por ejemplo, células Sf9 o Sf21) o *Trichoplusia ni* (por ejemplo, células High Five™; Invitrogen, Carlsbad, CA). Véase, en general, Glick y Pasternak, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*, ASM Press, Washington, D.C., 1994. Véase también la patente U.S. nº 5.300.435. Se utilizan medios sin suero para cultivar y mantener las células. Las combinaciones de los medios adecuados son conocidas en la técnica y pueden obtenerse en los proveedores

comerciales. Las células se cultivan a una densidad de inoculación de aproximadamente 2-5 × 10^5 células hasta una densidad de 1-2 × 10^6 células, en cuyo tiempo se añade una solución madre vírica recombinante a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 a 10, más típicamente cerca de 3. Los procedimientos utilizados se describen en general en los manuales de laboratorio disponibles (por ejemplo, King y Possee, *ibid.*; Richardson, *ibid.*).

Las células de hongos, incluyendo las células de levaduras, también pueden utilizarse en la presente invención. Las especies de levadura de particular interés a este respecto incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*. Los procedimientos para transformar las células de *S. cerevisiae* con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de las mismas se dan a conocer, por ejemplo, por Kawasaki, patente U.S. nº 4.599.311; Kawasaki *et al*., patente U.S. nº 4.931.373; Brake, patente U.S. nº 4.870.008; Welch *et al*., patente U.S. nº 5.037.743 y Murray *et al*., patente U.S. nº 4.845.075. Las células transformadas se seleccionan por el fenotipo determinado por el marcador seleccionable, frecuentemente la resistencia a la droga o la capacidad para crecer en ausencia de un nutriente específico (por ejemplo, leucina). Un sistema de vector a título de ejemplo para su utilización en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema del vector *POT1* dado a conocer por Kawasaki *et al*. (patente U.S. nº 4.931.373), que permite seleccionar células transformadas por el crecimiento en medio que contiene glucosa. Los activadores y terminadores adecuados para su utilización en las levaduras incluyen los de los genes de la enzima glucolítica (véase, por ejemplo, Kawasaki, patente U.S. nº 4.599.311; Kingsman *et al*., patente U.S. nº 4.615.974; y Bitter, patente U.S. nº 4.977.092) y genes de alcohol deshidrogenasa. Véanse también las patentes U.S. nº 4.990.446; nº 5.063.154; nº 5.139.936 y nº 4.661.454. Los sistemas de transformación para otras levaduras, incluyendo *Hansenula polymorpha, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces fragilis, Ustilago maydis, Pichia pastoris, Pichia methanolice, Pichia guillemondii* y *Candida maltosa* son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Gleeson *et al*., *J. Gen. Microbiol.* 132:3459-3465, 1986; Cregg, patente U.S. nº 4.882.279; y Raymond *et al*., *Yeast* 14, 11-23, 1998. Las células de *Aspergillus* pueden utilizarse según los procedimientos de McKnight *et al*., patente U.S. nº 4.935.349. Los procedimientos para transformar *Acremonium chrysogenum* son dados a conocer por Sumino *et al*., patente U.S. nº 5.162.228. Los procedimientos para transformar *Neurospora* son dados a conocer por Lambowitz, patente U.S. nº 4.486.533. La producción de proteínas recombinantes en *Pichia methanolica* se da a conocer en las patentes U.S. nº 5.716.808, nº 5.736.383, nº 5.854.039 y nº 5.888.768.

Las células hospedadoras procarióticas, que incluyen cepas de la bacteria *Escherichia coli*, *Bacillus* y otros géneros son también células hospedadoras útiles en la presente invención. Las técnicas para transformar estos hospedadores y que expresan secuencias clonadas de ADN extraño en la presente memoria son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al*., *ibid.*). Cuando expresan un polipéptido zvegf3 en bacterias tales como *E. coli*, el polipéptido puede mantenerse en el citoplasma, típicamente como gránulos insolubles, o puede ser dirigido al espacio periplásmico por una secuencia de secreción bacteriana. En el caso anterior, se lisan las células y los gránulos se recuperan y se desnaturalizan utilizando, por ejemplo, isotiocianato de guanidina o urea. El polipéptido desnaturalizado puede a continuación replegarse y dimerizarse diluyendo el desnaturalizante, tal como por diálisis frente a una solución de urea y una combinación de glutatión reducido y oxidado, seguido de diálisis frente a una solución salina tamponada. Alternativamente, puede recuperarse la proteína del citoplasma en forma soluble y aislarse sin la utilización de desnaturalizantes. La proteína se recupera de la célula en forma de extracto acuoso, por ejemplo, en solución salina tamponada con fosfato. Para capturar la proteína de interés, el extracto se aplica directamente a un medio cromatográfico, tal como un anticuerpo inmovilizado o la columna Sepharose con heparina. Los polipéptidos segregados pueden recuperarse del espacio periplásmico en forma soluble y funcional destruyendo las células (por ejemplo, por tratamiento con ultrasonidos o choque osmótico) para liberar los contenidos del espacio periplásmico y recuperar la proteína, obviando de este modo la necesidad de desnaturalización y replegamiento.

La producción de las proteínas de fusión de zvegf3 en las células hospedadoras procarióticas es de particular interés. Una de dichas proteínas de fusión a título de ejemplo comprende un polipéptido de zvegf3 fusionado a la proteína que se une a la maltosa. Dichas fusiones pueden comprender además secuencias adicionales, tal como polihistidina para proporcionar la purificación por afinidad de la fusión del polipéptido. Puede también incluirse un punto de escisión enzimático (por ejemplo, un punto de escisión de trombina) para que permita la separación de los componentes zvegf3 y distinto de zvegf3 de la fusión.

Las células hospedadoras transformadas o transfectadas se cultivan según procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de las células hospedadoras seleccionadas. Una variedad de medios adecuados, incluyendo los medios definidos y los medios complejos, son conocidos en la técnica y generalmente incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. El medio puede contener también componentes tales como factores de crecimiento o suero, según se requiera. El medio de crecimiento generalmente seleccionará células que contienen el ADN añadido de forma exógena, por ejemplo, por selección del fármaco o deficiencia en un nutriente esencial que se enriquece con el marcador seleccionable transportado en el vector de expresión o cotransfectado en la célula hospedadora. Las células *P. methanolica*, por ejemplo, se cultivan en un medio que comprende fuentes adecuadas de carbono, nitrógeno y trazas de nutrientes a una temperatura entre aproximadamente 25ºC y 35ºC. Se proporcionan cultivos líquidos con suficiente aireación por medios convencionales, tal como agitación de pequeños matraces o rociado de fermentadores.

Los polipéptidos zvegf3 o los fragmentos de los mismos pueden prepararse también por síntesis química según los procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo la síntesis exclusiva en fase sólida, los procedimientos en fase sólida parcial, la condensación del fragmento o la síntesis en solución clásica. Véase, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149, 1963; Stewart *et al*., *Solid Phase Peptide Synthesis* (2ª edición), Pierce Chemical Co., Rockford,

IL, 1984; Bayer y Rapp, *Chem. Pept. Prot.* 3:3, 1986; y Atherton *et al*., *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1989.

Los complejos no covalentes que comprenden un polipéptido zvegf3 pueden prepararse incubando un polipéptido zvegf3 y un segundo polipéptido (por ejemplo, un polipéptido zvegf3 u otro péptido de la familia PDGF/VEGF) a pH casi fisiológico. En una reacción típica, los polipéptidos en una concentración de aproximadamente 0,1 a 0,5 μg/ml se incuban a pH≈7,4 en un tampón débil (por ejemplo, tampón fosfato o acetato 0,01 M); puede incluirse cloruro sódico a una concentración de aproximadamente 0,1 M. A 37ºC la reacción es esencialmente completa en 4 a 24 horas. Véase, por ejemplo, Weintraub *et al*., *Endocrinology* 101:225-235, 1997.

Los complejos covalentes pueden prepararse también aislando los polipéptidos del componente deseado y combinándoles *in vitro*. Los complejos covalentes que pueden prepararse de esta manera incluyen homodímeros de polipéptidos zvegf3, heterodímeros de dos polipéptidos zvegf3 diferentes y heterodímeros de un polipéptido de zvegf3 y un polipéptido de otro miembro de la familia de la familia VEGF/PDGF de proteínas. Los dos polipéptidos se mezclan conjuntamente en condiciones desnaturalizantes y reductoras, seguido de renaturalización de las proteínas por eliminación de los desnaturalizantes. La eliminación puede realizarse, por ejemplo, por diálisis o cromatografía de exclusión de tamaño para proporcionar el intercambio del tampón. Cuando se combinan dos polipéptidos diferentes, las proteínas renaturalizadas resultantes pueden formar homodímeros de los componentes individuales así como heterodímeros de los dos componentes de polipéptido. Véase, Cao *et al*., *J. Biol. Chem.* 271:3154-3162, 1996.

Dependiendo de la utilización deseada, los polipéptidos y proteínas de la presente invención pueden purificarse hasta ≥80% de pureza, hasta ≥90% de pureza, hasta ≥95% de pureza o hasta un estado farmacéuticamente puro, que es superior al 99,9% con respecto a las macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácido nucleicos, y libre de agentes infecciosos y pirógenos.

Las proteínas zvegf3 recombinantes (incluyendo los polipéptidos híbridos y las proteínas poliméricas) se purifican por procedimientos convencionales de purificación de proteínas, por lo general mediante una combinación de técnicas cromatográficas. Véase, en general, *Affinity Chromatography: Principles & Methods*, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia, 1988; y Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York, 1994. Las proteínas que comprenden una etiqueta por afinidad de polihistidina (por lo general aproximadamente 6 restos de histidina) se purifican por cromatografía de afinidad sobre una resina de quelato de níquel. Véase, por ejemplo, Houchuli *et al*., *Bio/Technol.* 6: 1321-1325, 1988. Además, el propio dominio del factor de crecimiento se une a la resina con níquel a pH 7,0-8,0 y fosfato Na 25 mM, NaCl 0,25 M. La proteína fijada puede eluirse con un gradiente de pH descendiente hasta pH 5,0 o un gradiente de imidazol. Las proteínas que comprenden una etiqueta glu-glu pueden purificarse por cromatografía de inmunoafinidad según los procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Grussenmeyer *et al*., *ibid.* Las fusiones de la proteína de fijación de maltosa se purifican en una columna de amilosa según los procedimientos conocidos en la técnica. Como se da a conocer con mayor detalle a continuación, la proteína del dominio del factor de crecimiento zvegf3 puede purificarse utilizando una combinación de cromatografía en un intercambiador catiónico fuerte seguido de cromatografía de interacción hidrófoba. Cuando la proteína se produce en células BHK el factor de crecimiento insulinoide que fija la proteína 4 (IGFBP4) se purifica conjuntamente con zvegf3 en estas condiciones. Puede obtenerse purificación adicional utilizando HPLC en fase inversa, intercambio aniónico en un intercambiador catiónico fuerte de aminas cuaternarias a baja fuerza iónica y pH de 7,0 a 9,0, o cromatografía de interacción hidrófoba en una resina de éster fenílico. Se ha descubierto que zvegf3 se une a varias matrices de colorante (por ejemplo, BLUE1, BLUE 2, ORANGE 1, ORANGE 3, y RED3 de Lexton Scientific, Signal Hill, CA) en PBS a pH 6-8, a partir del cual la proteína unida puede eluirse en NaCl 1-2 M, tampón de ácido bórico 20 mM a pH 8,8. La proteína eluída de RED3 puede pasarse sobre RED2 (Lexton Scientific) para separar los contaminantes restantes.

Utilizando los procedimientos conocidos en la técnica, pueden prepararse proteínas zvegf3 como monómeros o polímeros; glucosiladas o no glucosiladas; pegiladas o no pegiladas; y pueden o no incluir un resto de aminoácido inicial de metionina.

La invención proporciona además polipéptidos que comprenden una parte de una proteína portadora de un epítopo como se muestra en la SEC. ID. nº: 2. Un "epítopo" es una zona de una proteína a la que puede unirse un anticuerpo. Véase, por ejemplo, Geysen *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002, 1984. Los epítopos pueden ser lineales o de configuración, estando este último compuesto por zonas discontinuas de la proteína que forman un epítopo durante el plegamiento de la proteína. Los epítopos lineales son generalmente por lo menos restos de 6 aminoácidos de longitud. Los péptidos sintéticos relativamente cortos que simulan parte de una secuencia de proteína son de manera rutinaria capaces de producir un antisuero que reacciona con la proteína parcialmente simulada. Véase, Sutcliffe *et al*., *Science* 219:660-666, 1983. Los anticuerpos que reconocen epítopos lineales cortos son particularmente útiles en aplicaciones analíticas y de diagnóstico que emplean proteína desnaturalizada, tal como la inmunotransferencia Western (Tobin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4356, 1979). Los anticuerpos contra péptidos cortos pueden reconocer también proteínas en configuración natural y de este modo serán útiles para controlar la expresión de la proteína y el aislamiento de la proteína, y en la detección de proteínas zvegf3 en solución, tal como por ELISA o en estudios de inmunoprecipitación.

Los polipéptidos antigénicos portadores de epítopo de la presente invención son útiles para construir anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, que se unen específicamente a una proteína zvegf3. Los polipéptidos antigéni-

cos, portadores del epítopo contienen una secuencia de por lo menos seis, con frecuencia por lo menos nueve, más a menudo de 15 a aproximadamente 30 restos de aminoácido contiguos de una proteína zvegf3 (por ejemplo, SEC. ID. nº: 2). Están incluidos los polipéptidos que comprenden una porción mayor de una proteína zvegf3, es decir, de 30 a 50 restos hasta la secuencia completa. Resulta preferido que la secuencia de aminoácidos del polipéptido portador del epítopo se seleccione para proporcionar solubilidad sustancial en disolventes acuosos, esto es la secuencia incluye restos relativamente hidrófobos, y los restos hidrófobos se evitan sustancialmente. Dichas zonas incluyen los restos 43 a 48, 96 a 101, 97 a 102, 260 a 265 y 330 a 335 de la SEC. ID. nº: 2. Como se mencionó anteriormente, generalmente resulta preferido utilizar péptidos algo más largos como inmunógenos, tal como un péptido que comprende los restos 80 a 104, 299 a 314 y 299 a 326 de la SEC. ID. nº: 2. Este último péptido puede prepararse con un resto cys en el terminal N adicional para facilitar el acoplamiento.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpos" incluye los anticuerpos policlonales, los anticuerpos policlonales purificados por afinidad, los anticuerpos monoclonales y los fragmentos que se unen al antígeno, tales como los fragmentos proteolíticos $F(ab')_2$ y Fab. Los anticuerpos intactos modificados genéticamente o los fragmentos, tales como los anticuerpos híbridos, los fragmentos Fv, los anticuerpos monocatenarios y similares, así como los péptidos y polipéptidos sintéticos que se unen al antígeno, están también incluidos. Los anticuerpos no humanos pueden humanizarse injertando las RCD no humanas en la retícula humana y zonas constantes o incorporando los dominios variables completos no humanos (opcionalmente "camuflándolos" con una superficie pseudohumana por sustitución de los restos expuestos, en los que el resultado es un anticuerpo "chapeado"). En algunos casos, los anticuerpos humanizados pueden conservar restos no humanos dentro de los dominios del armazón de la zona variable humana para aumentar las características de fijación apropiadas. Mediante los anticuerpos humanizantes, puede aumentarse la vida media biológica, y se reduce el potencial para reacciones inmunitarias adversas durante la administración a los seres humanos. Los anticuerpos monoclonales pueden también producirse en ratones que han sido alterados genéticamente para producir anticuerpos que tienen una estructura humana.

Los procedimientos para preparar y aislar anticuerpos policlonales y monoclonales son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Cooligan, *et al*., (eds.), *Current Protocols in Immunology*, National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook *et al*., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor, NY, 1989; y Hurrell, J. G. R. (ed.), *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press, Inc., Boca Ratón, FL, 1982. Como resulta evidente para cualquier experto en la materia, los anticuerpos policlonales pueden generarse a partir de la inoculación de una variedad de animales de sangre caliente tales como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones y ratas con un polipéptido zvegf3 o un fragmento del mismo. La inmunogenicidad de un polipéptido zvegf3 puede aumentarse mediante la utilización de un adyuvante, tal como alúmina (hidróxido de aluminio) o el adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para la inmunización incluyen también polipéptidos de fusión, tales como las fusiones de zvegf3 o una porción de la misma con un polipéptido de inmunoglobulina o con una proteína que se fija a la maltosa. Si la parte del polipéptido es "haptenoide", dicha parte puede unirse o ligarse con ventaja a un vehículo macromolecular (tal como la hemocianina de la lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o la vacuna contra el tétanos) para inmunización.

Las técnicas alternativas para generar o seleccionar anticuerpos incluyen la exposición *in vitro* de linfocitos a la proteína o péptido zvegf3 y la selección del anticuerpo presenta bancos en el fago o vectores similares (por ejemplo, mediante la utilización de la proteína o péptido zvegf3 inmovilizada o marcada). Las técnicas para crear e identificar dichos bancos de presentación del péptido aleatorios son conocidas en la materia (Ladner *et al*., patente U.S. nº 5.223.409; Ladner *et al*., patente U.S. nº 4.946.778; Ladner *et al*., patente U.S. nº 5.403.484 y Ladner *et al*., patente U.S. nº 5.571.698) y los bancos de presentación del péptido aleatorios y los kits para la identificación de dichos bancos están disponibles en el mercado, por ejemplo en Clontech Laboratories (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Los bancos aleatorios de presentación de péptido pueden cribarse utilizando las secuencias de zvegf3 dadas a conocer en la presente memoria para identificar proteínas que se unen a zvegf3. Estas "proteínas de fijación", que interactúan con polipéptidos zvegf3, pueden utilizarse para células de etiquetado o para aislar polipéptidos homólogos por purificación por afinidad o pueden conjugarse directa o indirectamente con fármacos, toxinas, radionucleidos y similares. Estas proteínas de fijación pueden utilizarse también en métodos analíticos, tales como para cribar bancos de expresión y neutralizar la actividad; en ensayos de diagnóstico, tal como para la determinación de los niveles en circulación de polipéptidos; para detectar o cuantificar polipéptidos solubles como marcadores de patologías o enfermedades subyacentes; y como antagonistas de zvegf3 para bloquear la fijación de zvegf3 y la transducción de la señal *in vitro* e *in vivo*.

Los anticuerpos se determinan para que se fijen específicamente si se unen a un polipéptido, péptido o epítopo de zvegf3 con una afinidad por lo menos 10 veces mayor que la afinidad de unión para controlar el polipéptido o proteína (distinto de zvegf3). A este respecto, un "polipéptido distinto de zvegf3" incluye las moléculas VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF, PDGF-A y PDGF-B relacionadas, pero excluye los polipéptidos zvegf3 de especies no humanas. Debido al alto nivel de la secuencia de aminoácidos esperado entre los ortólogos de zvegf3, los anticuerpos específicos para zvegf3 humano pueden también unirse a zvefg3 de otras especies. La afinidad de unión de un anticuerpo puede ser determinada fácilmente por cualquier experto en la materia, por ejemplo, por análisis Scatchard (Scatchard, G., *Ann. NY Acad. Sci.* 51:660-672, 1949). Los procedimientos para identificar y aislar anticuerpos específicos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Paul (ed.), *Fundamental Immunology*, Raven Press, 1993; Getzoff *et al*., *Adv. in Immunol.* 43:1-98, 1988; Goding, J.W. (ed.), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press Ltd., 1996; Benjamin *et al*., *Ann. Rev. Immunol.* 2:67-101, 1984.

Una variedad de ensayos conocidos por los expertos en la materia puede utilizarse para detectar anticuerpos que se unen específicamente a proteínas o péptidos zvegf3. Se describen ensayos a título de ejemplo con detalle en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Ejemplos representativos de dichos ensayos incluyen: inmunoelectroforesis concurrente, radioinmunoanálisis, radioinmunoprecipitación, ensayo inmunorsorbente con enzima ligada (ELISA), transferencia de manchas o ensayo de transferencia Western, ensayo de inhibición o competencia y ensayo en sandwich. Además, en los anticuerpos pueden identificarse la unión a la proteína o polipéptido natural frente a la proteína o polipéptido zvegf3 mutante.

Los anticuerpos contra zvefg3 pueden utilizarse para etiquetar células que expresan a zvegf3; para aislar zvegf3 mediante purificación por afinidad; para análisis de diagnóstico para determinar los niveles en circulación de polipéptidos zvegf3; para detectar o cuantificar zvegf3 soluble como marcador de patología o enfermedad subyacente; en los métodos analíticos que emplean FACS; para cribar bancos de expresión; para generar anticuerpos antidiotípicos; y como anticuerpos neutralizantes o como antagonistas para bloquear la actividad de zvegf3 *in vitro* e *in vivo*. Las etiquetas o marcadores directos adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares; etiquetas o marcadores indirectos pueden presentar la utilización de biotina-avidina u otro par complemento/anticomplemento como productos intermedios. Los anticuerpos pueden también conjugarse directa o indirectamente con fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y estos conjugados utilizarse para el diagnóstico *in vivo* o aplicaciones terapéuticas. Además, los anticuerpos contra zvegf3 o los fragmentos de los mismos pueden utilizarse *in vitro* para detectar zvegf3 desnaturalizada o fragmentos de la misma en ensayos, por ejemplo, transferencias Western u otros ensayos conocidos en la técnica. Los anticuerpos pueden utilizarse también para dirigir un grupo terapéutico o de diagnóstico acoplado a células que expresan zvegf3 o receptores de zvegf3.

Para algunas aplicaciones (por ejemplo, determinadas aplicaciones terapéuticas) resulta preferido utilizar anticuerpos neutralizantes. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "anticuerpo neutralizante" indica un anticuerpo que inhibe por lo menos el 50% de la actividad biológica del antígeno afín cuando el anticuerpo se añade a un acceso molar de 1.000 veces. Los expertos en la materia apreciarán que la actividad neutralizante mayor es algunas veces deseable y los anticuerpos que proporcionan el 50% de inhibición a un acceso de 100 veces o 10 veces molar pueden emplearse ventajosamente.

La actividad de las proteínas zvegf3 y antagonistas de las mismas pueden medirse *in vitro* utilizando células cultivadas o *in vivo* administrando moléculas de la invención reivindicada para un modelo animal apropiado. Las células diana para su utilización en ensayos de actividad de zvefg3 incluyen las células vasculares (especialmente las células endoteliales y las células del músculo liso), las células hematopoyéticas (mieloides y linfoides), las células hepáticas (incluyendo los hepatocitos, las células endoteliales perforadas, las células Kupffer y las células Ito), fibroblastos (incluyendo los fibroblastos dérmicos humanos y los fibroblastos pulmonares), las células neuritas (incluyendo los astrocitos, las células gliales, las células dendríticas y las células PC-12), las células Schwann, las células de los pulmones del feto, sinoviocitos articulares, pericitos, condrocitos, oligodentrocitos, osteoblastos y otras células que expresan los receptores PDGF alfa.

En las proteínas zvegf3 puede analizarse la actividad de unión del receptor por una variedad de procedimientos bien conocidos en la técnica, incluyendo los ensayos de competencia del receptor (Bowen-Pope y Ross, *Methods Enzymol.* 109:69-100, 1985), la utilización de receptores solubles y la utilización de receptores producidos como proteínas de fusión de IgG (patente U.S. nº 5.750.375). Los ensayos de fijación del receptor pueden realizarse en las estirpes celulares que contienen receptores de la superficie celular conocidos para evaluación. Los receptores pueden presentarse de forma natural en la célula, o pueden ser receptores recombinantes expresados por las células modificadas genéticamente. Los tipos de células que son capaces de unirse a zvegf3 pueden identificarse mediante la utilización de conjugados zvegf3-toxina, tales como los conjugados de una proteína zvegf3 y saporina. La fijación del conjugado zvegf3-toxina por las células, ya sea en el cultivo tisular, en cultivos de órganos, o medios que permitan la incorporación del conjugado en la célula. Una vez en el interior la saporina celular tiene un efecto tóxico sobre la célula, destruyéndola de este modo. Esta actividad puede utilizarse para identificar tipos de células que pueden unirse e interiorizar zvegf3. Además de permitir la identificación de tipos de células responsables, pueden utilizarse conjugados de toxina en estudios *in vivo* para identificar órganos y tejidos donde zvegf3 presenta actividad biológica buscando la patología en el animal después de la inyección del conjugado.

La actividad de las proteínas zvegf3 puede medirse *in vitro* utilizando células cultivadas. La actividad mitógena puede medirse utilizando ensayos conocidos, que incluyen los ensayos de incorporación de ^{3}H-timidina (descrita por, por ejemplo, Raines y Ross, *Methods Enzymol.* 109:749-773, 1985 y Wahl *et al*., *Mol. Cell Biol.* 8:5016-5025, 1988), ensayos de incorporación de colorante (descritos, por ejemplo, por Mosman, *J. Immunol. Meth.* 65:55-63, 1983 y Raz *et al*., *Acta Trop.* 68:139-147, 1997) o recuentos de células. Los ensayos de mitogénesis adecuados miden la incorporación de ^{3}H-timidina en (1) cultivos confluentes al 20% para buscar la capacidad de las proteínas zvegf3 para estimular más las células proliferantes, y (2) las células latentes ayudan en la confluencia durante 48 horas a buscar la capacidad de las proteínas zvegf3 para superar la inhibición del crecimiento producida por contacto. Los ensayos de incorporación de colorante adecuados incluyen la medición de la incorporación del colorante Alamar azul (Raz *et al*., *ibid*.) en células diana. Véase también, Gospodarowicz *et al*., *J. Cell. Biol.* 70:395-405, 1976; Ewton y Florini, *Endocrinol.* 106:577-583, 1980; y Gospodarowicz *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7311-7315, 1989. La diferenciación celular puede ensayarse utilizando células precursoras adecuadas que pueden producirse para diferenciarse en un fenotipo más maduro. Por ejemplo, las células endoteliales y las células hematopoyéticas son derivadas de una célula ancestral

común, el hemangioblasto (Chol *et al*., *Development* 125:725-732, 1998). Pueden utilizarse también células madre mesenquimáticas para medir la capacidad de la proteína zvegf3 para estimular la diferenciación en los osteoblastos. La diferenciación está indicada por la expresión de la osteocalcina, la capacidad de las células para mineralizar y la expresión de la fosfatasa alcalina, todo lo cual puede medirse por procedimientos de rutina conocidos en la técnica. Los efectos de las proteínas zvegf3 o del crecimiento de la célula tumoral y la metástasis pueden analizarse utilizando el modelo de carcinoma pulmonar de Lewis, por ejemplo tal como describen Cao *et al*., *J. Exp. Med.* 182:2069-2077, 1995. La actividad de las proteínas zvegf3 o de las células de origen neural puede analizarse utilizando ensayos para medir los efectos sobre el crecimiento de las neuritas.

La actividad de zvegf3 puede detectarse también utilizando ensayos diseñados para medir la producción inducida por zvegf3 de uno o más factores de crecimiento u otras macromoléculas. Dichos ensayos incluyen aquellos para la determinación de la presencia del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor alfa de crecimiento transformante (TGFα), interleucina-6 (IL-6), VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF) y angiogenina. Los ensayos adecuados incluyen los ensayos de mitogénesis utilizando células diana responsables para la macromolécula de interés, ensayos de fijación del receptor, ensayos de fijación con competencia, ensayos inmunológicos (por ejemplo, ELISA) y otros formatos conocidos en la técnica. La secreción de metaloproteasa se mide en los fibroblastos dérmicos humanos primarios tratados, sinoviocitos y condrocitos. Las concentraciones relativas de colagenasa, gelatinasa y estromalisina producidas en respuesta a cultivar la presencia de la proteína zvegf3 se miden utilizando geles de zimogramo (Loita y Stetler-Stevenson, *Cancer Biology* 1:96-106, 1990). La síntesis de procolágeno/colágeno por los fibroblastos dérmicos y condrocitos en respuesta a la proteína de la prueba se mide utilizando la incorporación de ^{3}H-prolina en colágeno naciente segregado. El colágeno marcado con ^{3}H se observa por SDS-PAGE seguido de autorradiografía (Unemori y Amento, *J. Biol. Chem.* 265: 10681-10685, 1990). La secreción de glucosaminoglucano (GAG) de fibroblastos dérmicos y condrocitos se mide utilizando un ensayo de fijación con un colorante azul de 1,9-dimetilmetileno (Farndale *et al*., *Biochim. Biophys. Acta* 883:173-177, 1986). Los ensayos con colágeno y GAG se realizan también en presencia de IL-1β o de TGF-β para examinar la capacidad de la proteína zvegf3 para modificar las respuestas creadas para estas citocinas.

Se realizan ensayos de activación de monocitos (1) para buscar la capacidad de las proteínas zvegf3 de estimular más la activación de monocitos, y (2) para examinar la capacidad de las proteínas zvegf3 para modular la activación de monocitos inducida por acoplamiento o inducida por la endotoxina (Fuhlbrigge *et al*., *J. Immunol.* 138:3799-3802, 1987). Las concentraciones de IL-1β y TNFα producidas en respuesta a la activación se miden por ELISA (Biosource, Inc. Camarillo, CA). Las células de monocitos/macrófagos, en virtud de CD14 (receptor de LPS), son exquisitamente sensibles a la endotoxina, y las proteínas con concentraciones moderadas de actividad similar a la endotoxina activarán estas células.

La actividad hematopoyética de las proteínas zvegf3 puede analizarse en varias células hematopoyéticas en cultivo. Los ensayos adecuados incluyen ensayos con médula ósea primaria o colonias de leucocitos de sangre periférica y después la etapa de ensayos de colonias restringidos por el linaje, que son conocidos en la técnica (por ejemplo, Holly *et al*., publicación WIPO WO 95/21920). Las células de la médula colocadas en un medio semisólido adecuado (por ejemplo, metilcelulosa al 50% que contiene suero bovino fetal al 15%, albúmina de suero bovino al 10% y una mezcla de antibiótico PSN al 0,6%) se incuban en presencia del polipéptido de la prueba, a continuación se examinan al microscopio la formación de colonias. Como referencias se utilizan factores hematopoyéticos conocidos. La actividad mitógena de los polipéptidos zvegf3 sobre las estirpes celulares hematopoyéticas puede medirse utilizando análisis de incorporación de ^{3}H-timidina, análisis de incorporación del colorante o recuentos celulares (Raines y Ross, *Methos Enzymol.* 109:749-773, 1985 y Foster *et al*., patente U.S. nº 5.641.655). Por ejemplo, las células se cultivan en placas de microvaloración multipocillo. Estas muestras y ^{3}H-timidina se añaden, y las células se incuban durante la noche a 37ºC. Los contenidos de los pocillos se transfieren a filtros, se secan y se hace el recuento para determinar la incorporación del marcador. La proliferación celular puede medirse también utilizando un ensayo colorimétrico basado en la destrucción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Mosman, *ibid.*). En resumen, se añade una solución de MTT a 100 μl de células de ensayo, y las células se incuban a 37ºC. Después de 4 horas, se añaden 200 μl de HCl 0,04 N en isopropanol, se mezcla la solución y se mide la absorbancia de la muestra a 570 nm.

La migración celular se ensaya esencialmente como describen Kähler *et al*. (*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17:932-939, 1997). Una proteína es considerada quimiotáctica si provoca la migración de las células de una zona de baja concentración en proteínas hasta un área de alta concentración en proteínas. El análisis se realiza utilizando cámaras de Boyden modificadas con una membrana de poliestireno que separa las dos cámaras (Transwell; Corning Costar Corp.). La muestra de ensayo, se diluye en un medio que contiene BSA al 1%, se añade a la cámara inferior de una placa de 24 pocillos que contiene Transwells. Las células se colocan a continuación en la inserción Transwell que ha sido pretratada con gelatina al 0,2%. Se mide la migración celular después de 4 horas de incubación a 37ºC. Las células que no migran se enjugan en la parte superior de la membrana Transwell y las células unidas a la cara inferior de la membrana se fijan y se tiñen con violeta cristal al 0,1%. Las células teñidas se extraen a continuación con ácido acético al 10% y se mide la absorbancia a 600 nm. Se calcula a continuación la migración a partir de una curva de calibración patrón.

La migración de las células del músculo liso (SMC) puede medirse en el ensayo de explante aórtico de Kenagy *et al*. (*Circulation* 96:3555-3560, 1997). En un protocolo típico, se preparan explantes de aortas torácicas de mandril, y se aísla el medio interno y se tritura en piezas de 1 mm^{2}. Se colocan los explantes en matraces para cultivo tisular

que contienen DMEM enriquecido con 5 μg/ml de transferrina, 6 μg/ml de insulina, 1 mg/ml de ovoalbúmina y el compuesto de ensayo. El número de células migrantes se determina diariamente.

La actividad de adhesión celular se ensaya esencialmente como describe LaFleur *et al*. (*J. Biol. Chem.* 272:32798-32803, 1997). En resumen, las placas de microvaloración se recubren con la proteína de ensayo, se bloquean los puntos no específicos con BSA, y las células (tales como las células del músculo liso, leucocitos o las células endoteliales) se colocan en placas a una densidad de aproximadamente entre 10^4 y 10^5 células/pocillo. Se incuban los pocillos a 37ºC (por lo general durante aproximadamente 60 minutos), a continuación las células no adherentes se eliminan mediante lavado suave. Se cuantifican las células adherentes por procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante lavado con violeta cristal, lisando las células y determinando la densidad óptica del lisado). Los pocillos de referencia se recubren con una proteína adhesiva conocida, tal como fibronectina o vitronectina.

Los ensayos de actividad angiógena son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el efecto de las proteínas zvegf3 sobre las células endoteliales primordiales en la angiogénesis puede determinarse en un ensayo de angiogénesis de membrana corialantoica de pollo (Leung, *Science* 246:1306-1309, 1989; Ferrara, *Ann. NY Acad. Sci.* 752:246-256, 1995). En resumen se corta una pequeña ventana en la cáscara de un huevo fecundado de ocho días y se aplica una sustancia de ensayo a la membrana corialantoica. Después de 72 horas, se examina la neurovascularización en la membrana. Otros ensayos adecuados incluyen la microinyección del embrión de codorniz (*Cotumix cotumix japonica*) en etapa precoz descrita por Drake *et al*. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7657-7661, 1995); el modelo de roedor de neovascularización de la córnea descrito por Muthukkaruppan y Auerbach (*Science* 205:1416-1418, 1979), en el que una sustancia de ensayo se inserta en una bolsa en la córnea de un ratón consanguíneo; y el ensayo de la bolsa de la mejilla del hámster (Höckel *et al*., *Arch. Surg.* 128:423-429, 1993). La producción de permeabilidad vascular, que es indicadora de la actividad angiógena, se mide en los ensayos diseñados para detectar la pérdida de proteína del sistema vascular del animal de ensayo (por ejemplo, ratón o cobaya) tras la administración de un compuesto de ensayo (Miles y Miles, *J. Physiol.* 118:228-257, 1952; Feng *et al*., *J. Exp. Med.* 183:1981-1986, 1996). Los ensayos *in vitro* de actividad angiógena incluyen el modelo de matriz de gel de colágeno tridimensional (Pepper *et al*., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 189:824-831, 1992 y Ferrara *et al*., *Ann. NY Acad. Sci.* 732:246-256, 1995), que mide la formación de estructuras similares a tubos por las células endoteliales microvasculares; y los modelos de matrigel (Grant *et al*., "Angiogenesis as a component of epithelial-mesenchymal interactions" en Golberg y Rosen, *Epithelial-Mesenchymal Interaction in Cancer,* Birkhäuser Verlag, 1995, 235-248; Baatout, *Anticancer Research* 17:451-456, 1997),que se utilizan para determinar los efectos sobre la migración celular y la formación del tubo por células endoteliales sembradas en matrigel, un extracto de membrana basal enriquecido en laminina. Los ensayos de angiogénesis pueden realizarse en presencia y ausencia de VEGF para evaluar posibles efectos combinatorios. Puede utilizarse VEGF como referencia en análisis *in vivo*.

La actividad de zvegf3 puede medirse también utilizando ensayos que miden la orientación y crecimiento del axón. Resultan de particular interés los ensayos que indican cambios en los modelos de crecimiento de neuronas, por ejemplo los dados a conocer en Hastings, publicación WIPO WO 97/29189 y Walter *et al*., *Development* 101:685-96, 1987. Los ensayos para medir los efectos sobre el crecimiento de las neuronas son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, el ensayo C (por ejemplo, Raper y Kapfhammer, *Neuron.* 4:21-9, 1990 y Luo *et al*., *Cell* 75:217-27, 1993) puede utilizarse para determinar la actividad de colapso de zvegf3 sobre las neuronas en crecimiento. Otros procedimientos que pueden evaluar los efectos inducidos por zvegf3 sobre la ampliación de neuritas son también conocidos. Véase, Goodman, *Annu. Rev. Neurosci.* 19:341-77, 1996. Los medios condicionados de las células que expresan una proteína zvegf3, un agonista zvegf3 o un antagonista zvegf3 o los agregados de dichas células, pueden colocarse en una matriz de gel cerca de las células nerviosas adecuadas, tales como los ganglios de la espina dorsal (DRG) o los explantes de los ganglios simpáticos, que se han cultivado con factor de crecimiento de nervios. En comparación con las células de referencia, los cambios provocados por zvegf3 en el crecimiento de las neuronas puede medirse (como se da a conocer, por ejemplo, por Messersmith *et al*., *Neuron* 14:949-59, 1995 y Pluschel *et al*., *Neuron* 14:941-8, 1995). Asimismo pueden medirse las excrecencias de las neuritas utilizando suspensiones celulares neuronales desarrolladas en presencia de moléculas de la presente invención. Véase, por ejemplo, O'Shea *et al*., *Neuron.* 7:231-7, 1991 y DeFreitas *et al*., *Neuron* 15:333-43, 1995.

Las actividades biológicas de las proteínas zvegf3 pueden estudiarse en animales no humanos por administración de proteína exógena, por expresión de polinucleótidos que codifican a zvegf3 y por supresión de la expresión de zvegf3 endógena por técnicas antisentodo de inactivación génica. Las proteínas zvegf3 pueden administrarse o expresarse individualmente, en combinación con otras proteínas zvegf3 o en combinación con proteínas que no sean vegf3, incluyendo otros factor de crecimiento (por ejemplo, otros VEGF, PIGF o PDGF). Por ejemplo, una combinación de polipéptidos zvegf3 (por ejemplo, una combinación de $zvegf3_{15-163}$, $zvegf3_{15-230}$ y $zvegf3_{235-345}$) puede administrarse a un animal de ensayo o expresarse en el animal. En los animales de ensayo se controlan los cambios en parámetros tales como los signos clínicos, el peso corporal, los recuentos de células sanguíneas, la analítica clínica, la histopatología y similares.

Los efectos de los antagonistas zvegf3 y zvegf3 sobre la fibrosis hepática y renal pueden determinarse en modelos animales conocidos, tales como el modelo del ratón db/db dados a conocer por Cohen *et al*., *Diabetologia* 39:270-274, 1996 y Cohen *et al*., *J. Clin. Invest.* 95:2338-2345, 1995 o en modelos de animales transgénicos (Imal *et al*., *Contrib. Nephrol.* 107:205-215, 1994).

Los efectos sobre la fibrosis pueden también ensayarse en un modelo de ratón que utiliza bleomicina. El agente de quimioterapia bleomicina es un conocido agente etiológico de la fibrosis pulmonar en seres humanos y puede provocar neumopatía intersticial en ratones, incluyendo un aumento del número de fibroblastos, de posición de colágeno aumentada y remodelado de la matriz desregulada. Se administra bleomicina a ratones C57BI/6 mediante una minibomba osmótica durante 1 semana. Sigue un periodo de inflamación, con toxicidad cutánea que comienza aproximadamente 4 a 7 días después de la administración de bleomicina y que continúa durante aproximadamente una semana, tras la cual los ratones parecen volver a recobrar la salud. Aproximadamente 3 a 4 semanas después de la finalización de la administración de bleomicina, se sacrifican los ratones, y se examinan histológicamente en los pulmones los signos de fibrosis. La puntuación se basa en la extinción de las lesiones fibrósicas pulmonares y en su gravedad. Se analiza la láctico deshidrogenasa en el suero, enzima intracelular que se libera en la circulación en el momento de la muerte celular o lesión generales. Se analiza en el tejido pulmonar la hidroxiprolina como medida de deposición de colágeno.

La estimulación del crecimiento colateral coronario puede medirse en modelos animales conocidos, incluyendo un modelo de conejo de isquemia del miembro periférico y de isquemia de la extremidad trasera y un modelo de cerdo de isquemia miocárdica crónica (Ferrara *et al*., *Endocrine Reviews* 18:4-25, 1997). Se analizan las proteínas zvegf3 en presencia y ausencia de VEGF, las angiopoyetinas y FGF básico para determinar los efectos combinatorios. Estos modelos pueden modificarse mediante la utilización de adenovirus o de ADN desnudo para la administración génica como se da a conocer con mayor detalle a continuación, dando como resultado la expresión local de la(s) proteína(s) de la prueba.

La eficacia de los polipéptidos zvegf3 en la estimulación de la cicatrización de heridas puede ensayarse en modelos animales. Uno de dichos modelos es el modelo de incisión de la piel lineal de Mustoe *et al*. (*Science* 237: 1333, 1987). En un procedimiento típico, se realiza una incisión de 6 cm en la piel dorsal de una rata adulta, a continuación se cierra con grapas tejidas. Las sustancias y referencias de la prueba (en solución, gel o en forma de polvo) se aplican antes del cierre principal. La administración con frecuencia estará limitada a una sola aplicación, aunque pueden hacerse aplicaciones adicionales en días sucesivos mediante inyección cuidadosa en varios puntos bajo la incisión. La intensidad de la rotura de la herida se evalúa entre los días 3 y 21 después de la cicatrización. En un segundo modelo, se realizan escisiones múltiples, pequeñas, de espesor completo en la oreja de un conejo. El cartílago en la oreja entablilla la herida, eliminando la variable de contracción de la herida en la evaluación del cierre. Se aplican tratamientos y controles experimentales. La geometría y anatomía del punto de la herida permite la cuantificación fiable del crecimiento interno de la célula y la migración epitelial, así como el análisis cuantitativo de la bioquímica de las heridas (por ejemplo, contenido en colágeno). Véase, Mustoe *et al*., *J. Clin. Invest.* 87:684, 1991. El modelo de oreja de conejo puede modificarse para crear un medio de herida isquémica, que recuerda íntimamente la situación clínica (Ahn *et al*., *Ann. Plast. Surg.* 24:17, 1990). En un tercer modelo, se evalúa la cicatrizacion de heridas en la piel en parte del espesor en cerdos o cobayas (LeGrand *et al*., *Growth Factors* 8:307, 1993). Se aplican tratamientos experimentales diariamente sobre o bajo los vendajes. Siete días después de la herida, se determina el espesor del tejido de granulación. Este modelo es particularmente útil para estudios de respuesta a la dosis, ya que es más cuantitativo que otros modelos *in vivo* de cicatrización de heridas. Puede utilizarse también un modelo de escisión en todo el espesor. En este modelo, se extrae la epidermis y la dermis bajo el panículo carnoso en roedores o la grasa subcutánea en cerdos. Se aplican tópicamente tratamientos experimentales sobre o bajo un vendaje, y puede aplicarse diariamente si se desea. La herida se cierra mediante una combinación de contracción y excrecencia y proliferación celular. Los puntos finales mensurables incluyen el tiempo para el cierre de la herida, la puntuación histológica y los parámetros bioquímicos del tejido herido. Los modelos de cicatrización de heridas modificados son también conocidos en la técnica (por ejemplo, Cromack *et al*., *Surgery* 113:36, 1993; Pierce *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2229, 1989; Greenhalgh *et al*., *Amer. J. Pathol.* 136:1235, 1990). La demora o prolongación del proceso de cicatrización de la herida puede provocarse farmacológicamente por tratamiento con esteroides, irradiación de la zona herida o por cuadros clínicos relacionados (por ejemplo, la diabetes). Las incisiones lineales o las escisiones en todo el espesor se utilizan más frecuentemente como herida experimental. Los puntos finales son como se describió anteriormente para cada tipo de herida. Pueden utilizarse implantes subcutáneos para evaluar la actuación de los compuestos en las etapas iniciales de cicatrización de la herida (Broadley *et al*., *Lab. Invest.* 61:571, 1985; Sprugel *et al*., *Amer. J. Pathol.* 129: 601, 1987). Se preparan implantes en un recipiente poroso, relativamente no inflamatorio (por ejemplo, esponjas de polietileno o implantes de politetrafluoroetileno expandido rellenos con colágeno bovino) y colocados por vía subcutánea en ratones o ratas. El interior del implante está vacío de células, produciendo un "espacio de la herida" que está bien definido y es separable del tejido preexistente. Esta disposición permite la evaluación del influjo celular y del tipo de célula así como la medición de la vasculogénesis, angiogénesis y producción de matriz extracelular.

La expresión de las proteínas zvegf3 en animales proporciona modelos para el estudio de los efectos biológicos o la sobreproducción o la inhibición de la actividad de las proteínas *in vivo*. Los polinucleótidos que codifican a zvegf3 pueden introducirse en animales de ensayo, tales como ratones, utilizando vectores víricos o ADN desnudo, o pueden producirse animales transgénicos. En general, una proteína zvegf3 se expresa con un péptido secretor. Los péptidos secretores adecuados incluyen el péptido secretor zvegf3 (por ejemplo, restos 1 a 14 de la SEC. ID. nº: 2) y péptidos secretores heterólogos. Un péptido secretor heterólogo a título de ejemplo es el de un activador del plasminógeno del tejido humano (t-PA). El péptido secretor t-PA puede modificarse para reducir la escisión proteolítica indeseada como se da a conocer en la patente U.S. nº 5.641.655.

Las proteínas de la presente invención pueden analizarse *in vivo* utilizando sistemas de administración víricos. Los virus a título de ejemplo incluyen adenovirus, herpesvirus, retrovirus, virus de vacuna y virus adenoasociados (AAV). Para estudios, véase Becker *et al*., *Meth. Cell Biol.* 43:161-89, 1994; y Douglas y Curiel, *Science & Medicine*

4:44-53, 1997. El adenovirus (estudiado por Becker *et al*., *Meth. Cell Biol.* 43:161-89, 1994; y Douglas y Curiel, *Science & Medicine* 4:44-53, 1997) ofrece varias ventajas. El adenovirus puede (i) contener inserciones de ADN relativamente grandes; (ii) desarrollarse hasta un valor elevado; (iii) infectar un amplia gama de tipos de células de mamífero; y (iv) utilizarse con muchos activadores diferentes incluyendo activadores omnipresentes, específicos para el tejido y regulables. Debido a que los adenovirus son estables en el torrente sanguíneo, pueden administrarse por inyección intravenosa. Si el sistema de administración adenovírico tiene una eliminación del gen E1, el virus no puede replicarse en las células hospedadoras. Sin embargo, el tejido del hospedador (por ejemplo, hígado) expresará y procesará (y, si está presente una secuencia señal secretora, segregará) la proteína heteróloga. Las proteínas segregadas se introducirán en la circulación en el hígado muy vascularizado, y pueden determinarse los efectos sobre el animal infectado. Los vectores adenovíricos que contienen varias eliminaciones de genes víricos pueden utilizarse en un intento de reducir o eliminar las respuestas inmunitarias para el vector. Dichos adenovirus son E1 eliminado, y además contienen eliminaciones de E2A o E4 (Lusky *et al*., *J. Virol.* 72:2022-2032, 1998; Raper *et al*., *Human Gene Therapy* 9:671-679, 1998). Además, la eliminación de E2b se ha informado que reduce las respuestas inmunitarias (Amalfitano, *et al*., *J. Virol.* 72:926-933, 1998). La generación de los denominados adenovirus "cobardes" donde todas las unidades de transcripción vírica están eliminadas es especialmente ventajosa para la inserción de grandes inserciones de ADN heterólogo. Para estudios, véase Yeh y Perricaudet, *FASEB J.* 11:615-623, 1997. Los vectores retrovíricos son dados a conocer, por ejemplo, por Anderson *et al*., patente U.S. nº 5.399.346; Mann *et al*., *Cell* 33:153, 1983; Temin *et al*., patente U.S. nº 4.650.764; Temin *et al*., patente U.S. nº 4.980.289; Markowitz *et al*., *J. Virol.* 62:1120, 1988; Temin *et al*., patente U.S. nº 5.124.263; Dougherty *et al*., publicación WIPO WO 95/07358; y Kuo *et al*., *Blood* 82:845, 1993.

En un procedimiento alternativo, puede introducirse un vector por transfección mediada por liposomas, técnica que proporciona determinadas ventajas prácticas, incluyendo la dirección molecular de liposomas a células específicas. La transfección por dirección a determinados tipos de células es especialmente ventajosa en un tejido con heterogeneidad celular, tal como el páncreas, hígado, riñón y cerebro. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas con fines de dirección. Los péptidos dirigidos (por ejemplo, hormonas o neurotransmisores), las proteínas tal como los anticuerpos o las moléculas distintas de péptidos pueden acoplarse químicamente a liposomas.

En otra forma de realización las células diana se extraen del animal y el ADN se introduce como ADN plásmido desnudo. Las células transformadas se reimplantan a continuación en el cuerpo del animal. Los vectores de ADN desnudo pueden introducirse en las células huésped deseadas por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato cálcico, utilización de un cañón génico o utilización de un transportador del vector de ADN. Véase, por ejemplo, Wu *et al*., *J. Biol. Chem.* 267:963-7, 1992; Wu *et al*., *J. Biol. Chem.* 263:14621-4, 1988.

Pueden generarse también ratones modificados genéticamente para expresar el gen zvegf3, denominados "ratones transgénicos" y ratones que presentan una ausencia completa de la función del gen zvegf3, denominados "ratones con inactivación génica" (Snouwaert *et al*., *Science* 257:1083, 1992; Lowell *et al*., *Nature* 366:740-42, 1993; Capecchi, *Science* 244:1288-1292, 1989; Palmiter *et al*., *Ann. Rev. Genet.* 20:465-499, 1986). Los experimentos de transgénesis pueden realizarse utilizando ratones normales o ratones con enfermedad genética u otros fenotipos alterados. Los ratones transgénicos que sobreexpresan zvegf3, bien de manera omnipresente o bajo un activador específico para el tejido o restringido por el tejido, pueden utilizarse para determinar si o no la sobreexpresión produce un cambio fenotípico. Los promotores adecuados incluyen los activadores del gen con metaltioneína, albúmina (Pinkert *et al*., *Genes Dev.* 1(3):268-76, 1987), y el queratinocito K-14 (Vassar *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(5):1563-1567, 1989). El activador de la metaltioneína-1 (MT-1) proporciona la expresión en el hígado y en otros tejidos, dejando con frecuencia elevadas concentraciones de proteína circulante. La sobreexpresión de un polipéptido zvegf3 natural, un fragmento de polipéptido o de su mutante puede alterar los procedimientos celulares normales, dando como resultado un fenotipo que identifica un tejido en el que la expresión de zvegf3 es funcionalmente relevante y puede indicar una diana terapéutica para el zvegf3, sus agonistas o antagonistas. Por ejemplo, un ratón transgénico puede modificarse genéticamente para sobreexpresar una secuencia completa de zvegf3, que puede producir un fenotipo que presenta similitud con enfermedades humanas. Asimismo los ratones con zvegf3 con inactivación génica pueden utilizarse para determinar dónde se requiere rotundamente zvegf3 *in vivo*. El fenotipo de ratones con inactivación génica sirve de pronóstico de los efectos *in vivo* de antagonistas de zvegf3. Los ratones con inactivación génica pueden utilizarse también para estudiar los efectos de las proteínas zvegf3 en modelos de enfermedad, incluyendo, por ejemplo, cáncer, ateroesclerosis, artritis reumatoide, isquemia y cardiovasculopatía. Puede utilizarse ADNc de zvegf3 humano para aislar ARNm con zvegf3 murino, ADNc y ADN genómico como se dio a conocer anteriormente, que se utilizan posteriormente para generar ratones con inactivación génica. Estos ratones pueden utilizarse para estudiar el gen zvegf3 y la proteína codificada por los mismos en un sistema *in vivo* y pueden utilizarse como modelos *in vivo* para las correspondientes enfermedades humanas. Además, los ratones transgénicos que expresan polinucleótidos complementarios con zvegf3 o los ribozimas dirigidos contra zvegf3, descritos en la presente memoria, pueden utilizarse de manera análoga contra ratones con inactivación génica descritos anteriormente.

La relación funcional entre los ligandos zvegf3 y PDGF puede investigarse mediante experimentos de "knockin" (sustitución génica). Por ejemplo, el gen PDGF A o el PDGF B en un animal puede reemplazarse mediante la sustitución génica del gen zvegf3 o de ADNc en el locus genómico de un ligando PDGF en células madre embrionarias (ES), que se utilizan para generar ratones con sustitución génica, en los que la proteína zvegf3 está expresada por el locus genómico PDGF (sustituido). Dichos ratones con sustitución génica pueden utilizarse para estudiar numerosas cuestiones, tales como si zvegf3 puede sustituir la función del PDGF durante el desarrollo; si zvegf3 tiene funciones exclusivas; y utilizando estirpes celulares creadas en los ratones, en mecanismo de la transducción de señal de zvegf3.

Véase, por ejemplo, Wang *et al*., *Development* 124:2507-2513, 1997; Zhuang *et al*., *Mol. Cell Biol.* 18:3340-3349, 1998; Geng *et al*., *Cell* 97:767-777, 1999. En una aplicación adicional de esta tecnología, los dominios individuales de zvegf3 pueden eliminarse o modificarse específicamente sustituyendo una secuencia génica en una secuencia de zvegf3 modificada o una versión cortada y empalmada específica de zvegf3, proporcionando de este modo un modelo transgénico para el estudio de dominios funcionales de la proteína. Véase, por ejemplo, Zhuang *et al*. (*ibid*.) y Baudoin *et al*. (*Genes Dev.* 12:1202-1216, 1998). En otra aplicación, los tejidos y los tipos de células que expresan el gen zvegf3 pueden identificarse sustituyendo una secuencia génica de un gen indicador sensible (por ejemplo, *LacZ*) en el locus de zvegf3. Véase, por ejemplo, Monroe *et al*., *Immunity* 11:201-212, 1999; Zhuang *et al*., *ibid*.; Geng *et al*., *ibid*.

La metodología antisentido puede utilizarse para inhibir la transcripción del gen zvegf3 para examinar los efectos de dicha inhibición *in vivo*. Los polinucleótidos que son complementarios para un segmento de un polinucleótido que codifica a zvegf3 (por ejemplo, un polinucleótido publicado en la SEC. ID. nº: 1) se diseñan para unirse a un ARNm que codifica a zvegf3 y para inhibir la traducción de dicho ARNm. Dichos oligonucleótidos antisentido pueden utilizarse también para inhibir la expresión de los genes que codifican el polipéptido zvegf3 en el cultivo celular.

Los expertos en la materia apreciarán que los análisis dados a conocer en la presente memoria pueden adaptarse fácilmente para estudiar la actividad de las proteínas zvegf3, los anticuerpos anti-zvegf3 y otros antagonistas y las sustancias de ensayo obtenidas a partir de varias fuentes.

Las proteínas zvegf3 pueden utilizarse terapéuticamente para estimular el desarrollo o la reparación del tejido, la diferenciación o la proliferación celular. Se ha descubierto que zvegf3 se une al receptor alfa de PDGF y para estimular los procesos celulares mediados por el receptor alfa. La proteína puede por consiguiente utilizarse como un agonista del receptor alfa de PDGF. Las aplicaciones específicas incluyen, sin limitación: el tratamiento de las heridas en la piel en todo el espesor, incluyendo las úlceras de la insuficiencia venosa y otras herida crónicas, no cicatrizantes, específicamente en los casos de la cicatrización de heridas con insuficiencia debidas a la diabetes mellitus, a la enfermedad del tejido conectivo, tabaquismo, quemaduras y otras enfermedades que empeoran; la reparación de fracturas; injerto de piel; en la cirugía reconstructiva para estimular la neovascularización y aumentar la supervivencia de pellejos cutáneos; para establecer redes vasculares en células y tejidos trasplantados, tal como los islotes de Langerhans transplantados; para tratar trastornos del aparato reproductor femenino, incluyendo la insuficiencia aguda o crónica de la placenta (un factor importante que produce morbidez y mortalidad perinatal) y en hemorragias prolongadas; para estimular el crecimiento del tejido dañado por la periodontitis; para estimular la reparación del tejido hepático dañado; en el tratamiento de lesiones agudas y crónicas del aparato digestivo, incluyendo las úlceras de duodeno, que se caracterizan por una insuficiencia de capilares; para estimular la angiogénesis e impedir la degeneración neuronal debida a la isquemia cerebral crónica; para acelerar la formación de vasos sanguíneos secundarios en los miembros isquémicas; para estimular la reparación de vasos y el desarrollo de la circulación secundaria tras el infarto de miocardio con el fin de limitar la lesión isquémica; y para estimular la hematopoyesis. Los polipéptidos son también aditivos útiles en adhesivos tisulares para estimular la revascularización del tejido cicatrizante.

De particular interés es la utilización de zvegf3 o de antagonistas de zvegf3 para el tratamiento o reparación de la lesión hepática, incluyendo la lesión debida a la hepatitis crónica, incluyendo la hepatitis activa crónica (que incluye la hepatitis C) y muchos otros tipos de cirrosis. La necrosis difundida, masiva, que incluye la destrucción de prácticamente todo el hígado, puede ser producida, entre otros, por la hepatitis vírica fulminante; sobredosis del analgésico acetaminofeno; exposición a otros fármacos y productos químicos tales como halotano, inhibidores de la monoamina oxidasa, agentes empleados en el tratamiento de la tuberculosis, fósforo, tetracloruro de carbono y otros productos químicos industriales. Las enfermedades asociadas a lesiones ultraestructurales que no necesariamente producen necrosis obvia de hepatocitos incluyen el síndrome de Reye en los niños, la toxicidad de la tetraciclina y el hígado graso agudo del embarazo. La cirrosis, un proceso difuso caracterizado por fibrosis y conversión de la estructura normal en los ganglios estructuralmente anormales, puede producirse por una variedad de razones incluyendo el alcoholismo, la cirrosis posnecrótica (normalmente debida a la hepatitis crónica activa), la cirrosis biliar, la cirrosis pigmentaria, la cirrosis criptógena, la enfermedad de Wilson y la insuficiencia de alfa-1-antitripsina. zvegf3 puede también ser útil para el tratamiento de la congestión hepática crónica pasiva (CPC) y la necrosis hemorrágica central (CHN), que son dos cambios circulatorios que representan un continuo encontrados en la insuficiencia cardiaca del lado derecho. Otros trastornos circulatorios que pueden tratarse con zvegf3 incluyen la trombosis de la vena hepática, la trombosis de la vena porta y la esclerosis cardiaca. En los casos de fibrosis hepática puede ser beneficioso administrar un antagonista de zvegf3 para suprimir la activación de células estrelladas, que han estado implicadas en la producción de la matriz extracelular en el hígado fibrótico (Li y Friedman, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 14:618-633, 1999).

Los polipéptidos zvegf3 pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes vasculógenos o angiógenos, incluyendo zvegf3. Por ejemplo, se ha descubierto que los FGF básicos y ácidos y VEGF desempeñan una función en el desarrollo de la circulación colateral, y la utilización combinada de zvegf3 con uno o más de estos factores puede ser ventajosa. VEGF ha estado también implicada en la supervivencia de las células de islotes trasplantados (Gorden *et al*., *Transplantation* 63:436-443, 1997; Pepper, *Arteriosclerosis, Throm. and Vascular Biol.* 17:605-619, 1997). Se ha demostrado que FGF básica provoca angiogénesis y cicatrización acelerada de úlceras en animales experimentales (estudiados por Folkman, *Nature Medicine* 1:27-31, 1995). Se ha demostrado que VEGF estimula la reendotelialización de vasos y reduce la hiperplasia de la íntima en modelos animales de restenosis (Asahara *et al*., *Circulation* 91:2802-2809, 1995; Callow *et al*., *Growth Factors* 10:223-228, 1994); la eficacia de los polipéptidos zvegf3 puede probarse en estos y otros modelos conocidos. Cuando se utiliza zvegf3 en combinación con un agente adicional, los

dos compuestos pueden administrarse simultánea o sucesivamente como apropiados para la enfermedad específica que se está tratando.

Las proteínas zvegf3 pueden utilizarse ya sea solas o en combinación con otros factores hematopoyéticos tales como IL-3, G-CSF, GM-CSF o el factor de células madre para aumentar la expansión y movilización de las células madre precursoras endoteliales. Las células que pueden expandirse de esta manera incluyen las células aisladas de la médula ósea o las células aisladas de la sangre. Las proteínas zvegf3 pueden también administrarse directamente a un individuo para aumentar la producción de células madre endoteliales y la diferenciación en el individuo tratado. Las células madre, ya sea desarrolladas dentro del paciente o proporcionadas de nuevo a un paciente, pueden desarrollar entonces una función en las áreas de modulación de la isquemia en el cuerpo, proporcionando de este modo un efecto terapéutico. Estas células pueden ser también útiles para aumentar la reendotelialización de las áreas desprovistas de cobertura endotelial, tal como los injertos vasculares, las endoprótesis vasculares y las áreas en las que se ha dañado o eliminado la cobertura endotelial (por ejemplo, áreas de angioplastia). Pueden utilizarse también proteínas zvegf3 en combinación con otros factores de crecimiento y diferenciación tal como la angiopoyetina-1 (Davis *et al*., *Cell* 87:1161-1169, 1996) para ayudar a crear y estabilizar la formación de nuevos vasos en áreas que requieren neovascularización, incluyendo las áreas de isquemia (isquemia cardiaca o periférica), trasplantes de órganos, cicatrización de heridas e injerto de tejido.

Las proteínas zvegf3, agonistas y antagonistas pueden utilizarse para modular el crecimiento de las neuritas y el desarrollo y estructuras delimitadas del sistema nervioso. Como tales, las proteínas zvegf3, agonistas o antagonistas pueden ser útiles en el tratamiento de neuropatías periféricas aumentando la excrecencia de la médula espinal y de las neuritas sensibles y como parte de un tratamiento terapéutico para la regeneración de excrecencias de neuritas después de embolias, daños cerebrales causados por lesiones en la cabeza y parálisis producida por lesiones en la médula espinal. La aplicación puede realizarse también en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. La aplicación puede también realizarse en el modelo de mediación del desarrollo e inervación del tejido del estómago.

Para su utilización farmacéutica, las proteínas zvegf3 se formulan para administración tópica o parenteral, particularmente intravenosa o subcutánea, por procedimientos convencionales. En general, las formulaciones farmacéuticas incluirán un polipéptido zvegf3 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como solución salina tamponada, dextrosa al 5% en agua o similares. Las formulaciones pueden incluir además uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes tamponantes, albúmina para evitar la pérdida de proteínas en las superficies del vial, etc. Los procedimientos de formulación son bien conocidos en la técnica y están descritos, por ejemplo, en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; 19ª ed., 1995. Zvegf3 se utilizará normalmente en una concentración entre aproximadamente 10 y 100 μg/ml del volumen total, aunque pueden utilizarse concentraciones comprendidas en el intervalo entre 1 ng/ml a 1.000 μg/ml. Para aplicación tópica, tal como para la estimulación de la cicatrización de heridas, se aplicará la proteína en el intervalo entre 0,1 y 10 μg/cm^2 de área de la herida, con la dosis exacta determinada por el médico según patrones aceptados, teniendo en cuenta la naturaleza de la gravedad de la enfermedad que va a tratarse, las características del paciente, etc. La determinación de la dosis está dentro del nivel de la experiencia normal en la técnica. Las formulaciones terapéuticas se administrarán generalmente durante el periodo requerido para la neovascularización, por lo general entre uno a varios meses y, en el tratamiento de enfermedades crónicas, durante un año o más. La dosificación es diaria o intermitente durante el periodo de tratamiento. La administración intravenosa será por inyección intravenosa rápida o infusión durante un periodo típico de una a varias horas. Pueden emplearse también formulaciones de liberación mantenida. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz de zvegf3 es una cantidad suficiente para producir un cambio clínicamente significativo en la enfermedad tratada, tal como una reducción clínicamente significativa en el tiempo requerida por el cierre de la herida, una reducción significativa en el área de la herida, una mejora significativa en la vascularización, una reducción significativa en la morbidez o un aumento significativo de la puntuación histológica.

Las proteínas de la presente invención son útiles para modular la proliferación, diferenciación, migración o metabolismo de tipos de células sensibles, que incluyen tanto células primarias como estirpes celulares cultivadas. De particular interés a este respecto son las células hepáticas, las células hematopoyéticas (incluyendo las células madre y las células mieloides y linfoides maduras), las células endoteliales, las células nerviosas y las células mesenquimáticas (incluyendo los fibroblastos y las células del músculo liso). Los polipéptidos zvegf3 se añaden al medio de cultivo del tejido para estos tipos de células a una concentración de aproximadamente 10 pg/ml a aproximadamente 1.000 ng/ml. Los expertos en la materia apreciarán que las proteínas zvegf3 pueden combinarse de manera ventajosa con otros factores de crecimiento en el medio de cultivo.

En el campo de la investigación en el laboratorio, las proteínas zvegf3 pueden utilizarse también como patrones de peso molecular; como reactivos en análisis para determinar las concentraciones circulantes de la proteína, tal como en el diagnóstico de los trastornos caracterizados por sobre o infraproducción de la proteína zvegf3; o como patrones en el análisis del fenotipo celular.

Las proteínas zvegf3 pueden utilizarse también para identificar inhibidores de su actividad. Los compuestos de ensayo se añaden a los análisis dados a conocer anteriormente para identificar los compuestos que inhiben la actividad de la proteína zvegf3. Además de los ensayos dados a conocer anteriormente, pueden probarse muestras para la inhibición de la actividad de zvegf3 dentro de una variedad de ensayos diseñados para medir la fijación del receptor o la estimulación/inhibición de las respuestas celulares dependientes de zvegf3. Por ejemplo, pueden transfectarse

estirpes celulares sensibles a zvegf3 con un montaje de gen indicador que es sensible a una serie de reacciones celulares estimuladas por zvegf3. Los montajes del gen indicador de este tipo son conocidos en la técnica y generalmente comprenderán un elemento de respuesta al suero (SRE) activado por zvegf3 funcionalmente unido a un gen que codifica una proteína ensayable, tal como la luciferasa. En los compuestos, soluciones, mezclas o extractos experimentales se determina la capacidad para inhibir la actividad de zvegf3 en las células diana como se demostró por una disminución en la estimulación de zvegf3 de la expresión del gen indicador. Los ensayos de este tipo detectarán compuestos que se unen directamente al zvegf3 del bloque a los receptores de la superficie celular, así como a los compuestos que bloquean los procesos en la serie de reacciones celulares después de la fijación del receptor-ligando. Alternativamente, los compuestos u otras muestras pueden determinarse por bloqueo directo de la fijación de zvegf3 al receptor utilizando zvegf3 dirigido con un marcador detectable (por ejemplo, ^{125}I, biotina, peroxidada de rábano picante, FITC y similares). En los ensayos de este tipo, la capacidad de una muestra de análisis para inhibir la fijación de zvegf3 marcada al receptor es indicadora de la actividad inhibidora, que puede confirmarse mediante ensayos secundarios. Los receptores utilizados en los análisis de fijación pueden ser receptores celulares o aislados, receptores inmovilizados.

La actividad de las proteínas zvegf3 puede medirse con un microfisiómetro biosensor a base de silicio que mide la tasa de acidificación celular o la excreción de protones asociada con la fijación del receptor y las posteriores respuestas celulares fisiológicas. Un ejemplo de dicho dispositivo es el Cytosensor™ Microphysiometer fabricado por Molecular Devices, Sunnyvale, CA. Varias respuestas celulares, tal como la proliferación celular, el transporte iónico, la producción de energía, la respuesta inflamatoria, la activación reguladora y receptora y similares, pueden medirse por este procedimiento. Véase, por ejemplo, McConnell *et al*., *Science* 257:1906-1912, 1992; Pitchford *et al*., *Meth. Enzymol.* 228:84-108, 1997; Arimilli *et al*., *J. Immunol. Meth.* 212:49-59, 1998; y Van Liefde *et al*., *Eur. J. Pharmacol.* 346:87-95, 1998. El microfisiómetro puede utilizarse para analizar células eucarióticas o procariócas adherentes o no adherentes. Midiendo los cambios de acidificación extracelular en el medio celular a lo largo del tiempo, el microfisiómetro mide directamente las respuestas celulares a varios estímulos, incluyendo las proteínas zvegf3, sus agonistas y antagonistas. El microfisiómetro puede ser utilizado para medir respuestas de una célula eucariótica sensible a zvegf3, en comparación con una célula eucariótica de referencia que no responde al polipéptido zvegf3. Las células eucarióticas sensibles a zvegf3 comprenden las células en las que se ha transfectado un receptor para zvegf3 creando una célula que es sensible a zvegf3, así como las células naturales sensibles a zvegf3 tales como las células obtenidas del tejido vascular o nervioso. Las diferencias, medidas por un cambio, por ejemplo, un aumento o disminución en la acidificación extracelular, en la respuesta de las células expuestas al polipéptido zvegf3, relativas a un control no expuesto a zvegf3, son una medición directa de las respuestas celulares moduladas por zvegf3. Además, dichas respuestas moduladas por zvegf3 pueden analizarse bajo una variedad de estímulos. La presente invención proporciona de este modo procedimientos de identificación de agonistas y antagonistas de proteínas zvegf3, que comprende proporcionar células sensibles a un polipéptido zvegf3, cultivar una primera porción de estas células en ausencia de un compuesto de ensayo, cultivar una segunda porción de las células en presencia de un compuesto de ensayo y detectar un cambio, por ejemplo, un aumento o disminución, en una respuesta celular de la segunda porción de las células en comparación con la primera porción de las células. El cambio en la respuesta celular se presenta como un cambio mensurable en la tasa de acidificación extracelular. Cultivar una tercera porción de las células en presencia de una proteína zvegf3 y la ausencia de un compuesto de ensayo proporciona una referencia positiva para las células sensibles a zvegf3 y una referencia para comparar la actividad agonista de un compuesto de ensayo con el del polipéptido zvegf3. Los antagonistas de zvegf3 pueden identificarse exponiendo las células a la proteína zvegf3 en presencia y ausencia del compuesto de ensayo, por lo que una reducción en la actividad estimulada por zvegf3 es indicadora de actividad antagonista en el compuesto de ensayo.

Las proteínas zvegf3 pueden utilizarse también para identificar células, tejidos o estirpes celulares que responden a una serie de reacciones estimuladas por zvegf3. El microfisiómetro, descrito anteriormente, puede utilizarse para identificar rápidamente las células sensibles al ligando, tales como las células sensibles a las proteínas zvegf3. Las células se cultivan en presencia o ausencia del polipéptido zvegf3. Las células que producen un cambio mensurable en la acidificación extracelular en presencia de zvegf3 son sensibles a zvegf3. Las células sensibles pueden utilizarse para identificar antagonistas y agonistas del polipéptido zvegf3 como se describió anteriormente.

Los inhibidores de actividad de zvegf3 (antagonistas de zvegf3) incluyen anticuerpos anti-zvegf3, receptores solubles de zvegf3 (incluyendo receptor alfa de PDGF soluble; véase, por ejemplo, Herren *et al*., *J. Biol. Chem.* 268:15088-15095, 1993), anticuerpos antirreceptores y otros agentes peptídicos y no peptídicos, incluyendo ribozimas, inhibidores de moléculas pequeñas y fragmentos de unión al receptor angiogénica o mitogénicamente inactivo de polipéptidos zvegf3. Dichos antagonistas pueden utilizarse para bloquear los efectos mitógenos, quimiotácticos o angiógenos de zvegf3. Estos antagonistas por consiguiente pueden ser útiles para reducir el crecimiento de los tumores sólidos inhibiendo la neovascularización del tumor en desarrollo, bloqueando directamente el crecimiento de las células tumorales o estimulando la apoptosis mediante la inhibición de procesos mediados por el receptor alfa de PDGF. Por ejemplo, pruebas experimentales indican que zvegf3 es producido por células de glioblastoma, lo que sugiere que la inhibición de la actividad de zvegf3 puede ser útil en el tratamiento de estos tumores. Otras utilizaciones de antagonistas de zvegf3 incluyen el tratamiento de la retinopatía diabética, la psoriasis, artritis y escleroderma; y la reducción de la fibrosis, incluyendo la formación de cicatrices, queloides, fibrosis hepática, fibrosis pulmonar (por ejemplo, silicosis, asbestosis), fibrosis renal (incluyendo la nefropatía diabética) y glomeruloesclerosis. Los inhibidores de zvegf3 pueden también ser útiles en el tratamiento de trastornos vasculares proliferantes en los que la actividad de zvegf3 es patógena. Dichos trastornos pueden incluir la arterioesclerosis y la restenosis hiperplásica de la íntima tras la angioplasia, endarterectomía, injerto vascular, trasplante de órganos o emplazamiento de endoprótesis vascular. Estas

enfermedades implican respuestas complejas mediadas por el factor de crecimiento en las que determinados factores pueden ser beneficiosos para el resultado clínico y otros pueden ser patógenos.

Los inhibidores de zvegf3 pueden proporcionar también utilidad en el tratamiento de la neovascularización ocular, que incluye la retinopatía diabética y la degeneración macular relacionada con la edad. Las pruebas experimentales sugieren que estas enfermedades proceden de la expresión de factores angiógenos provocados por la hipoxia en la retina.

Los antagonistas de zvegf3 son también de interés en el tratamiento de trastornos inflamatorios, tales como la artritis reumatoide y la psoriasis. En la artritis reumatoide, los estudios sugieren que zvegf3 desempeña un papel importante en la formación de cataratas, un tejido muy vascularizado que invade y destruye el cartílago. Las lesiones psoriásicas son hipervasculares y sobreexpresan el polipéptido IL-8 angiógeno.

Los antagonistas de zvegf3 también pueden demostrar utilidad en el tratamiento de los hemangiomas infantiles, que presentan sobreexpresión de VEGF y bFGF durante la fase proliferante.

Los inhibidores están formulados para su utilización farmacéutica como se dio a conocer en general anteriormente, teniendo en cuenta la naturaleza química y física exacta del inhibidor y la enfermedad que debe tratarse. Las determinaciones relevantes están comprendidas en el nivel de experiencia ordinaria en la ténica de la formulación. Otros factores angiógenos y vasculógenos, que incluyen VEGF y bFGF, han estado implicados en la neovascularización patológica. En tales casos puede presentar ventajas combinar un inhibidor de zvegf3 con uno o más inhibidores de estos otros factores.

Los polipéptidos, ácidos nucleicos y anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse en el diagnóstico o tratamiento de trastornos asociados con la pérdida de células o la proliferación anormal de células, incluyendo el cáncer, la vasculogénesis o angiogénesis alterada o excesiva y las enfermedades del sistema nervioso. Los polipéptidos zvegf3 marcados pueden utilizarse para diagnosticar por la imagen tumores u otras zonas de proliferación celular anormal. A la vista de la fijación de zvegf3 al receptor alfa de PDGF, pueden ser útiles los antagonistas de zvegf3 en el tratamiento de tumores que expresan este receptor (por ejemplo, glioblastomas, melanomas malignos). Debido a que la angiogénesis en animales adultos está limitada generalmente a la cicatrización de la herida y al ciclo reproductor femenino, es un indicador muy específico de procesos patológicos. La angiogénesis es indicadora, por ejemplo, del desarrollo de tumores sólidos, retinopatías y artritis.

Los polipéptidos zvegf3 y los anticuerpos anti-zvegf3 pueden estar conjugados directa o indirectamente con fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y estos conjugados pueden utilizarse para aplicaciones en diagnóstico o terapéuticas *in vivo*. Por ejemplo, los polipéptidos o anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse para identificar o tratar tejidos u órganos que expresan una molécula anticomplementaria correspondiente (receptor o antígeno, respectivamente, por ejemplo). Más específicamente, los polipéptidos zvegf3 o los anticuerpos anti-zvegf3 o los fragmentos bioactivos o porciones de los mismos, pueden acoplarse a moléculas detectables o citotóxicas y administrarse a un mamífero con células, tejidos u órganos que expresan la molécula anticomplementaria. Por ejemplo, el dominio CUB de zvegf3 puede utilizarse para dirigir restos peptídicos y no peptídicos contra las semaforinas como se dio a conocer anteriormente.

Las moléculas detectables adecuadas pueden acoplarse directa o indirectamente al polipéptido o anticuerpo e incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las moléculas citotóxicas adecuadas pueden acoplarse directa o indirectamente al polipéptido o anticuerpo, e incluyen toxinas bacterianas o vegetales (por ejemplo, la toxina de la difteria, la exotoxina *Pseudomonas*, ricino, abrina, saporina y similares), así como los radionúclidos terapéuticos, tales como yodo-131, renio-188 o itrio-90. Éstos pueden estar acoplados directamente al polipéptido o anticuerpo o acoplados indirectamente según procedimientos conocidos, tales como mediante un resto quelante. Los polipéptidos o anticuerpos pueden conjugarse también a fármacos citotóxicos, tales como la adriamicina. Para el acoplamiento indirecto de una molécula detectable o citotóxica, la molécula detectable o citotóxica puede conjugarse con un miembro de un par complementario/anticomplementario, donde el otro miembro está unido al polipéptido o parte del anticuerpo. Con este objeto, la biotina/estreptavidina es un par complementario/anticomplementario a título de ejemplo.

En otra forma de realización, las proteínas de fusión polipéptido-toxina o las proteínas de fusión anticuerpo/fragmento-toxina pueden utilizarse para la inhibición o ablación de la célula o tejido dirigidos, tal como en la terapia del cáncer. A este respecto son de especial interés los conjugados de un polipéptido zvegf3 y una citotoxina, que puede utilizarse para dirigir la citotoxina a un tumor u otro tejido que está experimentando replicación y modificación celular indeseada.

En otra forma de realización, las proteínas de fusión zvegf3-citocina o las proteínas de fusión anticuerpo/fragmento-citocina pueden utilizarse para aumentar la citotoxicidad *in vitro* (por ejemplo, la mediada por anticuerpos monoclonales contra dianas tumorales) y para potenciar la destrucción *in vivo* de tejidos diana (por ejemplo, cánceres de sangre y de médula ósea). Véase, en general, Hornick *et al*., *Blood* 89:4437-4447, 1997). En general, las citocinas son tóxicas si se administran generalmente. Las proteínas de fusión descritas permiten la dirección de una citocina a una zona de acción deseada, tal como una célula que tiene zonas de fijación para zvegf3, proporcionando de este modo una concentración local elevada de citocina. Las citocinas adecuadas con esta finalidad incluyen, por ejemplo, la interleucina-

2 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Dichas proteínas de fusión pueden utilizarse para producir la destrucción provocada por la citocina de tumores y otros tejidos que presentan replicación celular indeseada.

Todavía en otra forma de realización, un polipéptido zvegf3 o un anticuerpo anti-zvegf3 pueden conjugarse con un radionúclidos, particularmente con un radionúclido que emite partículas beta o partículas gamma y utilizarse para reducir la restenosis. Por ejemplo, cintas impregnadas con iridio-192 colocadas en recipientes con endoprótesis de pacientes hasta que se administró la dosis de radiación requerida dio como resultado la disminución del crecimiento del tejido en el vaso y mayor diámetro luminal que el grupo de referencia, que recibió cintas con placebo. Además, la revascularización y la trombosis de endoprótesis fueron significativamente inferiores en el grupo de tratamiento. Resultados similares se pronostican con la dirección de un conjugado bioactivo que contiene un radionúclico, tal como se describió anteriormente.

El polipéptido bioactivo o el conjugado del anticuerpo descritos en la presente memoria pueden administrarse por vía intravenosa, intraarterial o en el interior del conducto, o pueden introducirse localmente en la zona deseada de actuación.

Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos zvegf3 son útiles en aplicaciones de la terapia génica donde se desea aumentar o inhibir la actividad de zvegf3. Por ejemplo, Isner *et al*., *The Lancet* (*ibid.*) describió que la terapia génica de VEGF estimulaba el crecimiento de los vasos sanguíneos en un miembro isquémico. Las aplicaciones adicionales de la terapia génica de zvegf3 incluyen la estimulación de la cicatrización de heridas, la repoblación de injertos vasculares, la estimulación del crecimiento de neuritas y la inhibición del desarrollo del cáncer y la metástasis. La presente invención también proporciona reactivos polinucleótidos para su utilización en diagnóstico. Por ejemplo, un gen zvegf3, una sonda que comprende el ADN o ARN de zvegf3, o una subsiguiente de los mismos puede utilizarse para determinar si el gen zvegf3 está presente en el cromosoma 4 de un paciente humano o si se ha producido una mutación. Las aberraciones cromosómicas detectables en el locus del gen zvegf3 incluyen, pero no se limitan a, aneuploidia, cambios en el número de copias del gen, inserciones, eliminaciones, cambios en la secuencia de restricción y reordenamientos. Tales aberraciones pueden detectarse utilizando polinucleótidos de la presente invención mediante el empleo de técnicas genéticas moleculares, tal como el análisis de polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción (RFLP), análisis de repeticiones cortas en tándem (STR) que emplean técnicas PCR y otras técnicas analíticas de enlace genético conocidas en la técnica (Sambrook *et al*., *ibid*.; Ausubel *et al*., *ibid*.; A.J. Marian, *Chest* 108:255-265, 1995).

El mapeo del híbrido por radiación es una técnica genética para células somáticas desarrollada para construir mapas contiguos de alta resolución, de cromosomas de mamíferos (Cox *et al*., *Science* 250:245-250, 1990). El conocimiento parcial o completo de una secuencia génica le permite a uno diseñar cebadores por PCR adecuados para su utilización con paneles de mapeo del híbrido de radiación cromosómica. Los paneles de mapeo del híbrido de radiación disponibles que comprenden el genoma humano completo, tal como el Stanford G3 RH Panel y el GeneBridge 4 RH Panel (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL), están disponibles. Estos paneles permiten localizaciones rápidas de cromosomas basadas en la PCR y el ordenamiento de los genes, las secuencias activadas por la secuencia (STS) y otros marcadores no polimórficos y polimórficos en una zona de interés. Esta técnica le permite a uno establecer directamente distancias físicas proporcionales entre los genes recién descubiertos de interés y los marcadores mapeos anteriormente. El conocimiento exacto de una posición del gen puede ser útil para numerosas finalidades, incluyendo: 1) determinar las relaciones entre las secuencias cortas y obtener secuencias genéticas circundantes adicionales en varias formas, tal como los clones YAC, BAC o ADNc; 2) proporcionar un posible gen experimental para una enfermedad hereditaria que muestre el enlace con alguna zona cromosómica; y 3) referenciar de forma cruzada organismos modelo, tal como el ratón, que pueden ayudar a determinar qué función puede tener un determinado gen.

La invención se ilustra además mediante los ejemplos no limitativos siguientes.

Ejemplo 1

Se identificaron clones que comprenden partes de la secuencia de codificación de zvegf3 en bases de datos públicas y patentadas de etiquetas de la secuencia expresada (EST). Se obtuvo y se secuenció un primer clon, que corresponde a una EST en una base de datos patentada. Contenía una inserción de 2.350 bp con un marco de lectura abierto de aproximadamente 800 bp. El extremo 5' del ORF se perdió. Se secuenció a continuación un segundo clon, correspondiente a una EST en una base de datos pública, pero no se extendió la secuencia obtenida del primer clon. Se secuenció a continuación un tercer clon, procedente de una base de datos patentada. Este clon contenía aproximadamente 156 bp más que el primer clon, pero había perdido también el extremo 5'.

Se realizaron inmunotransferencias Northern utilizando una serie de inmunotransferencias Northern (Multiple Tissue Northern Blots, Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA). Se generó por digestión una sonda de ADN de aproximadamente 400 bp, basada directamente en la EST identificada, por digestión de un clon correspondiente a la primera EST patentada con EcoRI y BgIII. La sonda de ADN se purificó en gel utilizando una columna rotativa que contenía una membrana de gel de sílice (QIAquick™ Gel Extraction Kit; Qiagen, Inc., Valencia, CA). La sonda se marcó por radioactividad con ^{32}P utilizando un kit de marcado con sonda aleatoria disponible en el mercado (Rediprime™ II, Amersham Corp., Arlington Heights, IL) según las especificaciones del fabricante. Se purificó la

sonda utilizando una columna de impulsión (columna NucTrap®; Stratagene, La Jolla, CA; véase la patente U.S. nº 5.336.412). Se utilizó una solución de hibridación disponible en el mercado (ExpressHyb™ Hybridization Solution; Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) para la prehibridación y como solución de hibridación para las inmunotransferencias Northern. La hibridación tuvo lugar durante la noche a 65ºC, y las inmunotransferencias se lavaron a continuación 4 veces en 2× SSC y SDS al 0,1% a temperatura ambiente, seguido de dos lavados en 0,1× SSC y SDS al 0,1% a 50ºC y un lavado en 0,1× SSC y SDS al 0,1% a 56ºC. Las inmunotransferencias Northern se expusieron a continuación a la película durante la noche a -80ºC y durante tres días a -80ºC. Se observó una extensión de transcrito en todos los tejidos a aproximadamente 4,0 kb. La intensidad de la señal fue mayor en la glándula tiroides, la médula espinal y las glándulas suprarrenales. La intensidad de la señal fue media en el corazón, riñones, páncreas, próstata, ovario, estómago y tráquea. La intensidad de la señal fue débil en todos los demás tejidos.

Se realizó el análisis por inmunotransferencia Northern utilizando inmunotransferencias múltiples de tejido de ratón adquiridas en Clontech Laboratories e Invitrogen (Carlsbad, CA). Se generó por digestión de un clon una sonda de ADN de aproximadamente 400 bp, basada directamente en la EST identificada, correspondiente a la primera EST patentada con EcoRI y BgIII. La sonda de ADN se purificó en gel utilizando una columna rotativa como se dio a conocer anteriormente. La sonda se marcó por radioactividad con ^{32}P mediante sondado aleatorio como se dio a conocer anteriormente. Se purificó la sonda utilizando una columna de impulsión NucTrap®. Las concentraciones de la hibridación fueron las dadas a conocer anteriormente. Se lavaron las inmunotransferencias cuatro veces en 2× SSC, SDS al 0,1%, a continuación dos veces en 1× SSC a 50ºC, a continuación se expusieron a la película durante la noche a -80ºC y durante tres días a -80ºC. Se observó una extensión transcrita de aproximadamente 3,0 kb en embriones de 7 días. La exposición de tres días presentó bandas de menos intensidad en los embriones de 11, 15 y 17 días. La intensidad disminuyó con la edad del embrión. Las transferencias de manchas presentaban un punto en el embrión de 17 días y con exposición de tres días en la glándula submaxilar. Se observó una banda potencial de aproximadamente 2,0 kb en los testículos después de tres días.

Se realizaron análisis por transferencia Southern utilizando una inmunotransferencia Southern realizada previamente que contenía ADN genómico digerido con EcoRI de nueve especies eucarióticas diferentes (ZOO-BLOT de Clontech Laboratories). Una sonda de ADN de aproximadamente 400 bp basada directamente en la primera EST de la base de datos patentada, se generó por digestión del clon correspondiente con EcoRI y BgIII. La sonda de ADN se purificó en gel utilizando una columna rotatoria. La sonda se marcó con radioactividad con ^{32}P mediante sondado aleatorio y se purificó utilizando una columna de impulsión. Las condiciones de hibridación y de lavado fueron las dadas a conocer anteriormente para las transferencias de tejido múltiple de ratón. Se expusieron las transferencias Northern a continuación a una película durante la noche a -80ºC y durante tres días a -80ºC. Las bandas fuertes se observaron en conejo, ratón, rata y mono.

Ejemplo 2

Se cribó un banco de las glándulas salivales humanas para un clon completo de zvegf3 por PCR. Este banco era un banco ordenado que representaba $9,6 \times 10^5$ clones realizado en el vector pZP5×. El vector pZP5× es el mismo que el vector pZP-9 (depositato en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA con el número de registro 98668), pero contiene un activador de citomegalovirus en lugar de un activador de metaltioneína entre las secuencias Asp718 y BamHI. El plásmido de este modo comprende un gen de dihidrofolato reductasa bajo control del activador precoz SV40 y de la secuencia de poliadenilación SV40, y una secuencia de clonación para insertar el gen de interés en la referencia del activador CMV y la secuencia de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento humano (hGH). La placa de trabajo que contiene 80 grupos de 12.000 colonias cada una se identificó por PCR utilizando los cebadores oligonucleotídicos ZC19.045 (SEC. ID. nº: 25) y ZC19.047 (SEC. ID. nº: 26) con una temperatura de hibridación de 60ºC durante 35 ciclos. Existían dos grupos positivos potentes, 58 (T-8 F1-F12) y 77 (T-7 H1-H12). Los grupos correspondientes en la placa de transferencia se identificaron a continuación por PCR utilizando las mismas condiciones. Se obtuvieron dos positivos en el nivel de transferencia. Los positivos fueron T-7 H11 y T-8 F10. Se efectuaron las reacciones 5' RACE en los grupos de la placa de transferencia y se secuenciaron los fragmentos para comprobar la secuencia de zvegf3 y determinar si un clon completo estaba presente. Para la PCR, se utilizaron cebadores oligonucleotídicos ZC12.700 (SEC. ID. nº: 27) y ZC19.045 (SEC. ID. nº: 25) a una temperatura de hibridación de 61ºC durante 5 ciclos, a continuación 55ºC durante 30 ciclos. El secuenciado demostró que el grupo T-7 H11 tenía un desplazamiento del marco. La secuencia del grupo F10 de la placa 8 de transferencia parecía ser correcta, de modo que este grupo de ADN se utilizó en lechos filtrantes.

El grupo F10 de la placa de transferencia 8 se colocó en placas y se filtró en el lecho utilizando membranas de nilón (Hybond-N™; Amersham Corporation). Se tomaron aproximadamente 1.200 colonias por placa en cada uno de los 5 filtros para un total de aproximadamente 6.000 colonias. Se marcaron los filtros con una aguja caliente para orientación, a continuación se desnaturalizaron durante 6 minutos en NaOH 0,5 M y Tris-HCl 1,5 M, pH 7,2. Los filtros se neutralizaron a continuación en NaCl 1,5 M y Tris-HCl 0,5 M, pH 7,2 durante 6 minutos. Se fijó el ADN a los filtros utilizando un reticulador UV (Stratalinker®, Stratagene, La Jolla, CA) a 1.200 julios. Se prelavaron los filtros a 65ºC en un tampón de prelavado consistente en 0,25× SSC, SDS 0,25% y EDTA 1 mM. Se cambió la solución un total de tres veces durante un periodo de 45 minutos para eliminar el residuo celular. Se hibridaron previamente los filtros durante aproximadamente 3 horas a 65ºC 25 ml en 25 ml de ExpressHyb™. Se generó la sonda utilizando un fragmento de aproximadamente 400 bp producido por digestión del primer clon de la base de datos patentada con EcoRI y BgIII y se purificó en gel utilizando una columna rotatoria como la descrita anteriormente. Se marcó con

radioactividad la sonda con ^{32}P por cebado aleatorio tal como se dio a conocer anteriormente y se purificó utilizando una columna de impulsión. Se utilizó la solución ExpressHyb™ para la solución de hibridación para los filtros. La hibridación tuvo lugar durante la noche a 65ºC. Se lavaron 2× las inmunotransferencias en la solución 1 (2× SSC, SDS al 0,1%) a 65ºC, a continuación se lavaron 4 veces en la solución 1 a 65ºC. Se expusieron los filtros a una película durante la noche a -80ºC. Había 14 positivos en los filtros. Se seleccionaron 85 clones de las áreas positivas y se identificaron por PCR utilizando los cebadores oligonucleotídicos ZC19.045 (SEC. ID. nº: 25) y ZC19.047 (SEC. ID. nº: 26) y una temperatura de hibridación de 60ºC. Se obtuvieron trece positivos y se secuenciaron los clones individuales. Se seleccionaron veinticuatro colonias y se comprobaron por PCR como se describió anteriormente. Se obtuvieron seis positivos, de los cuales dos se secuenciaron. Ambas secuencias eran la misma y de longitud completa. La secuencia se muestra en SEC. ID. nº: 1.

Ejemplo 3

El gen zvegf3 humano se mapeó al cromosoma 4 utilizando el GeneBridge 4 Radiation Hybrid Panel (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL) disponible en el mercado. El GeneBridge 4 Radiation Hybrid Panel contiene los ADN por PCR de cada uno de los 93 clones híbridos por radiación, más dos ADN de referencia (el donante HFL y el receptor A23). Un servidor de WWW disponible al público (http:///www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl) permite el mapeo relativo al mapeo híbrido por radiación del Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research's del genoma humano (mapeo híbrido por radiación "WICGR"), que se construyó con el GeneBridge 4 Radiation Hybrid Panel.

Para el mapeo de zvegf3 con el GeneBridge 4 RH Panel, se montaron reacciones de 20 μl en una placa de microvaloración de 96 pocillos por PCR (Stratagene, La Jolla, CA) y se utilizaron en un mezclador térmico (RoboCycler® Gradient 96; Stratagene). Cada una de las 95 reacciones por PCR contenía 2 μl 10× del tampón de reacción por PCR (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA), 1,6 μl de la mezcla dNTP (2,5 mM cada una, PERKIN-ELMER, Foster City, CA), 1 μl de cebador de antisentido ZC 20.368 (SEC. ID. nº: 28), 1 μl de cebador de cadena complementaria ZC 20.369 (SEC. ID. nº: 29), 2 μl de un agente de aumento de densidad y un colorante de seguimiento de pista (RediLoad, Research Genetics, Inc., Huntsville, AL), 0,4 μl de una mezcla disponible en el mercado de ADN polimerasa/anticuerpo (50× Advantage™ KlenTaq Polymerase Mix, adquirida en Clontech Laboratories, Inc.), 25 ng de ADN de un clon híbrido individual o la referencia, y x μl de H_2Odd para un volumen total de 20 μl. Se cubrieron con una capa las mezclas de reacción con una cantidad igual de aceite mineral y se sellaron. Las condiciones del ciclador de PCR fueron las siguientes: 4 minutos iniciales de desnaturalización a 94ºC; 35 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a 94ºC, 45 segundos de hibridación a 56ºC y 75 segundos de ampliación a 72ºC; seguido de una ampliación final de 7 minutos a 72ºC. Se separaron los productos de la reacción por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (Life Technologies, Gaithersburg, MD).

Los resultados presentaron los mapeos 3.56 cR_3000 de zvegf3 del marcador del armazón CHLC.GATA72A08 en el mapeo del híbrido de radiación WICGR del cromosoma 4. Los marcadores del armazón próximo y distal fueron CHLC.GAGA72A08 y WI-3936, respectivamente. La utilización de los marcadores circundantes coloca el gen zvegf3 en la zona 4q28.3 en el mapeo del cromosoma 4 en el LDB integrado (The Genetic Location Database, University of Southhampton, WWW Server: http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/).

Utilizando sustancialmente los mismos procedimientos, se mapeó el gen zvegf3 de ratón en el cromosoma 3, se unió al marcador D3Mit212 del armazón situado a 39,7 cM. Esta zona es sinténica con el locus de zvegf3 humano.

Ejemplo 4

Se cribó un panel de PCR para el ADN con zvegf3 de ratón. El panel contenía 8 muestras de bancos de ADNc del cerebro, médula ósea, embriones de 15 días, testículos, glándulas salivales, placenta, embriones de 15 días (Clontech Laboratories) y embriones de 17 días (Clontech Laboratories).

Las mezclas de PCR contenían los cebadores oligonucleotídicos zc21.222 (SEC. ID. nº: 38) y zc21.224 (SEC. ID. nº: 39). La reacción se realizó a una temperatura de hibridación de 66ºC con un tiempo de prolongación de 2 minutos para un total de 35 ciclos utilizando la Ex Taq™ ADN polimerasa (PanVera, Madison, WI) más el anticuerpo. Las muestras de ADN obtenidas eran positivas para zvegf3 por PCR y se confirmaron por secuenciado incluido el ADN del grupo total del banco de embriones de 15 días de ratón, el embrión de 15 días de ratón (Clontech Laboratories) y el embrión de 17 días (adquiridos ambos en Clontech Laboratories), el ADN del grupo completo del banco de glándulas salivales de ratón y el ADNc del grupo completo del banco de testículos de ratón. Se secuenciaron los fragmentos de aproximadamente 600 bp de cada uno de los ADNc del grupo completo del banco de embriones de 15 días de ratón, el ADNmc de embriones de 15 días de ratón y los productos por PCR de ADNmc de los embriones de 17 días de ratón. La secuencia de los ADNmc de los embriones de 17 días de ratón y de los productos de ADNc del grupo completo del banco de embriones de 15 días de ratón confirmó que los fragmentos eran de ADN con zvegf3 de ratón.

Se cribó el ADN con zvegf completo del banco de embriones de 15 días de ratón. Este banco estaba en un banco ordenado representando $9{,}6\times10^6$ clones en el vector pCMV·SPORT 2 (Life Technologies, Gaithersburg, MD). La placa de investigación, que contenía 80 grupos de 12.000 colonias cada una, se identificó por PCR utilizando los cebadores

oligonucleotídicos zc21.223 (SEC. ID. nº: 40) y zc21.224 (SEC. ID. nº: 39) con una temperatura de hibridación de 66ºC durante 35 ciclos. Se obtuvieron dieciocho positivos. Se secuenciaron los fragmentos de cuatro grupos (A2, A10, B2 y C4); se confirmó que todos codifican a zvegf3. Las rondas adicionales de identificación que utilizan las mismas condiciones de reacción y los grupos de las placas de trabajo y de origen identificaron un grupo positivo (5D).

Se identificaron por hibridación las colonias positivas. El grupo 5D procedente de la placa nº 5 de la fuente original se colocó en placas a razón de aproximadamente 250 colonias por placa y se transfirió a membranas de nilón (Hybond-N™; Amersham Corporation, Arlington Heights, IL). Se tomaron cinco filtros para un total de ~1.250 colonias. Se marcaron los filtros con una aguja caliente para orientación, a continuación se desnaturalizaron durante 6 minutos en NaOH 0,5 M y Tris-HCl 1,5 M, pH 7,2. Se neutralizaron a continuación los filtros en NaCl 1,5 M y Tris-HCl 0,5 M, pH 7,2 durante 6 minutos. Se fijó el ADN a los filtros utilizando un reticulador de UV (Stratalinker®, Stratagene, La Jolla, CA) a 1.200 julios. Se generó una sonda por PCR utilizando los cebadores oligonucleotídicos zc21.223 (SEC. ID. nº: 40) y zc21.224 (SEC. ID. nº: 39) y una plantilla de embrión de 15 días de ratón a una temperatura de hibridación de 66ºC durante 35 ciclos. El fragmento de PCR se purificó en gel utilizando una columna rotatoria que contenía una membrana de gel de sílice (QIAquick™ Gel Extraction Kit; Qiagen, Inc., Valencia, CA). El ADN se marcó con radioactividad con ^{32}P utilizando un kit disponible en el mercado (sistema de marcado con cebador aleatorio Rediprime™ II; Amersham Corp., Arlington Heights, IL) según las especificaciones del fabricante. Se purificó la sonda utilizando una columna de impulsión disponible en el mercado (columna NucTrap®; Stratagene, La Jolla, CA; véase la patente U.S. nº 5.336.412). Se prelavaron los filtros en un tampón de prelavado constituido por 0,25× SSC, SDS al 0,25% y EDTA 1 mM. Se cambió la solución un total de tres veces durante un periodo de 45 minutos para eliminar el residuo celular. Se hibridaron previamente los filtros durante la noche a 65ºC en una solución de hibridación (ExpressHyb™ Hybridization Solution; Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA), a continuación se hibridaron durante la noche a 65ºC en la misma solución. Se enjuagaron los filtros dos veces a 65ºC en tampón de prelavado (0,25× SSC, SDS al 25% y EDTA 1 mM), a continuación se lavaron dos veces en tampón de prelavado a 65ºC. Se expusieron los filtros a una película durante 2 días a -80ºC. Había 10 positivos en los filtros. Se seleccionaron 3 clones de las áreas positivas, se rayaron y 15 colonias individuales de estos tres positivos se identificaron por PCR utilizando los cebadores zc21.223 (SEC. ID. nº: 40) y zc21.334 (SEC. ID. nº: 41) a una temperatura de hibridación de 66ºC. Se recuperaron dos positivos y se secuenciaron. Se observó que ambas secuencias eran iguales y se codificó zvegf3 completa de ratón (SEC. ID. nº: 42).

La secuencia de aminoácidos está muy conservada entre las zvegf3 de ratón y humana, con una identidad de la secuencia de aminoácidos del 87%. El péptido secretor, el dominio de CUB, el interdominio y el dominio del factor de crecimiento tienen una identidad del 82%, 92%, 79% y 94% de aminoácidos, respectivamente.

Ejemplo 5

La inmunotransferencia Northern se realizó utilizando Mouse Multiple Tissue Blots de Origene, Rockville, MD y Clontech, Palo Alto, CA. Se generó por PCR una sonda de ADN de aproximadamente 800 bp utilizando el cebador zc21.223 (SEC. ID. nº: 40) para el extremo 5' y el cebador zc21.224 (SEC. ID. nº: 39) para el extremo 3'. Se realizó la reacción durante 35 ciclos a una temperatura de hibridación de 66ºC utilizando Ex Taq™ ADN polimersa (PanVera). El producto de la reacción se purificó en gel utilizando una columna rotativa que contenía membrana en gel de sílice y estaba marcada con ^{32}P utilizando un kit de marcado disponible en el mercado (sistema de marcado de ADN Multiprime™, Amersham Corp.) según las especificaciones del fabricante. La sonda marcada se purificó utilizando una columna de impulsión. Se utilizó una solución de hibridación disponible en el mercado (solución de hibridación ExpressHyb™; Clontech Laboratories, Inc.) para la hibridación previa y como solución de hibridación para las inmunotransferencias Northern. La hibridación tuvo lugar durante la noche a 65ºC, a continuación las transferencias se lavaron cuatro número en 2× SCC y SDS al 0,05% a temperatura ambiente, seguido de dos lavados en 0,1× SSC y SDS al 0,1% a 50ºC. Las inmunotransferencias se expusieron a continuación a la película dos días y durante la noche a -80ºC. Se observaron extensiones de transcrito múltiples. Los transcritos de ~3,5 y ~4,0 kb se observan en embriones de 7, 11, 15 y 17 días, siendo la más fuerte a los 7 días y disminuyendo gradualmente a los 17 días. Se observó un transcrito de ~3,0 kb en el riñón, hígado, cerebro y posiblemente los testículos. Se observó un transcrito de ~1,0 kb en los testículos, músculo y bazo. Las transferencias de manchas corresponden a las inmunotransferencias Northern.

Ejemplo 6

Para generar animales transgénicos que expresan los genes zvegf3 se requiere machos fecundos, adultos (sementales) (B6C3f1, de 2 a 8 meses de vida (Taconic Farms, Germantown, NY)), machos vasectomizados (defectuosos) (B6D2f1, de 2 a 8 meses, (Taconic Farms)), hembras fecundas prepubescentes (donantes) (B6C3f1, de 4 a 5 semanas (Taconic Farms)) y hembras fecundas adultas (receptoras) (B6D2f1, de 2 a 4 meses, (Taconic Farms)).

Los donantes se aclimatan durante 1 semana, a continuación se les inyecta aproximadamente 8 U.I./ratón de gonadotropina de suero de yegua preñada (Sigma, St. Louis, MO) I.P., y 46 a 47 horas después, 8 U.I./gonadotropina coriónica humana de ratón (hCG (Sigma)) I.P. para provocar la superovulación. Los donantes se aparean con sementales después de inyecciones de hormona. La ovulación generalmente se produce a las 13 horas de la inyección de hCG. La copulación se confirma por la presencia de un coágulo vaginal a la mañana siguiente del apareamiento.

Se recogen los óvulos fecundados bajo un microscopio quirúrgico (Leica MZ12 Stereo Microscope, Leica, Wetzlar, Alemania). Los oviductos se recogen y se liberan los óvulos en portaobjetos de análisis de orina que contienen hialuronidasa (Sigma Chemical Co.). Los óvulos se lavan una vez en hialuronidasa, y dos veces en medio W640 de Whitten (Tabla 7; todos los reactivos están disponibles en Sigma Chemical Co.) que se ha incubado con 5% de CO_2, 5% de O_2 y 90% de N_2 a 37ºC. Los óvulos se almacenan en una incubadora a 37ºC/5% de CO_2 hasta la microinyección.

TABLA 7

	mg/200 ml	mg/500 ml
NaCl	1.280	3.200
KCl	72	180
KH_2PO_4	32	80
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	60	150
Glucosa	200	500
Lactato de Ca^{2+}	106	265
Bencilpenicilina	15	37,5
SO_4 de estreptomicina	10	25
$NaHCO_3$	380	950
Piruvato Na	5	12,5
H_2O	200 ml	500 ml
EDTA 500 mM	100 µl	250 µl
Rojo fenol al 5%	200 µl	500 µl
BSA	600	1.500

El ADNc de zvegf3 se inserta en el vector de expresión pHB12-8 (véase la Fig. 2). El vector pHB12-8 se obtuvo a partir de p2999B4 (Palmiter *et al*., *Mol. Cell Biol.* 13:5266-5275, 1993) por inserción de un intrón de insulina II de rata (aprox. 200 bp) y un policonector (Fse I/Pme I/Asc I) en la secuencia Nru I. El vector comprende un activador de metaltioneína (MT-1) de ratón (aprox. 750 bp) y la zona no traducida de la hormona de crecimiento humano (hGH) y la señal de poliadenilación (aprox. 650 bp) flanqueada por 10 kb de la secuencia adyacente 5' MT-1 y 7 kb de la secuencia adyacente 3' MT-1. El ADNc se inserta entre la insulina II y las secuencias de hGH.

Se alinean, se purifican en gel y se vuelven a poner en suspensión 10 a 20 microgramos del ADN plásmido en Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 0,25 mM pH 8,0, a una concentración final de 5 a 10 nanogramos por microlitro para microinyección.

El ADN plásmido se microinyecta en los óvulos recogidos contenidos en una gota de medio W640 recubierto por aceite mineral caliente, equilibrado con CO_2. El ADN se extrae en una aguja de inyección (que se desliza en un capilar de vidrio de borosilicato de 1 mm de diámetro externo y 0,75 mm de diámetro interno) y se inyecta en óvulos individuales. Cada óvulo es penetrado con la aguja de inyección en uno o ambos de los pronúcleos haploides.

Los picolitros de ADN se inyectan en los pronúcleos, y la aguja de inyección se retira sin ponerla en contacto con los nucleolos. Se repite el procedimiento hasta que todos los óvulos están inyectados. Los óvulos microinyectados con éxito se transfieren a una placa de cultivo de tejido del órgano con el medio W640 gaseado previamente para almacenaje durante la noche en una incubadora a 37ºC, 5% de CO_2.

Al día siguiente, los embriones con 2 células se transfieren a receptoras pseudopreñadas. En las receptoras se identifica la presencia de coágulos de copulación, tras la copulación con vasectomizados estériles. Las receptoras se anestesian y se rasuran en el costado izquierdo dorsal y se transfieren a un microscopio quirúrgico. Se practica una pequeña incisión en la piel y a través de la pared del músculo en medio del área abdominal contorneado por la caja torácica, el cuarto trasero y la pata trasera, a medio camino entre la rodilla y el bazo. Los órganos reproductores se sacan al exterior en una pequeña toalla quirúrgica. La almohadilla de grasa se tiende sobre la toalla quirúrgica y una pequeña pinza serrefine (Roboz, Rockville, MD) se acopla a la almohadilla de grasa y se deja colgando sobre el dorso del ratón, impidiendo que los órganos se vuelvan a deslizar.

Con una pipeta fina de transferencia que contiene aceite mineral seguido de W640 alternativo y burbujas de aire, se transfieren a la receptora 12 a 17 embriones de 2 células sanos de la inyección del día anterior. La ampolla hinchada se coloca y se cuelga del oviducto entre la ampolla y la bolsa, y se practica una muesca en el oviducto con una aguja de calibre 28 g en la bolsa, asegurando que no lagrimea la ampolla o la bolsa.

Se transfiere la pipeta a la muesca en el oviducto y los embriones se hinchan, dejando que escape la primera burbuja de aire de la pipeta. La almohadilla de grasa se impulsa suavemente dentro del peritoneo, y los órganos reproductores se dejan deslizar. La pared del peritoneo se cierra con una sutura, y la piel se cierra con una grapa de herida. Los ratones se recuperan en un calentador de portaobjeto durante un mínimo de 4 horas.

Las receptoras se devuelven a las jaulas en parejas y se dejan de 19 a 21 días de gestación. Tras el nacimiento, 19 a 21 días después del parto se dejan antes del destete. Se comprueba el sexo en los animales destetados y se colocan en jaulas por sexos separados y se recorta una biopsia de 0,5 cm (utilizada para genotipado) de la cola con tijeras limpias.

Se prepara el ADN genómico de los recortes de la cola utilizando un kit disponible en el mercado (KNeasy™ 96 Tissue Kit; Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico se analiza por PCR utilizando cebadores diseñados para el fragmento 3' UTR de la hormona de crecimiento humano (hGH) del vector transgénico. La utilización de una zona única para la secuencia humana (identificada en una alineación de las secuencias del ADN 3' UTR de la hormona de crecimiento humana y de ratón) asegura que la reacción de la PCR no amplía la secuencia del ratón. Los cebadores zc17.251 (SEC. ID. nº: 30) y zc17.252 (SEC. ID. nº: 31) amplían un fragmento de 368 pares de bases de hGH. Además, los cebadores zc17.156 (SEC. ID. nº: 32) y zc17.157 (SEC. ID. nº: 33), que se hibridan a las secuencias del vector y amplían la inserción del ADNc, pueden utilizarse junto con los cebadores de hGH. En estos experimentos, el ADN de los animales positivos al transgén generarán dos bandas, una banda de 368 pares de bases correspondientes al fragmento 3' UTR de hGH y una banda de tamaño variable correspondiente a la inserción del ADNc.

Una vez se confirma que los animales son transgénicos (TG), se vuelven a cruzar en una cepa endogámica colocando una hembra TG con un macho salvaje, o un macho TG con una o dos hembra(s) salvaje(s). A medida que las crías nacen y se destetan, se separan los sexos, y se recortan sus colas para genotipado.

Para comprobar la expresión de un transgén en un animal vivo, se lleva a cabo una hepatectomía parcial. Se realiza una preparación quirúrgica del abdomen superior directamente bajo la apófisis xifoide. Utilizando una técnica estéril, se practica una pequeña incisión de 1,5 a 2 cm bajo el esternón, y se saca al exterior el lóbulo lateral izquierdo del hígado. Utilizando un hilo de seda 4-0, se hace un nudo alrededor del lóbulo izquierdo asegurándolo fuera de la cavidad corporal. Se utiliza una abrazadera no traumática para sujetar el nudo mientras que se coloca un segundo bucle de Dexon absorbible (American Cyanamid, Wayne, N.J.) próxima al primer nudo. Se hace un corte distal en el nudo Dexon, y se colocan aproximadamente 100 mg del tejido hepático escindido en una placa de petri estéril. La sección de hígado escindido se transfiere a un tubo con fondo redondo de polipropileno de 14 ml, se congela rápidamente en nitrógeno líquido y se almacena en nieve carbónica. El punto quirúrgico se cierra con grapas de sutura y de herida, y la jaula del animal se coloca en una almohadilla de calefacción a 37ºC durante 24 horas posfuncionalmente. El animal se comprueba cada día después de la operación, y las grapas tejidas se extraen 7 a 10 días después de la intervención quirúrgica.

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

Se preparó un vector de adenovirus utilizando un potenciador génico de albúmina específico para el hígado y un activador basal (denominado "activador AEO"). Se construyó el montaje del activador de albúmina (denominado pAEO) insertando un fragmento Not1/EcoRV de 2,2 kb del pALBdelta2L (Pinkert *et al*., *Genes Dev.* 1:268-276, 1987) y un segmento de ADN NruI/Not1 de 850 bp que comprende el intrón de la insulina II de rata, un policonector Frei/PmeI/AscI y la secuencia de poli A de la hormona de crecimiento humano en un vector fagómido disponible en el mercado (pBluescript® KS(+); Stratagene, La Jolla, CA). Para la microinyección, se digirió el plásmido con Not1 para liberar el casete de expresión.

Se construyó un vector de adenovirus adicional utilizando un activador del gen de queratina (K14) específico para las células epiteliales (Vassar *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1563-1567, 1989). El marco de lectura abierta de 1038 bp que codifica la zvegf3 humana completa se amplificó por PCR a fin de introducir un codón de iniciación optimizado y flanqueando las secuencias 5' *Pme*I y 3' *Asc*I utilizando los cebadores ZC20.180 (SEC. ID. nº: 34) y ZC20.181 (SEC. ID. nº: 35). El fragmento *Pme*I/*Asc*I resultante se subclonó en el policonector de pKFO114, un vector transgénico restringido a queranocitos basales que comprende el activador de queratina 14 (K14) humana (un fragmento de aproximadamente 2,3 kb ampliado en el ADN genómico humano [obtenido en Clontech Laboratories, Inc.] basándose en la secuencia de Staggers *et al*., "Sequence of the promoter for the epidermal keratina gene, K14", nº de registro del GenBank 11076, 1994), seguido de un intrón heterólogo (un fragmento *BstX*I/*Pst*I de 294 bp de pIRES1hyg (Clontech Laboratories, Inc.; véase, Huang y Gorman, *Nucleic Acids Res.* 18:937-947, 1990), un policonector *Pme*I/*Asc*I y la señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento humano (un fragmento *Sma*I/*Eco*RI de 627 bp; véase, Seeburg, *DNA* 1:239-249, 1982). Se separó la inserción del transgén del eje central del plásmido mediante digestión con *Not*I y purificación en gel de agarosa, y se microinyectaron óvulos fertilizados de apareamientos de ratones B6C3F1Tac o de ratones FVB/NTac endogámicos y se implantaron en hembras pseudopreñadas esencialmente tal como describe Malik *et al*., *Molec. Cell. Biol.* 15:2349-2358, 1995. Se identificaron los implantadores transgénicos por PCR en el ADN genómico de la cola utilizando cebadores específicos para la seña de poli A de la hormona de crecimiento humano (ZC17.252, SEC. ID. nº: 31; y ZC17.251, SEC. ID. nº: 30) para ampliar un producto de diagnóstico de 368 bp. Se iniciaron estirpes transgénicas cruzando implantadores con ratones C57BL/6Tac o FVB/NTac.

Se generaron ratones transgénicos esencialmente como se describió anteriormente utilizando los activadores MT-1, K14 y AEO. Se generaron cuatro ratones transgénicos MT-1/zvegf3. En un animal (hembra) se produjeron aproximadamente 800 células con moléculas de ARNm/célula con zvegf3 en el hígado después de la provocación con

cinc. Este animal presentaba alargamiento del hígado y del bazo. Se observó también la proliferación de células sinoidales hepáticas y hematopoyesis extramedular. Un ratón transgénico (hembra) con K14/zvegf3 presentaba un nivel bajo de expresión con peso corporal bajo, hematocrito bajo y recuento de plaquetas bajo. Un ratón transgénico con AEO/zvegf3 (macho) con un nivel bajo de expresión presentó proliferación de las células sinusoidales del hígado.

Ejemplo 7

Un plásmido de expresión que contiene todo o parte de un polinucleótido que codifica a zvegf3 se construye por recombinación homóloga. Un fragmento de ADNc de zvegf3 se aisla por PCR utilizando la secuencia polinucleotídica SEC. ID. nº: 1 con las zonas adyacentes a los extremos 5' y 3' correspondientes a las secuencias del vector que son adyacentes al punto de inserción de zvegf3. Cada uno de los cebadores para la PCR incluye desde el extremo 5' a 3': 40 bp de la secuencia adyacente del vector y 17 bp correspondiente a los terminales amino y carboxilo del marco de lectura abierto de zvegf3.

Diez μl de los 100 μl de la reacción por PCR se introducen en un gel de agarosa al 0,8% de baja temperatura de fusión (Reaplaque GTG®; FMC BioProducts, Rockland, ME) con 1 × tampón TBE para análisis. Los 90 μl restantes de la reacción PCR se precipitan con adición de 5 μl de NaCl 1 M y 250 μl de etanol absoluto. El plásmido pZMP6, que ha sido cortado con SmaI, se utiliza para la recombinación con el fragmento de PCR. Se construyó el plásmido pZMP6 procedente del pZP9 (depositado en la American Type Culture Collection 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con el número de registro nº 98668) con los elementos genéticos de la levadura extraídos de pRS316 (depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevadrd, Manassas, VA 20110-2209, con el número de registro nº 77145), un elemento de la secuencia de entrada del ribosoma interno (IRES) del poliovirus y el dominio extracelular del CD8 truncado en el extremo del terminal C del dominio transmembranario. pZMP6 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el activador precoz inmediato de citomegalovirus, múltiples secuencias de restricción para la inserción de las secuencias de codificación, un codón de terminación y un terminador de la hormona de crecimiento humano. El plásmido contiene también un origen de replicación de *E. coli*. Una unidad de expresión del marcador seleccionable de mamífero que comprende un activador SV40, potenciador y origen de replicación, un gen DHFR y el terminador SV40; así como las secuencias URA3 y CEN-ARS requeridas para la selección y replicación en *S. cerevisiae*.

Cien microlitros de células de levadura competitivas (*S. cerevisiae*) se combinan independientemente con 10 μl de varias mezclas de ADN de antes y se transfieren a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. Las mezclas de levadura/ADN se electropulsan utilizando equipos de suministro de potencia de 0,75 kV (5 kV/cm), ∞ ohmios, 25 μF. A cada cubeta se añaden 600 μl de sorbitol 1,2 M y la levadura se coloca en placas en dos alícuotas de 300 μl en dos placas URA-D y se incuban a 30ºC. Después de aproximadamente 48 horas, los transformantes de la levadura Ura^+ de una sola placa se vuelven a poner en suspensión en 1 ml de H_2O y se centrifugan brevemente para sedimentar las células de levadura. El sedimento celular se vuelve a poner en suspensión en 1 ml de tampón de lisis (Triton X-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Quinientos mililitros de la mezcla de lisis se añaden al tubo Eppendorf que contiene 300 μl de perlas de vidrio lavadas con ácido y 200 μl de fenol-cloroformo, se agita fuertemente durante intervalos de 1 minuto dos o tres veces, y se centrifuga durante 5 minutos en una centrifugadora Eppendorf a velocidad máxima. Trescientos microlitros de la fase acuosa se transfieren a un tubo reciente, y el ADN se precipita con 600 μl de etanol (EtOH), seguido de centrifugación durante 10 minutos a 4ºC. El sedimento se vuelve a poner en suspensión en 10 μl de H_2O.

La transformación de las células hospedadoras electrocompetitivas de *E. coli* (células Electromax DH10B™; adquirida en Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) se realiza con 0,5 a 2 ml de ADN prep de levadura y 40 μl de células. Se electropulsan las células a 1,7 kV, 25 μF y 400 ohmios. Después de la electroporación, se colocan en placas 1 ml de SOC (Bacto™ triptona al 2% (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura al 0,5% (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, glucosa 20 mM) se colocan en placas en alícuotas de 250 μl en cuatro placas LB AMP (caldo de cultivo LB (Lennox), Bacto™ Agar al 1,8% (Difco), 100 mg/l de ampicilina).

Los clones individuales que albergan el montaje de expresión correcto para zvegf3 se identifican mediante el digesto de restricción para verificar la presencia de la inserción zvegf3 y para confirmar que varias secuencias de ADN se han unido correctamente una a la otra. Las inserciones de clones positivos se someten a análisis de la secuencia. El ADN plásmido a escala mayor se aísla utilizando un kit disponible en el mercado (QIAGEN Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. El montaje correcto se denomina pZMP6/zvegf3 (Fig. 3).

Ejemplo 8

Se colocan células DG44 de CHO (Chasin *et al*., *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555-666, 1986) en placas de cultivo tisular de 10 cm para cultivar a aproximadamente 50% al 70% de confluencia durante la noche a 37ºC, 5% de CO_2, en medio F12/FBS de Ham (medio F12 de Ham, Life Technologies), suero de bovino fetal al 5% (Hyclone, Logan, UT), L-glutamina al 1% (JRH Biosciences, Lenexa, KS), piruvato sódico al 1% (Life Technologies). Se transfectan a continuación las células con el plásmido pZMP6/zvegf3 por transfección mediada por liposomas utilizando una formulación de liposomas 3:1 (p/p) del lípido procatiónico 2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-

dimetil-1-propaniminio-trifluoroacetato y el lípido neutro dioleoil-fosfatidiletanolamina en agua filtrada por membranas (reactivo Lipofectamina™, Life Technologies), en formulación de medio exento de suero (SF) (F12 de Ham, 10 mg/ml de transferrina, 5 mg/ml de insulina, 2 mg/ml de fetuina, 1% de L-glutamina y 1% de piruvato sódico). Se diluye el plásmido pZMP6/zvegf3 en tubos de 15 ml hasta un volumen final total de 640 μl con el medio SF. Se mezclan 300 μl de Lipofectamina™ con 605 μl de medio SF. Se añade la mezcla de Lipofectamina™ a una mezcla de ADN y se deja incubar aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se añaden cinco ml de medio SF a la mezcla de ADN:Lipofectamina™. Se enjuagan las células una vez con 5 ml de medio SF, se aspiran y se añade la mezcla ADN:Lipofectamina™. Se incuban las células a 37ºC durante cinco horas, a continuación se añaden a cada placa 6,4 ml de F12 de Ham/FBS al 10%, medio PSN al 1%. Se incuban las placas a 37ºC durante la noche y la mezcla ADN:Lipofectamina™ se sustituye por medio de Ham con FBS al 5% al día siguiente. Al tercer día tras la transfección, las células se dividen en matraces T-175 en el medio de cultivo. Al 7º día de la transfección, las células se tiñen con anticuerpo monoclonal FITC-anti-CD8 (Pharmingen, San Diego, CA) seguido de perlas magnéticas conjugadas con anti-FITC (Miltenyi Biotec). Las células positivas a CD8 se separan utilizando columnas disponibles en el mercado (columnas mini-MACS; Miltenyi Biotec) según las directrices del fabricante y se colocan en DMEM/F12 de Ham/FBS al 5% sin nucleósidos pero con metotrexato 50 nM (medio de selección).

Las células se colocan en placas para subclonar a una densidad de 0,5, 1 y 5 células por pocillo en placas de 96 pocillos en el medio de selección y se dejan crecer durante aproximadamente dos semanas. Se comprueba en los pocillos la evaporación del medio y se vuelve a llevar a 200 μl por pocillo cuando sea necesario durante este proceso. Cuando un gran porcentaje de las colonias en la placa están cerca de confluencia, se recogen 100 μl del medio de cada pocillo para análisis por inmunotransferencia de manchas, y las células se alimentan con medio de selección reciente. Se aplica el sobrenadante a un filtro de nitrocelulosa en un aparato de transferencia de manchas y el filtro se trata a 100ºC en una estufa de vacío para desnaturalizar la proteína. Se incuba el filtro en Tris-glicina 625 mM, pH 9,1, β-mercaptoetanol 5 mM, a 65ºC, 10 minutos, a continuación en tampón A de Western leche en polvo sin grasa al 2,5% (gelatina al 0,25%, Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Igepal CA-630 al 0,05%) durante la noche a 4ºC en un agitador rotativo. Se incuba el filtro con un conjugado de anticuerpo-HRP en tampón A Western con leche en polvo sin grasa al 2,5% durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador rotativo. Se lava el filtro a continuación tres veces a temperatura ambiente en PBS más Tween 20 al 0,01%, 15 minutos por lavado. Se revela el filtro con reactivos de quimioluminiscencia (kit de marcado directo ECL™; Amersham Corp., Arlington Heights, IL) según las directrices del fabricante y se expone a la película (Hyperfilm ECL, Amersham) durante aproximadamente 5 minutos. Los clones positivos se tratan con tripsina de las placas de 96 pocillos y se transfieren a placas de 6 pocillos en el medio de selección para tratamiento a escala y análisis por inmunotransferencia Western.

Ejemplo 9

La proteína zvegf3 completa se produjo en células BHK transfectadas con pZMP6/zvegf3 (Ejemplo 7). Las células BHK 570 (ATCC CRL-10314) se colocaron en placas de cultivo de tejido de 10 cm y se dejaron cultivar durante aproximadamente 50 a 70% de confluencia durante la noche a 37ºC, 5% de CO_2 en medio DMEM/FBS (DMEM, Gibco/BRL rico en glucosa; Life Technologies), suero bovino fetal al 5% (Hyclone, Logan, UT) L-glutamina 1 mM (JRH Biosciences, Lenexa, KS), piruvato sódico 1 mM (Life Technologies). Las células se transfectaron a continuación con pZMP6/zvegf3 por transfección mediada por liposomas (utilizando (Lipofectamina™; Life Technologies), en medio exento de suero (SF) (DMEM enriquecido con 10 mg/ml de transferrina, 5 mg/ml de insulina, 2 mg/ml de fetuina, L-glutamina al 1% y piruvato sódico al 1%). El plásmido se diluyó en tubos de 15 ml hasta un volumen final total de 640 μl con medio SF. 35 μl de la mezcla de lípido se mezclaron con 605 μl de medio SF y la mezcla se dejó incubar aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron cinco mililitros de medio SF a la mezcla ADN:lípido. Las células se enjuagaron una vez con 5 ml de medio SF, se aspiraron y se añadió la mezcla ADN:lípido. Se incubaron las células a 37ºC durante cinco horas, a continuación se añadieron 6,4 ml de DMEM/FBS al 10%, PSN al 1% a cada placa. Se incubaron las placas a 37ºC durante la noche y se sustituyó la mezcla ADN:lípido por medio FBS/DMEM al 5% al día siguiente. Al 5º día después de la transfección, se dividieron las células en matraces T-162 en el medio de selección (DMEM +FBS al 5%, L-Gln al 1%, NaPyr al 1% y metotrexato 1 μM). Aproximadamente 10 días después de la transfección, se trataron con tripsina las placas de cultivo de 150 mm de colonias resistentes a metotrexato de cada transfección y las células se mezclaron y se colocaron en placas en un matraz T-162 y se transfectaron al cultivo a gran escala.

Ejemplo 10

Se construyó un vector de expresión de células de mamífero para el dominio del factor de crecimiento de zvegf3 esencialmente como se describe en el Ejemplo 7. La secuencia de codificación para el dominio del factor de crecimiento (restos 235 a 345 de la SEC. ID. nº: 2), unido a una secuencia que codifica una secuencia señal secretora t-PA optimizada (patente U.S. nº 5.641.655) se unió al vector pZMP11 linealizado corriente abajo del activador de CMV. El plásmido pZMP11 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el activador precoz inmediato a CMV, un intrón de consenso de la zona variable del locus de la cadena pesada de inmunoglobulina de ratón, secuencias Kozak, secuencias de restricción múltiples para la inserción de las secuencias de codificación, un codón de terminación y un terminador de la hormona de crecimiento humano. El plásmido contiene también un elemento IRES de poliovirus, el dominio extracelular de CD8 truncado en el extremo del terminal C del dominio transmembranario, un origen de replicación en *E. coli*, una unidad de expresión del marcador seleccionable

de mamífero que tiene un activador SV40, potenciador y origen de replicación, un gen DHFR, el terminador SV40 y las secuencias URA3 y CEN-ARS requeridas para la selección y replicación en *S. cerevisiae*. En la Fig. 4 se presenta el vector resultante, denominado pZMP11/zv3GF-otPA.

Se transfectaron células BHK 570 con pZMP11/zv3GF-otPA y se cultivaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 9.

Ejemplo 11

Para la construcción de vectores de adenovirus, se amplió por PCR la zona de codificación de la proteína zvegf3 humana utilizando los cebadores que añadían secuencias de restricción PmeI y AscI en los terminales 5' y 3' respectivamente. Se utilizaron cebadores de PCR ZC20.180 (SEC. ID. nº: 34) y ZC20.181 (SEC. ID. nº: 35) con una plantilla del ADNc de la zvegf3 completa en una reacción de PCR de la manera siguiente: un ciclo a 95ºC durante 5 minutos; seguido de 15 ciclos a 95ºC durante 1 min., 61ºC durante 1 min., y 72ºC durante 1,5 min.; seguido de 72ºC durante 7 min.; seguido de agitación a 4ºC. Se cargó el producto de la reacción PCR en un gel de agarosa al 1,2% de bajo punto de fusión en tampón TAE (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M). El producto de PCR zvegf3 se escindió del gel y se purificó utilizando un kit disponible en el comercio que comprende una columna rotatoria de membrana de gel de sílice (kit de purificación por PCR QIAquick™ y kit de limpieza del gel; Qiagen, Inc.) para instrucciones del kit. El producto por PCR se digirió a continuación con PmeI y AscI, se extrajo con fenol/cloroformo, se precipitó con EtOH y se rehidrató en 20 ml de TE (Tris/EDTA pH 8). El fragmento zvegf3 de 1038 bp se ligó a continuación en las secuencias PmeI-AscI del vector transgénico pTG12-8 (conocido también como pHB12-8; véase el Ejemplo 6) y se transformó en células competitivas DH10B™ de *E. coli* por electroporación. Se identificaron los clones que contienen zvegf3 por el plásmido ADN miniprep seguido de digestión con PmeI y AscI. Se secuenció un clon positivo para asegurar que no existían eliminaciones u otras anomalías en el montaje. Se confirmó la secuencia del ADNc con zvegf3.

Se preparó ADN utilizando un kit disponible en el mercado (Maxi Kit, Qiagen, Inc.) y se liberó el ADNc con zvegf3 de 1038 bp del vector pTG12-8 utilizando las enzimas PmeI y AscI. Se aisló el ADNc en un gel de agarosa de punto de fusión bajo al 1% y se escindió del gel. La sección de gel se fundió a 70ºC, y se extrajo el ADN dos veces con un volumen igual de fenol tamponado con Tris y se precipitó con EtOH. Se volvió a poner en suspensión el ADN en 10 μl de H_2O.

El ADNc de zvegf3 se clonó en las secuencias EcoRV-AscI de un pAdTrack-CMV (He, T-C. *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2509-2514, 1998). Este montaje contiene el gen marcador con la proteína verde fluorescente (GFP). El activador de CMV que dirige la expresión de GFP se sustituyó con el activador SV40 y la señal de poliadenilación de SV40 se sustituyó por la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento humano. Además, el policonector natural se sustituyó por las secuencias FseI, EcoRI y AscI. Esta forma modificada de pAdTrack-CMV se denominó pZyTrack. La ligadura se realizó utilizando una ligadura de ADN disponible en el mercado y un kit de identificación (kit Fast-Link™; Epicentre Technologies, Madison, WI). Los clones que contienen zvegf3 se identificaron por digestión del ADN miniprep con FseI y AscI. Con el fin de linealizar el plásmido, se digirió el plásmido pZyTrack zvegf3 con PmeI. Aproximadamente 1 μg del plásmido linealizado se transformó conjuntamente con 200 ng de pAdEasy superenrollado (He *et al*., *ibid.*) en células BJ5183 de *E. coli* (He *et al*., *ibid.*). La transformación conjunta se realizó utilizando Gene Pulser de Bio-Rad a 2,5 kV, 200 ohmios y 25 μFa. Se colocó la mezcla de transformación conjunta completa en 4 placas LB que contenían 25 μg/ml de kanamicina. Las colonias más pequeñas se seleccionaron y se propagaron en LB/kanamicina y se identificó el ADN de adenovirus recombinante por procedimientos habituales con ADN miniprep. La digestión del ADN de adenovirus recombinante con FseI y AscI confirmó la presencia de la inserción zvegf3. El ADN miniprep del adenovirus recombinante se transformó en células competitivas DH10B™ de *E. coli* y se preparó ADN utilizando Maxi Kit (Qiagen, Inc.) según las instrucciones del kit.

Se digirieron aproximadamente 5 μg de ADN adenovírico recombinante con la enzima PacI (New England Biolabs) durante 3 horas a 37ºC en un volumen de reacción de 100 μl que contenía 20 a 30 U de PacI. El ADN digerido se extrajo dos veces con un volumen igual de fenol/cloroformo y se precipitó con etanol. El sedimento de ADN se volvió a poner en suspensión en 10 μl de agua destilada. Un matraz T25 de células QBI-293A (Quantum Biotechnologies, Inc. Montreal, Qc. Canadá), inoculado el día anterior y cultivado entre 60 y 70% de confluencia, se transfectaron con el ADN digerido con PacI. El ADN digerido con PacI se diluyó hasta un volumen total de 50 μl con HBS estéril (NaCl 150 mM, HEPES 20 mM). En un tubo separado, 20 μl de sales de N-[1(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP) a 1 mg/ml (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) se diluyeron hasta un volumen total de 100 μl con HBS. Se añadió el ADN al DOTAP, se mezcló suavemente pipeteando arriba y abajo y se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El medio se separó de las células 293A y se lavó con 5 ml de medio alfa esencial mínimo (MEM) exento de suero que contenía piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales de MEM 0,1 mM y tampón HEPES 25 mM (reactivos adquiridos en Life Technologies, Gaithersburg, MD). Se añadieron 5 ml de MEM exento de suero a las células 293A y se mantuvo a 37ºC. La mezcla ADN/lípido se añadió gota a gota al matraz T25 de las células 293A, se mezcló suavemente y se incubó a 37ºC durante 4 horas. Después de 4 h. el medio que contenía la mezcla ADN/lípido se aspiró y se sustituyó con 5 ml de MEM completo que contiene 5% de suero ternero fetal. Las células transfectadas fueron controladas para la expresión de GFP y la formación de focos (placas víricas).

Siete días después de la transfección de las células 293A con el ADN adenovírico recombinante, las células expresaron la proteína GFP y empezaron a formar focos ("placas" víricas). Se recogió el lisado vírico en bruto utilizando una espátula de células para recoger todas las células 293A. El lisado se transfirió a un tubo cónico de 50 ml. Para liberar la mayoría de las partículas víricas de las células, se realizaron tres ciclos de congelación/descongelación en un baño con nieve carbónica/etanol y un baño de agua a 37ºC.

Se amplió el lisado en bruto (ampliación primaria (1º)) para obtener una "solución madre" de trabajo del lisado rAdV de zvegf3. Diez placas de 10 cm de células 293A casi confluentes (80 a 90%) se introdujeron 20 horas antes, 200 μl de lisado rAdV en bruto a cada placa de 10 cm y se controló durante 48 a 72 horas observando por CPE al microscopio de luz blanca y la expresión de GFP al microscopio fluorescente. Cuando todas las células 293A presentaban CPE (efecto citopático) este lisado 1º de solución madre se recogió y se realizaron ciclos de congelación/descongelación como se describe bajo el lisado rAdV en bruto.

La ampliación secundaria (2º) de zvegf3 rAdV se obtuvo de la manera siguiente: se prepararon veinte placas de cultivo de tejido de 15 cm de modo que las células eran 80 a 90% confluentes. Cada uno de los 20 ml de medio MEM al 5% se separó y cada placa se inoculó con 300 a 500 μl del lisado 1º ampliado de rAdv. Tras 48 horas las células 293A se lisaron a partir de la producción de virus, se recogió el lisado en botellas de centrifugadora de propileno de 250 ml y se purificó el rAdv.

Se añadió detergente NP-40 a una concentración final de 0,5% a las botellas del lisado en bruto con objeto de lisar todas las células. Se colocaron las botellas en una plataforma rotativa durante 10 minutos agitando tan rápido como era posible sin caerse las botellas. Se sedimentó el residuo por centrifugación a 2.000 × G durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a botellas de centrifugadora de policarbonato de 250 ml y se añadieron 0,5 volúmenes de PEG8000 al 20%/solución NaCl 2,5 M. Se agitaron las botellas durante la noche en hielo. Las botellas se centrifugaron a 20.000 × G durante 15 minutos y el sobrenadante se descartó en una solución de blanqueo. Utilizando una espátula estéril para células, el precipitado blanco de virus/PEG de las dos botellas se volvió a poner en suspensión en 2,5 ml de PBS. La solución de virus resultante se colocó en tubos de microcentrifugadora de 2 ml y se centrifugó a 14.000 × G en la microcentrifugadora durante 10 minutos para eliminar cualquier resto de células adicional. El sobrenadante de los tubos de microcentrifugadora de 2 ml se transfirió a un tubo de cierre rápido de polipropileno de 15 ml y se ajustó a una densidad de 1,34 g/ml con CsCl. Se estimó el volumen de la solución del virus y se añadieron 0,55 g/ml de CsCl. El CsCl se disolvió y 1 ml de esta solución pesaba 1,34 g. La solución se transfirió a tubos de centrifugadora de pared delgada de policarbonato de 3,2 ml y se centrifugó a 348.000 × G durante 3 a 4 horas a 25ºC. El virus formó una banda blanca. Utilizando puntas de pipeta de boro anchas, se recogió la banda de virus.

El virus del gradiente tenía una gran cantidad de CsCl que debía eliminarse antes de ser utilizado en las células. Se utilizaron columnas de intercambio iónico disponibles en el mercado (columnas PD-10 rellenas previamente con Sephadex® G-25M; Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) para desalar la preparación del virus. Se equilibró la columna con 20 ml de PBS. Se cargó el virus y se dejó avanzar dentro de la columna. Se añadieron 5 ml de PBS a la columna y se recogieron fracciones de 8 a 10 gotas. Se determinaron las densidades ópticas de las diluciones 1:50 de cada fracción a 260 nm en un espectrofotómetro. Un pico de absorbancia transparente estaba presente entre las fracciones 7 a 12. Estas fracciones se mezclaron y se determinó la densidad óptica (D.O.) de una dilución 1:25. La D.O. se convirtió a concentración de virus utilizando la fórmula: (D.O. a 260 nm) (25) ($1{,}1 \times 10^{12}$) = viriones/ml. La D.O. de una dilución 1:25 de rAdV de zvegf3 fue 0,145, dando una concentración de virus de 4×10^{12} viriones/ml.

Para almacenar el virus se añadió glicerol al virus purificado a una concentración final del 15%, se mezcló suave pero eficazmente y se almacenó en alícuotas a -80ºC.

Se siguió un protocolo desarrollado por Quantum Biotechnologies, Inc. (Montreal, Canadá) para medir la infectividad del virus recombinante. En resumen, se sembraron dos placas de cultivo tisular de 96 pocillos con 1×10^4 células 293A por pocillo en MEM que contenía suero bovino fetal al 2% por cada virus recombinante a ensayar. Después de 24 horas las diluciones de 10 veces de cada virus desde 1×10^{-2} hasta 1×10^{-14} se hicieron en MEM que contenía suero bovino fetal al 2%. 100 μl de cada dilución se colocó en cada uno de los 20 pocillos. Después de 5 días a 37ºC, los pocillos fueron leídos bien positivos o negativos para el efecto citopático (CPE) y se calculó un valor para las "unidades formadoras de placa/ml" (PFU).

La formulación de $TCID_{50}$ utilizada fue como para Quantum Biotechnologies, Inc., anteriormente. El valor (T) se determinó en una placa donde se diluyó el virus desde 10^{-2} hasta 10^{-14} y se leyó 5 días después de la infección. A cada dilución se determinó una relación (R) de pocillos positivos para CPE por el número total de pocillos.

Para calcular el valor de la muestra de virus sin diluir: el factor, "F" = 1+d(S-0,5); donde "S" es la suma de las relaciones (R); y "d" es el log10 de la serie de dilución, por ejemplo, "d" es igual a 1 para una serie de diez veces de dilución. El valor de la muestra sin diluir es $T = 10^{(1+F)} = TCID_{50}$/ml. Para convertir $TCID_{50}$/ml en pfu/ml, se sustrajo 0,7 del exponente en el cálculo el valor (T).

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

Ejemplo 12

El tratamiento de ratones con zvegf3-adenovirus condujo a cambios en el hígado y el bazo. Los hígados que estaban pálidos y muy alargados, con vasos alargados en las puntas de los lóbulos. Los hígados también presentaban proliferación de células sinoidales. Se observaron también cambios en los hepatocitos (hipertrofia, degeneración y necrosis) y lo más probable eran efectos inespecíficos de la infección por adenovirus. El cambio esplénico consistía en aumento de la hematopoyesis extramedular, que se correlacionaba con extensiones esplénicas alargadas.

Ejemplo 13

Los datos de los ratones tratados con adenovirus y transgénicos concordaban con el aumento de hematopoyesis y/o angiogénesis en los animales de la prueba. Se emprendió por consiguiente un estudio para probar si proliferan las células estimuladas con zvegf3 administradas con adenovirus en los compartimentos hematopoyético o linfoide, tal como se determina mediante examen de la sangre periférica, examen histológico e incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) en los tejidos.

Los ratones (macho, C57BI, 7 semanas de vida) se dividieron en tres grupos. El día 0, se administró adenovirus del original o zvegf3 al primer (n=11) y segundo (n=12) grupos, respectivamente, por la vena de la cola, recibiendo cada ratón una dosis de $\sim 1 \times 10^{11}$ partículas en ~0,1 ml de volumen. El tercer grupo (n=8) no recibió ningún tratamiento. Se administraron a cada ratón dos dosis intraperitoneales de 3 mg de solución BrdU recién preparada a las aproximadamente 24 y 12 horas antes del sacrificio. Los días 2, 4, 6, 8 y 10, dos ratones de cada grupo de tratamiento y uno o dos ratones sin tratar se sacrificaron y se recogieron los tejidos y la sangre. Se analizaron las muestras para un recuento completo de sangre (CBC) y análisis químico del suero, y se prepararon extensiones para análisis de sangre diferencial manual y de las células madre de la médula. Un fémur, pulmón, corazón, timo, hígado, riñón, bazo, páncreas, duodeno y ganglios linfáticos mesentéricos se sometieron a histología normalizada y evaluación de la incorporación de BrdU. El revestimiento del duodeno sirvió como tejido de referencia para la incorporación de BrdU.

Además, dos ratones que recibieron aproximadamente la mitad de la dosis de partículas de adenovirus con zvegf3 y un ratón que recibió la dosis completa de adenovirus del original se sacrificaron y analizaron tal como se describió anteriormente el día 16.

Una pieza de hígado de cada ratón se reservó para el ensayo con ARNm de la proteína del adenovirus para examinar a lo largo del tiempo la expresión de las preparaciones de adenovirus.

Al inicio del día 6, la mayoría de los animales tratados con adenovirus presentaban los hígados y los bazos alargados a simple vista en comparación con los ratones sin tratar. Los hígados de los ratones tratados con adenovirus con zvegf3 tendían a parecer más pálidos que los animales tratados con el virus original. Se observó la proliferación de las células sinusoidales en el hígado. La inspección visual sugería que estas células eran células estrelladas y/o fibroblastos. El color del bazo era el mismo en ambos grupos. La mayoría de los animales que recibieron el adenovirus con zvegf3 presentaban flechas en el fémur más pálidas, con la médula más clara de color.

Los CDC de la sangre periférica presentaban una posible diferencia en los recuentos de plaquetas, pero no en los recuentos de RBC o WBC entre los animales tratados con zvegf3 con virus original. En comparación con los grupos sin tratar y tratados con virus original, el grupo con zvegf3 tenía recuentos de plaquetas menores los días 2, 4, 6 y 8, pero no el día 10. El volumen medio de plaquetas (tamaño medio de cada plaqueta) en el grupo con zvegf3 tendía también a ser mayor, coherente con el aumento relativo en la población mayor, de plaquetas inmaduras.

El marcado con BrdU presentó un aumento de la proliferación celular en el riñón, principalmente en la médula y en menor extensión en la corteza cerebral. Las células proliferantes parecía que eran células intersticiales, que pueden haber incluido fibroblastos y/o células del mesangio.

Ejemplo 14

Se analizó zvegf3 en un ensayo de excrecencia del anillo aórtico (Nicosia y Ottinetti, *Laboratory Investigation* 63(1):115, 1990; Villaschi y Nicosia, *Am. J. Pathology* 143(1):181-190, 1993). Se aislaron las aortas torácicas de ratas macho SD de 1 a 2 meses de vida y se transfirieron a placas petri que contenían solución salina tamponada de HANK. Las aortas se enjuagaron con solución salina tamponada de HANK adicional para eliminar la sangre, y el tejido adventicio que circunda la aorta se extirpó con cuidado. Las aortas lavadas se tranfirieron a placas petri que contenían medio basal EMB, exento de suero (Clonetics, San Diego, CA). Se obtuvieron anillos de la aorta cortando y empalmando aproximadamente secciones de 1 mm utilizando una cuchilla de escalpelo. No se utilizaron los extremos de las aortas utilizados para mantener la aorta en su lugar. Se enjuagaron los anillos en medio basal EBM reciente y se colocaron una a una en los pocillos de una placa de 24 pocillos recubierta con Matrigel (Becton Dickinson, Bedford, MA). Los anillos se cubrieron con 50 μl adicionales de Matrigel y se colocaron a 37ºC durante 30 minutos para dejar que gelificase la matriz. Las muestras de ensayo se diluyeron en medio exento de suero basal EMB enriquecido con 100

unidades/ml de penicilina, 100 μg/ml de estreptomicina y tampón HEPES y se añadieron a razón de 1 ml/pocillo. La referencia de fondo era medio basal EBM exento de suero solo. Se utilizó como referencia positiva FGF básico (R&D Systems, Minneapolis, MN) a razón de 20 ng/ml. Se añadió a los pocillos zvegf33 pZyTrack adenovirus (Ejemplo 11), suponiendo un recuento celular de 500.000 células y una multiplicidad de infección de 5.000 partículas/célula. Se utilizó como referencia adenovirus ZyTrack (zPar) inservible. Se añadieron muestras en un mínimo de cuadrupletes. Se incubaron los anillos durante 5 a 7 días a 37ºC y se analizó el crecimiento. La excrecencia aórtica fue puntuada por observadores múltiples a ciegas utilizando 0 como sin crecimiento y 4 como crecimiento máximo. El adenovirus con zvegf3 produjo un aumento significativo en la excrecencia en comparación con las referencias y era comparable a otros factores de crecimiento potentes (por ejemplo, bFGF). En experimentos adicionales, el dominio del factor de crecimiento con zvegf3 purificado produjo también un aumento significativo en la excrecencia a concentraciones inferiores a aproximadamente 50 ng/ml.

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

Ejemplo 15

Se inyectaron por vía subcutánea treinta ratones (macho, c57BL6) con 2,5 $\times$ 10^6 células de Lewis de carcinoma pulmonar (adquiridas en la American Type Culture Collection, Mannassas, VA). Tres días después del implante de las células, los ratones se dividieron en tres grupos de diez y se les inyectó con solución salina, adenovirus con zvegf3 (1×10^{11} partículas) o adenovirus de referencia (1×10^{11} partículas). Se controló el crecimiento de los tumores mediante medición dimensional el día 14 y por peso del tumor en grueso en el momento del sacrificio (día 21). Los pulmones, el hígado y el tumor se examinaron por procedimientos histológicos. El tamaño del tumor era significativamente inferior en el grupo tratado con zvegf3 en comparación con el grupo de adenovirus de referencia ($p<0,007$), pero no significativamente diferente del grupo tratado con solución salina ($p = 0,6$). La frecuencia de la metástasis era baja y no difería entre los grupos.

Ejemplo 16

Se determina la actividad mieloproliferante de zvegf3 en un modelo de ratón de mielosupresión. El día 0, a los ratones (macho, C57BI) en los grupos mieloinsuficientes se les administra 450 cGy de radiación y 1,2 mg de carboplatino. Un segundo conjunto de ratones no es tratado. Entre los días 0 y 7, se administran por vía subcutánea zvegf3 purificada, trombopoyetina o vehículo de referencia. Los días 7, 6, 10, 15 y 20 a los ratones se les extrae sangre bajo punción anestésica por punción retroorbital. Se analizan los CBC en las muestras de sangre y se preparan extensiones para análisis manual de las células diferenciadas e inmaduras.

Cuando se observa recuperación de las estirpes celulares de la sangre, se sacrifican los animales. La médula ósea se recoge para el análisis microscópico y ensayos del original de la médula ósea. Se recogen el bazo y el hígado para examen histológico con objeto de determinar la hematopoyesis extramedular. El pulmón, el timo, el corazón, los testículos y el riñón se analizan para su histología.

Ejemplo 17

Se prepararon anticuerpos antiséptico policlonales inmunizando dos conejos hembra blancos de Nueva Zelanda con los péptidos huzvegf3 (restos 80 a 104 de la SEC. ID. nº: 2), huzvegf3-2 (restos 299 a 314 de la SEC. ID. nº: 2), huzvegf3-3 (restos 299 a 326 de la SEC. ID. nº: 2 con un resto cis en el terminal N) o huzvegf3-4 (restos 195 a 225 de la SEC. ID. nº: 2 con un resto cis en el terminal C). Se sintetizaron los péptidos utilizando un sintetizador de péptidos modelo 431A de Applied Biosystems (Applied Biosytems, Inc., Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante. Los péptidos huzvegf3-1, huzvegf3-3 y huzvegf3-4 se conjugaron a continuación a la proteína maleimida activada con hemocianina de lapa californiana (KLH) mediante restos de cisteína (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). El péptido huzvegf3-2 se conjugó con la proteína portadora KLH utilizando gluteraldehído. Se administró a cada conejo una inyección intraperitoneal (IP) de 200 μg de péptido conjugado en adyuvante de Freund completo (Pierce Chemical Co.) seguido de inyecciones IP de refuerzo de 100 μg de péptido conjugado en adyuvante incompleto de Freund cada tres semanas. De siete a diez días después de la administración de la tercera inyección de refuerzo, se extrajo sangre a los animales y se recogió el suero. Se reforzó a continuación a los conejos y se les extrajo sangre cada tres semanas.

Los anticuerpos específicos para el péptido huzvegf3 purificados procedentes del suero de conejo que utilizan una columna con péptido CNBr-Sepharose® 4B (Pharmacia Biotech) que se preparó utilizando 10 mg de los péptidos respectivos por gramo de CNBr-Sepharose®, seguido de diálisis en PBS durante la noche. Los anticuerpos huzvegf3 específicos para el péptido se caracterizaron mediante una comprobación del valor por ELISA utilizando 1 μg/ml del péptido apropiado como diana del anticuerpo. Los anticuerpos específicos para el péptido huzvegf3-1 tienen un límite inferior de detección (LLD) de 500 pg/ml por ELISA en su diana del anticuerpo apropiada y reconocen la

proteína recombinante completa (MBP-fusión; véase el Ejemplo 28) por ELISA. Los anticuerpos específicos para el péptido huzvegf3-2 presentan una LLD de 1 ng/ml por ELISA. Los anticuerpos específicos para el péptido huzvegf3-3 presentan una LLD de 50 pg/ml por ELISA y la proteína recombinante reconocida por análisis de inmunotransferencia Western. Los anticuerpos específicos para el péptido huzvegf3-4 presentan una LLD de 50 pg/ml por ELISA y la proteína recombinante reconocida por análisis de inmunotransferencia Western.

Ejemplo 18

Se analizó la zvegf3 recombinante por inmunotransferencia Western utilizando anticuerpos contra los péptidos huzvegf3-1 y huzvegf3-3. Se produjo proteína en las células BHK como se dio a conocer anteriormente y en las células 293 y MVEC (endoteliales microvasculares) transfectadas con vectores de adenovirus según los procedimientos convencionales. Se realizó la electroforesis de las muestras y se transfirió a nitrocelulosa (0,2 μm; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a temperatura ambiente utilizando un papel secante modelo TE22 de Hoeffer Scientific Instruments (San Francisco, CA) con agitación según las instrucciones proporcionadas en el manual del instrumento. La transferencia se realizó a 500 mA durante una hora o a 50 mA durante 12 horas en un tampón que contenía base Tris 25 mM, glicina 200 mM y metanol al 20%. Se bloquearon a continuación los filtros con leche en polvo descremada al 10% en tampón A (Tris 50 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM (pH 8,0), Igepal CA-630 al 0,05%, NaCl 150 mM, gelatina al 0,25%) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se enjuagó rápidamente la nitrocelulosa, a continuación se añadió anticuerpo primario en tampón A que contenía leche en polvo descremada al 2,5%. Se incubaron las inmunotransferencias durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4ºC con agitación suave o balanceo. Tras la incubación, las inmunotransferencias se lavaron tres veces durante 10 minutos cada una en tampón A. Se añadió anticuerpo secundario (IgG anticonejo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante; adquirida en Rockland Inc., Gilbertsville, PA) diluida 1:4.000 en tampón A que contiene leche en polvo descremada al 2,5% y las inmunotransferencias se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave o balanceo. Las inmunotransferencias se lavaron a continuación tres veces, 10 minutos cada una, en tampón A, a continuación se enjuagaron rápidamente en H_2O. Las inmunotransferencias se desarrollaron utilizando reactivos de sustrato quimioluminiscente disponibles en el mercado (reactivos 1 y 2 SuperSignal® ULTRA mezclados 1:1; reactivos adquiridos en Pierce Chemical Co.) y expuestos a una película (Hyperfilm ECL™; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) durante periodos comprendido entre 1 segundo y 5 minutos o según sea necesario.

Utilizando el anticuerpo 3-1, la zvegf3 completa producida en células BHK presentaba dos bandas ($M_r \approx 46$ kDa y 30 kDa) en condiciones reductoras. La banda mayor era coherente con el tamaño del monómero zvegf3 completo y la banda más pequeña con el dominio CUB + zona de interdominio. En condiciones no reductoras, existía una banda mayor a $M_r \approx 78$ kDa, que parecía ser la molécula completa dimerizada. Se observaron también dos bandas menores más pequeñas. Resultados similares se obtuvieron con el anticuerpo 3-3, pero en condiciones reductoras la banda más pequeña se produjo a $M_r \approx 22$ kDa. El análisis de la secuencia de la banda más pequeña se demostró que era el dominio aislado del factor de crecimiento.

El dominio del factor de crecimiento recombinante (producido en células BHK) se analizó utilizando el anticuerpo 3-3, se realizó como una banda ancha de $M_r \approx 18$ kDa en condiciones reductoras. En condiciones no reductoras, la proteína presentó dos bandas de $M_r \approx 16$ y 28 kDa, lo que indica la presencia de ambas formas dimérica y monomérica del dominio del factor de crecimiento.

La proteína zvegf3 producida en las células 293 cultivada en medio sin suero presentaba dimensiones coherentes con la proteína completa prevista. En condiciones reductoras, la proteína presentaba a $M_r \approx 47$ kDa y en condiciones no reductoras a $M_r \approx 78$ kDa cuando se probaron las inmunotransferencias con los anticuerpos 3-1 o 3-3. La adición de suero al medio produjo escisión de la proteína, como se aprecia en el material producido por BHK.

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

Ejemplo 19

El dominio del factor de crecimiento de zvegf3 recombinante se produjo en células BHK 570 en factorías celulares. Se recogieron tres cultivos de 15 litros y los medios se filtraron con esterilización utilizando un filtro de 0,2 μ. Se estimaron los niveles de expresión por análisis de inmunotransferencia Western de las muestras del medio concentradas 20× frente al corte de 5 K y se diluyeron en serie dos veces a 1,25×. Se comparó la intensidad de la señal con una señal de la misma transferencia procedente de una proteína de fusión MBP-zvegf3 patrón (véase el Ejemplo 28) para la que la concentración de proteína se había determinado por análisis de aminoácidos. Los niveles de la expresión estuvieron comprendidos continuamente entre 0,25 y 0,35 mg/l del medio.

Se purificó la proteína en el medio acondicionado mediante una combinación de cromatografía de intercambio catiónico y una cromatografía de interacción hidrófoba. Se diluyó el medio de cultivo con ácido acético 0,1 M, pH

3,0, que contenía NaCl 0,3 M en una proporción de 60%:40% (medio:ácido acético) para administrar una corriente de proceso a una conductividad de 14 mS y pH 4,0. Esta corriente se administró a una resina de intercambio catiónico fuerte (Poros® HS; PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) con un volumen de lecho de 50 ml en una columna de 2 cm de diámetro a un caudal de 20 ml/minuto. Un lecho de 50 ml era suficiente para procesar 45 l de medio y capturar toda la proteína diana. La proteína unida se eluyó, después del lavado de la columna para 10 volúmenes de columna en ácido acético 10 mM con NaCl 0,15 M a pH =4,0, formando un gradiente lineal para NaCl 2 M en ácido acético 10 mM, pH 4,0. Se capturaron fracciones de 10 ml en tubos que contenían 2 ml de Tris 2,0 M, pH 8,0 para neutralizar la acidez. En las muestras procedentes de la columna de intercambio catiónico se analizó la presencia de zvegf3 por SDS PAGE con tinción de plata e inmunotransferencia Western. El dominio de crecimiento de vegf3 eluyó a NaCl entre 0,2 y 0,5 M. Se mezclaron las fracciones que contenían la proteína. Un lecho de 25 ml de medio de cromatografía (medio de cromatografía en éter Toso Haas) en una columna de 2 cm de diámetro se equilibró en $(NH_4)_2SO_4$ 1,8 M en tampón fosfato Na 25 mM a pH 7,4. La proteína mezclada procedente de la etapa de intercambio catiónico se ajustó a $(NH_4)_2SO_4$ 1,8 M en fosfato Na 25 mM, pH 7,0. Esta etapa se hizo fluir sobre la columna a razón de 10 ml/minuto. Una vez completada la carga se lavó la columna con 10 volúmenes de columna con el tampón de equilibrio antes de eluir con un gradientes de 10 volúmenes de columna formado entre el tampón de equilibrio y ácido bórico 40 mM a pH 8,8. La proteína del dominio del factor de crecimiento zvegf3 eluyó casi inicialmente en el gradiente entre $(NH_4)_2SO_4$ 1,5 y 1,0 M. En este punto la proteína fue entre el 40 y el 60% pura siendo un contaminante principal la proteína 4 que se fija al factor de crecimiento pseudoinsulínico (IGFBP4).

La proteína de la etapa de cromatografía HIC (éter) se aplicó a una columna HPLC en fase inversa. La proteína del dominio del factor de crecimiento zvegf3 eluyó en acetonitrilo al 36%. Este material contenía todavía aproximadamente 20% (mol/mol) de IGFB4.

Ejemplo 20

El dominio del factor de crecimiento de zvegf3 recombinante se purifica en el medio acondicionado con células mediante una combinación de cromatografía por intercambio catiónico, cromatografía por interacción hidrófoba y cromatografía por afinidad con níquel. La proteína se captura en un medio de intercambio catiónico fuerte y se eluye esencialmente tal como se dio a conocer en el Ejemplo 19. La proteína eluida se purifica más por cromatografía de interacción hidrófoba en una resina con éter (Poros® ET; PerSeptive Biosystems). La proteína zvegf3 parcialmente purificada se une a continuación a una resina de quilato de níquel a pH entre 7,0 y 8,0 en tampón de fosfato Na 25 mM que contiene NaCl 0,25 M. La proteína unida se eluye con un gradiente descendiente de pH inferior a pH 5,0 o un gradiente de imidazol. El eluido de la columna de níquel se ajusta a $(NH_4)_2SO_4$ 1 M, MES 20 mM (ácido morfolinetansulfónico) a pH 6,0 y se pasa a través de una columna cromatográfica de interacción hidrófoba con éter fenólico (Poros® PE, PerSeptive Biosystems) que ha sido equilibrada en $(NH_4)_2SO_4$ 1 M, MES 20 mM, pH 6,0. IGFBP4 y los contaminantes menores se retienen en la columna. Se recoge la fracción que pasa a través, que contiene zvegf3 muy purificado. La proteína recogida se desala según procedimientos convencionales (por ejemplo, diálisis, cromatografía de intercambio iónico).

Ejemplo 21

Se analizó la actividad mitógena de zvegf3 recombinante en células del músculo liso aórticas humanas (HAoSMC; Clonetics Corp., Walkersville, MD) y células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC; Clonetics Corp.). Se colocaron HAoSMC y HUVEC a una densidad de 5.000 células/pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos y se cultivaron durante aproximadamente 24 horas en DMEM que contenía suero de ternero fetal al 10% a 37ºC. Las células se mantuvieron en reposo incubándolas durante 24 horas en medio DMEM/F-12 de Ham sin suero que contenía insulina (5 μg/ml), transferrina (20 μg/ml) y selenio (16 pg/ml) (ITS). En el momento del ensayo, se extrajo el medio y se añadieron muestras de ensayo a los pocillos por triplicado. Las muestras de ensayo consistían en medio acondicionado (CM) procedente de células queratinocitos humanos HaCaT infectadas por adenovirus (Boukamp *et al*., *J. Cell. Biol.* 106:761-771, 1988) que expresan a zvegf3 completa, el dominio del factor de crecimiento purificado expresado en células BHK o el medio de referencia de las células infectadas con adenovirus original (Zpar). Se concentró el CM 10 veces utilizando un dispositivo de filtro de centrifugadora de 15 ml con un filtro de membrana de 10 K (Ultrafree®; Millipore Corp., Bedford, MA), a continuación se volvió a diluir con 3× con medio ITS y se añadió a las células. El CM de referencia se generó a partir de las células HaCaT infectadas con un adenovirus que expresa la proteína zvegf3 fluorescente y se trató de manera idéntica al CM de zvegf3. La proteína purificada en un tampón que contiene BSA al 0,1% se diluyó en serie en medio ITS a concentraciones de 1 μg/ml a 1 ng/ml y se añadió a la placa de ensayo. Un tampón de referencia de BSA al 0,1% se diluyó de manera idéntica a la concentración mayor de proteína zvegf3 y se añadió a la placa. Para la medición de la incorporación de [^{3}H]timidina, se añadieron 20 μl de una solución madre de 50 μCi/ml en DMEM directamente a las células, para una actividad final de 1 μCi/pocillo. Después de otras 24 horas de incubación, se evaluó la actividad mitógena midiendo la absorción de [^{3}H]timidina. Se eliminó el medio y se incubaron las células con 0,1 ml de tripsina hasta que se desprendieron las células. Se recogieron las células en placas filtrantes de 96 pocillos utilizando un recogedor de muestras (recogedor FilterMate™; Packard Instrument Co., Meriden, CT). Se secaron a continuación las placas a 65ºC durante 15 minutos, se sellaron después añadiendo 40 μl/pocillo de mezcla de centelleo (Microscint™ O; Packard Instrument Co.) y se hizo el recuento en un contador de centelleo en microplaca (Topcount®; Packard Instrument Co.).

Los resultados presentados en la Tabla 8 demuestran que CM de zvegf3 tenía aproximadamente actividad mitógena superior a 1,5 veces sobre las células HAoSM sobre la CM de referencia y la proteína purificada produjo un aumento máximo de 1,8 veces en la incorporación de [^{3}H]timidina sobre el tampón de referencia.

TABLA 8

	CPM incorporada	
Muestra	Media	Desv. est.
zvegf3 (3× CM)	81089	8866
Zpar (3× CM)	58760	2558
dominio GF de zvegf3, 1 µg/ml	63884	3281
dominio GF de zvegf3, 500 ng/ml	57484	9744
dominio GF de zvegf3, 100 ng/ml	70844	10844
dominio GF de zvegf3, 50 ng/ml	61164	2813
dominio GF de zvegf3, 10 ng/ml	60676	1514
dominio GF de zvegf3, 5 ng/ml	60197	2481
dominio GF de zvegf3, 1 ng/ml	49205	5208
tampón de referencia	39645	9793
10 ng/ml de PDGF (respuesta máxima)	50634	4238
Medio solo (respuesta basal)	24220	2463

Los resultados presentados en la Tabla 9 demuestran que CM de zvegf3 no presentaba ninguna actividad mitógena en HUVEC en comparación con la CM de referencia, y la proteína purificada produjo un aumento máximo de 1,3 veces en la incorporación de [^{3}H]timidina sobre el tampón de referencia.

TABLA 9

	CPM incorporada	
Muestra	Media	Desv. est.
Zvegf3 (3× CM)	62723	10716
Zpar (3× CM)	61368	1553
dominio VEGF de zvegf3, 1 µg/ml	44901	6592
dominio VEGF de zvegf3, 500 ng/ml	41921	5330
dominio VEGF de zvegf3, 100 ng/ml	35613	5187
dominio VEGF de zvegf3, 50 ng/ml	31107	525
dominio VEGF de zvegf3, 10 ng/ml	28505	2950
dominio VEGF de zvegf3, 5 ng/ml	29290	988
dominio VEGF de zvegf3, 1 ng/ml	28586	2718
tampón de referencia	33461	404
10 ng/ml de veGF (respuesta máxima)	53225	5229
Medio solo (respuesta basal)	22264	2814

Ejemplo 22

Se ensayó la estimulación de la liberación del calcio intracelular en la proteína zvegf3 recombinante como indicador de la fijación y activación del receptor. Se cultivaron células en portaobjetos con cobertura de vidrio de borosilicato con cámara. El día del ensayo, se incubaron las células durante 30 minutos a temperatura ambiente en tampón KRW (KrebsRingerWollheim; NaCl 140 mM; KCl 3,6 mM, NaH_2PO_4 0,5 mM, $MgSO_4$ 0,5 mM, $NaHCO_3$ 2 mM, glucosa 3 mM, $CaCl_2$ 1,5 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4) que contenía fura-2 AM 2 μM (adquirido en Molecular Probes Inc., Eugene, OR), se lavó dos veces con tampón KRW y se dejó reposar a temperatura ambiente durante por lo menos 15 minutos antes de la adición del factor de crecimiento o del medio de cultivo (CM) acondicionado con células que va a analizarse. Se midieron los cambios en el calcio citosólico por diagnóstico por imagen de la relación de fluorescencia (excitación a 340 nm dividida por la excitación a 380 nm). El diagnóstico por la imagen digital se realizó utilizando un microscopio fluorescente invertido (Nikon TE300) equipado con un objetivo de aceite (Nikon 40× Plan Fluor). Se obtuvieron imágenes utilizando una cámara digital Princeton CCD y se analizaron con el programa informático Universal Imaging Metafluor. En la Tabla 10 se presentan los datos.

TABLA 10

Estirpe celular	CM de zvegf3	CM de referencia	VEGF	PDGF BB
células del anillo aórtico	+	-	-	+
pericitos	+	-	-	+
células de músculo liso aórtico	+	-	-	+
fibroblastos aórticos adventicios	+	-	-	+

Ejemplo 23

Se realizó el análisis de inmunotransferencia Northern utilizando ARN completo de las estirpes celulares neuronal y glial humanas A172 (glioblastoma), NTera 2 (precursora neuronal de teratocarcinoma; adquirida en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA), U-87 MG (glioblastoma/astrocitoma), U-118 MG (glioblastoma), U138 MG (glioblastoma), U373 MG (glioblastoma). Excepto cuando se indique, las estirpes celulares se adquirieron en la American Type Culture Collection, Manassas, VA. Se prepararon inmunotransferencias utilizando 10 μg de ARN por banda. Se generó una sonda de ADN de aproximadamente 400 bp por digestión del ADNc de zvegf3 humana con EcoRI y BgIII. Se sometió a electroforesis en gel la sonda de ADN seguida de extracción utilizando una columna rotativa que contenía una membrana de gel de sílice (QIAquick™ Gel Extraction Kit; Qiagen, Inc., Valencia, CA). La sonda se marcó por radioactividad con ^{32}P utilizando un kit disponible en el mercado (sistema de marcado con sonda aleatoria Rediprime™ II; Amersham Corp., Arlington Heights, IL) según las especificaciones del fabricante. Se purificó la sonda utilizando una columna de impulsión. La hibridación tuvo lugar durante la noche a 65ºC en una solución disponible en el mercado (ExpressHyb™ Hybridization Solution; Clontech Laboratories, Inc.).

A continuación se lavaron 4× las inmunotransferencias en 2× SCC y SDS al 0,05% a temperatura ambiente, seguido de dos lavados en 0,1× SSC y SDS al 0,1% a 50ºC. Se detectó una extensión del transcrito a aproximadamente 4 kb en muestras de A172, U-87 MG, U-118 MG, U138 MG y U373 MG. La señal de intensidad fue mayor para U373 MG, U-118MG y U-87 MG.

Ejemplo 24

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

Se colocaron en placas las estirpes celulares siguientes dentro de los pocillos de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos y se cultivaron en medio de crecimiento durante tres días:

1. Grupo del anillo aórtico de rata (ARC)
2. Clon 14B del anillo aórtico de rata (ARC#14B)
3. Células endoteliales de la vena umbilical humana, paso 5 (HUVEC)
4. Fibroblastos aórticos adventicios humanos, paso 4 (AOAF)
5. Células del músculo liso aórtico humano, paso 9 (AOSMC)
6. Pericitos de la retina humana, paso 4 (pericitos)

Se lavaron las células una vez con tampón de fijación enfriado en hielo (RPMI que contenía BSA al 0,1%, Tris:HCl 20 mM, pH 7,2) y a continuación se añadieron 250 μl de las soluciones siguientes a cada uno de los tres pocillos de las placas de cultivo que contienen las células de ensayo.

Se prepararon solución de fijación en 5 ml de tampón de fijación con 10 ng/ml de ^{125}I-zvegf3 y:

1. Sin adición.
2. Un μg/ml de zvegf3.
3. Un μg/ml de VEGF (R&D Systems, Minneapolis, MN).

4. Un μg/ml de PDGF-BB.

5. Cinco μg/ml de receptor α de PDGF-BB (R&D Systems).

6. Cinco μg/ml de receptor β de PDGF (como fusión del dominio extracelular IgG Fc-receptor).

Se incubaron las mezclas de reacción en hielo durante 2 horas, a continuación se lavaron tres veces con un ml de tampón de fijación enfriado en hielo. Se cuantificó ^{125}I-zvegf3 unido por recuento con gamma de un extracto en NaOH de las células.

Los resultados, representados en la Fig. 5, indican la fijación de zvegf3 al receptor α de PDGF. Los datos se grafican como ^{125}I-zvegf3 unido/pocillo. Las barras de error representan desviaciones estándar.

Se repitió el experimento mediante la adición de células estrelladas de hígado de rata, paso 6 (Greenwel *et al*., *Laboratory Investigation* 69:210-216, 1993). Las células estrelladas fijaban zvegf3 a un nivel comparable con los pericitos.

Ejemplo 25

Se midió por espectrometría de masas la fijación de zvegf3 recombinante a los receptores alfa y beta de PDGF utilizando un instrumento de desorción e ionización de láser de superficie aumentada (SELDI) (ProteinChip™,Ciphergen Biosystems, Palo Alto, CA). Para este experimento se utilizó una matriz de superficie preactivada de 8 puntos. A este chip activado por amina se añadió proteína A (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA) a una concentración de 1 mg/ml, y el chip se incubó a 4ºC durante cuatro horas. Después del bloqueo con etanolamina 1 M pH 8,0 y posteriores lavados (una vez en Triton X-100 al 0,1% en PBS; una vez en acetato Na 100 mM, pH 4,5, NaCl 0,5 M; una vez en Tris-HCl 100 mM, pH 8,5, NaCl 0,5 M; una vez en PBS), se añadieron proteínas de fusión del dominio extracelular del receptor Fc de IgG (receptor alfa de PDGF, receptor beta de PDGF o receptor de referencia no citado) y se incubó el chip a 4ºC durante la noche. Después de tres lavados en PBS, se añadieron 250 μl de zvegf3 (300 ng/ml), PDGF-AA o PDGF-BB, y el chip se incubó durante la noche a 4ºC. Se lavó el chip dos veces con Triton X100 al 0,05%, HEPES 100 mM pH 7,2, a continuación dos veces con agua desionizada. Se dejó secar el chip a temperatura ambiente antes de dos adiciones de 0,3 microlitros de ácido sinapínico (Ciphergen Biosystems) en una mezcla 50:50 de acetonitrilo y ácido trifluoroacético al 1%. Los ligandos que se unen al receptor se conservaron en el chip después del lavado y se detectaron posteriormente por espectrometría de masas. La asignación de un + o - para la fijación se realizó comparando el perfil de la espectrometría de masas del receptor de PDGF con el de un Fc solamente de referencia para cada ligando. En la Tabla 11 se presentan los datos.

TABLA 11

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

Ejemplo 26

Se realizó el análisis de transferencia Northern con poli(A) ARN de estirpes celulares vasculares humanas HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana; Cascade Biologics, Inc., Portland, OR), HPAEC (células endoteliales de la arteria pulmonar humana; Cascade Biologics), HAEC (células endoteliales aórticas humanas; Cascade Biologics), AoSMC (células del músculo liso aórtico; Clonetics Corporation, Walkersville, MD), UASMC (células del músculo liso de la arteria umbilical; Clonetics Corp.), HISM (músculo liso intestinal humano; American Type Culture Collection, CRL 7130), SK5 (células de fibroblastos dérmicos humanos; adquiridos en Dr. Russel Ross, Universidad de Washington), NHLF (fibroblastos de pulmón humano normales; Clonetics Corp.), NHDF-*neo* (fibroblastos neonatales dérmicos humanos normales; Clonetics Corp.); y de estirpes celulares de leucemia Daudi, Raji, Molt-4, K562 (adquiridas todas en Clontech Laboratories, Inc.), HL60, Jurkat y Hut 78. Se cargó ARN a razón de 2 μg por banda. Se generó una sonda de ADN de aproximadamente 490 bp por digestión de un clon de zVEGF3 completo con Pvul y Stul. Se realizó la electroforesis de la sonda de ADN y se purificó utilizando una columna rotatoria que contenía una membrana de gel de sílice (QIAquick™ Gel Extraction Kit; Qiagen, Inc., Valencia, CA). La sonda se marcó con radioactividad con ^{32}P utilizando un kit disponible en el mercado (sistema de marcado con sonda aleatorio Rediprime™ II; Amersham Corp., Arlington Heights, IL) según las especificaciones del fabricante. Se purificó la sonda utilizando una columna de impulsión. Se utilizó solución Expresshyb (Clontech, Palo Alto, Ca) para la solución de hibridación destinada a las transferencias. La hibridación tuvo lugar durante la noche a 65ºC en una solución de hibridación disponible en el mercado (solución de hibridación ExpressHyb™; Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA). Se lavaron a continuación las transferencias cuatro veces en 2× SCC y SDS al 0,1% a temperatura ambiente, seguido de dos lavados en 0,1× SSC y SDS al 0,1% a 50ºC. Se detectó una extensión transcrita a aproximadamente 4 kb en NHLF, NHDF-neo, SK5, UASMC, HAEC, AoSMC, Jurkat, Hut78. La intensidad de la señal fue máxima para UASMC, SK5, NHLF y NHDF-neo.

Ejemplo 27

Los efectos de zvegf3 sobre la regeneración endotelial vascular y la hiperplasia de la íntima se determinan en un modelo de arteria de carótida de rata lesionada de globo. Se utiliza adenovirus como vector para administración.

Para determinar la ineficacia del adenovirus y el nivel de expresión del gen obtenido en la pared vascular, las ratas se lesionaron con globo como se da a conocer a continuación y se les infundió un vector de adenovirus que comprende una unidad de expresión para la proteína verde fluorescente (GFP). Se infunden tres grupos de tres ratas cada uno con dosis de $1{,}5 \times 10^{10}$ pfu/ml, 3×10^{10} pfu/ml y 6×10^{10} pfu/ml. Las carótidas lesionadas y no lesionadas se recogen 48 horas después de la infección y se fijan en formalina tamponada al 10% durante 24 h. Se procesa y se analiza el tejido utilizando un anticuerpo anti-GFP para determinar el % de infectividad.

Se determinan los efectos de zvegf3 en un estudio de 14 días utilizando la dosis óptima determinada del estudio de GFP. Se lesionan con globo y se infectan dos grupos de 14 animales cada uno con adenovirus con zvegf3 o adenovirus de referencia. Se aísla la carótida común izquierda y se interrumpe la circulación sanguínea por el vaso atando la carótida interna, la carótida externa y la carótida común proximalmente. Se practica una arteriotomía entre el nudo en la carótida externa y la bifurcación, y se enjuaga el vaso con solución de Ringer lacteada. Se inserta el catéter de embolectomía 2F, se infla y se retira, mientras que se retuerce, para eliminar las células endoteliales; este procedimiento se realiza tres veces. Se enjuaga otra vez a continuación el vaso, y aproximadamente se inyectan 50 μl de solución con adenovirus utilizando un catéter de tubuladura silástica. El catéter se ata en el vaso justo distal a la bifurcación y se deja en su lugar durante aproximadamente 20 minutos. Se retira a continuación el catéter y el vaso se enjuaga brevemente con sangre perdiendo el nudo proximal. Se hace el nudo justo distal a la bifurcación. Se restablece la circulación sanguínea eliminando el nudo en la carótida interna y el nudo proximal en la carótida común. Los nudos en la carótida externa permanecen. Para determinar la producción de la proteína zvegf3 en la pared del vaso, se sacrifican dos animales de cada grupo los días uno y siete. Se procesan los tejidos para su análisis inmunohistoquímico y el análisis de inmunotransferencia Western. Para el análisis inmunohistoquímico, se mantienen los tejidos en formalina durante 24 horas, a continuación se transfieren a alcohol etílico al 70%. Para el análisis de inmunotransferencia Western, se congelan por expansión los tejidos y se almacenan a -80ºC. A los trece días se administra a los animales comprimidos de BrdU por vía subcutánea. A los catorce días (24 horas tras la inserción de BrdU) se administra por vía intravenosa colorante azul de Evan para teñir los segmentos no endotelializados y se extrae sangre de los animales y se sacrifican. A continuación se extrae sangre de los animales y se fija la perfusión con formalina tamponada al 10%. Se recogen ambas carótidas, el hígado, el riñón y el bazo. Se inspeccionan visualmente las carótidas y se cuantifica la reendotelialización midiendo la distancia desde la bifurcación hasta el límite del colorante distal (blanco/azul). Se mantienen todos los tejidos en formalina durante 24 horas, a continuación se transfieren a alcohol etílico al 70%. Se seccionan las carótidas en tres piezas cada una y se impregnan en bloques de parafina. El hígado, el riñón y el bazo se inspeccionan visualmente y se procesan. Se hacen extensiones de secciones cruzadas de las carótidas y se tiñen con hematoxilina y eosina, a continuación se miden utilizando un programa de diagnóstico SPOT® (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI). Las mediciones incluyen la longitud de la lámina elástica interna y las áreas de la media, de la íntima y del lumen. El análisis ICC incluye el número de células infectadas (utilizando anticuerpos anti-gfp), proliferación celular (marcado con BrdU) y % de muerte celular.

Se realizó un tercer estudio para determinar la expresión génica de zvegf3 a lo largo del tiempo tras la lesión con globo. Se recogieron las carótidas de los animales lesionados con globo (5 animales/punto de tiempo) a T=0 (no lesionados), T=6 h., 1, 4, 7 y 14 días. Se congelaron por expansión las carótidas y se almacenaron a -80ºC para análisis de inmunotransferencia Northern.

Ejemplo 28

Un plásmido de expresión que contiene un polinucleótido que codifica a zvegf3 humana condensado en el terminal N con la proteína que se une a la maltosa (MBP) se construyó por recombinación homóloga.

Se aisló un fragmento de ADNc de zvegf3 humana utilizando la PCR. Se utilizaron dos cebadores en la producción del fragmento de zvegf3 humana en una reacción de PCR. El cebador ZC20.572 (SEC. ID. nº: 44), contenía 40 bp de secuencia adyacente al vector y 25 bp correspondientes al terminal amino de zvegf3 humana y al cebador ZC20.573 (SEC. ID. nº: 45) contenía 40 bp del extremo 3' correspondiente a la secuencia del vector adyacente y 25 bp correspondientes al terminal carboxilo de la zvegf3 humana. Las condiciones de la reacción PCR fueron 25 ciclos de 94ºC durante 30 segundos, 50ºC durante 30 segundos y 72ºC durante 1,5 minutos; seguido de agitación a 4ºC, realizado por duplicado. Una alicuota de 2 μl de 100 μl de la mezcla de reacción se introdujo en un gel de agarosa al 1,0% con tampón Tris/borato/EDTA para análisis y se observó la banda esperada de aproximadamente 1.000 bp. Los 90 μl restantes de la mezcla de reacción se combinaron con un segundo tubo de PCR precipitado con 400 μl de etanol absoluto que debe utilizarse para recombinación en el vector pTAP98 receptor del corte por S*ma1*-cut para producir el montaje que codifica la fusión MBP-zvegf3.

El plásmido pTAP98 se obtuvo de los plásmidos pRS316 (vector lanzadera de *Saccharomyces cerevisiae*; véase, Hieter y Sikorski, *Genetics* 122:19-27, 1989) y pMAL™-c2X (New England Biolabs; Beverly, MA). Este último vector lleva el activador *tac* que dirige a *MaIE* (gen que codifica a MBP) seguido de una etiqueta His, una secuencia de escisión de trombina, una secuencia de clonación y el terminador *rmB*. El vector pTAP98 se construyó utilizando

recombinación homóloga de levadura. Se recombinaron 100 ng de pMAL™-c2X cortado con EcoRI con 1 μg de pRS316 cortado con *PvuI*, 1 μg de enlazador y 1 μg de pRS316 cortado con *Sca1*/*EcoRI*. Se construyó el enlazador combinando los oligonucleótidos ZC19.372 (SEC. ID. nº: 46) (100 pmoles), ZC19.351 (SEC. ID. nº: 47) (1 pmol), ZC19.352 (SEC. ID. nº: 48) (1 pmol) y ZC19.371 (SEC. ID. nº: 49) (100 pmoles) en una reacción de PCR durante 10 ciclos de 94ºC durante 30 segundos, 50ºC durante 30 segundos y 72ºC durante 30 segundos; seguido de agitación a 4ºC. Los productos de PCR se concentraron por precipitación en etanol al 100%.

Se construyó un vector que contiene la secuencia de fusión MBP-zvegf3 por recombinación homóloga. Cien microlitros de células de levadura competitivas (*S. cerevisiae*) se combinaron con 10 μl de una mezcla que contenía aproximadamente 1 μg de la inserción de zvegf3 humana y 100 ng del vector pTAP98 digerido con SmaI y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La mezcla levadura/ADN se electropulsó a 0,75 kV (5 kV/cm), infinitos ohmios, 25 μF. A cada cubeta se añadieron 600 μl de sorbitol 1,2 M. La levadura se colocó a continuación en placas en dos alícuotas de 300 μl en dos placas -URA D y se incubaron a 30ºC. Después de aproximadamente 48 horas, los transformantes de la levadura Ura^+ de una sola placa se volvieron a poner en suspensión en 1 ml de H_2O y se centrifugaron brevemente para sedimentar las células de levadura. El sedimento celular se volvió a poner en suspensión en 1 ml de tampón de lisis (Triton X-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM). Se añadieron quinientos microlitros de la mezcla de lisis a un tubo Eppendorf que contenía 300 μl de perlas de vidrio lavadas con ácido y 200 μl de fenol-cloroformo, se agitó fuertemente durante intervalos de 1 minuto dos o tres veces, seguido de una centrifugación de 5 minutos en una microcentrifugadora a velocidad máxima. Se transfirieron 300 microlitros de la fase acuosa a un tubo reciente y se precipitó el ADN con 600 μl de etanol (EtOH), a continuación se centrifugó durante 10 minutos a 4ºC. El sedimento de ADN se volvió a poner en suspensión en 100 μl de H_2O. Las células electrocompetentes de *E. coli* (MC1061; Casadaban *et al*., *J. Mol. Biol.* 138:179-207) se transformaron con 1 μl de la preparación de ADN de levadura en un volumen de 40 μl. Se electropropulsaron las células a 2,0 kV, 25 μF, 400 ohmios. Tras la electroporación, se colocaron 0,6 ml de SOC (Bacto™ Triptona (Difco Laboratories, Detroit, MI), extracto de levadura al 0,5% (Difco Laboratories), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, glucosa 20 mM) en placas AMP LB en una alícuota (caldo de cultivo LB (Lennox), agar-agar al 1,8% (Bacto™; Difco Laboratories), 100 mg/l de ampicilina). Los clones individuales portadores del montaje de expresión correcta para zvegf3 se identificaron por la expresión. Se cultivaron células en medio mínimo enriquecido con casaminoácidos y 100 μg/ml de ampicilina durante la noche. Se utilizaron 50 μl del cultivo de toda la noche para inocular 2 ml de medio reciente. Se cultivaron los cultivos a 37ºC, agitando durante 2 horas. Se provocó 1 ml del cultivo con IPTG 1 mM. Se mezclaron 2 a 4 horas después 250 μl de cada cultivo con 250 μl de perlas de vidrio lavadas con ácido y 250 μl de tampón Thorner (urea 8 M, Tris 100 mM pH 7,0, glicerol al 10%, EDTA 2 mM, SDS al 5%) enriquecido con β-ME al 5% y colorante. Se agitaron fuertemente las muestras durante un minuto y se calentaron a 65ºC durante 5 a 10 minutos. Se cargaron 20 μl por banda en un gel de PAGE del 4% al 12% (NOVEX, San Diego, CA). Se introdujeron los geles en tampón 1× MES. Los clones positivos se denominaron pCZR236 y se sometieron a análisis de la secuencia. La secuencia polinucleotídica de la fusión MBP-zvegf3 en pCZR236 se presenta en la SEC. ID. nº: 50.

Para expresar la proteína de fusión, se utilizó 1 μl de ADN de secuenciado para transformar la cepa W3110 de *E. coli* (adquirida en la American Type Culture Collection, Manassas, VA). Se electropropulsaron las células a 2,0 kV, 25 μF, 400 ohmios. Tras la electroporación, se colocaron 0,6 ml de SOC (Bacto™ Triptona (Difco Laboratories, Detroit, MI), extracto de levadura al 0,5% (Difco Laboratories), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, glucosa 20 mM) en placas AMP LB en una alícuota (caldo de cultivo LB (Lennox), agar-agar Bacto™ al 1,8% (Difco Laboratories), 100 mg/l de ampicilina). Se seleccionaron células de la placa y se cultivaron durante la noche en medio de cultivo mínimo que contenía casaminoácidos. Una alícuota de 50 μl del cultivo de toda la noche se utilizó para inocular 2 ml de medio reciente. Los cultivos se desarrollaron a 37ºC con agitación durante 2 horas. Un ml del cultivo se provocó con IPTG 1 mM y se lisaron las células esencialmente como se describió anteriormente. Se analizaron alícuotas de 20 μl del lisado por electroforesis en gel como se describió anteriormente.

Ejemplo 29

Se analizó la actividad mitógena de zvegf3 recombinante en células estrelladas de rata (adquiridas en N. Fausto, University of Washington). Las células estrelladas se colocaron en placas a una densidad de 2.000 células/pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos y se cultivaron durante aproximadamente 72 horas en DMEM que contenía suero de ternero fetal al 10% a 37ºC. Las células se dejaron en reposo incubándolas durante 20 horas en DMEM exento de suero/medio F-12 de Ham que contenía insulina (5 μg/ml), transferrina (20 μg/ml) y selenio (16 pg/ml) (ITS). En el momento del ensayo, se retiró el medio y las muestras de ensayo se añadieron a los pocillos por triplicado. Las muestras de ensayo constituidas por un medio acondicionado (CM) de células queratinocitos humanas HaCaT infectadas por adenovirus (Boukamp *et al*., *J. Cell. Biol.* 106:761-771, 1988) que expresan a zvegf3 completa, el dominio del factor de crecimiento purificado expresado en las células BHK o medio de referencia de células infectadas con adenovirus original (Zpar) que contiene una unidad de expresión para la proteína verde fluorescente. Se concentró 10 veces el CM utilizando un dispositivo de filtro de centrífuga de 15 ml con un filtro de membrana de 10 K (Ultrafree®; Millipore Corp., Bedford, MA), a continuación se volvió a diluir 3× con medio ITS y se añadió a las células. La proteína purificada en un tampón que contiene BSA al 1% se diluyó en serie en medio ITS a concentraciones de 1 μg/ml a 1 ng/ml y se añadió a la placa de ensayo. Un tampón de referencia de BSA al 0,1% se diluyó de manera idéntica a la concentración mayor de proteína zvegf3 y se añadió a la placa. Para la medición de la incorporación de [^{3}H]timidina, se añadieron directamente a las células 20 μl de una solución madre de 50 μCi/ml de solución madre en DMEM, para una actividad final de 1 μCi/pocillo. Después de otras 24 horas de incubación, se evaluó la actividad mitógena

midiendo la absorción de [^{3}H]timidina. Se retiró el medio y se incubaron las células con 0,1 ml de tripsina hasta que se desprendieron las células. Se recogieron las células en placas filtrantes de 96 pocillos utilizando un recogedor de muestras (recogedor FilterMate™; Packard Instrument Co., Meriden, CT). Se secaron a continuación las placas a 65ºC durante 15 minutos, se sellaron después de añadir 40 μl/pocillo de cocktail de centelleo (Microscint™ O; Packard Instrument Co.) y se hizo el recuento en un contador de centelleo en microplaca (Topcount®; Packard Instrument Co.).

Los resultados, presentados en la Tabla 12, demuestran que CM de zvegf3 tenía aproximadamente 4,4 veces mayor actividad mitógena en las células estrelladas que la CM de referencia, y la proteína purificada a 100 ng/ml produjo un aumento máximo de 14 veces en la incorporación de [^{3}H]timidina sobre el tampón de referencia.

TABLA 12

	CPM incorporada	
Muestra	Media	Desv. est.
Zvegf3 (2× CM)	42489	1306
Zpar (2× CM)	9629	540
Dominio GF de zvegf3, 100 ng/ml	77540	4142
Dominio GF de zvegf3, 33,3 ng/ml	74466	18142
Dominio GF de zvegf3, 11,1 ng/ml	52462	6239
Dominio GF de zvegf3, 3,7 ng/ml	15128	4989
Tampón de referencia	5618	573
20 ng/ml de PDGF-BB	19741	2075
20 ng/ml de PDGF-AA	33133	3325
Medio solo (respuesta basal)	6765	226

REIVINDICACIONES

1. Proteína aislada que comprende un primer disulfuro de polipéptido unido a un segundo polipéptido, en la que cada uno de dichos primer y segundo polipéptidos es de 111 a 136 aminoácidos de longitud y comprende:

a) los restos 235 a 345 de la SEC. ID. nº: 2; o

b) una secuencia de restos de aminoácidos que es por lo menos 90% idéntica a los restos 235 a 345 de la SEC. ID. nº: 2

en la que la proteína modula la proliferación, la diferenciación, el metabolismo o la migración celulares.

2. Proteína aislada según la reivindicación 1, en la que cada uno de dichos primer y segundo polipéptidos comprende los restos

a) 230 a 345 de la SEC. ID. nº: 2; o

b) 226 a 345 de la SEC. ID. nº: 2.

3. Proteína aislada según la reivindicación 1, en la que cada uno de dichos primer y segundo polipéptidos está constituido por los restos

a) 235 a 345 de la SEC. ID. nº: 2; o

b) 226 a 345 de la SEC. ID. nº: 2.

4. Proteína aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que está glucosilada.

5. Composición que comprende una proteína según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

6. Proteína aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su utilización como producto farmacéutico.

7. Anticuerpo que se une específicamente a un epítopo de un polipéptido que comprende los restos 235 a 345 de la SEC. ID. nº: 2.

8. Anticuerpo según la reivindicación 7, que es

a) un anticuerpo monoclonal; o

b) un anticuerpo de cadena única.

9. Composición que comprende un anticuerpo según la reivindicación 6 ó 7 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10. Anticuerpo según la reivindicación 6 ó 7, para su utilización como agente de diagnóstico o terapéutico.

11. Vector de expresión que comprende los elementos unidos funcionalmente siguientes:

un activador de transcripción;

un segmento de ADN que codifica un polipéptido de 111 a 136 restos de aminoácidos de longitud y que comprende los restos 235 a 345 de la SEC. ID. nº: 2;

que comprende opcionalmente además una secuencia señal secretora unida funcionalmente al segmento de ADN;

y un terminador de la transcripción.

12. Vector de expresión según la reivindicación 11, en el que dicho polipéptido comprende los restos

a) 230 a 345 de la SEC. ID. nº: 2; o

b) 226 a 345 de la SEC. ID. nº: 2.

13. Vector de expresión según la reivindicación 11, en el que dicho polipéptido está constituido por los restos:

a) 235 a 345 de la SEC. ID. nº: 2; o

b) 226 a 345 de la SEC. ID. nº: 2.

14. Célula cultivada en la que se ha introducido un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que dicha célula expresa el polipéptido codificado por el segmento de ADN.

15. Procedimiento para preparar un polipéptido que comprende cultivar una célula según la reivindicación 14 y recuperar el polipéptido codificado por el segmento de ADN y expresado por la célula.

16. Utilización de una proteína aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de un medicamento destinado a:

a) activar la proliferación de los fibroblastos o de las células de músculo liso en un mamífero;

b) activar la cicatrización de una herida en un mamífero; o

c) activar la proliferación de los osteoblastos o los condrocitos en un mamífero.

17. Procedimiento *in vitro* de activación de un receptor alfa de PDGF en la superficie celular, que comprende exponer una célula que comprende un receptor alfa de PDGF en la superficie celular a una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, uniéndose proteína al receptor y activándolo.

18. Polinucleótido antisentido aislado que es el complemento de un polinucleótido que codifica un polipéptido es de 111 a 136 restos de aminoácidos de longitud y comprende los restos 325 a 345 de la SEC. ID. nº: 2; que opcionalmente comprende además el activador de la transcripción funcionalmente unido y las secuencias del terminador.

19. Utilización de un anticuerpo según la reivindicación 6 ó 7, para su utilización en la preparación de un medicamento para inhibir la proliferación celular en un mamífero.

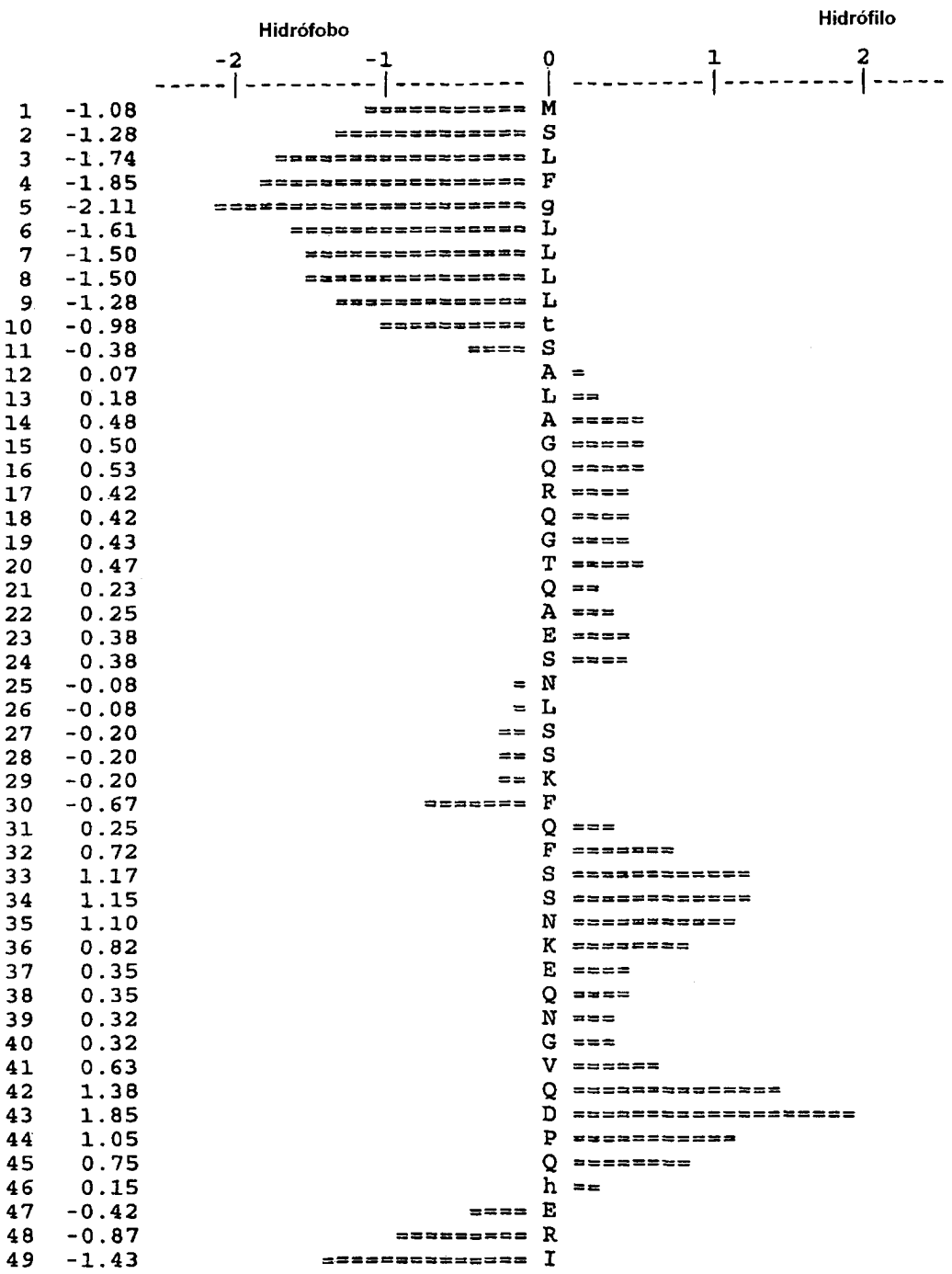

Hidrófobo
Hidrófilo
-2
-1
0
1
2
1 -1.08 M
2 -1.28 S
3 -1.74 L
4 -1.85 F
5 -2.11 g
6 -1.61 L
7 -1.50 L
8 -1.50 L
9 -1.28 L
10 -0.98 t
11 -0.38 S
12 0.07 A
13 0.18 L
14 0.48 A
15 0.50 G
16 0.53 Q
17 0.42 R
18 0.42 Q
19 0.43 G
20 0.47 T
21 0.23 Q
22 0.25 A
23 0.38 E
24 0.38 S
25 -0.08 N
26 -0.08 L
27 -0.20 S
28 -0.20 S
29 -0.20 K
30 -0.67 F
31 0.25 Q
32 0.72 F
33 1.17 S
34 1.15 S
35 1.10 N
36 0.82 K
37 0.35 E
38 0.35 Q
39 0.32 N
40 0.32 G
41 0.63 V
42 1.38 Q
43 1.85 D
44 1.05 P
45 0.75 Q
46 0.15 h
47 -0.42 E
48 -0.87 R
49 -1.43 I

Fig. 1

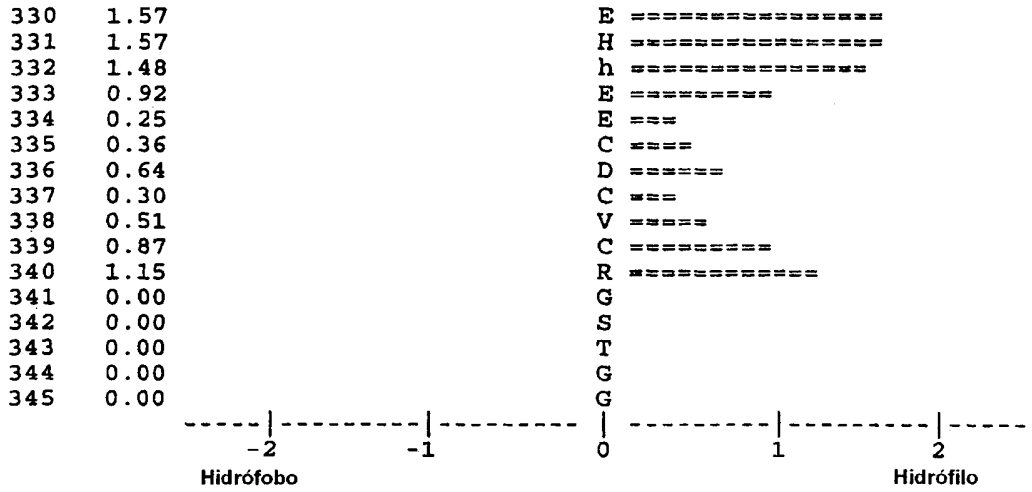
```
 50  -1.10                  ========== I
 51  -0.80                     ======= t
 52  -0.18                         == V
 53  -0.23                         == S
 54  -0.37                       ==== T
 55  -0.25                        === N
 56  -0.28                        === G
 57   0.22                            S ==
 58  -0.25                        === I
 59   0.05                            H
 60   0.05                            S
 61  -0.07                          = P
 62  -0.05                            R
 63  -0.55                     ====== F
 64   0.37                            P ====
 65   0.40                            H ====
 66   0.42                            T ====
 67   0.23                            Y ==
 68  -0.08                          = P
 69  -0.33                       === R
 70  -1.40              ============== N
 71  -0.93                  ========= T
 72  -1.17               ========== V
 73  -1.17               ========== L
 74  -0.95                ========= V
 75  -0.95                ========= W
 76   0.12                            R =
 77   0.12                            L =
 78   0.45                            V =====
 79   0.45                            A ====
 80  -0.03                            V
 81  -0.08                          = E
 82  -0.55                     ====== E
 83  -1.35              ============== N
 84  -1.45              ============== V
 85  -1.62            ================ W
 86  -0.55                     ====== I
 87   0.25                            Q ===
 88   0.72                            L =======
 89   0.60                            T ======
 90   0.67                            F =======
 91   0.78                            D ========
 92   0.78                            E ========
 93   0.78                            R ========
 94   0.28                            F ===
 95   1.20                            G ============
 96   1.70                            L ================
 97   2.50                            E ========================
 98   1.70                            D ================
 99   1.03                            P ==========
100   1.53                            E ==============
101   0.65                            D =======
102   0.65                            D =======
103  -0.27                       === I
104  -0.22                        == C
105   0.45                            K =====
```

```
106   -0.30                          === Y
107    0.58                              D ======
108    0.58                              F ======
109    1.00                              V ==========
110    1.30                              E ============
111    1.30                              V ============
112    1.55                              E ================
113    0.98                              E ==========
114    0.18                              P ==
115   -0.12                            = S
116   -0.17                           == D
117   -0.17                           == G
118   -0.73                       ======= T
119   -0.83                       ======== I
120   -0.53                         ====== L
121   -0.80                       ======== G
122   -0.80                       ======== R
123   -1.37                    =========== W
124   -1.05                    =========== C
125   -0.88                      ========= G
126   -0.88                      ========= S
127    0.18                              G ==
128    0.22                              T ==
129   -0.02                              V
130    0.28                              P ===
131    0.78                              G =========
132    0.78                              K ========
133    0.32                              Q ===
134    0.32                              I ===
135    0.32                              S ===
136    0.77                              K =========
137   -0.03                              G
138    0.47                              N =====
139    0.02                              Q
140   -0.27                          === I
141    0.08                              R =
142    0.08                              I =
143    0.88                              R ==========
144    0.00                              F
145    0.00                              V
146    0.25                              S ===
147    0.25                              D ===
148    0.25                              E ===
149   -0.25                          === Y
150    0.13                              F =
151    0.13                              P =
152   -0.03                              S
153   -0.38                        ==== E
154   -0.97                     ========== P
155   -1.35                  ============== G
156   -1.32                   ============= F
157   -1.20                    ============ C
158   -1.28                   ============= I
159   -1.20                    ============ H
160   -1.12                     =========== Y
161   -0.70                         ======= N
```

```
162  -1.15                ============ I
163  -0.92                 ========= V
164  -0.17                       == M
165  -0.03                          P
166  -0.28                     === Q
167  -0.27                     === F
168   0.15                          T =
169   0.27                          E ===
170  -0.48                   ===== A
171  -0.70                  ======= V
172  -0.45                    ==== S
173  -0.50                   ===== P
174  -0.45                   ===== S
175  -0.58                  ====== V
176  -0.63                  ====== L
177  -0.33                     === P
178  -0.63                  ====== P
179  -0.13                       = S
180  -0.48                   ===== A
181  -0.70                  ======= L
182  -0.37                    ==== P
183  -0.33                     === L
184  -0.12                       = D
185  -0.92                 ========= L
186  -1.18                ============ L
187  -0.97                 ========== N
188  -1.42              ============== N
189  -2.02 ====================== A
190  -2.00 ==================== I
191  -2.00 ====================== t
192  -0.93                 ========= A
193  -0.35                    ==== F
194  -0.23                      == s
195   0.03                          T
196   0.60                          L ======
197   0.52                          E =====
198  -0.28                     === D
199  -0.28                     === L
200   0.02                          I
201   0.82                          R ========
202   0.82                          Y ========
203   1.03                          L ==========
204   1.37                          E ==============
205   0.57                          P ======
206   1.07                          E ===========
207   0.27                          R ===
208   0.27                          W ===
209   0.93                          Q =========
210   0.60                          L ======
211   0.52                          D =====
212   0.52                          L =====
213   0.82                          E ========
214   0.25                          D ===
215  -0.42                    ==== L
216  -0.08                       = Y
217   0.00                          R
```

```
218   -0.80                    ======= P
219   -0.80                    ======= T
220   -0.23                       == W
221   -0.15                        = Q
222   -0.60                     ====== L
223   -0.55                     ====== L
224   -0.67                    ======= G
225   -0.67                    ======= K
226   -0.67                    ======= A
227   -0.08                        = F
228    0.38                          V ====
229    1.13                          F ===========
230    1.30                          G ============
231    1.05                          R ==========
232    1.05                          K ==========
233    0.25                          S ===
234    0.23                          R ==
235   -0.57                     ====== V
236   -0.62                     ====== V
237   -0.43                       ==== D
238   -0.43                       ==== L
239    0.37                          N ====
240    0.08                          L =
241    0.88                          L =========
242    0.88                          T =========
243    0.57                          E ======
244    0.12                          E =
245   -0.55                     ====== V
246   -0.37                       ==== R
247   -0.87                  ========= L
248   -0.07                        = Y
249    0.35                          S ====
250   -0.12                        = C
251    0.10                          T =
252   -0.08                        = P
253   -0.03                          R
254   -0.83                   ======== N
255   -0.37                       ==== F
256    0.55                          S ======
257    1.00                          V ==========
258    0.95                          S ==========
259    1.40                          I ============
260    2.20                          R ====================
261    1.63                          E ==============
262    1.63                          E ==============
263    1.07                          L ==========
264    1.07                          K ==========
265    0.15                          R =
266   -0.92                  ========= T
267   -0.85                  ========= D
268   -1.35               ============ T
269   -1.45              ============= I
270   -1.45               ============ F
271   -1.33                ============ W
272   -1.02                 ========== P
273   -0.52                     ===== G
```

```
274   -0.02                                C
275   -0.02                                L
276    0.28                                L ===
277    0.58                                V ======
278    0.87                                K =========
279    0.20                                R ==
280   -0.38                          ==== C
281   -0.38                          ==== G
282   -0.55                        ====== G
283   -0.85                      ========= N
284   -0.97                     ========== C
285   -0.77                       ======== A
286   -0.85                      ========= C
287   -0.65                        ======= C
288    0.02                                L
289    0.15                                H ==
290    0.27                                N ===
291    0.07                                C =
292   -0.02                                N
293   -0.05                                E
294   -0.50                           ===== C
295    0.17                                Q ==
296   -0.12                             = C
297   -0.02                                V
298    0.73                                P =======
299    1.23                                S ============
300    1.20                                K ============
301    0.62                                V ======
302    1.37                                T ==============
303    1.18                                K ===========
304    0.38                                K ====
305   -0.08                             = Y
306   -0.40                          ==== H
307    0.18                                E ==
308   -0.32                           === V
309    0.43                                L ====
310    0.67                                Q =======
311    0.63                                L ======
312    0.68                                R =======
313    0.68                                P =======
314    0.68                                K =======
315   -0.12                             = T
316   -0.13                             = G
317    0.37                                V ====
318    0.67                                R =======
319   -0.13                             = G
320   -0.20                           == L
321    0.60                                H ======
322    0.43                                K ====
323   -0.15                             = S
324   -0.50                        ===== L
325    0.30                                T ===
326    0.28                                D ===
327    0.10                                V =
328    0.85                                A ========
329    1.43                                L ==============
```


330 1.57 E
331 1.57 H
332 1.48 h
333 0.92 E
334 0.25 E
335 0.36 C
336 0.64 D
337 0.30 C
338 0.51 V
339 0.87 C
340 1.15 R
341 0.00 G
342 0.00 S
343 0.00 T
344 0.00 G
345 0.00 G
-2
-1
0
1
2
Hidrófobo
Hidrófilo

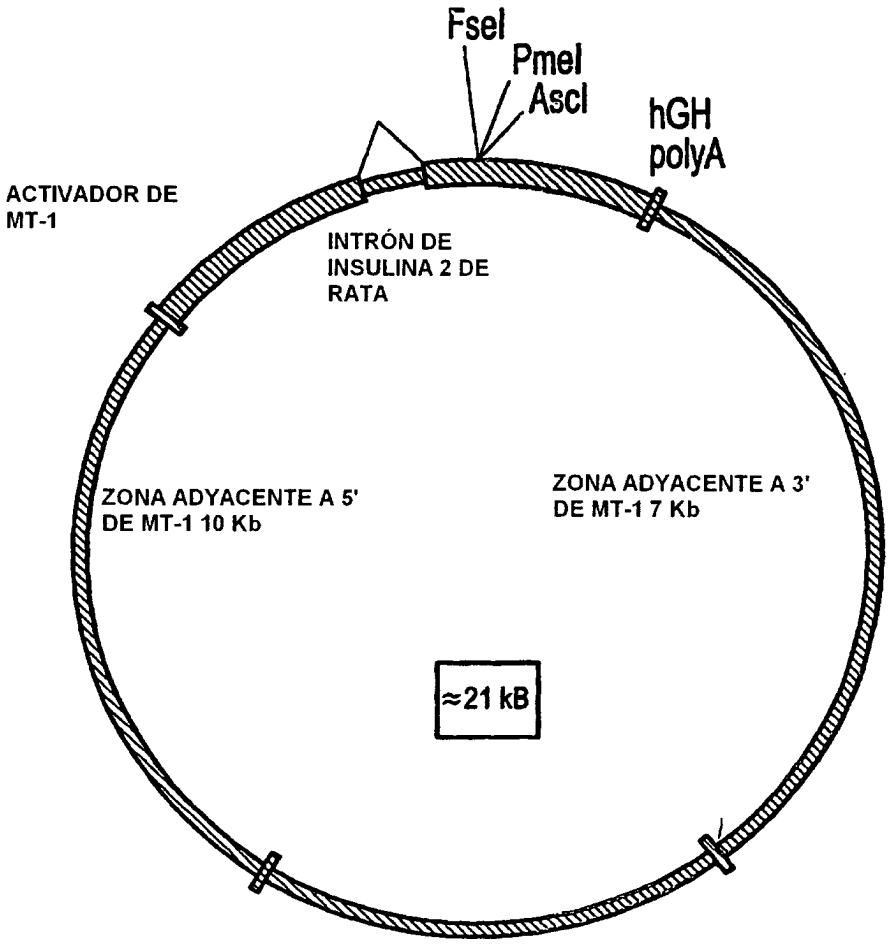

FseI
PmeI
AscI
hGH
polyA
ACTIVADOR DE
MT-1
INTRÓN DE
INSULINA 2 DE
RATA
ZONA ADYACENTE A 5'
DE MT-1 10 Kb
ZONA ADYACENTE A 3'
DE MT-1 7 Kb
≈21 kB

Fig. 2

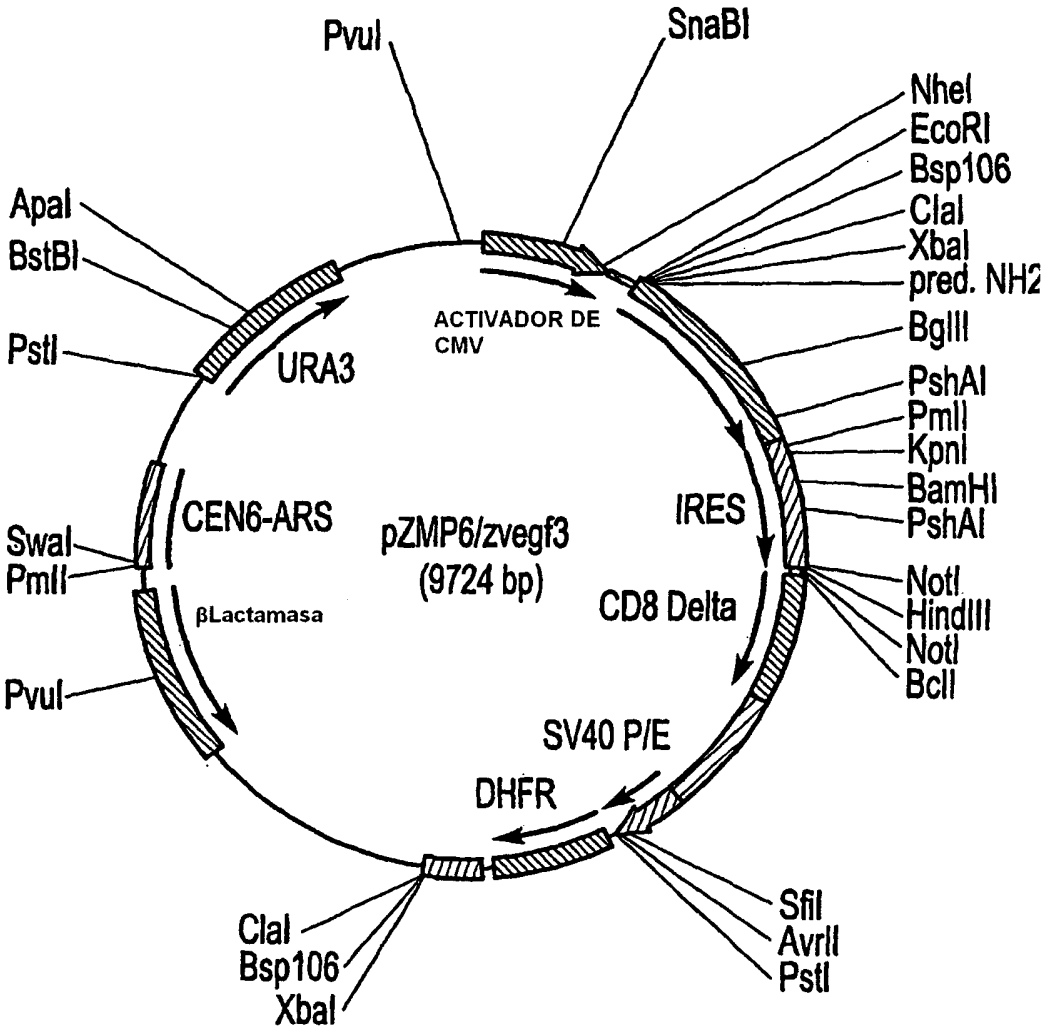

PvuI
SnaBI
NheI
EcoRI
Bsp106
ClaI
XbaI
pred. NH2
BglII
PshAI
PmlI
KpnI
BamHI
PshAI
NotI
HindIII
NotI
BclI
ApaI
BstBI
PstI
URA3
ACTIVADOR DE CMV
CEN6-ARS
pZMP6/zvegf3
(9724 bp)
IRES
CD8 Delta
SwaI
PmlI
βLactamasa
PvuI
SV40 P/E
DHFR
ClaI
Bsp106
XbaI
SfiI
AvrII
PstI

Fig. 3

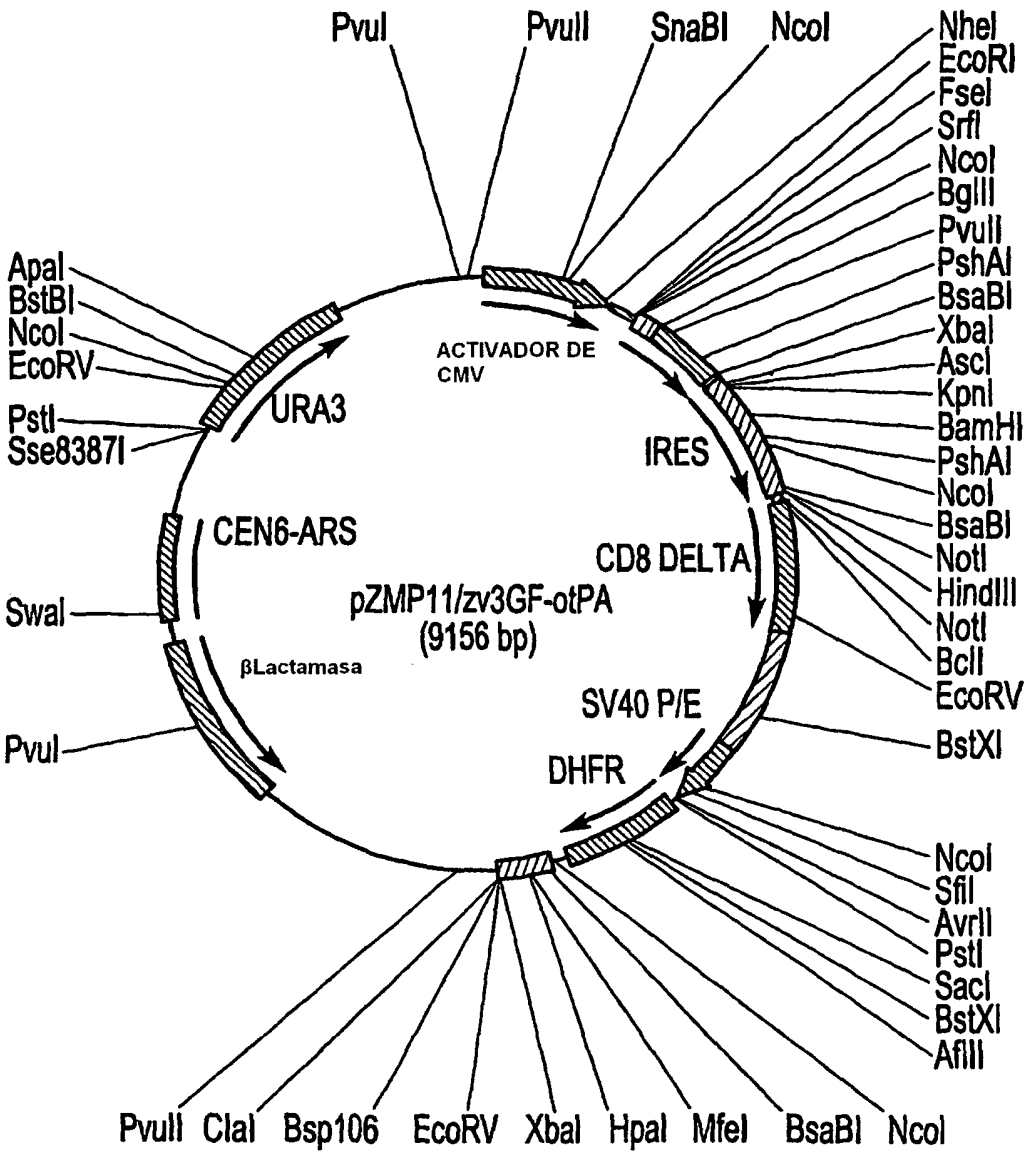

PvuI
PvuII
SnaBI
NcoI
NheI
EcoRI
FseI
SrfI
NcoI
BglII
PvuII
PshAI
BsaBI
XbaI
AscI
KpnI
BamHI
PshAI
NcoI
BsaBI
NotI
HindIII
NotI
BclI
EcoRV
BstXI
ApaI
BstBI
NcoI
EcoRV
PstI
Sse8387I
URA3
ACTIVADOR DE CMV
IRES
CD8 DELTA
CEN6-ARS
pZMP11/zv3GF-otPA
(9156 bp)
βLactamasa
SwaI
PvuI
SV40 P/E
DHFR
NcoI
SfiI
AvrII
PstI
SacI
BstXI
AflII
PvuII ClaI Bsp106 EcoRV XbaI HpaI MfeI BsaBI NcoI

Fig. 4

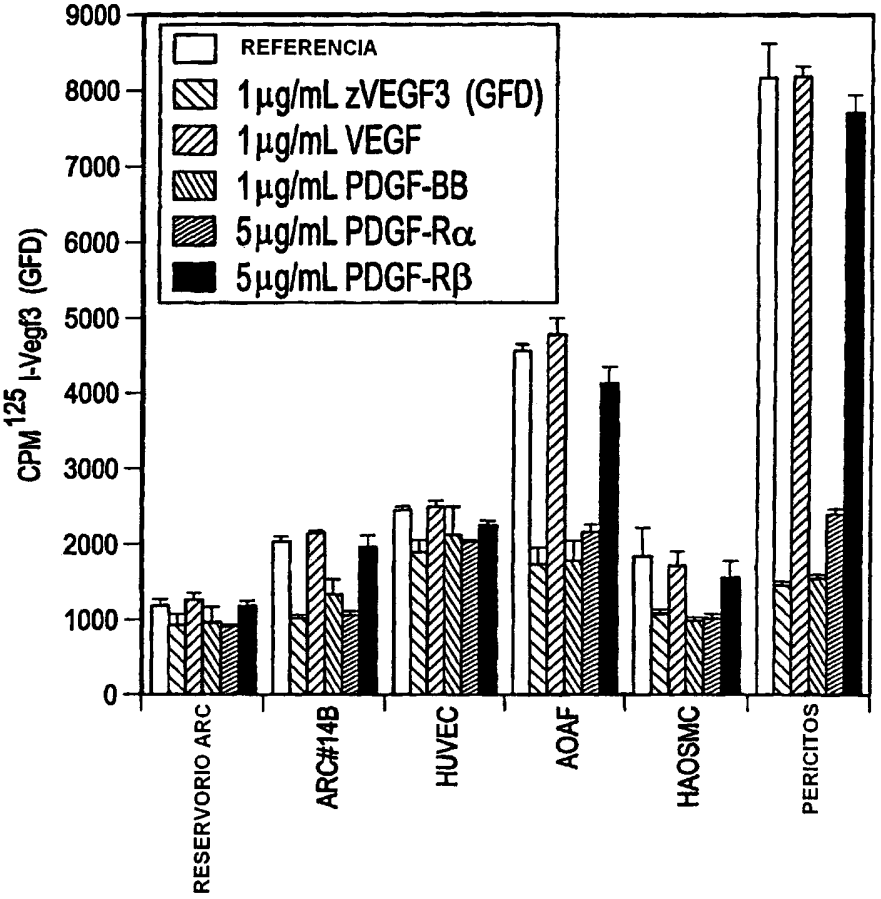

REFERENCIA
1µg/mL zVEGF3 (GFD)
1µg/mL VEGF
1µg/mL PDGF-BB
5µg/mL PDGF-Rα
5µg/mL PDGF-Rβ
CPM 125 I-Vegf3 (GFD)
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
RESERVORIO ARC
ARC#14B
HUVEC
AOAF
HAOSMC
PERICITOS

Fig. 5

```
MSLFGLLLLTSALAGQRQGTQAESNLSSKFQFSSNKEQNGVQDPQHERIITVSTNGSIHS

MLLLGLLLLTSALAGQRTGTRAESNLSSKLQLSSDKEQNGVQDPRHERVVTISGNGSIHS
         10         20         30         40         50         60

PRFPHTYPRNTVLVWRLVAVEENVWIQLTFDERFGLEDPEDDICKYDFVEVEEPSDGTIL

PKFPHTYPRNMVLVWRLVAVDENVRIQLTFDERFGLEDPEDDICKYDFVEVEEPSDGSVL
         70         80         90        100        110        120

GRWCGSGTVPGKQISKGNQIRIRFVSDEYFPSEPGFCIHYNIVMPQFTEAVSPSVLPPSA

GRWCGSGTVPGKQTSKGNHIRIRFVSDEYFPSEPGFCIHYSIIMPQVTETTSPSVLPPSS
        130        140        150        160        170        180

LPLDLLNNAITAFSTLEDLIRYLEPERWQLDLEDLYRPTWQLLGKAFVFGRKSRVVDLNL

LSLDLLNNAVTAFSTLEELIRYLEPDRWQVDLDSLYKPTWQLLGKAFLYGKKSKVVNLNL
        190        200        210        220        230        240

LTEEVRLYSCTPRNFSVSIREELKRTDTIFWPGCLLVKRCGGNCACCLHNCNECQCVPSK

LKEEVKLYSCTPRNFSVSIREELKRTDTIFWPGCLLVKRCGGNCACCLHNCNECQCVPRK
        250        260        270        280        290        300

VTKKYHEVLQLRPKTGVRGLHKSLTDVALEHHEECDCVCRGSTGG (SEQ ID NO:2)

VTKKYHEVLQLRPKTGVKGLHKSLTDVALEHHEECDCVCRGNAGG (SEQ ID NO:43)
        310        320        330        340
```

Fig. 6

LISTA DE SECUENCIAS

<110> ZymoGenetics, Inc.

<120> ZVEGF3 homólogo de factor de crecimiento

<130> 98-60PC

<160> 50

<170> FastSEQ para la versión Windows 3.0

<210> 1

<211> 1760

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (154)...(1191)

<400> 1

```
attatgtgga aactaccctg cgattctctg ctgccagagc aggctcggcg cttccacccc     60
agtgcagcct tcccctggcg gtggtgaaag agactcggga gtcgctgctt ccaaagtgcc    120
cgccgtgagt gagctctcac cccagtcagc caa atg agc ctc ttc ggg ctt ctc     174
                                      Met Ser Leu Phe Gly Leu Leu
                                       1               5

ctg ctg aca tct gcc ctg gcc ggc cag aga cag ggg act cag gcg gaa      222
Leu Leu Thr Ser Ala Leu Ala Gly Gln Arg Gln Gly Thr Gln Ala Glu
         10                  15                  20

tcc aac ctg agt agt aaa ttc cag ttt tcc agc aac aag gaa cag aac      270
Ser Asn Leu Ser Ser Lys Phe Gln Phe Ser Ser Asn Lys Glu Gln Asn
     25                  30                  35

gga gta caa gat cct cag cat gag aga att att act gtg tct act aat      318
Gly Val Gln Asp Pro Gln His Glu Arg Ile Ile Thr Val Ser Thr Asn
 40                  45                  50                  55

gga agt att cac agc cca agg ttt cct cat act tat cca aga aat acg      366
Gly Ser Ile His Ser Pro Arg Phe Pro His Thr Tyr Pro Arg Asn Thr
                 60                  65                  70
```

```
gtc ttg gta tgg aga tta gta gca gta gag gaa aat gta tgg ata caa      414
Val Leu Val Trp Arg Leu Val Ala Val Glu Glu Asn Val Trp Ile Gln
             75                  80                  85

ctt acg ttt gat gaa aga ttt ggg ctt gaa gac cca gaa gat gac ata      462
Leu Thr Phe Asp Glu Arg Phe Gly Leu Glu Asp Pro Glu Asp Asp Ile
         90                  95                 100

tgc aag tat gat ttt gta gaa gtt gag gaa ccc agt gat gga act ata      510
Cys Lys Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu Glu Pro Ser Asp Gly Thr Ile
    105                 110                 115

tta ggg cgc tgg tgt ggt tct ggt act gta cca gga aaa cag att tct      558
Leu Gly Arg Trp Cys Gly Ser Gly Thr Val Pro Gly Lys Gln Ile Ser
120                 125                 130                 135

aaa gga aat caa att agg ata aga ttt gta tct gat gaa tat ttt cct      606
Lys Gly Asn Gln Ile Arg Ile Arg Phe Val Ser Asp Glu Tyr Phe Pro
                140                 145                 150

tct gaa cca ggg ttc tgc atc cac tac aac att gtc atg cca caa ttc      654
Ser Glu Pro Gly Phe Cys Ile His Tyr Asn Ile Val Met Pro Gln Phe
            155                 160                 165

aca gaa gct gtg agt cct tca gtg cta ccc cct tca gct ttg cca ctg      702
Thr Glu Ala Val Ser Pro Ser Val Leu Pro Pro Ser Ala Leu Pro Leu
        170                 175                 180

gac ctg ctt aat aat gct ata act gcc ttt agt acc ttg gaa gac ctt      750
Asp Leu Leu Asn Asn Ala Ile Thr Ala Phe Ser Thr Leu Glu Asp Leu
    185                 190                 195

att cga tat ctt gaa cca gag aga tgg cag ttg gac tta gaa gat cta      798
Ile Arg Tyr Leu Glu Pro Glu Arg Trp Gln Leu Asp Leu Glu Asp Leu
200                 205                 210                 215

tat agg cca act tgg caa ctt ctt ggc aag gct ttt gtt ttt gga aga      846
Tyr Arg Pro Thr Trp Gln Leu Leu Gly Lys Ala Phe Val Phe Gly Arg
                220                 225                 230

aaa tcc aga gtg gtg gat ctg aac ctt cta aca gag gag gta aga tta      894
Lys Ser Arg Val Val Asp Leu Asn Leu Leu Thr Glu Glu Val Arg Leu
            235                 240                 245
```

```
tac agc tgc aca cct cgt aac ttc tca gtg tcc ata agg gaa gaa cta      942
Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn Phe Ser Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu
        250                 255                 260

aag aga acc gat acc att ttc tgg cca ggt tgt ctc ctg gtt aaa cgc      990
Lys Arg Thr Asp Thr Ile Phe Trp Pro Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg
    265                 270                 275

tgt ggt ggg aac tgt gcc tgt tgt ctc cac aat tgc aat gaa tgt caa     1038
Cys Gly Gly Asn Cys Ala Cys Cys Leu His Asn Cys Asn Glu Cys Gln
280                 285                 290                 295

tgt gtc cca agc aaa gtt act aaa aaa tac cac gag gtc ctt cag ttg     1086
Cys Val Pro Ser Lys Val Thr Lys Lys Tyr His Glu Val Leu Gln Leu
                300                 305                 310

aga cca aag acc ggt gtc agg gga ttg cac aaa tca ctc acc gac gtg     1134
Arg Pro Lys Thr Gly Val Arg Gly Leu His Lys Ser Leu Thr Asp Val
            315                 320                 325

gcc ctg gag cac cat gag gag tgt gac tgt gtg tgc aga ggg agc aca     1182
Ala Leu Glu His His Glu Glu Cys Asp Cys Val Cys Arg Gly Ser Thr
        330                 335                 340

gga gga tag ccgcatcacc accagcagct cttgcccaga gctgtgcagt             1231
Gly Gly  *
    345

gcagtggctg attctattag agaacgtatg cgttatctcc atccttaatc tcagttgttt   1291
gcttcaagga cctttcatct tcaggattta cagtgcattc tgaaagagga gacatcaaac   1351
agaattagga gttgtgcaac agctcttttg agaggaggcc taaaggacag gagaaaaggt   1411
cttcaatcgt ggaaagaaaa ttaaatgttg tattaaatag atcaccagct agtttcagag   1471
ttaccatgta cgtattccac tagctgggtt ctgtatttca gttctttcga tacggcttag   1531
ggtaatgtca gtacaggaaa aaaactgtgc aagtgagcac ctgattccgt tgccttgctt   1591
aactctaaag ctccatgtcc tgggcctaaa atcgtataaa atctggattt ttttttttt    1651
ttttgctca tattcacata tgtaaaccag aacattctat gtactacaaa cctggttttt   1711
aaaaaggaac tatgttgcta tgaattaaac ttgtgtcgtg ctgatagga              1760
```

<210> 2
<211> 345
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

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

<220>
<223> motivo peptídico

<221> VARIANTE
<222> (2)...(19)
<223> Xaa es cualquier aminoácido

<221> VARIANTE
<222> (20)...(34)
<223> Xaa es cualquier aminoácido o no está presente

<221> VARIANTE
<222> (36)...(36)
<223> Xaa es cualquier aminoácido

<221> VARIANTE
<222> (38)...(38)
<223> Xaa es cualquier aminoácido

<221> VARIANTE
<222> (40)...(45)
<223> Xaa es cualquier aminoácido

<221> VARIANTE
<222> (46)...(72)
<223> Xaa es cualquier aminoácido o no está presente

<221> VARIANTE
<222> (74)...(93)
<223> Xaa es cualquier aminoácido

<221> VARIANTE
<222> (94)...(113)
<223> Xaa es cualquier aminoácido o no está presente

<221> VARIANTE
<222> (115)...(115)
<223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 3

```
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1               5                  10                  15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
            20                  25                  30
Xaa Xaa Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
        35                  40                  45
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
    50                  55                  60
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
65                  70                  75                  80
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
                85                  90                  95
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
            100                 105                 110
Xaa Cys Xaa Cys
        115
```

<210> 4
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> motivo peptídico

<221> VARIANTE
<222> (2)...(2)
<223> Xaa es Lys ó Arg

<221> VARIANTE
<222> (4)...(4)
<223> Xaa es Asp, Asn ó Glu

<221> VARIANTE
<222> (5)...(5)
<223> Xaa es Trp, Tyr ó Phe

<221> VARIANTE
<222> (6)...(16)
<223> Xaa es cualquier aminoácido

<221> VARIANTE
<222> (17)...(20)
<223> Xaa es es cualquier aminoácido o no presente

<221> VARIANTE
<222> (22)...(22)
<223> Xaa es Lys ó Arg

<221> VARIANTE
<222> (23)...(23)
<223> Xaa es Trp, Tyr o Phe

<400> 4

```
Cys Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1               5                  10                  15
Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Cys
            20
```

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> etiqueta peptídica

<400> 5

```
Glu Tyr Met Pro Met Glu
 1               5
```

<210> 6
<211> 1035
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia degenerada derivada de la SEC ID nº 1 y 2

<221> misc_feature
<222> (1)...(1035)
<223> n = A, T, C o G

<400> 6

```
atgwsnytnt tyggnytnyt nytnytnacn wsngcnytng cnggncarmg ncarggnacn      60
cargcngarw snaayytnws nwsnaartty carttywsnw snaayaarga rcaraayggn     120
gtncargayc cncarcayga rmgnathath acngtnwsna cnaayggnws nathcaywsn     180
ccnmgnttyc cncayacnta yccnmgnaay acngtnytng tntggmgnyt ngtngcngtn     240
gargaraayg tntggathca rytnacntty gaygarmgnt tyggnytnga rgayccngar     300
```

gaygayatht gyaartayga yttygtngar gtngargarc cnwsngaygg nacnathytn 360
ggnmgntggt gyggnwsngg nacngtnccn ggnaarcara thwsnaargg naaycarath 420
mgnathmgnt tygtnwsnga ygartaytty ccnwsngarc cnggnttytg yathcaytay 480
aayathgtna tgccncartt yacngargcn gtnwsnccnw sngtnytncc nccnwsngcn 540
ytnccnytng ayytnytnaa yaaygcnath acngcnttyw snacnytnga rgayytnath 600
mgntayytng arccngarmg ntggcarytn gayytngarg ayytntaymg nccnacntgg 660
carytnytng gnaargcntt ygtnttyggn mgnaarwsnm gngtngtnga yytnaayytn 720
ytnacngarg argtnmgnyt ntaywsntgy acnccnmgna ayttywsngt nwsnathmgn 780
gargarytna armgnacnga yacnathtty tggccnggnt gyytnytngt naarmgntgy 840
ggnggnaayt gygcntgytg yytncayaay tgyaaygart gycartgygt nccnwsnaar 900
gtnacnaara artaycayga rgtnytncar ytnmgnccna aracnggngt nmgnggnytn 960
cayaarwsny tnacngaygt ngcnytngar caycaygarg artgygaytg ygtntgymgn 1020
ggnwsnacng gnggn 1035

<210> 7
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<221> misc_feature
<222> (1)...(17)
<223> n = A, T, C o G

<400> 7

mgntgyggng gnaaytg **17**

<210> 8
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<221> misc_feature
<222> (1)...(17)
<223> n = A, T, C o G

<400> 8

mgntgydsng gnwrytg **17**

<210> 9
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<221> misc_feature
<222> (1)...(17)
<223> n = A, T, C o G

<400> 9
carywnccns hrcanck 17

<210> 10
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<221> misc_feature
<222> (1)...(17)
<223> n = A, T, C o G

<400> 10
ttytggccng gntgyyt 17

<210> 11
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<221> misc_feature
<222> (1)...(17)
<223> n = A, T, C o G

<400> 11
ntnddnccnn sntgybt 17

<210> 12
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido
<221> misc_feature
<222> (1)...(17)
<223> n = A, T, C o G

<400> 12
avrcansnng gnhhnan 17

<210> 13

<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<400> 13
caygargart gygaytg 17

<210> 14
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<221> misc_feature
<222> (1)...(17)
<223> n = A, T, C o G

<400> 14
caynnnnvnt gyvvntg 17

<210> 15
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<221> misc_feature
<222> (1)...(17)
<223> n = A, T, C o G

<400> 15
canbbrcanb nnnnrtg 17

<210> 16
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<221> misc_feature
<222> (1)..(17)
<223> n = A, T, C o G

<400> 16

tgyacnccnm gnaaytt 17

<210> 17
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<221> misc_feature
<222> (1)...(17)
<223> n = A, T, C o G

<400> 17

tgyhnnmcnm knrmndh 17

<210> 18
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<221> misc_feature
<222> (1)...(17)
<223> n = A, T, C o G

<400> 18

dhnkynmkng knndrca 17

<210> 19
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<400> 19

tgyaartayg aytwygt 17

<210> 20
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<400> 20

acrwartcrt ayttrca 17

<210> 21
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<221> misc_feature
<222> (1)...(17)
<223> n = A, T, C o G

<400> 21

ywnggnmrnt dbtgygg 17

<210> 22
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<221> misc_feature
<222> (1)...(17)
<223> n = A, T, C o G

<400> 22

ccrcavhany knccnwr 17

<210> 23
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido
<221> misc_feature
<222> (1)...(17)
<223> n = A, T, C o G

<400> 23

tdbccnmand vntaycc 17

<210> 24
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<221> misc_feature
<222> (1)...(17)
<223> n = A, T, C o G

<400> 24
ggrtanbhnt knggvha 17

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<400> 25
agcaggtcca gtggcaaagc 20

<210> 26
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<400> 26
cgtttgatga aagatttggg c 21

<210> 27
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<400> 27
ggaggtctgt ataagcagag c 21

<210> 28
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<400> 28

taacagagga ggtaagat 18

<210> 29
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<400> 29

tcggttctct ttagttct 18

<210> 30
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<400> 30

tctggacgtc ctcctgctgg tatag 25

<210> 31
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<400> 31

ggtatggagc caggggcaag ttggg 25

<210> 32
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<400> 32

gagtggcaac ttccagggcc aggagag 27

<210> 33
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido

<400> 33

cttttgctag cctcaaccct gactatc **27**

<210> 34
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido ZC20,180

<400> 34

cgcgcggttt aaacgccacc atgagcctct tcggg **35**

<210> 35
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido ZC20,181

<400> 35

cgtatcggcg cgccctatcc tcctgtgctc cc **32**

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

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

<400> 36

```
ccgtcaccat ttatcagctc agcaccacaa ggaagtgcgg cacccacacg cgctcggaaa     60
gttcagcatg caggaagttt ggggagagct cggcgattag cacagcgacc cgggccagcg    120

cagggcgagc gcaggcggcg agagcgcagg gcggcgcggc gtcggtcccg ggagcagaac    180
ccggcttttt cttggagcga cgctgtctct agtcgctgat cccaa atg cac cgg ctc     237
                                                 Met His Arg Leu
                                                  1

atc ttt gtc tac act cta atc tgc gca aac ttt tgc agc tgt cgg gac       285
Ile Phe Val Tyr Thr Leu Ile Cys Ala Asn Phe Cys Ser Cys Arg Asp
 5                  10                  15                  20

act tct gca acc ccg cag agc gca tcc atc aaa gct ttg cgc aac gcc       333
Thr Ser Ala Thr Pro Gln Ser Ala Ser Ile Lys Ala Leu Arg Asn Ala
                25                  30                  35

aac ctc agg cga gat gag agc aat cac ctc aca gac ttg tac cga aga       381
Asn Leu Arg Arg Asp Glu Ser Asn His Leu Thr Asp Leu Tyr Arg Arg
            40                  45                  50

gat gag acc atc cag gtg aaa gga aac ggc tac gtg cag agt cct aga       429
Asp Glu Thr Ile Gln Val Lys Gly Asn Gly Tyr Val Gln Ser Pro Arg
        55                  60                  65

ttc ccg aac agc tac ccc agg aac ctg ctc ctg aca tgg cgg ctt cac       477
Phe Pro Asn Ser Tyr Pro Arg Asn Leu Leu Leu Thr Trp Arg Leu His
    70                  75                  80

tct cag gag aat aca cgg ata cag cta gtg ttt gac aat cag ttt gga       525
Ser Gln Glu Asn Thr Arg Ile Gln Leu Val Phe Asp Asn Gln Phe Gly
 85                  90                  95                  100

tta gag gaa gca gaa aat gat atc tgt agg tat gat ttt gtg gaa gtt       573
Leu Glu Glu Ala Glu Asn Asp Ile Cys Arg Tyr Asp Phe Val Glu Val
                105                 110                 115

gaa gat ata tcc gaa acc agt acc att att aga gga cga tgg tgt gga       621
Glu Asp Ile Ser Glu Thr Ser Thr Ile Ile Arg Gly Arg Trp Cys Gly
            120                 125                 130

cac aag gaa gtt cct cca agg ata aaa tca aga acg aac caa att aaa       669
His Lys Glu Val Pro Pro Arg Ile Lys Ser Arg Thr Asn Gln Ile Lys
        135                 140                 145

atc aca ttc aag tcc gat gac tac ttt gtg gct aaa cct gga ttc aag       717
Ile Thr Phe Lys Ser Asp Asp Tyr Phe Val Ala Lys Pro Gly Phe Lys
    150                 155                 160
```

```
att tat tat tct ttg ctg gaa gat ttc caa ccc gca gca gct tca gag      765
Ile Tyr Tyr Ser Leu Leu Glu Asp Phe Gln Pro Ala Ala Ala Ser Glu
165                 170                 175                 180

acc aac tgg gaa tct gtc aca agc tct att tca ggg gta tcc tat aac      813
Thr Asn Trp Glu Ser Val Thr Ser Ser Ile Ser Gly Val Ser Tyr Asn
                185                 190                 195

tct cca tca gta acg gat ccc act ctg att gcg gat gct ctg gac aaa      861
Ser Pro Ser Val Thr Asp Pro Thr Leu Ile Ala Asp Ala Leu Asp Lys
            200                 205                 210

aaa att gca gaa ttt gat aca gtg gaa gat ctg ctc aag tac ttc aat      909
Lys Ile Ala Glu Phe Asp Thr Val Glu Asp Leu Leu Lys Tyr Phe Asn
        215                 220                 225

cca gag tca tgg caa gaa gat ctt gag aat atg tat ctg gac acc cct      957
Pro Glu Ser Trp Gln Glu Asp Leu Glu Asn Met Tyr Leu Asp Thr Pro
    230                 235                 240

cgg tat cga ggc agg tca tac cat gac cgg aag tca aaa gtt gac ctg     1005
Arg Tyr Arg Gly Arg Ser Tyr His Asp Arg Lys Ser Lys Val Asp Leu
245                 250                 255                 260

gat agg ctc aat gat gat gcc aag cgt tac agt tgc act ccc agg aat     1053
Asp Arg Leu Asn Asp Asp Ala Lys Arg Tyr Ser Cys Thr Pro Arg Asn
                265                 270                 275

tac tcg gtc aat ata aga gaa gag ctg aag ttg gcc aat gtg gtc ttc     1101
Tyr Ser Val Asn Ile Arg Glu Glu Leu Lys Leu Ala Asn Val Val Phe
            280                 285                 290

ttt cca cgt tgc ctc ctc gtg cag cgc tgt gga gga aat tgt ggc tgt     1149
Phe Pro Arg Cys Leu Leu Val Gln Arg Cys Gly Gly Asn Cys Gly Cys
        295                 300                 305

gga act gtc aac tgg agg tcc tgc aca tgc aat tca ggg aaa acc gtg     1197
Gly Thr Val Asn Trp Arg Ser Cys Thr Cys Asn Ser Gly Lys Thr Val
    310                 315                 320

aaa aag tat cat gag gta tta cag ttt gag cct ggc cac atc aag agg     1245
Lys Lys Tyr His Glu Val Leu Gln Phe Glu Pro Gly His Ile Lys Arg
325                 330                 335                 340
```

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

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

gagaatgtgc acatccttac attaagcctg aaagaacctt tagtttaagg agggtgagat   1398
aagagaccct tttcctacca gcaaccaaac ttactactag cctgcaatgc aatgaacaca   1458
agtggttgct gagtctcagc cttgctttgt taatgccatg gcaagtagaa aggtatatca   1518
tcaacttcta tacctaagaa tataggattg catttaataa tagtgtttga ggttatatat   1578
gcacaaacac acacagaaat atattcatgt ctatgtgtat atagatcaaa tgttttttt    1638
ttttggtata tataaccagg tacaccagag gttacatatg tttgagttag actcttaaaa   1698
tcctttgcca aaataaggga tggtcaaata tatgaaacat gtctttagaa aatttaggag   1758
ataaatttat ttttaaattt tgaaacacga aacaattttg aatcttgctc tcttaaagaa   1818
agcatcttgt atattaaaaa tcaaaagatg aggctttctt acatatacat cttagttgat   1878
tatt                                                               1882
```

<210> 37

<211> 370

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

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

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

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

<220>
<223> Cebador oligonucleótido ZC21,222

<400> 38

tgagccctcg ccccagtcag **20**

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

<220>
<223> Cebador oligonucleótido ZC21,224

<400> 39

acatacagga aagccttgcc caaaa **25**

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

<220>
<223> Cebador oligonucleótido ZC21,223

<400> 40

aaactaccct gcgattctct gctgc 25

<210> 41
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido ZC21,334

<400> 41

ggtaaatgga gcttggctga g 21

<210> 42
<211> 3571
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> CDS
<222> (1049)...(2086)

<400> 42

```
gaattcccgg gtcgacccac gcgtccgggc gcccagggga aaggaagctg ggggccgcct     60
ggcggcattc ctcgccgcag tgtgggctcc gtctgccgcg gggcccgcag tgccccctgt    120
ctgcgccagc acctgttggc ccgccagctg gccgcccgcg ccccccgcgc ccccgcgcc     180
cgcccggccg ccagccccgc gccccgcgcg ccgcccgctg ggggaaagtg gagacgggga    240
ggggacaaga gcgatcctcc aggccagcca ggccttccct tagccgcccg tgcttagccg    300
ccacctctcc tcagccctgc gtcctgccct gccttagggc aggcatccga gcgctcgcga    360
ctccgagccg cccaagctct cccggcttcc cgcagcactt cgccggtacc cgagggaact    420
```

```
tcggtggcca ccgactgcag caaggaggag gctccgcggt ggatccgggc cagtcccgag    480
tcgtccccgc ggcctctctg cccgcccggg acccgcgcgg cactcgcagg gcacggtccc    540
ctccccccag gtgggggtgg ggcgccgcct gccgccccga tcagcagctt tgtcattgat    600
cccaaggtgc tcgcctcgct gccgacctgg cttccagtct ggcttggcgg gaccccgagt    660
cctcgcctgt gtcctgtccc ccaaactgac aggtgctccc tgcgagtcgc cacgactcat    720
cgccgctccc ccgcgtcccc acccttctt tcctccctcg cctaccccca ccccccgcac    780
ttcggcacag ctcaggattt gtttaaacct tgggaaactg gttcaggtcc aggttttgct    840
ttgatccttt tcaaaaactg gagacacaga agagggctct aggaaaaact tttggatggg    900
attatgtgga aactaccctg cgattctctg ctgccagagc cggccaggcg cttccaccgc    960
agcgcagcct ttccccggct gggctgagcc ttggagtcgt cgcttcccca gtgcccgccg   1020
cgagtgagcc ctcgccccag tcagccaa atg ctc ctc ctc ggc ctc ctc ctg      1072
                                  Met Leu Leu Leu Gly Leu Leu Leu
                                   1               5

ctg aca tct gcc ctg gcc ggc caa aga acg ggg act cgg gct gag tcc     1120
Leu Thr Ser Ala Leu Ala Gly Gln Arg Thr Gly Thr Arg Ala Glu Ser
     10                  15                  20

aac ctg agc agc aag ttg cag ctc tcc agc gac aag gaa cag aac gga     1168
Asn Leu Ser Ser Lys Leu Gln Leu Ser Ser Asp Lys Glu Gln Asn Gly
 25                  30                  35                  40

gtg caa gat ccc cgg cat gag aga gtt gtc act ata tct ggt aat ggg     1216
Val Gln Asp Pro Arg His Glu Arg Val Val Thr Ile Ser Gly Asn Gly
                 45                  50                  55

agc atc cac agc ccg aag ttt cct cat aca tac cca aga aat atg gtg     1264
Ser Ile His Ser Pro Lys Phe Pro His Thr Tyr Pro Arg Asn Met Val
             60                  65                  70

ctg gtg tgg aga tta gtt gca gta gat gaa aat gtg cgg atc cag ctg     1312
Leu Val Trp Arg Leu Val Ala Val Asp Glu Asn Val Arg Ile Gln Leu
         75                  80                  85

aca ttt gat gag aga ttt ggg ctg gaa gat cca gaa gac gat ata tgc     1360
Thr Phe Asp Glu Arg Phe Gly Leu Glu Asp Pro Glu Asp Asp Ile Cys
     90                  95                 100

aag tat gat ttt gta gaa gtt gag gag ccc agt gat gga agt gtt tta     1408
Lys Tyr Asp Phe Val Glu Val Glu Glu Pro Ser Asp Gly Ser Val Leu
105                 110                 115                 120

gga cgc tgg tgt ggt tct ggg act gtg cca gga aag cag act tct aaa     1456
Gly Arg Trp Cys Gly Ser Gly Thr Val Pro Gly Lys Gln Thr Ser Lys
                125                 130                 135
```

```
gga aat cat atc agg ata aga ttt gta tct gat gag tat ttt cca tct      1504
Gly Asn His Ile Arg Ile Arg Phe Val Ser Asp Glu Tyr Phe Pro Ser
            140                 145                 150

gaa ccc gga ttc tgc atc cac tac agt att atc atg cca caa gtc aca      1552
Glu Pro Gly Phe Cys Ile His Tyr Ser Ile Ile Met Pro Gln Val Thr
        155                 160                 165

gaa acc acg agt cct tcg gtg ttg ccc cct tca tct ttg tca ttg gac      1600
Glu Thr Thr Ser Pro Ser Val Leu Pro Pro Ser Ser Leu Ser Leu Asp
    170                 175                 180

ctg ctc aac aat gct gtg act gcc ttc agt acc ttg gaa gag ctg att      1648
Leu Leu Asn Asn Ala Val Thr Ala Phe Ser Thr Leu Glu Glu Leu Ile
185                 190                 195                 200

cgg tac cta gag cca gat cga tgg cag gtg gac ttg gac agc ctc tac      1696
Arg Tyr Leu Glu Pro Asp Arg Trp Gln Val Asp Leu Asp Ser Leu Tyr
                205                 210                 215

aag cca aca tgg cag ctt ttg ggc aag gct ttc ctg tat ggg aaa aaa      1744
Lys Pro Thr Trp Gln Leu Leu Gly Lys Ala Phe Leu Tyr Gly Lys Lys
            220                 225                 230

agc aaa gtg gtg aat ctg aat ctc ctc aag gaa gag gta aaa ctc tac      1792
Ser Lys Val Val Asn Leu Asn Leu Leu Lys Glu Glu Val Lys Leu Tyr
        235                 240                 245

agc tgc aca ccc cgg aac ttc tca gtg tcc ata cgg gaa gag cta aag      1840
Ser Cys Thr Pro Arg Asn Phe Ser Val Ser Ile Arg Glu Glu Leu Lys
    250                 255                 260

agg aca gat acc ata ttc tgg cca ggt tgt ctc ctg gtc aag cgc tgt      1888
Arg Thr Asp Thr Ile Phe Trp Pro Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg Cys
265                 270                 275                 280

gga gga aat tgt gcc tgt tgt ctc cat aat tgc aat gaa tgt cag tgt      1936
Gly Gly Asn Cys Ala Cys Cys Leu His Asn Cys Asn Glu Cys Gln Cys
                285                 290                 295

gtc cca cgt aaa gtt aca aaa aag tac cat gag gtc ctt cag ttg aga      1984
Val Pro Arg Lys Val Thr Lys Lys Tyr His Glu Val Leu Gln Leu Arg
            300                 305                 310
```

```
cca aaa act gga gtc aag gga ttg cat aag tca ctc act gat gtg gct     2032
Pro Lys Thr Gly Val Lys Gly Leu His Lys Ser Leu Thr Asp Val Ala
        315                 320                 325

ctg gaa cac cac gag gaa tgt gac tgt gtg tgt aga gga aac gca gga     2080
Leu Glu His His Glu Glu Cys Asp Cys Val Cys Arg Gly Asn Ala Gly
    330                 335                 340

ggg taa ctgcagcctt cgtagcagca cacgtgagca ctggcattct gtgtaccccc      2136
Gly  *
345

acaagcaacc ttcatcccca ccagcgttgg ccgcagggct ctcagctgct gatgctggct   2196
atggtaaaga tcttactcgt ctccaaccaa attctcagtt gtttgcttca atagccttcc   2256
cctgcaggac ttcaagtgtc ttctaaaaga ccagaggcac caagaggagt caatcacaaa   2316
gcactgcctt ctagaggaag cccagacaat ggtcttctga ccacagaaac aaatgaaatg   2376
aatgtagatc gctagcaaac tctggagtga cagcatttct tttccactga cagaatggtg   2436
tagcttagtt gtcttgatat gggcaagtga tgtcagcaca agaaaatggt gaaaaacaca   2496
cacttgattg tgaacaatgc agaaatactt ggatttctcc aacctgtttg catagataga   2556
cagatgctct gttttctaca aactcaaagc ttttagagag cagctatgtt aataggaatt   2616
aaatgtgcca tgctgaaagg aaagactgaa gttttcaatg cttggcaact tctccgcaat   2676
ttggaggaaa ggtgcggtca tggtttggag aaagcacacc tgcacagagg agtggccttc   2736
ccttcccttc cctctgaggt ggcttctgtg tttcattgtg tatattttta tattctcctt   2796
ttgacattat aactgttggc ttttctaatc ttgttaaata tttctatttt taccaaaggt   2856
atttaatatt ctttttttatg acaacctaga gcaattattt ttagcttgat aatttttttt   2916
tctaaacaaa attgttatag ccagaagaac aaagatgatt gatataaaaa tcttgttgct   2976
ctgacaaaaa catatgtatt tcttccttgt atggtgctag agcttagcgt catctgcatt   3036
tgaaaagatg gaatggggaa gtttttagaa ttggtaggtc gcagggacag tttgataaca   3096
actgtactat catcaattcc caattctgtt cttagagcta cgaacagaac agagcttgag   3156
taaatatgga gccattgcta acctacccct ttctatggga aataggagta tagctcagag   3216
aagcacgtcc ccagaaacct cgaccatttc taggcacagt gttctgggct atgctgcgct   3276
gtatggacat atcctattta tttcaatact agggttttat tacctttaaa ctctgctcca   3336
tacacttgta ttaatacatg gatattttta tgtacagaag tatatcattt aaggagttca   3396
cttattatac tctttggcaa ttgcaaagaa aatcaacata atacattgct tgtaaatgct   3456
taatctgtgc ccaagttttg tggtgactat ttgaattaaa atgtattgaa tcatcaaata   3516
aaataatctg gctattttgg ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaagggcg gccgc        3571
```

<210> 43

<211> 345

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 43

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

<210> 44

<211> 65

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido ZC20,572

<400> 44

tcaccacgcg aattcggtac cgctggttcc gcgtggatcc ggccagagac aggggactca ggcgg 65

<210> 45
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido ZC20,573

<400> 45

tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcatc cgccaaaaca ctatcctcct gtgctccctc tgcac 65

<210> 46
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido ZC19,372

<400> 46

tgtcgatgaa gccctgaaag acgcgcagac taattcgagc 40

<210> 47
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido ZC19,351

<400> 47

acgcgcagac taattcgagc tcccaccatc accatcacca cgcgaattcg gtaccgctgg 60

<210> 48
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido ZC19,352

<400> 48

actcactata gggcgaattg cccgggggat ccacgcggaa ccagcggtac cgaatcgcg 60

<210> 49
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador oligonucleótido ZC19,371

<400> 49

acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaat tg 42

<210> 50
<211> 1095
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN fusionado

<400> 50

ctgaaagacg cgcagactaa ttcgagctcc caccatcacc atcaccacgc gaattcggta 60
ccgctggttc cgcgtggatc cggccagaga caggggactc aggcggaatc caacctgagt 120
agtaaattcc agttttccag caacaaggaa cagaacggag tacaagatcc tcagcatgag 180
agaattatta ctgtgtctac taatggaagt attcacagcc caaggtttcc tcatacttat 240
ccaagaaata cggtcttggt atggagatta gtagcagtag aggaaaatgt atggatacaa 300
cttacgtttg atgaaagatt tgggcttgaa gacccagaag atgacatatg caagtatgat 360
tttgtagaag ttgaggaacc cagtgatgga actatattag ggcgctggtg tggttctggt 420
actgtaccag gaaaacagat ttctaaagga aatcaaatta ggataagatt tgtatctgat 480
gaatattttc cttctgaacc agggttctgc atccactaca acattgtcat gccacaattc 540
acagaagctg tgagtccttc agtgctaccc ccttcagctt tgccactgga cctgcttaat 600
aatgctataa ctgcctttag taccttggaa gaccttattc gatatcttga accagagaga 660
tggcagttgg acttagaaga tctatatagg ccaacttggc aacttcttgg caaggctttt 720
gtttttggaa gaaaatccag agtggtggat ctgaaccttc taacagagga ggtaagatta 780
tacagctgca cacctcgtaa cttctcagtg tccataaggg aagaactaaa gagaaccgat 840
accattttct ggccaggttg tctcctggtt aaacgctgtg gtgggaactg tgcctgttgt 900

ctccacaatt gcaatgaatg tcaatgtgtc ccaagcaaag ttactaaaaa ataccacgag 960
gtccttcagt tgagaccaaa gaccggtgtc aggggattgc acaaatcact caccgacgtg 1020
gccctggagc accatgagga gtgtgactgt gtgtgcagag ggagcacagg aggatagtgt 1080
tttggcggat gagat 1095