



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 309 990**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **96929012 .1**

96 Fecha de presentación : **23.08.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **0851920**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.07.1998**

54

Título: **Variantes del factor del crecimiento de células endoteliales vasculares, su utilización y sus procedimientos.**

30

Prioridad: **25.08.1995 US 2827**
05.12.1995 US 567200
02.08.1996 US 691794

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2008

73

Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
460 Point San Bruno Boulevard
South San Francisco, California 94080, US

72

Inventor/es: **Keyt, Bruce;**
Nguyen, Francis, Hung;
Ferrara, Napoleone;
Cunningham, Brian, C.;
Wells, James, A. y
Li, Bing

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 309 990 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Variantes del factor del crecimiento de células endoteliales vasculares, su utilización y sus procedimientos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a variantes concretas del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (más adelante en ocasiones referido como VEGF), a los procedimientos para preparar dichas variantes, y a los procedimientos y las composiciones y los ensayos que utilizan dichas variantes para producir materiales farmacéu-
10 ticamente activos que tienen propiedades terapéuticas y farmacológicas que difieren del compuesto original, VEGF. En particular, los ensayos que utilizan dichas variantes pueden emplearse para descubrir nuevos materiales que tienen propiedades agonistas o antagonistas a VEGF.

Antecedentes de la invención

15 El VEGF es un compuesto natural que se produce en las células foliculares o folículo estrelladas (FC), una población bien caracterizada morfológicamente de células granulares. Las FC son células estrelladas que envían procesos citoplasmáticos entre células secretoras.

20 Hace varios años se identificó un factor de crecimiento de células endoteliales unido a heparina llamado factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y se purificó a partir de medio condicionado por células foliculares o folículo estrelladas de pituitaria bovina. Véase Ferrara *et al.*, Biophys. Res. Comm. 161, 851 (1989).

Aunque podría aislarse un factor de crecimiento de células endoteliales vasculares y purificarse a partir de fuentes
25 naturales para un uso terapéutico posterior, las concentraciones relativamente bajas de la proteína en las FC y el alto coste, ambos en términos de esfuerzo y gasto, de la recuperación de VEGF demostraron la inviabilidad comercial. Por consiguiente, se realizaron esfuerzos adicionales para clonar y expresar el VEGF mediante técnicas de ADN recombinante. Las realizaciones de esta investigación se exponen en las solicitudes de patente referidas anteriormente; esta investigación también se describe en la literatura científica en Laboratory Investigation 72, 615 (1995), y en las referencias citadas en el mismo.
30

En estas solicitudes se describe una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un factor de crecimiento de células endoteliales vasculares que tiene un peso molecular de aproximadamente 45.000 daltons bajo condiciones no reductoras y aproximadamente 23.000 bajo condiciones reductoras tal y como se mide
35 mediante SDS-PAGE. Tanto el ADN como las secuencias de aminoácidos se exponen en las figuras que forman parte de la presente solicitud - ver posteriormente.

El VEGF preparado tal y como se describe en las solicitudes de patente citadas anteriormente, es útil para tratar condiciones en las que una acción seleccionada en las células endoteliales vasculares, en ausencia de crecimiento
40 tisular excesivo, es importante, por ejemplo, las úlceras diabéticas y las lesiones vasculares resultantes de una lesión tal como heridas subcutáneas. Siendo un factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (arteria y vena), el VEGF restablece las células que están dañadas, un proceso referido como vasculogénesis, y estimula la formulación de nuevos vasos, un proceso referido como angiogénesis.

45 El VEGF se expresa en varios tejidos como formas homodiméricas múltiples (121, 165, 189 y 206 aminoácidos por monómero) resultantes de "splicing" de ARN alternativo. El VEGF₁₂₁ es un mitógeno soluble que no se une a heparina; las formas más largas de VEGF se unen a heparina con una afinidad progresivamente más alta. Las formas de VEGF que se unen a heparina pueden dividirse en el carboxi terminal mediante plasmina para liberar una forma o formas difusibles de VEGF. La secuenciación de aminoácidos del péptido carboxi terminal identificado tras la división
50 con plasmina es Arg₁₁₀-Ala₁₁₁. La proteína "central" amino terminal, VEGF (1-110) aislado como un homodímero, se une neutralizando los anticuerpos monoclonales (4.6.1 y 2E3) y formas solubles de los receptores FLT-1, KDR y FLK con una afinidad similar en comparación con el homodímero de VEGF₁₆₅ intacto.

Tal y como se indica, el VEGF contiene dos dominios que son responsables respectivamente de la unión a los
55 receptores KDR (región del dominio de quinasa) y FLT-1 (tirosina quinasa de tipo FMS). Estos receptores sólo existen en células endoteliales (vasculares). A medida que las células se quedan sin oxígeno, debido a una lesión o similar, la producción de VEGF se incrementa en dichas células que a continuación se unen a los receptores respectivos con el objetivo de señalar el efecto biológico final. A continuación, la señal incrementa la permeabilidad vascular y las células se dividen y se expanden para formar nuevos mecanismos vasculares - vasculogénesis y angiogénesis.
60 De este modo, el VEGF y los derivados del mismo, tal y como se describe en las solicitudes de patentes referidas anteriormente, serían útiles en el restablecimiento de la vasculatura después de un infarto de miocardio, además de otros usos que pueden deducirse.

La presente invención se describe en base a la investigación dirigida a identificar las regiones o los dominios que
65 son responsables de la unión a los receptores KDR y FLT. Tras la identificación, el objetivo fue mutagenizar dicho dominio con el fin de producir variantes que presentan una mayor o menor capacidad de unión con respecto a aquellos dominios de unión de KDR y FLT respectivos.

ES 2 309 990 T3

Un objetivo adicional de esta investigación fue producir variantes de VEGF que tuvieran actividad selectiva con respecto a los dominios KDR y FLT de unión. Se postuló que si se pudiera incrementar la capacidad de unión del dominio responsable de la vasculogénesis y la angiogénesis, se podría producir un material más potente para un uso terapéutico determinado. En cambio, si se pudiera mediante mutagénesis inducida producir variantes de VEGF que tuvieran una actividad reducida, y consecuentemente, anti-vasculogénesis y anti-angiogénesis, se podría utilizar dichas variantes en casos de tratamiento tumoral con el objetivo de privar de nutrientes a los tumores para una regresión determinada.

Como objetivos adicionales, dichas variantes podrían emplearse entonces en sistemas de ensayo para descubrir agonistas y antagonistas de moléculas pequeñas para un uso terapéutico determinado en dichas indicaciones.

Los resultados de dicha investigación es la materia de la presente invención. Se observó que los dominios dominantes de VEGF para la unión del receptor se localizaban de manera próxima, pero en sitios distintos, permitiendo el desarrollo de variantes que resultaron ser selectivas del receptor. Se observó que el receptor KDR se unía a VEGF predominantemente a través de los sitios en un bucle putativo que contiene Arginina (Arg o R) en la posición 82 de VEGF, Lisina (Lys o K) en la posición 84 e Histidina (His o H) en la posición 86. Se observó que el receptor FLT-1 se unía a VEGF predominantemente a través de los sitios en un bucle putativo que contiene Ácido aspártico (Asp o D) en la posición 63, Ácido glutámico (Glu o E) en la posición 64 y Ácido glutámico (Glu o E) en la posición 67. Los experimentos de mutagénesis se siguieron generalmente con respecto a aquellos dominios que resultan en las variantes de la presente invención. Dicha mutagénesis utilizó tanto estrategias específicas como aleatorias, de acuerdo con los procedimientos generalmente conocidos por un experto en la materia.

Dado que el VEGF actúa mediante la dimerización o la agregación de sus receptores diana un antagonista debe inutilizar la unión en sólo uno de los sitios de unión de KDR. De este modo, permanece un sitio de unión intacto y permite a la hormona unirse al receptor, pero es incapaz de activar KDR. Dicho complejo uno a uno (de VEGF mutante con un único receptor KDR) es funcionalmente inerte e impide que el VEGF endógeno interaccione con KDR. Dado que el VEGF es un homodímero con una simetría de dos pliegues, cada mutación que interrumpe la unión en un sitio interrumpirá necesariamente de manera idéntica la unión en el otro sitio. Por consiguiente, para producir un antagonista es necesario desarrollar un procedimiento de restricción de mutaciones en sólo un sitio. En teoría esto puede llevarse a cabo mediante la producción de heterodímeros o mediante la creación del homodímero de VEGF en una molécula de una sola cadena.

De esta manera, se producen antagonistas mediante la creación de una molécula de VEGF de una sola cadena. Dado que las dos subunidades se fusionan en una sola molécula, cambia la designación del número de los residuos en lo que sería equivalente a la 2ª subunidad.

Descripción resumida de la invención

Los objetivos de la presente invención, tal y como se definieron de forma general anteriormente, se consiguen mediante la disposición de una variante del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF) según las reivindicaciones, que presenta mutaciones en la región del dominio de la Quinasa (KDR) y/o la región de la Tirosina-Quinasa de tipo FMS (FLT-1), mostrando dichas variantes características de unión modificadas en dichas regiones en comparación con el VEGF nativo.

En una realización preferida, dicha mutagénesis se realiza dentro de la región unida mediante aminoácidos en las posiciones 78 a 95 de VEGF.

En otra realización, dicha mutagénesis se realiza dentro de la región unida mediante aminoácidos en las posiciones 60 a 70 de VEGF.

En otra realización dicha mutagénesis se realiza en ambas de dichas regiones.

En una realización particularmente preferida, la mutagénesis se realiza por lo menos en las posiciones 82, 84 y 86 de VEGF y/o en las posiciones 63, 64 y 67 de VEGF.

En aún otra realización particularmente preferida, las variantes de VEGF se producen de manera que se crea mutagénesis en las posiciones 82, 84 y 86 del siguiente modo: R82A, K84A y H86A y/o D63A, E64A y E67A. Estos símbolos indican el cambio realizado en las posiciones respectivas, por ejemplo, el codón de Arginina (R) en la posición 82 se mutó hasta producir una Alanina (A) en esa posición, etc.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a secuencias de ADN que codifican las diversas variantes descritas anteriormente, vectores de expresión replicables capaces de expresar dichas secuencias de ADN mediante la transformación del ADN en una célula huésped transformante, y microorganismos y cultivos celulares que se transforman con dichos vectores.

En realizaciones adicionales, la presente invención se refiere a composiciones útiles para el tratamiento de indicaciones cuando se desea la vasculogénesis o la angiogénesis para el tratamiento del estado patológico subyacente que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una variante de VEGF de la presente invención mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable.

En aún otra realización, la presente invención se refiere a una composición para el tratamiento de indicaciones cuando se desea la anti-vasculogénesis o la anti-angiogénesis, como por ejemplo en la detención de tumores, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una variante de VEGF de la presente invención mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable.

En particular, las mutaciones de acuerdo con la presente invención que se han introducido generalmente en las posiciones que abarcan la región de aminoácidos 78 a 95, y más concretamente 82 a 86, crean variantes que normalmente se unen al receptor FLT, pero que tienen propiedades de unión significativamente reducidas con respecto al receptor KDR. Las mutaciones de acuerdo con la presente invención que se han introducido generalmente en las posiciones que abarcan la región de aminoácidos de 60 a 70, y más concretamente de 63 a 67, crean variantes que esencialmente normalmente se unen al receptor KDR pero que tienen una unión significativamente reducida con respecto al receptor KDR.

Ampliando la premisa básica de la presente invención del descubrimiento y la mutagénesis de los dominios de unión KDR y/o FLT de VEGF, la presente invención se refiere a todas las realizaciones asociadas derivadas de la misma, incluyendo materiales de ADN recombinante y procesos para preparar dichas variantes, materiales e información para componer dichas variantes en una forma farmacéuticamente acabada y ensayos que utilizan dichas variantes para cribar candidatos que tienen propiedades agonísticas o antagonísticas con respecto a los receptores KDR y/o FLT.

Un aspecto relacionado adicional de la presente invención se basa en los hallazgos tras los análisis de la estructura cristalina y el mapeo funcional del sitio de unión al Receptor del Dominio de Quinasa de VEGF. Un análisis funcional exhaustivo determinó que el VEGF capta los receptores de KDR utilizando dos sitios de unión simétricos localizados en los extremos opuestos de la molécula. Cada sitio se compone de dos "puntos calientes" para la unión que consisten en residuos presentados a partir de ambas subunidades del homodímero de VEGF. Los dos más importantes de estos determinantes de unión se localizan dentro del punto caliente dominante en una lámina- β corta de 3 hebras que se conserva en el factor de crecimiento transformante $\beta 2$ (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF). El análisis funcional de los epítomos de unión para dos anticuerpos bloqueadores de receptor revela determinantes de unión cerca de cada uno de los puntos calientes de unión de KDR.

Se ha observado que la introducción de un grupo de glicosilación en la posición 84 en el bucle $\beta 5$ - $\beta 6$ bloquea la unión a KDR - ver más adelante. La característica dominante dentro del monómero de VEGF es el denominado motivo del nudo de cisteína que se encuentra en otros factores de crecimiento y consiste en un anillo de ocho residuos generado por los puentes disulfuro entre la Cys57 y la Cys 102, y la Cys 61 y la Cys 104, con una tercera unión disulfuro (Cys 26 a Cys 102) que pasa a través del mismo. Del nudo de cisteína se extiende una lámina- β central de cuatro hebras (marcada como $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$ y $\beta 6$). Como en los otros factores de crecimiento con nudo de cisteína, se forman enlaces de hidrógeno extensos entre las hebras $\beta 1$ y $\beta 2$, así como entre las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$; entre las hebras $\beta 3$ y $\beta 5$ tan sólo hay presente un único enlace de hidrógeno, haciendo esta lámina de cuatro hebras altamente irregular. El segmento de conexión entre las hebras $\beta 1$ y $\beta 3$ contiene un solo giro de hélice α , así como una hebra- β corta $\alpha 2$ y $\beta 2$. Esta hebra, junto con el extremo de $\beta 5$ y el principio de $\beta 6$, forma una lámina- β corta de tres hebras en el extremo opuesto de la molécula desde el nudo de cisteína. Los residuos de esta lámina, la hélice $\alpha 2$ y las regiones de bucle $\beta 1$ - $\beta 3$ y $\beta 5$ - $\beta 6$, junto con los residuos de la hélice N-terminal del otro monómero forman un pequeño núcleo hidrofóbico. Esto proporciona presumiblemente una estabilización adicional a la lámina central de cuatro hebras, que es accesible al disolvente por ambos lados. En el dímero de VEGF, el eje despliegue en dos es perpendicular a la lámina, dando lugar a una orientación antiparalela con las dos láminas de cuatro hebras una junto a la otra.

En base a este hallazgo, se prepararon cincuenta mutantes de alanina individuales que cubrieron todas las cadenas laterales expuestas al disolvente dentro de un radio de aproximadamente 25 Å del residuo 84. Esta región es altamente discontinua en la secuencia primaria (Figura 23) y contiene residuos de ambas caras de la molécula, presentados a partir de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$, las hebras $\beta 2$, $\beta 5$ (medio C-terminal), $\beta 6$ (medio N-terminal) y $\beta 7$, y los bucles $\alpha 1$ - $\beta 1$, $\alpha 2$ - $\beta 2$, y $\beta 3$ - $\beta 4$.

Varias de estas mutaciones individuales interrumpieron la unión a KDR. Por consiguiente, estos mutantes serían útiles terapéuticamente en indicaciones en las que la antivasclogénesis/antiangiogénesis fueran útiles terapéuticamente, tales como en el tratamiento de tumores y retinopatía vascular y artritis reumatoide. Se observó que las cadenas laterales más importantes para la unión de KDR eran Ile 46, Ile 83 y Glu 64; se observó que otras cadenas laterales menos importantes estaban compuestas de los residuos Phe 17, Gln 79 e Ile 43. En base a estos descubrimientos, el VEGF posee dos sitios de unión a KDR simétricos y funcionalmente similares, definidos por las hebras $\beta 2$ (Ile 43) y $\beta 5$ (Gln 79, Ile 83) y el bucle $\beta 1$ - $\beta 2$ (Ile 43) junto con la hélice N-terminal (Phe 17) y el bucle $\beta 3$ - $\beta 4$ (Glu 64). De este modo, por ejemplo, las mutaciones en Phe 17, Ile 46, Ile 83, Glu 64 producirían un heterodímero de VEGF con una subunidad siendo C51R/I46A/I83A y la otra subunidad siendo C60R/F17A/E64A. Esto reduce la unión de KDR a uno de los sitios de unión y deja la unión intacta en el sitio restante, dando como resultado un antagonista del receptor KDR.

De este modo, en este aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende una variante del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF) que contiene por lo menos una modificación de aminoácido en la región del receptor del dominio de la Quinasa (KDR) definida por los aminoácidos Ile 46, Gln 79 e Ile 83 y/o Ile 43, Phe 17 y Glu 64, mostrando dicho polipéptido una afinidad de unión a KDR funcionalmente reducida.

Más específicamente, este aspecto de la presente invención define las modificaciones de aminoácidos en cada una de las posiciones especificadas anteriormente, y donde dichas modificaciones, individualmente, acumulativamente o colectivamente, comprenden mutaciones en un aminoácido diferente del presente o presentes en dichas posiciones en el VEGF de tipo natural. En particular, dichos otros aminoácidos se seleccionarían de un grupo de aminoácidos de una naturaleza diferente de la del aminoácido en el sitio dado en la molécula de tipo natural, es decir, la sustitución de un residuo básico por un residuo ácido, hidrofóbico, aromático o residuo polar, etc. Este ámbito en la presente invención se representa mediante la modificación o modificaciones del respectivo aminoácido o aminoácidos de tipo natural en alanina.

Naturalmente, este aspecto de la presente invención incluye realizaciones asociadas de dichos polipéptidos modificados, tales como composiciones farmacéuticas que incorporan a los mismos, procedimientos de tratamiento que los utilizan, así como aplicaciones recombinantes que incluyen ADN que los codifican, vectores de expresión y los cultivos de huésped transfectado que albergan dicho ADN y todos los procedimientos asociados con la preparación de las realizaciones recombinantes especificadas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa la secuencia de aminoácidos y ADN de VEGF que tiene 165 aminoácidos. Debajo de la secuencia de ADN se muestran los aminoácidos previstos de la proteína y se numeran desde el primer residuo del N-terminal de la secuencia proteica. Los números negativos de aminoácidos se refieren a la supuesta secuencia señal líder o pre-proteína, mientras que los números positivos se refieren a la proteína madura putativa.

La Figura 2 representa los diversos dominios de VEGF₁₆₅ y muestra el sitio de división por plasmina. Los dominios de unión al receptor se localizan dentro de la región que abarca los aminoácidos 1 a 100.

La Figura 3 muestra los sitios de unión de receptor separados y distintos para los receptores KDR y FLT. Estos sitios se localizan respectivamente en la región que abarca generalmente los aminoácidos 78 a 90 (representados por "A" en la Figura 3) y de 60 a 70 (representados por "B").

La Figura 4 muestra la unión del receptor KDR siendo mediada por el dímero 1-110 de VEGF.

La Figura 5 muestra las mutaciones por rastreo cargadas en Alanina de la presente en VEGF.

La Figura 6 muestra que la unión de KDR está mediada fundamentalmente por R82, K84, H86. IC50 se refiere al 50% de concentración inhibidora que se relaciona con la constante de disociación.

La Figura 7 muestra que la unión de FLT está mediada fundamentalmente por D63, E64, E67.

La Figura 8 muestra que la glicosilación extra en la posición 82 bloquea la unión de KDR.

La Figura 9 muestra que las mutaciones en el sitio 82-86 bloquean la unión de KDR (A) y que las mutaciones en el sitio 63-67 bloquean la unión de FLT (B).

La Figura 10 muestra que las mutaciones múltiples tienen un efecto sinérgico con KDR. K84A es una potente sustitución individual de Alanina.

La Figura 11 muestra que los mutantes de VEGF con menor unión de receptor KDR son mitógenos de células endoteliales débiles.

La Figura 12 es una fotografía a color de un modelo molecular de VEGF que muestra las localizaciones de los sitios de unión de KDR (azul) y de FLT (rojo)

La Figura 13 representa la construcción con sus diversos elementos del plásmido pSDVF₁₆₅.

La Figura 14 representa la construcción con sus diversos elementos del plásmido pRK5.

La Figura 15 representa la construcción esquemática seguida para reparar los vectores de expresión finales que albergan el ADN que contiene mutaciones de acuerdo con la preparación de varios productos de la presente invención.

La Figura 16 representa los niveles de unión de KDR-IgG de diversas variantes de VEGF.

La Figura 17 representa los niveles de unión de FLT-1-IgG de diversas variantes de VEGF.

La Figura 18 representa los niveles de unión de A461-IgG de diversas variantes de VEGF.

La Figura 19 muestra la cuantificación de mutantes de VEGF mediante ELISA de base monoclonal y policlonal. Se analizaron alícuotas de medio celular condicionado con VEGF o mutantes de VEGF mediante inmunoensayo utilizando dos tipos de ELISA. Un anticuerpo anti-VEGF policlonal combinado con un anticuerpo monoclonal (Mab

5F8, específico para el dominio carboxi terminal de VEGF) produjo un inmunoensayo de tipo sándwich que no se vio afectado por las mutaciones en el dominio de unión a receptor de VEGF (región 1-110). Alternativamente, se utilizó un ELISA de base monoclonal dual con Mabs 5F8 y A4.6.1 para cuantificar los mutantes de VEGF. Se calculó la media de los resultados del inmunoensayo de múltiples transfecciones (de 2 a 10 réplicas) por cada mutante y se comparó en la Figura 19.

La Figura 20 muestra la Inmunotransferencia SDS-PAGE de mutantes de VEGF. Los sobrenadantes de la transfección transitoria (de células 293) que contienen aproximadamente de 10 a 20 ng de VEGF o de mutante de VEGF se analizaron mediante SDS-PAGE no reducido. Los geles se transfirieron y “mancharon” tal como se describe en los Procedimientos Experimentales, utilizando un conjunto de 5 anticuerpos monoclonales murinos antihumanos de VEGF₁₆₅ identificados como los siguientes: 2E3, 4D7, A4.6.1, 5C3, y 5F8. Las inmunotransferencias se expusieron durante 5 días.

La Figura 21 muestra la actividad de los mutantes de VEGF en un ensayo de crecimiento de células endoteliales. Los mutantes de VEGF se expresaron en un cultivo de células 293, se utilizó el medio celular condicionado para estimular la mitogénesis de células endoteliales capilares corticales adrenales bovinas. El número promedio de residuos indica la localización de las mutaciones. Los valores se expresan como la concentración requerida para estimular la mitad del máximo de la proliferación de células endoteliales (EC₅₀). Los mutantes de alanina de VEGF se indican con círculos sólidos y los mutantes de VEGF extra-glicosilados potenciales con cuadrados sólidos. Estos experimentos se hicieron por triplicado.

La Figura 22 representa los niveles de unión de 2E3-IgG de diversas variantes de VEGF.

La Figura 23 muestra una comparación del monómero de VEGF con PDGF-BB y TGF- β con una alineación de secuencia basada en la estructura. Las estructuras se superpusieron en VEGF utilizando un punto de corte de distancia de 3,5 Å: para TGF- β las dos mitades de la molécula se superpusieron independientemente. Se marcan los elementos estructurales secundarios de VEGF.

La Figura 24 muestra un vector fagémido pB2105 producido mediante amplificación por PCR del ADNc que codifica los residuos 1-109 del VEGF humano, utilizando cebadores que permitieron su posterior unión como un fragmento de restricción NsiI/XbaI en el vector fagémido, phGHam-g3 (Lowman *et al.*, J. Mol. Biol. 234, 564 (1993)). Esto también introdujo un codón ámbar inmediatamente después del residuo 109 de VEGF (barra negra), y se fusionó este ADN a la mitad C-terminal del gen III que comprende los residuos 249 a 406 (barra blanca). La producción de fagos en una cepa supresora de *E. coli* (Stratagene, XL1-azul) permitió la expresión de la proteína de fusión VEGF-gIII y la proteína VEGF 1-109 libre. La capacidad del fagémido de unir fuertemente KDR-IgG indicó que un heterodímero de VEGF activo compuesto de subunidades de cada forma, se expuso en la superficie del fago. La parte b muestra las afinidades de la unión KDR-IgG de este fagémido que expresa VEGF 1-109 y se determinaron los dos mutantes por eliminación N-terminales, VEGF 8-109 y VEGF 11-109, mediante Phage ELISAs. Las mediciones produjeron valores de EC₅₀ de 4,6 nM, 4,1 nM y 4,4 nM, respectivamente. La afinidad más débil de aproximadamente 100 veces observada para la unión de fagémido, en relación a su equivalente de VEGF libre (Ver Tabla 7, más adelante), puede ser atribuible parcialmente a la fusión del Gen III que bloquea un componente con aidez presente en la unión de la hormona libre con la proteína de fusión KDR-IgG bivalente. PROCEDIMIENTOS. Phage ELISA: se añadieron diluciones en serie de KDR-IgG competidores y una concentración subsaturante de fagémido a placas de microtitulación recubiertas de KDR-IgG (Nunc, Maxisorp). Tras el equilibrio, se tiñeron los fagémidos unidos a la placa con conjugado de peroxidasa de rábano picante con Mab anti-fago (Pharmacia) y se ensayó. Se calcularon las afinidades (EC₅₀) como la concentración de receptor competidor que daba lugar a la mitad del máximo de unión a fagémido.

Descripción detallada de la invención

A. Definiciones

Tal como se utiliza en la presente invención, “factor de crecimiento de células endoteliales vasculares” o “VEGF”, se refiere a un factor de crecimiento de mamífero tal como se definen en la Patente de Estados Unidos 5.332.671, incluyendo la secuencia de aminoácidos humana de la figura 1. La actividad biológica de VEGF nativo es compartida por cualquier análogo o variante del mismo que es capaz de activar el crecimiento selectivo de células endoteliales vasculares, pero no de células endoteliales corneales bovinas, células epiteliales del cristalino, células del córtex adrenal, fibroblastos BHK-21 o queratinocitos, o que poseen un epítipo inmune que reacciona inmunológicamente de manera cruzada con un anticuerpo desarrollado contra por lo menos un epítipo del correspondiente VEGF nativo.

“Transfección” se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula huésped tanto si de hecho se expresa o no alguna secuencia codificante. El técnico en la materia conoce numerosos métodos de transfección, por ejemplo, CaPO₄ y electroporación. La transfección satisfactoria se reconoce generalmente cuando aparece cualquier indicación de la operación de este vector en la célula huésped.

“Transformación” significa la introducción de ADN en un organismo, de manera que el ADN es replicable, ya sea como un elemento extracromosómico o mediante un integrador cromosómico. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio utilizando cloruro de calcio, tal como se describe por Cohen, S.N. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 69, 2110 (1972)

ES 2 309 990 T3

y Mandel *et al.*, J. Mol. Biol. 53, 154 (1970), se utiliza generalmente para procariotas u otras células que contienen barreras sustanciales de paredes celulares. Para células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se prefiere el método de precipitación de fosfato de calcio de Graham, F. y van der Eb, A., Virology, 52, 456-457 (1978). Los aspectos generales de transformaciones de células huésped de células de mamífero se han descrito por Axel en la Patente de Estados Unidos No. 4.399.216 concedida el 16 de agosto de 1983. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo habitualmente según el método de Van Solingen, P., *et al.*, J. Bact., 130, 946 (1977) y Hsiao, C.L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden utilizar otros métodos para la introducción de ADN en células tales como la inyección nuclear o mediante la fusión de protoplastos.

La “mutagénesis dirigida de sitio” es una técnica estándar en el sector y se realiza utilizando un cebador de oligonucleótidos sintéticos complementario a un ADN de fago de cadena única a mutagenizar a excepción del desapareamiento limitado, que representa la mutación deseada. Brevemente, el oligonucleótido sintético se utiliza como cebador para dirigir la síntesis de una cadena complementaria al fago y el ADN de doble cadena resultante se transforma en una bacteria huésped que soporta al fago. Los cultivos de las bacterias transformadas se ponen en placas de top agar, permitiendo la formación de placas a partir de células individuales que albergan al fago. Teóricamente, el 50% de las nuevas placas contendrán el fago que tiene, como cadena única, la forma mutada: el 50% tendrá la secuencia original. Las placas se hibridan con cebador sintético quinasado a una temperatura que permite la hibridación de un emparejamiento exacto, pero a la que los desapareamientos con la cadena original son suficientes para evitar la hibridación. Las placas que se hibridan con la sonda a continuación se seleccionan y cultivan y se recupera el ADN.

“Unido operativamente” se refiere a la yuxtaposición, de manera que se puede realizar la función normal de los componentes. De este modo, una secuencia codificante “unida operativamente” a secuencias de control se refiere a una configuración en la que la secuencia codificante se puede expresar bajo el control de estas secuencias y en la que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o una secuencia líder secretora está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, entonces los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan según la práctica convencional.

“Secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma, y posiblemente, otras secuencias aunque aún poco comprensibles. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

“Sistema de expresión” se refiere a secuencias de ADN que contienen una secuencia codificante deseada y secuencias de control en unión operativa, de manera que los huéspedes transformados con estas secuencias son capaces de producir las proteínas codificadas. Para realizar la transformación, el sistema de expresión se puede incluir en un vector; aunque el ADN pertinente se puede integrar también en el cromosoma huésped.

Tal como se utiliza en la presente invención, “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se utilizan indistintamente y todas estas denominaciones incluyen la progenie. De este modo, los “transformantes” o “células transformadas” incluyen la célula primaria del sujeto y cultivos derivados de la misma sin considerar el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o voluntarias. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma funcionalidad tal como se criba en la célula originalmente transformada. Cuando se deseen indicar denominaciones diferentes, será evidente a partir del contexto.

Los “plásmidos” se denominan mediante una p en minúscula precedida y/o seguida por letras mayúsculas y/o números. Los plásmidos iniciales de la presente invención están disponibles comercialmente, disponibles al público sin restricciones, o pueden construirse a partir de plásmidos disponibles de acuerdo con procedimientos publicados. Además, son conocidos en la materia otros plásmidos equivalentes y serán evidentes para cualquier experto en la materia.

La “digestión” de ADN se refiere a la división catalítica del ADN con una enzima que actúa sólo en ciertos puntos del ADN. Dichas enzimas se denominan enzimas de restricción y los sitios para los cuales cada una es específica se denominan sitio de restricción. Las diversas enzimas de restricción utilizadas en la presente invención están disponibles comercialmente y sus condiciones de reacción, cofactores, y otros requisitos se utilizan tal como establecen los suministradores de enzimas. Las enzimas de restricción se denominan habitualmente mediante abreviaciones compuestas de una letra mayúscula seguida de otras letras que representan el microorganismo del que se obtuvo originalmente la enzima de restricción y a continuación un número que designa la enzima concreta. En general, se utiliza aproximadamente 1 mg de plásmido o fragmento de ADN con aproximadamente 1-2 unidades de enzima en aproximadamente 20 ml de solución tampón. Las cantidades de tampón y sustrato adecuadas para enzimas de restricción concretas son especificadas por el fabricante. Se utiliza normalmente una incubación de aproximadamente 1 hora a 37°C, pero puede variar según las instrucciones del suministrador. Después de la incubación, se extrae la proteína mediante extracción con fenol y cloroformo y el ácido nucleico digerido se recupera de la fracción acuosa mediante precipitación con

etanol. La digestión con una enzima de restricción raramente va seguida de hidrólisis con fosfatasa alcalina bacteriana de los fosfatos 5' terminales para evitar que los dos extremos divididos por restricción de un fragmento de ADN se "circularicen" o formen un bucle cerrado que impediría la inserción de otro fragmento de ADN en el sitio de restricción. A menos que se indique lo contrario, la digestión de plásmidos no va seguida de desfosforilación 5' terminal.

5 Los procedimientos y reactivos para desfosforilación son convencionales (T. Maniatis *et al.*, 1982, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982), pág. 133-134).

La "recuperación" o "aislamiento" de un fragmento de ADN determinado de una digestión de restricción significa la separación del digesto sobre gel de poliacrilamida o agarosa mediante electroforesis, la identificación del fragmento de interés mediante la comparación de su movilidad frente a la de los fragmentos marcadores de ADN de peso molecular conocido, la extracción de la sección de gel que contiene el fragmento deseado, y la separación del gel del ADN. Este procedimiento es generalmente conocido. Por ejemplo, véase R. Lawn *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 9, 6103-6114 (1981) y D. Goeddel *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 8, 4507 (1980).

El "análisis Southern" es un método por el cual la presencia de secuencias de ADN en un digesto o composición que contiene ADN se confirma mediante la hibridación a un oligonucleótido o fragmento de ADN marcado conocido. Para los objetivos de la presente invención, a menos que se indique lo contrario, el análisis Southern significará la separación de digestos en agarosa al 1 por ciento, la desnaturalización y la transferencia a nitrocelulosa mediante el método de E. Southern, *J. Mol. Biol.* 98, 503-517 (1975) y la hibridación tal como se describe por T. Maniatis *et al.*, *Cell* 15, 687-701 (1978).

La "unión" se refiere al proceso de formación de enlaces fosfodiésteres entre dos fragmentos de ácido nucleico de doble cadena (T. Maniatis *et al.*, 1982, *supra*, pág. 146). A menos que se indique lo contrario, la unión se puede realizar utilizando tampones y condiciones conocidas con 10 unidades de T4 ADN ligasa ("ligasa") por cada 0,5 mg de cantidades aproximadamente equimolares de los fragmentos de ADN a unir.

La "preparación" de ADN de transformantes significa el aislamiento de ADN plásmido de cultivo microbiano. A menos que se indique lo contrario, se puede utilizar el método alcalino/SDS de Maniatis *et al.*, 1982, *supra*, pág. 90.

Los "oligonucleótidos" son polidesoxinucleótidos de cadena simple o doble y longitud corta que se sintetizan químicamente mediante métodos conocidos (tales como, química de fosfotriéster, fosfito o fosforamidita, utilizando técnicas de fase sólida tales como las descritas en la Patente EP de No. De Publicación 266.032 publicada el 4 de mayo de 1988, o a través de intermedios de desoxinucleósido H-fosfonato tal como se describe por Froehler *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 14, 5399-5407 [1986]). A continuación, se purifican sobre geles de poliacrilamida.

La abreviatura "KDR" se refiere a la región de dominio de quinasa de la molécula VEGF. Se sabe que es esta región la que se une al receptor de la región de dominio de quinasa.

La abreviatura "FLT-1" se refiere al dominio de unión de tirosina quinasa de tipo FMS que se sabe que se une al correspondiente receptor de FLT-1. Estos receptores existen en las superficies de las células endoteliales.

En el término "afinidad de unión a KDR funcionalmente reducida", el subtérmino "funcionalmente" define el efecto biológico modificado general, es decir, contempla las reducciones en la afinidad de unión a KDR que afectan en las consecuencias biológicas de la función de VEGF en comparación con VEGF natural, de manera que los polipéptidos modificados de la presente invención que muestran una "afinidad de unión a KDR funcionalmente reducida" serían útiles en relación a la unión reducida tal como antivasculogenesis/antiangiogenesis en el contexto de un heterodímero o molécula de cadena única, es decir, una función antagonista.

B. Metodología general

1. Glicosilación

La variante de secuencia de aminoácidos de VEGF puede contener por lo menos una secuencia de aminoácidos que tiene el potencial de ser glicosilada a través de la unión a N y que no está normalmente glicosilada en la molécula nativa.

La introducción de un sitio de glicosilación por unión a N en la variante requiere una secuencia de tripeptidilo de la fórmula: asparagina-X-serina o asparagina-X-treonina, en la que la asparagina es el aceptor y X es cualquiera de los veinte aminoácidos codificados genéticamente, excepto prolina, que evita la glicosilación. Véase, D. K. Struck y W. J. Lennarz, en *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*, ed. W. J. Lennarz Plenum Press, 1980, pág. 35, R.D. Marshall, *Biochem. Soc. Symp.*, 40, 17 (1974) y Winzler, R. J. en *Hormonal Proteins and Peptides* (ed. Li, C.I.), pág. 1-15 (Academic Press, Nueva York, 1973). La secuencia de aminoácidos variante de la presente invención se modifica mediante la sustitución por el aminoácido o aminoácidos en el sitio o sitios apropiados de los aminoácidos apropiados para realizar la glicosilación.

Si se utiliza la glicosilación por unión a O, la unión O-glicosídica aparece en células animales entre N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa y uno de diversos hidroxilaminoácidos, más habitualmente serina o treonina, pero también en algunos casos un residuo 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina situados en la región apropiada de la molécula.

ES 2 309 990 T3

Los patrones de glicosilación para proteínas producidas por mamíferos se describen en detalle en *The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control*, F. W. Putnam, ed. 2ª edición, volumen 4 (Academic Press, Nueva York, 1984), pág. 271-315, la descripción completa del cual se incorpora en la presente invención por referencia. En este capítulo, se describen los oligosacáridos unidos a asparagina, incluyendo su subdivisión en por lo menos tres grupos a los que se hace referencia como complejo, manosa superior y estructuras híbridas, así como oligosacáridos unidos de manera O-glicosídica.

El acoplamiento químico y/o enzimático de glicósidos a proteínas se puede realizar utilizando una serie de grupos activados, por ejemplo, tal como se describe por Aplin y Wriston en *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pág. 259-306 (1981), la descripción del cual se incorpora en la presente invención por referencia. Las ventajas de las técnicas de acoplamiento químico son que son relativamente simples y no necesitan la maquinaria enzimática complicada requerida para la glicosilación por unión a O y N natural. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar o azúcares se pueden unir a (a) arginina o histidina, (b) grupos carboxilo libres, tales como los de ácido glutámico o ácido aspártico, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen más detalladamente en PCT WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, la descripción de la cual se incorpora en la presente invención por referencia.

Los patrones de glicosilación para proteínas producidas por levaduras se describen en detalle por Tanner y Lehle, *Biochim. Biophys. Acta*, 906(1), 81-99 (1987) y por Kukuruzinska *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.*, 56, 915-944 (1987), las descripciones de las cuales se incorporan en la presente invención por referencia.

2. Variantes de secuencias de aminoácidos

a. Mutaciones adicionales

Con el fin de denominar de manera corta las variantes de VEGF descritas en la presente invención, cabe indicar que los números se refieren al residuo/posición a lo largo de las secuencias de aminoácidos del VEGF maduro putativo. La identificación de aminoácidos utiliza el alfabeto de aminoácidos de una letra, es decir,

Asp	D	Ácido aspártico	Ile	I	Isoleucina
Thr	T	Treonina	Leu	L	Leucina
Ser	S	Serina	Tyr	Y	Tirosina
Glu	E	Ácido glutámico	Phe	F	Fenilalanina
Pro	P	Prolina	His	H	Histidina
Gly	G	Glicina	Lys	K	Lisina
Ala	A	Alanina	Arg	R	Arginina
Cys	C	Cisteína	Trp	W	triptófano
Val	V	Valina	Gln	Q	Glutamina
Met	M	Metionina	Asn	N	Asparagina

La presente invención se refiere a variantes de VEGF donde dichas variantes tienen modificaciones en la secuencia de aminoácidos en dos de los dominios de unión a receptor: 1) en el intervalo de aminoácidos 78 a 95 y 2) en el intervalo de aminoácidos en la posición 60 a 70. Estas variantes tienen actividad selectiva con respecto a los respectivos sitios de unión de los receptores correspondientes.

Se entenderá que pueden fabricarse otras variantes en otras posiciones en la molécula de VEGF sin alejarse del alcance de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones con respecto a las dos variaciones de sitio de unión a receptor. De este modo, se pueden realizar variaciones puntuales u otras variaciones más amplias en las otras partes de la molécula para transmitir las propiedades interesantes que no realizan las propiedades generales de las variantes con respecto a los dominios de 78 a 95 y 60 a 70.

Estas últimas variantes adicionales se pueden realizar mediante medios conocidos generalmente en la técnica.

Por ejemplo, se pueden realizar modificaciones covalentes a varios de los residuos de aminoácidos.

ES 2 309 990 T3

Los residuos cisteinilo se hacen reaccionar más habitualmente con α -haloacetatos (y las correspondientes aminas), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para producir derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos cisteinilo también se derivan mediante la reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidozoi) propiónico, fosfato de cloroacetil, N-alquilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil 2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-oxa-1,3-diazol.

Los residuos histidilo se derivan mediante la reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El para-bromofenacilo también es útil; la reacción se realiza preferentemente en cacodilato sódico 0,1 M a pH 6,0.

Los residuos lisinilo y amino terminales se hacen reaccionar con anhídridos de ácidos succínico u otros ácidos carboxílicos. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen α -amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; clorborhidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y reacción con glioxilato catalizado por transaminasa.

Los residuos arginilo se modifican mediante la reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al pKa elevado del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como el grupo épsilon-amino de arginina.

La modificación específica de residuos tirosilo *per se* se ha estudiado ampliamente, con particular interés en la introducción de marcadores espectrales en los residuos tirosilo mediante la reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Más habitualmente, se utilizan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar las especies O-acetil tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Los residuos tirosilo se yodan utilizando ^{125}I o ^{131}I para preparar proteínas marcadas para su uso en radioinmunoensayo, siendo adecuado el método de la cloramina T descrito anteriormente.

Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican de manera selectiva mediante la reacción con carbodiimidias ($\text{R}'\text{-N-C-N-R}'$), tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonio-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Además, los residuos aspartilo y glutamilo se convierten en residuos asparaginilo y glutaminilo mediante la reacción con iones amonio.

La derivatización con agentes bifuncionales es útil para reticular el VEGF a una matriz o superficie soporte insoluble en agua para su uso en el procedimiento de purificación de anticuerpos anti-VEGF. Entre los agentes de reticulación utilizados habitualmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo disuccinimidilésteres tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes derivatizantes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditiolpropioimidato producen intermedios fotoactivables que son capaces de formar reticulaciones en presencia de luz. Alternativamente, las matrices insolubles en agua reactivas tales como carbohidratos activados por bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en la Patente de Estados Unidos Nos. 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440 se utilizan para la inmovilización de proteínas.

Los residuos glutaminilo y asparaginilo se desamidán frecuentemente a los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo. Alternativamente, estos residuos se desamidán bajo condiciones suavemente ácidas. Cualquier forma de estos residuos se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 79-86 [1983]), acetilación de la amina N-terminal y, en algunos casos, la amidación del grupo carboxilo C-terminal.

b. Mutaciones de ADN

Las variantes de la secuencia de aminoácidos de VEGF también se puede preparar mediante mutaciones en el ADN. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, eliminaciones, inserciones o sustituciones de residuos de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución también se puede realizar para llegar a la construcción final, con la condición de que la construcción final posea la actividad deseada. Obviamente, las mutaciones que se realizarán en el ADN que codifica la variante no debe situar la secuencia fuera del marco de lectura y preferentemente no crearán regiones complementarias que podrían producir estructura secundaria de ARNm (véase, EP 75.444A).

A nivel genético, estas variantes se preparan normalmente mediante mutagénesis dirigida de sitio de nucleótidos en el ADN que codifica el VEGF, produciendo de este modo el ADN que codifica la variante, y a continuación, expresando el ADN en un cultivo de células recombinantes. Las variantes mostrarán habitualmente la misma actividad biológica cualitativa que el análogo natural.

Aunque el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la mutación *per se* no está necesariamente predeterminada. Por ejemplo, para optimizar la acción de una mutación en un sitio determinado, se puede realizar una mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y cribar las variantes de VEGF expresadas para la combinación óptima de la actividad deseada. Las técnicas para realizar mutaciones por sustitución en sitios predeterminados en ADN que presenta una secuencia conocida son bien conocidas, por ejemplo, mutagénesis específica de sitio.

La preparación de variantes de VEGF según la presente invención se consigue preferiblemente mediante mutagénesis específica de sitio del ADN que codifica una variante preparada anteriormente o una versión no variante de la proteína. La mutagénesis específica de sitio permite la producción de variantes de VEGF a través del uso de secuencias de oligonucleótidos específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia de cebador de tamaño suficiente y complejidad de secuencia para formar una cadena doble estable en ambos lados de la unión de eliminación que se atraviesa. Habitualmente, se prefiere un cebador de aproximadamente 20 a 25 nucleótidos de longitud, con aproximadamente 5 a 10 residuos en ambos lados de la unión de la secuencia que se altera. En general, la técnica de mutagénesis específica de sitio es bien conocida en el sector, tal como se ejemplifica en publicaciones tales como Adelman *et al.*, DNA 2, 183 (1983), la descripción de la cual se incorpora en la presente invención por referencia.

Tal como se entenderá, la técnica de mutagénesis específica de sitio utiliza habitualmente un vector fago que existe tanto en forma de cadena única como de cadena doble. Los vectores habituales útiles en la mutagénesis dirigida de sitio incluyen vectores tales como el fago M13, por ejemplo, tal como se describe por Messing *et al.*, Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA, Editor A. Walton, Elsevier, Amsterdam (1981), la descripción del cual se incorpora en la presente invención por referencia. Estos fagos están fácilmente disponibles comercialmente y su uso es conocido generalmente por los expertos en la materia. Alternativamente, se pueden utilizar vectores plásmidos que contienen un origen de replicación de fago de cadena única (Veira *et al.*, Meth. Enzymol., 153, 3 [1987]) para obtener ADN de cadena única.

En general, la mutagénesis dirigida de sitio según la presente invención se realiza obteniendo en primer lugar un vector de cadena única que incluye en su secuencia una secuencia de ADN que codifica la proteína pertinente. Se prepara un cebador de oligonucleótidos que transporta la secuencia mutada deseada, generalmente de manera sintética, por ejemplo, mediante el método de Crea *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 75, 5765 (1978). A continuación, este cebador se empareja con el vector que contiene la secuencia para proteínas de cadena única y se somete a enzimas de polimerización de ADN tales como el fragmento Klenow de polimerasa I de *E. coli*, para completar la síntesis de la cadena que porta la mutación. De este modo, se forma una cadena doble heteróloga en la que una cadena codifica la secuencia original no mutada y la segunda cadena porta la mutación deseada. Este vector de doble cadena heteróloga se utiliza a continuación para transformar células apropiadas tales como células JM101 y se seleccionan los clones que incluyen vectores recombinantes que portan la disposición de secuencia mutada.

Después de seleccionar dicho clon, la región de la proteína mutada se puede extraer y colocar en un vector apropiado para la producción de proteínas, generalmente un vector de expresión del tipo que se puede utilizar para la transformación de un huésped apropiado.

c. Tipos de mutaciones

Las eliminaciones en la secuencia de aminoácidos varían generalmente desde aproximadamente 1 a 30 residuos, más preferiblemente de 1 a 10 residuos, y normalmente son contiguas.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales de un residuo hasta polipéptidos de una longitud esencialmente no limitada, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Las inserciones intrasecuencia (es decir, inserciones en la secuencia de VEGF madura) pueden variar generalmente de aproximadamente 1 a 10 residuos, más preferiblemente de 1 a 5. Un ejemplo de una inserción terminal incluye una fusión de una secuencia señal, tanto si es heteróloga u homóloga a la célula huésped, al extremo N-terminal de la molécula de VEGF para facilitar la secreción de VEGF maduro a partir de huéspedes recombinantes.

El tercer grupo de variantes son aquellas en las que por lo menos un residuo de aminoácido en la molécula de VEGF y preferiblemente sólo uno, ha sido eliminado y un residuo diferente ha sido insertado en su lugar. Dichas sustituciones se realizan preferiblemente según la siguiente Tabla 1 cuando se desea modular con precisión las características de una molécula de VEGF.

ES 2 309 990 T3

TABLA I

	Residuo original	Sustituciones de ejemplo
5	Ala (A)	gly; ser
	Arg (R)	lys
	Asn (N)	gln; his
10	Asp (D)	glu
	Cys (C)	ser
	Gln (Q)	asn
15	Glu (E)	asp
	Gly (G)	ala; pro
	His (H)	asn; gln
20	Ile (I)	leu; val
	Leu (L)	ile; val
	Lys (K)	arg; gln; glu
25	Met (M)	leu; tyr; ile
	Phe (F)	met; leu; tyr
30	Ser (S)	thr
	Thr (T)	ser
	Trp (W)	tyr
35	Tyr (Y)	Trp; phe
	Val (V)	ile; leu

40 Los cambios sustanciales en la función o la identidad inmunológica se realizan mediante la selección de sustituciones que son menos conservativas que las de la Tabla I, es decir, la selección de residuos que difieren más significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que se espera que en general produzcan los mayores cambios en las propiedades de VEGF serán aquellas en las que (a) glicina y/o prolina (P) se sustituyen por otro aminoácido o se eliminan o se insertan; (b) un residuo hidrofílico, por ejemplo, serilo o treonilo, se sustituye por un residuo hidrofóbico, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (c) un residuo de cisteína se sustituye por cualquier otro residuo; (d) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo o histidilo se sustituye por un residuo que tiene una carga electronegativa, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; (e) un residuo que tiene una cadena lateral electronegativa se sustituye por un residuo que tiene una carga electropositiva; o (f) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye por una que no tiene dicha cadena lateral, por ejemplo, glicina.

55 No se espera que la mayoría de eliminaciones e inserciones, y sustituciones en particular, produzcan cambios radicales en las características de la molécula de VEGF. Sin embargo, cuando es difícil predecir el efecto exacto de la sustitución, eliminación o inserción por adelantado, un experto en la materia entenderá que el efecto se evaluará mediante ensayos de cribado ("screening") rutinarios. Por ejemplo, se fabrica habitualmente una variante mediante mutagénesis específica de sitio del ácido nucleico que codifica VEGF nativo, la expresión del ácido nucleico variante en un cultivo de células recombinantes, y, opcionalmente, la purificación a partir del cultivo celular, por ejemplo, mediante adsorción por inmunofinidad en una columna anti-VEGF policlonal de conejo (para absorber la variante mediante su unión a por lo menos un epítipo inmune restante).

65 Dado que el VEGF tiende a agregarse en dímeros, se encuentra dentro del alcance de la presente invención la disposición de heterodímeros y homodímeros, en los que una o ambas subunidades son variantes. Cuando ambas subunidades son variantes, los cambios en la secuencia de aminoácidos pueden ser los mismos o diferentes para cada cadena de la subunidad. Los heterodímeros se producen fácilmente mediante la cotransformación de células huésped con ADN que codifica ambas subunidades y, si es necesario, la purificación del heterodímero deseado, o mediante la

síntesis por separado de las subunidades, la disociación de las subunidades (por ejemplo, mediante el tratamiento con un agente caotrópico tal como urea, clorhidrato de guanidina, o similares), la mezcla de las subunidades disociadas y, a continuación, la reasociación de las subunidades mediante la dialización del agente caotrópico.

5 También se incluyen en el alcance de los mutantes de la presente invención los denominados mutantes “glyco-scan”. Esta realización aprovecha el conocimiento de los denominados sitios de glicosilación que se identifican mediante la secuencia

10

**- NXS
T**

15

20

en la que N representa el aminoácido asparagina, X representa cualquier aminoácido excepto prolina y probablemente glicina y la tercera posición se puede ocupar por serina o treonina. De este modo, cuando sea apropiado, se puede introducir dicho sitio de glicosilación para producir una especie que contenga grupos de glicosilación en esa posición. De manera similar, se puede eliminar un sitio de glicosilación existente mediante mutación para producir especies que carezcan de glicosilación en ese sitio. Se entenderá que, una vez más, como con las otras mutaciones contempladas por la presente invención, se introducen en los denominados dominios KDR y/o FLT-1 según la premisa básica de la presente invención, y se pueden introducir en otros puntos fuera de estos dominios dentro de la molécula global, siempre y cuando el producto final no difiera en general de las propiedades de la mutación introducida en uno o ambos de dichos dos dominios de unión.

25

30

La actividad del lisato celular o variante de VEGF purificado se criba a continuación en un ensayo de cribado adecuado para la característica deseada. Por ejemplo, un cambio en el carácter inmunológico de la molécula de VEGF, tal como la afinidad para un anticuerpo determinado, se mide mediante un inmunoensayo competitivo. Los cambios en el potenciamiento o supresión del crecimiento del endotelio vascular por los mutantes candidatos se miden mediante el ensayo apropiado. Las modificaciones de dichas propiedades de proteína tales como la estabilidad redox o térmica, la hidrofobicidad, la susceptibilidad a la degradación proteolítica, o la tendencia a la agregación con portadores o en multímeros se ensayan mediante procedimientos conocidos para el experto en la materia.

3. *Expresión recombinante*

35

La molécula de VEGF deseada se puede preparar mediante cualquier técnica, incluyendo métodos recombinantes. Asimismo, un ADN aislado se entiende en la presente invención que significa ADN sintetizado químicamente, ADNc, ADN cromosómico o extracromosómico con o sin las regiones flanqueantes 3' y/o 5'. Preferiblemente, el VEGF deseado de la presente invención se fabrica mediante síntesis en el cultivo celular recombinante.

40

45

50

Para dicha síntesis, es necesario en primer lugar asegurar el ácido nucleico que codifica un VEGF. El ADN que codifica una molécula de VEGF se puede obtener de células foliculares pituitarias bovinas mediante (a) la preparación de una biblioteca de ADNc a partir de estas células, (b) la realización de un análisis de hibridación con ADN marcado que codifica el VEGF o fragmentos del mismo (hasta 100 pares de bases de longitud o más) para detectar clones en la biblioteca que contiene secuencias homólogas, y (c) el análisis de los clones mediante análisis por enzimas de restricción y la secuenciación de ácidos nucleicos para identificar clones de longitud completa. El ADN que es capaz de hibridarse a un ADN que codifica VEGF bajo condiciones de astringencia baja es útil para identificar ADN que codifica VEGF. Las condiciones de astringencia tanto elevadas como bajas se definen a continuación más adelante. Si los clones de longitud completa no están presentes en la biblioteca de ADNc, entonces se pueden recuperar fragmentos adecuados de los diversos clones utilizando la información de la secuencia de ácidos nucleicos descrita en la presente invención por primera vez y unirlos a los sitios de restricción comunes a los clones para ensamblar un clon de longitud completa que codifica el VEGF. Alternativamente, las bibliotecas genómicas proporcionarán el ADN deseado. La secuencia del ADN que codifica el VEGF bovino que se determinó a la larga se muestra en la figura 2. La secuencia del ADN que codifica el VEGF humano que se determinó por último mediante el sondeo de una línea celular de leucemia humana se muestra en la figura 10.

55

Una vez se ha identificado y aislado este ADN de la biblioteca, se une en un vector replicable para la posterior clonación o para la expresión.

60

En un ejemplo de un sistema de expresión recombinante, se expresa un gen que codifica VEGF en células de mamífero mediante la transformación con un vector de expresión que comprende ADN que codifica el VEGF. Es preferible transformar las células huésped capaces de realizar dicho procesado para obtener el VEGF en el medio de cultivo o periplasma de la célula huésped, es decir, para obtener una molécula secretada.

a. *Células huésped y vectores útiles*

65

Los vectores y procedimientos descritos en la presente invención son adecuados para su uso en células huésped en un amplio rango de organismos procariotas y eucariotas.

ES 2 309 990 T3

En general, naturalmente, se prefieren los procariotas para la clonación inicial de secuencias de ADN y la construcción de los vectores útiles en la presente invención. Por ejemplo, la cepa MM 294 de *E. coli* K12 (ATCC No. 31.446) es particularmente útil. Otras cepas microbianas que se pueden utilizar incluyen cepas de *E. coli* tales como *E. coli* B y *E. coli* X1776 (ATCC No. 31.537). Naturalmente, estos ejemplos pretenden ser ilustrativos más que limitativos.

También se pueden utilizar procariotas para la expresión. Se pueden utilizar las cepas mencionadas anteriormente, así como cepas W3110 de *E. coli* (F- lambda, prototrófica, ATCC No. 27.325), K5772 (ATCC No. 53.635) y SR101, bacilos tales como *Bacillus subtilis* y otras enterobacteriáceas tales como *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcesans* y varias especies de pseudomonas.

En general, se utilizan vectores plásmidos que contienen replicón y secuencias de control que derivan de especies compatibles con la célula huésped conjuntamente con estos huéspedes. El vector porta normalmente un sitio de replicación, así como secuencias de marcaje que son capaces de proporcionar la selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma habitualmente utilizando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli* (véase, por ejemplo, bolivar *et al.*, Gene 2, 95 [1977]). El pBR322 contiene genes para la resistencia a ampicilina y tetraciclina y, de este modo, proporciona medios sencillos para identificar células transformadas. El plásmido pBR322, u otros plásmidos o fagos microbianos, deben contener también, o modificarse para que contengan, promotores que se pueden utilizar por el organismo microbiano para la expresión de sus propias proteínas.

Los promotores más utilizados habitualmente en la construcción de ADN recombinante incluyen la b-lactamasa (penicilinas) y sistemas promotores de lactosa (Chang *et al.*, Nature, 375, 615 [1978]; Itakura *et al.*, Science, 198, 1056 [1977]; Goeddel *et al.*, Nature, 281, 544 [1979]) y un sistema promotor de triptófano (trp) (Goeddel *et al.*, Nucleic Acids Res., 8, 4057 [1980]; EPO Appl. Publ. No. 0036.776). Aunque éstos son los más utilizados habitualmente, se han descubierto u utilizado otros promotores microbianos y se han publicado detalles referentes a sus secuencias de nucleótidos, que permiten a un técnico unirlos de manera funcional con vectores plásmidos (véase, por ejemplo, Siebenlist *et al.*, Cell, 20, 269 [1980]).

Además de procariotas, también se pueden utilizar microbios eucariotas, tales como cultivos de levaduras. El *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura común de panadería, es el más utilizado habitualmente entre los microorganismos eucariotas, aunque existen una serie de otras cepas que también están disponibles habitualmente. Para la expresión en *Saccharomyces*, se utiliza habitualmente el plásmido YRp7, por ejemplo (Stinchcomb *et al.*, Nature 282, 39 [1979]; Kingsman *et al.*, Gene 7, 141 [1979]; Tschemper *et al.*, Gene 10, 157 [1980]). Este plásmido ya contiene el gen *trp1* que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44.076 o PEP4-1 (Jones, Genetics, 85, 12 [1977]). La presencia de la lesión de *trp1* como característica del genoma de la célula huésped de levadura proporciona entonces un ambiente eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

Entre las secuencias promotoras adecuadas en vectores de levadura se incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman *et al.*, J. biol. Chem. 255, 2073 [1980]) u otras enzimas glicolíticas (Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg. 7, 149 [1968]; Holland *et al.*, Biochemistry 17, 4900 [1978]), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfo-fructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa. En la construcción de plásmidos de expresión adecuados, las secuencias de terminación asociadas con estos genes también se unen en el vector de expresión en 3' de la secuencia deseada a expresar para proporcionar poliadenilación del ARNm y la terminación. Otros promotores, que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son la región promotora para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativos asociados con el metabolismo de nitrógeno y el mencionado anteriormente gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y las enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Es adecuado cualquier vector plásmido que contiene secuencias de promotor, origen de replicación y terminación compatibles de levadura.

Además de microorganismos, también se pueden utilizar como huéspedes cultivos de células derivados de organismos multicelulares. En principio, se puede utilizar cualquier cultivo celular, ya sea cultivo de vertebrado o invertebrado. Sin embargo, ha habido mayor interés en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivos (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento rutinario en los últimos años [Tissue Culture, Academic Press, Kruse y Patterson, editors (1973)]. Entre los ejemplos de dichas líneas de células huésped útiles están las células VERO y HeLa, líneas de células de ovario de hámster chino (CHO) y líneas de células W138, BHK, COS-7, 293 y MDCK. Los vectores de expresión para dichas células incluyen normalmente (si es necesario) un origen de replicación, un promotor localizado delante del gen a expresar, junto con cualquier sitio de unión a ribosoma necesario, sitios de splicing de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias de terminación.

Para el uso en células de mamífero, las funciones de control en los vectores de expresión se disponen frecuentemente por material vírico. Por ejemplo, los promotores utilizados habitualmente derivan de polioma, Adenovirus 2, y más frecuentemente Virus de Simio 40 (SV40). Los promotores temprano y tardío del virus SV40 son particularmente útiles porque ambos se obtienen fácilmente del virus como fragmento que también contiene el origen de replicación viral de SV40 [Fiers *et al.*, Nature, 273, 113 (1978)]. También se pueden utilizar fragmentos de SV40 más pequeños o más grandes, siempre y cuando se incluya la secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio *HindIII* hasta el sitio *BglII* localizado en el origen de replicación viral. Además, también es posible, y frecuentemente

ES 2 309 990 T3

deseable, utilizar secuencias promotoras o de control asociadas con la secuencia génica deseada, siempre y cuando dichas secuencias de control sean compatibles con los sistemas de célula huésped.

5 Se puede disponer de un origen de replicación mediante la construcción del vector para incluir un origen exógeno, tal como se puede derivar de SV40 u otro origen viral (por ejemplo, Polioma, Adeno, VSV, BPV) o se puede disponer mediante el mecanismo de replicación cromosómica de la célula huésped. Si el vector está integrado en el cromosoma de la célula huésped, con el último es suficiente.

10 Los cultivos celulares producen cantidades satisfactorias de proteína; aunque, sin embargo, los refinamientos, que utilizan una secuencia codificante secundaria, sirven para aumentar incluso más los niveles de producción. Una secuencia codificante secundaria comprende dihidrofolato reductasa (DHFR) que está afectado por un parámetro controlado de manera externa, tal como metotrexato (MTX), permitiendo de este modo el control de la expresión mediante el control de la concentración de metotrexato.

15 En la selección de una célula huésped preferida para la transfección por los vectores de la presente invención que comprenden secuencias de ADN que codifican tanto VEGF como la proteína DHFR, es apropiado seleccionar el huésped según el tipo de proteína DHFR utilizada. Si se utiliza proteína DHFR natural, es preferible seleccionar una célula huésped que es deficiente en DHFR, permitiendo de este modo el uso de la secuencia codificante de DHFR como marcador para la transfección satisfactoria en medio selectivo que carece de hipoxantina, glicina y timidina. Una
20 célula huésped apropiada en este caso es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada tal como se describe en Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77.4216 (1980).

Por otro lado, si se utiliza la proteína DHFR con una afinidad de unión baja para MTX como secuencia controladora, no es necesario utilizar células deficientes en DHFR. Dado que la DHFR mutante es resistente a metotrexato, se
25 puede utilizar un medio que contiene MTX como medio de selección con la condición de que las células huésped sean por sí solas sensibles a metotrexato. La mayoría de células eucariotas que son capaces de absorber MTX parecen ser sensibles a metotrexato. Una de dichas líneas celulares útiles es una línea CHO, CHO-K1 (ATCC No. CCL 61).

b. Metodología habitual utilizable

30 La construcción de vectores adecuados que contienen las secuencias codificantes y de control deseadas utiliza técnicas de unión estándar. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se dividen, se ajustan y se vuelven a unir en la forma deseada para preparar los plásmidos requeridos.

35 Si se requieren extremos romos, el preparado se puede tratar durante 15 minutos a 150°C con 10 unidades de Polimerasa I (Klenow), extraer con fenol-cloroformo y precipitar con etanol.

La separación por tamaño de los fragmentos divididos se puede realizar utilizando gel de poliacrilamida al 6 por
40 ciento descrito por Goeddel *et al.*, Nucleic Acids Res. 8, 4057 (1980).

Para el análisis para confirmar las secuencias correctas en plásmidos construidos, se utilizan habitualmente mezclas de unión para transformar la cepa 294 de *E. coli* K12 (ATCC 31.446) u otras cepas de *E. coli*, y transformantes satisfactorios seleccionados por resistencia a ampicilina o tetraciclina cuando sea apropiado. Se preparan plásmidos de los transformantes y se analizan mediante mapeo de restricción y/o secuenciación de ADN mediante el método de
45 Messing *et al.*, Nucleic Acids Res., 9, 309 (1981) o mediante el método de Maxam *et al.*, Methods of Enzymology 65, 499 (1980).

Después de la introducción del ADN en la célula huésped de mamífero y la selección en un medio para transfectantes estables, la amplificación de secuencias codificantes de proteína DHFR se realiza mediante el crecimiento de
50 cultivos de células huésped en presencia de concentraciones de aproximadamente 20.000-500.000 nM de metotrexato, un inhibidor competitivo de actividad de DHFR. El intervalo eficaz de concentración es altamente dependiente, naturalmente, de la naturaleza del gen de DHFR y las características del huésped. De manera clara, no se pueden definir de modo general los límites superior e inferior. También se podrían utilizar concentraciones adecuadas de otros análogos de ácido fólico u otros componentes que inhiben DHFR. Sin embargo, el MTX es por sí solo conveniente,
55 está fácilmente disponible y es eficaz.

Otras técnicas que se pueden utilizar se describen en la sección justo antes de los ejemplos.

4. Usos y formulación

60 Las moléculas de VEGF de la presente invención presentan una serie de usos terapéuticos asociados con el endotelio vascular. Dichos usos incluyen el tratamiento de lesiones en la red vascular en vista de la activación rápida demostrada por VEGF de la proliferación de células endoteliales vasculares que rodearían la lesión. Entre los ejemplos de dichas lesiones que podrían tratarse de esta manera se incluyen, pero no se limitan a, incisiones quirúrgicas,
65 particularmente aquellas que implican el corazón, heridas, incluyendo laceraciones, incisiones y penetraciones de vasos sanguíneos, y úlceras superficiales que implican el endotelio vascular tales como úlceras diabéticas, hemofílicas y varicosas. Otros estados fisiológicos que podrían mejorarse basados en el carácter mitogénico selectivo de VEGF también se incluyen en la presente invención.

ES 2 309 990 T3

Para los estados traumáticos a los que se ha hecho referencia anteriormente, la molécula de VEGF se formulará y dosificará de una manera consistente con la buena práctica médica teniendo en cuenta el trastorno específico a tratar, el estado del paciente individual, el punto de liberación del VEGF, el método de administración, y otros factores conocidos por los profesionales médicos. De este modo, para los objetivos de la presente invención, la “cantidad terapéuticamente eficaz” del VEGF es una cantidad que es eficaz para prevenir, reducir el empeoramiento, aliviar o curar el estado en tratamiento, en particular aquella cantidad que es suficiente para aumentar el crecimiento del endotelio vascular *in vivo*.

Las variantes de la secuencia de aminoácidos de VEGF y derivados que reaccionan de manera cruzada inmunológicamente con anticuerpos desarrollados contra VEGF nativo son útiles en inmunoensayos para VEGF como patrones o, cuando están marcados, como reactivos competitivos.

El VEGF se prepara para el almacenamiento o la administración mediante la mezcla de VEGF que presenta el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables. Dichos materiales son no tóxicos a los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas. Si el VEGF es soluble en agua, se puede formular en una solución tampón tal como fosfato u otra sal de ácido orgánico preferiblemente a un pH de aproximadamente 7 a 8. Si la variante de VEGF es sólo parcialmente soluble en agua, se puede preparar como una microemulsión mediante su formulación con un tensoactivo no iónico tal como Tween, Pluronic, o PEG, por ejemplo, Tween 80, en una cantidad de 0,04-0,05% (p/v) para aumentar su solubilidad.

Opcionalmente, se pueden añadir otros ingredientes tales como antioxidantes, por ejemplo, ácido ascórbico; péptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente diez residuos), por ejemplo, poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como suero, albúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinil pirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; y alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol.

El VEGF a utilizar para la administración terapéutica debe ser estéril. La esterilidad se consigue fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estéril (por ejemplo, membranas de 0,2 micras). El VEGF se almacenará normalmente en forma liofilizada o como una solución acuosa si es altamente estable a la desnaturalización térmica y oxidativa. El pH de los preparados de VEGF será habitualmente de aproximadamente 6 a 8, aunque valores de pH superiores o inferiores también pueden ser apropiados en ciertas circunstancias. Se entenderá que el uso de ciertos excipientes, portadores o estabilizadores anteriores darán lugar a la formación de sales de VEGF.

Si el VEGF va a utilizarse parenteralmente, las composiciones terapéuticas que contienen el VEGF se disponen en general en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica.

En general, cuando el trastorno lo permita, se debería formular y dosificar el VEGF para una administración específica para una localización. Esto es conveniente en el caso de heridas y úlceras.

También se pueden preparar formulaciones de liberación controlada e incluyen la formación de partículas microcapsulares y artículos implantables. Para preparar composiciones de VEGF de liberación controlada, el VEGF se incorpora preferiblemente en una matriz o microcápsula biodegradable. Un material adecuado para este objetivo es un poliláctido, aunque se pueden utilizar otros polímeros de poli-(a-hidroxicarboxilácidos), tales como ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988A). Otros polímeros biodegradables incluyen poli(lactonas), poli(acetales), poli(ortoésteres) o poli(ortocarbonatos), la consideración inicial aquí debe ser que el propio portador, o sus productos de degradación, son no tóxicos en el tejido diana y no agravarán adicionalmente el estado. Esto se puede determinar mediante cribado de rutina en modelos animales del trastorno diana o, si dichos modelos no están disponibles, en animales normales. Numerosas publicaciones científicas documentan dichos modelos de animales.

Para ejemplos de composiciones de liberación controlada, véase la Patente de Estados Unidos No. 3.773.919, EP 58.481 A, Patente de Estados Unidos No. 3.887.699, EP 158.277 A, Patente de Canadá No. 1176565, U. Sidman *et al.*, *Biopolymers* 22, 547 [1983], y R. Langer *et al.*, *chem. Tech.* 12, 98 [1982].

Cuando se aplica tópicamente, el VEGF se combina de manera adecuada con otros ingredientes, tales como portadores y/o adyuvantes. No existen limitaciones en la naturaleza de dichos otros ingredientes, excepto que deben ser farmacéuticamente aceptables y eficaces para su administración pretendida, y no pueden degradar la actividad de los principios activos de la composición. Entre los ejemplos de vehículos adecuados se incluyen ungüentos, cremas, geles o suspensiones, con o sin colágeno purificado. Las composiciones también se pueden impregnar en parches transdérmicos, tiritas, vendas, preferiblemente en forma líquida o semilíquida.

Para obtener una formulación en gel, el VEGF formulado en una composición líquida se puede mezclar con una cantidad eficaz de un polisacárido o polímero sintético soluble en agua tal como polietilenglicol para formar un gel de la viscosidad apropiada para ser aplicado tópicamente. El polisacárido que se puede utilizar incluye, por ejemplo, derivados de celulosa tales como derivados de celulosa eterificados, incluyendo alquil celulosas, hidroxialquil celulosas y alquilhidroxialquil celulosas, por ejemplo, metilcelulosa, hidroxietil celulosa, carboximetil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa e hidroxipropil celulosa; almidón y almidón fraccionado; agar; ácido algínico y alginatos;

ES 2 309 990 T3

goma arábica; pululano; agarosa; carragenanos; dextranos; dextrinas; fructanos; inulina; mananos; xilanos; arabina-
nos; quitosanos; glicógenos; glucanos y biopolímeros sintéticos; así como gomas, tales como goma xantano; goma
guar; goma garrofín; goma arábica; goma tragacanto; y goma karaya; y derivados y mezclas de los mismos. El agente
5 gelificante preferido de la presente invención es aquel que es inerte a sistemas biológicos, es no tóxico, fácil de
preparar y no es demasiado líquido o viscoso y no desestabilizará el VEGF contenido en el mismo.

Preferiblemente, el polisacárido es un derivado de celulosa eterificado, más preferiblemente uno que esté bien
definido, purificado e indicado en USP, por ejemplo, metilcelulosa y los derivados de hidroxialquil celulosa, tales como
10 hidroxipropil celulosa, hidroxietil celulosa e hidroxipropil metil celulosa. Lo más preferido de la presente invención
es la metilcelulosa.

El polietilenglicol útil para la gelificación es habitualmente una mezcla de polietilenglicoles de peso molecular
bajo y elevado para obtener la viscosidad apropiada. Por ejemplo, una mezcla de un polietilenglicol de peso molecular
400-600 con uno de peso molecular 1500 sería eficaz para este objetivo cuando se mezcla en la proporción adecuada
15 para obtener una pasta.

El término "soluble en agua" a polisacáridos y polietilenglicoles pretende incluir soluciones y dispersiones coloi-
dales. En general, la solubilidad de los derivados de celulosa se determina mediante el grado de sustitución de grupos
éter, y los derivados estabilizantes útiles de la presente invención deberían tener una cantidad suficiente de dichos gru-
20 pos éter por unidad de anhidroglucosa en la cadena de celulosa para que hacer los derivados sean solubles en agua. Un
grado de sustitución de éter de por lo menos 0,35 grupos éter por unidad de anhidroglucosa es generalmente suficiente.
Adicionalmente, los derivados de celulosa pueden estar en forma de sales de metales alcalinos, por ejemplo, las sales
de Li, Na, K o Cs.

Si se utiliza metilcelulosa en el gel, comprende preferiblemente aproximadamente 2-5%, más preferiblemente
aproximadamente 3%, del gel y el VEGF está presente en una cantidad de aproximadamente 300-1000 mg por ml de
gel.

La dosis a utilizar depende de los factores descritos anteriormente. Como proposición general, el VEGF se formula
30 y libera a la localización o tejido diana en una dosis capaz de establecer en el tejido un nivel de VEGF superior a
aproximadamente 0,1 ng/cc hasta una dosis máxima que es eficaz pero no excesivamente tóxica. Esta concentración
en el interior del tejido debería mantenerse si es posible mediante infusión continua, liberación controlada, aplicación
tópica o inyección a frecuencias determinadas de manera empírica.

Se encuentra en el alcance de la presente invención la combinación de la terapia con VEGF con otras terapias
nuevas o convencionales (por ejemplo, factores de crecimiento tales como aFGF, bFGF, PFGF, IGF, NGF, esteroides
anabólicos, EGF o TGF- α) para aumentar la actividad de cualquiera de los factores de crecimiento, incluyendo VEGF,
en la activación de la proliferación y reparación celular. No es necesario que dichos fármacos de cotratamiento se
incluyan *per se* en las composiciones de la presente invención, aunque serán convenientes cuando dichos fármacos sean
40 proteínicos. Dichas mezclas se administran de manera adecuada de la misma manera y para los mismos objetivos que
el VEGF utilizado solo. La proporción molar útil de VEGF con respecto a dichos factores de crecimiento secundarios
es habitualmente de 1:0,1-10, siendo preferido cantidades aproximadamente equimolares.

5. Composiciones farmacéuticas

Los compuestos de la presente invención se pueden formular según los procedimientos conocidos para preparar
composiciones farmacéuticamente útiles, donde las variantes de VEGF de la presente invención se combinan en una
mezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Los vehículos portadores adecuados y su formulación,
incluyendo de otras proteínas humanas, por ejemplo, albúmina de suero humano, se describen, por ejemplo, en Re-
50 mington's Pharmaceutical Sciences, 16^a Ed., 1980, Mack Publishing Co., editado por Oslo et al., la descripción del
cual se incorpora en la presente invención por referencia. Las variantes de VEGF de la presente invención se pue-
den administrar parenteralmente a sujetos que padecen de enfermedades o estados cardiovasculares o mediante otros
procedimientos que aseguran su liberación al torrente sanguíneo en una forma eficaz.

Entre las composiciones particularmente adecuadas para la administración clínica de variantes de VEGF de la pre-
55 sente invención utilizadas en la práctica de la misma se incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas estériles, o polvos
hidratables estériles, tales como proteína liofilizada. Generalmente es deseable incluir adicionalmente en la formu-
lación una cantidad adecuada de una sal farmacéuticamente aceptable, generalmente en una cantidad suficiente para
hacer que la formulación sea isotónica. También se incluyen habitualmente un regulador de pH tal como base arginina
60 y ácido fosfórico en cantidades suficientes para mantener un pH apropiado, generalmente de 5,5 a 7,5. Además, para
aumentar el tiempo de vida útil o la estabilidad de formulaciones acuosas, también puede ser deseable incluir agentes
adicionales tales como glicerol. De esta manera, las formulaciones de t-PA variantes se convierten en apropiadas para
la administración parenteral y, en particular, la administración intravenosa.

Las dosificaciones y concentraciones deseadas de fármaco de composiciones farmacéuticas de la presente inven-
65 ción pueden variar dependiendo del uso particular previsto. Por ejemplo, en el tratamiento de la trombosis de vena
profunda o enfermedad vascular periférica, se preferirá habitualmente dosis en "bolo" proporcionando posteriores
administraciones para mantener un nivel constante en sangre, preferiblemente del orden de aproximadamente 3 μ g/ml.

Sin embargo, para su uso en relación con equipos para cuidados médicos de emergencia donde la capacidad de infusión no está generalmente disponible y debido a la naturaleza generalmente crítica de la enfermedad subyacente (por ejemplo, embolia, infarto), será deseable en general proporcionar dosis iniciales algo mayores, tales como un bolo intravenoso.

Para las diversas indicaciones terapéuticas a las que se hace referencia para los compuestos de la presente invención, las moléculas de VEGF se formularán y dosificarán de manera consistente con la buena práctica médica teniendo en cuenta el trastorno específico a tratar, el estado del paciente individual, el punto de liberación, el procedimiento de administración y otros factores conocidos para los técnicos del sector pertinente.

De este modo, para los objetivos de la presente invención, la "cantidad terapéuticamente eficaz" de las moléculas de VEGF de la presente invención es una cantidad que es eficaz para prevenir, reducir el empeoramiento, aliviar o curar la condición en tratamiento, en particular aquella cantidad que es suficiente para aumentar el crecimiento del endotelio vascular *in vivo*. En general, se utiliza una dosis capaz de establecer en el tejido que es la diana para la indicación terapéutica a tratar, un nivel de un mutante de VEGF de la presente invención mayor de aproximadamente 0,1 ng/cm³ hasta una dosis máxima que es eficaz pero no excesivamente tóxica. Se contempla que la administración en el interior del tejido puede a elección para ciertas indicaciones terapéuticas para los compuestos de la presente invención.

Los siguientes ejemplos pretenden meramente ilustrar el modo óptimo ahora conocido para realizar la presente invención, pero la presente invención no debe considerarse como limitada a los detalles de dichos ejemplos.

Ejemplo I

Materiales - El kit de mutagénesis *in vitro* de fagémido Muta-gene, la IgG de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante específica para IgG murina, los patrones de PM de rango bajo preteñidos y el Trans-Blot Transfer Medium (membrana de nitrocelulosa pura) se adquirieron de BioRad Laboratories (Richmond, CA). El kit Qiagen plasmid Tip 100 y la Sequenase versión 2.0 eran de Qiagen (Chatsworth, CA) y de United States Biochemical (Cleveland, OH), respectivamente. Los geles SDS (gradiente de poli(acrilamida del 4-20%)) y el papel de transferencia precortado eran de Integrated Separations Systems (Natick, MA). El tampón de muestra de SDS (concentrado 5x) y varias enzimas de restricción eran de New England Biolabs (Beverly, MA). La O-fenilendiamina, los tampones de fosfato citrato, el dodecil sulfato de sodio, y las pastillas de sustrato de H₂O₂ se adquirieron de Sigma (St Louis, MO). El BufferEZE formula 1 (tampón de transferencia) y la película de rayos X X-OMat AR eran de Eastman Kodak Co. (Rochester, NY). Las placas de microtitulación MAXosorb e Immulon-1 se adquirieron de Nunc (Kamstrup, Dinamarca) y Dynatech (Chantilly, VA), respectivamente. Las placas de cultivo celular (12 pocillos) y el medio de cultivo (con suero de ternera) eran de Costar (Cambridge, MA) y Gibco (Grand Island, NY), respectivamente. El monolaurato de polietileno-20-sorbitano (Tween-20) era de Fisher Biotech (Fair Lawn, NJ). Las columnas de Sephadex G25 (PD-10) y la proteína A marcada con ¹²⁵I eran de Pharmacia (Piscataway, NJ) y Amersham (Arlington Heights, IL), respectivamente. La albúmina de suero bovino (BSA) y la IgG anti-humano de IgG de conejo (Fc-específico) se adquirieron de Cappel (Durham, NC) y Calbiochem (La Jolla, CA), respectivamente. El vector plásmido (pRK5), las células de *E. coli* competentes (DH5a y CJ236), los oligonucleótidos sintéticos, el medio de cultivo celular, el VEGF₁₆₅ derivado de CHO purificado, los anticuerpos de VEGF₁₆₅ monoclonales (Mates A4.6.1, 2E3, 4D7, SC3, y SF8) y policlonales se prepararon en Genentech, Inc. (South San Francisco, CA). La construcción, la expresión y la purificación de las quimeras de IgG y receptor FLT-1, flkl y KDR eran tal y como describen en Park, *et al.* J. Biol. Chem. 269, 25646-25654 (1994).

Mutagénesis dirigida de sitio y Expresión de Variantes de VEGF - La mutagénesis dirigida de sitio se llevó a cabo utilizando el kit de mutagénesis *in vitro* Muta-Gene Phagemid de acuerdo con el procedimiento de Kunkel Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 488-492 (1985) y Kunkel *et al.*, Methods Enzymol. 154, 367-382 (1987). Se utilizó un vector plásmido pRK5 que contenía ADNc para la isoforma VEGF₁₆₅ en la mutagénesis y la expresión transitoria. El vector pRK5 es un vector pUC118 modificado y contiene un potenciador y un promotor CMV [Nakamaye *et al.*, Nucleic Acids Res. 14, 9679-9698 (1986) y Vieira *et al.*, Methods Enzymol. 155, 3-11 (1987)]. Se purificó el ADN mutagenizado utilizando el kit Qiagen Plasmid Midi Kit Tip 100 y se verificó la secuencia de las mutaciones utilizando el kit Sequenase Versión 2.0. Se analizó el ADN mutado mediante digestión con enzimas de restricción tal y como se describe en Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual part I, C5.28-5.32, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989).

Se realizó la transfección transitoria de "células 293" de riñón fetal humano en placas de 6 pocillos utilizando el procedimiento de precipitación de fosfato de calcio modificado tal y como se describe anteriormente [Jordan *et al.*, Bio/Technology (manuscrito en preparación) (1994); Chen *et al.*, Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987); Gorman *et al.*, DNA and Protein Engineering Techniques 2, 3-10 (1990); Graham *et al.*, Virology 52, 456-467 (1973)]. Brevemente, se incubaron aproximadamente 1,2 x 10⁶ células durante toda la noche a 37°C en presencia de 15 µg de ADN precipitado. El sobrenadante del cultivo celular se reemplazó por medio sin suero, y se incubaron monocapas celulares durante 72 horas a 37°C. El medio condicionado (3 ml) se recogió, se centrifugó, se puso en alícuotas y se guardó a 70°C hasta su uso.

ES 2 309 990 T3

Cuantificación de las Variantes de VEGF₁₆₅ mediante ELISA - Se adaptó un ensayo radioinmunométrico descrito anteriormente [Aiello *et al.*, N. Engl. J. Med. 331, 1480-1487 (1994)] para la cuantificación de mutantes de VEGF mediante el siguiente procedimiento. Los pocillos individuales de una placa de microtitulación de 96 pocillos se recubrió con 100 μ l de una solución 3 μ g/ml de un anticuerpo policlonal anti-VEGF₁₆₅ en 50 mM de tampón de carbonato de sodio pH 9,6 durante toda la noche a 4°C. Se descartó el sobrenadante, y se lavaron 4 veces los pocillos con PBS que contenía Tween 80 al 0,03%. La placa se bloqueó en tampón de ensayo (BSA al 0,5%, Tween 80 al 0,03%, Thimerosal en PBS al 0,01%) durante una hora (300 μ l/pocillo) a temperatura ambiente, a continuación se lavaron los pocillos. Se añadieron muestras diluidas (100 μ l) y VEGF₁₆₅ estándar (que varía entre 0,1 y 10 ng/ml) a cada pocillo y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Se descartó el sobrenadante, y se lavaron los pocillos. Se añadió una solución de anticuerpo 5F8 monoclonal anti-VEGF murino (100 μ l a 1 μ g/ml), y se incubó la placa de microtitulación a temperatura ambiente durante una hora con agitación suave. Después de descartar el sobrenadante, se lavó la placa y se añadió inmediatamente a cada pocillo IgG de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante específica para IgG murina (100 μ l) en una dilución a 1:25000. Se incubó la placa durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave tras lo cual se descartó el sobrenadante, se lavaron los pocillos y se revelaron mediante la adición de ortofenilendiamina (0,04%), H₂O₂ (0,012%) en 50 nM de tampón de fosfato citrato de pH 5 (100 μ l), a continuación se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 10 min. Se detuvo la reacción mediante la adición de 50 μ l de 4,5 N de H₂SO₄ a cada pocillo y se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de microplaca (SLT Labs). Se cuantificaron las concentraciones de las variantes de VEGF₁₆₅ mediante la interpolación de una curva patrón utilizando un análisis de regresión no lineal. Con intención de comparar, se desarrolló un segundo ELISA que utilizó un formato monoclonal dual. El ensayo fue similar al ELISA descrito anteriormente, excepto que se utilizó un anticuerpo monoclonal neutralizante (Mab A4.6.1) para recubrir las placas de microtitulación [Kim *et al.*, Growth Factors 7, 53-64 (1992)].

Inmunotransferencia de mutantes de VEGF - Se añadieron alícuotas de medio celular condicionado (16 μ l) que contenía VEGF o VEGF mutante (aproximadamente 10 ng) al tampón de muestra SDS 5x (4 μ l) y se calentaron a 90°C durante 3 min antes de cargarlos en geles de SDS poliacrilamida (de 4 a 20% de acrilamida). Los patrones de PM (10 μ l) preteñidos se cargaron en los carriles externos de los geles de SDS. Se desarrollaron los geles a 25 mA durante 90 min a 4°C. Los geles se transfirieron a papel de nitrocelulosa en un tanque de transferencia Bio-Rad que contenía BufferEZE con SDS al 0,1% durante 90 min a 250 mA a 25°C. Se prehumedeció la nitrocelulosa en tampón de transferencia con SDS al 0,1% durante 10 min antes de su uso. Las inmunotransferencias transferidas se bloquearon en PBS durante toda la noche con BSA al 1,0% y Tween 20 al 0,1% (tampón de bloqueo) a 4°C. Se preparó una solución que contenía 5 Mabs anti-VEGF murinos (A.4.6.1, 5C3, 5F8, 4D7, y 2E3) con 2 μ g/ml de cada Mab en tampón de bloqueo y se utilizó como anticuerpo primario. Se incubó la solución de anticuerpo primario con las inmunotransferencias durante 4 horas a 25°C con agitación suave, a continuación se lavaron 3 veces durante 10 min en tampón de bloqueo a 25°C. La proteína A marcada con ¹²⁵I se diluyó hasta 10⁴ cpm/ml (concentración final) en tampón de bloqueo y se incubó con las inmunotransferencias durante 60 min con agitación suave a 25°C. Se lavaron las inmunotransferencias 3 veces durante 10 min en tampón de bloqueo a 25°C, a continuación se secaron en papel de filtro y se colocaron en película Kodak X-Omat con dos cribados intensificantes a -70°C durante 3 días.

Preparación de VEGF₁₆₅ marcado con ¹²⁵I - El radiomarcaje del VEGF₁₆₅ derivado de CHO se preparó utilizando una modificación del procedimiento de yodación catalizado por cloramina T [Hunter *et al.*, Nature 194, 495-496 (1962)]. En una reacción típica, se añadieron 10 μ l de Tris-HCl 1M Tween 20 al 0,01% a pH 7,5 a 5 μ l de yoduro de sodio - 125 (0,5 milicurios, 0,24 nmol) en un recipiente de reacción tapado. A esta reacción se añadieron 10 μ l de VEGF₁₆₅ derivado de CHO (10 μ g, 0,26 nmol). La yodación se inició mediante la adición de 10 μ l de cloramina T 1 mg/ml en fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4. Después de 60 segundos se terminó la yodación mediante la adición de metabisulfito de sodio (20 μ l, 1 mg/ml) en fosfato sódico 0,1 M, pH 7,5. El recipiente de reacción se agitó después de cada adición. Se aplicó la mezcla de reacción a una columna de PD-10 (Sephadex G25) que se preequilibró con BSA al 0,5%, Tween 20 al 0,01% en PBS. Se recogieron las fracciones y se contó la radioactividad con un contador de centelleo gamma (LKB modelo 1277). Habitualmente, la radioactividad específica del VEGF yodado fue de 26 \pm 2,5 μ Ci/ μ g, que correspondía a un ¹²⁵I por cada dos moléculas del dímero de VEGF₁₆₅.

Ensayo de Unión del Receptor de VEGF₁₆₅ - El ensayo se realizó en inmunoplasmas de 96 pocillos (immulon-1); se recubrió cada pocillo con 100 μ l de una solución que contenía 10 μ g/ml de IgG anti-humano de IgG de conejo (específico de Fc) en tampón de carbonato de sodio 50 mM a pH 9,6 durante toda la noche a 4°C. Tras descartar el sobrenadante, se lavaron los pocillos tres veces en tampón de lavado (Tween 80 al 0,01% en PBS). Se bloqueó la placa (300 μ l/pocillo) durante una hora en tampón de ensayo (BSA al 0,5%, Tween 80, Thimerosal al 0,01% en PBS). Se descartó el sobrenadante y se lavaron los pocillos. Se preparó un cóctel con medio celular condicionado que contenía mutantes de VEGF₁₆₅ en concentraciones variadas (100 μ l), VEGF₁₆₅ radiomarcado con ¹²⁵I (aproximadamente 5x10³ cpm en 50 μ l) que se mezcló con la proteína quimérica receptor de VEGF-IgG, IgG FLT-1, IgG flk-1 o KDR-IgG (3-15 ng/ml, concentración final, 50 μ l) en tubos micrónicos. Se añadieron alícuotas de esta solución (100 μ l) a las placas de microtitulación prerrecubiertas y se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Se descartó el sobrenadante, se lavó la placa, y se contaron los pocillos de microtitulación individual mediante escintigrafía gamma (LKB modelo 1277). Se representó la unión competitiva entre VEGF₁₆₅ no marcado (o mutantes de VEGF₁₆₅) y VEGF₁₆₅ radiomarcado con ¹²⁵I a los receptores FLT-1, Flk-1, o KDR, y se analizó utilizando un programa de ajuste de cuatro parámetros (Kaleidagraph, Adelbeck Software). Se estimó la constante de disociación aparente para cada mutante de VEGF a partir de la concentración requerida para lograr el 50% de inhibición (IC₅₀).

ES 2 309 990 T3

5 *Ensayo del Crecimiento de Células Endoteliales Vasculares* - Se determinó la actividad mitogénica de las variantes de VEGF mediante la utilización de células endoteliales corticales adrenales (ACE) bovinas como células diana tal y como se describe anteriormente [Ferrara *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 161, 851-859 (1989)]. Brevemente, las células se pusieron en placas en poca cantidad (7000 células/pocillo) en placas de 12 pocillos y se incubaron durante toda la noche en medio de Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero de ternera al 10%, glutamina 2 mM y antibióticos. Al día siguiente se cambió el medio, y el VEGF y los mutantes de VEGF, diluidos en un medio de cultivo en concentraciones que variaban de 100 ng/ml hasta 10 µg/ml, se pusieron en capas por duplicado sobre las células sembradas. Tras la incubación durante 5 días a 37°C, se disociaron las células con tripsina, y se cuantificaron utilizando un contador Coulter.

10

Aislamiento del ADNc de VEGF

15 Se extrajo el ARN total [Ullrich *et al.*, Science 196, 1313-1317 (1977)] de células foliculares pituitarias bovinas [obtenidas tal y como se describe en Ferrara *et al.*, Meth. Enzymol. *supra*, y Ferrara *et al.*, Am. J. Physiol., *supra*] y se aisló la fracción de ARNm poliadenilada mediante cromatografía con oligo(dT)-celulosa. Aviv *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412 (1972). Se preparó el ADNc [Wickens *et al.*, J. Biol. Chem. 253, 2483-2495 (1978)] mediante el cebado con dT₁₂₋₁₈ o un hexámero dN₆ aleatorio. Se sintetizó el ADNc de doble cadena utilizando un kit de ADNc de Amersham, y el ADNc resultante se subclonó en Igt10 dividido con *EcoRI* tal y como se ha descrito [Huynh *et al.*, DNA Cloning Techniques, A Practical Approach, Glover ed. (IRL, Oxford, 1985)], excepto que se utilizaron enlazadores de *EcoRI* asimétricos [Norris *et al.*, Gene 7, 355-362 (1979)], permitiendo de este modo la necesidad del tratamiento con NcorI metilasa.

25 Se emplató el fago recombinante sobre *E. coli* C600 Hfl [Huynh *et al. supra*] y la réplica se emplató sobre filtros de nitrocelulosa. Benton *et al.*, Science 196, 180-182 (1977). Se hibridaron estas réplicas con una sonda de oligonucleótidos sintéticos marcada con ³²P [Taylor *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 442, 324-330 (1976)] de la secuencia: 5'-CCTATGGCTGAAGGCGGCCAGAAGCCTCACGAAGTGGTGAAGTTCATGGACGTGTATCA-3' a 42°C en formamida al 20%, 5 x SSC, fosfato de sodio 50 mM a pH 6,8, pirofosfato de sodio al 0,1%, 5 x de solución de Denhardt, y 50 mg/ml de ADN de esperma de salmón, y se lavaron en 2 x SSC, SDS al 0,1 % a 42°C.

30

Se identificó un clon positivo, designado como I.vegf.6. Este clon, marcado con ³²P, se utilizó como una sonda para cribar una biblioteca de ADNc de placenta humana cebada con oligo-dT, y se observaron los clones positivos. Cuando se cribó una biblioteca de ADNc de pituitaria humana con el mismo clon marcado, no se detectaron clones positivos.

35 Se determinó la secuencia de nucleótidos completa del clon I.vegf.6 mediante el procedimiento de finalización de la cadena con didesoxioligonucleótido [Sanger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977)] después de la subclonación en el vector pRK5. La secuencia obtenida, junto con la secuencia de aminoácidos implicada, incluía la secuencia señal.

40

Expresión del Gen que Codifica VEGF en Células de Mamífero

El vector de expresión final, pRK5.vegf.6, se construyó a partir de I.vegf.6 y pRK5. A continuación, se describe en detalle la construcción de pRK5 y pRK5.vegf.6.

45

A. Construcción de pRK5

A.1. Construcción de pF8CIS

50

A continuación se describe la construcción inicial en tres partes del plásmido de partida pF8CIS. 1) El marcador de resistencia a ampicilina y el origen de la replicación del vector final derivaban del plásmido de partida pUC13pML, una variante del plásmido pML (Lusky, M. y Botchen, M., Nature, 293, 79 [1981]). El pUC13pML se construyó mediante la transferencia del polienlazador de pUC13 (Vieira, J. y Messing, J., Gene, 19, 259 (1982)) a los sitios *EcoRI* y *HindIII* de pML. Un segundo plásmido de partida pUC8-CMV fue el origen del potenciador, el promotor y la secuencia dadora por "splice" de CMV. El pUC8-CMV se construyó mediante la inserción de aproximadamente 800 nucleótidos para el potenciador, el promotor y la secuencia dadora por "splice" de CMV en los sitios con extremos romos de *PstI* y *SphI* de pUC8. Vieira, J. y Messing, J., *op. cit.* Los enlazadores sintéticos *BamHI-HindIII* (disponibles comercialmente en New England Biolabs) se unieron al extremo de *BamHI* cohesivo creando un sitio *HindIII*. Después de esta unión se realizó un digesto de *HindIII-HincII*. Este digesto produjo un fragmento de aproximadamente 800 pb que contenían el potenciador, el promotor y el sitio dador por "splice" de CMV. Después del aislamiento del gel, este fragmento de 800 pb se unió a un trozo de 2900 pb de pUC13pML. El fragmento requerido para la construcción de pF8CIS se obtuvo mediante la digestión del plásmido intermedio anterior con *SalI* y *HindIII*. Este trozo de 3123 pb contenía el marcador de resistencia para ampicilina, el origen de replicación de pUC13pML, y las secuencias de control para el CMV, incluyendo el potenciador, el promotor y el sitio dador por "splice".

65

ES 2 309 990 T3

2) El intrón de la región variable de Ig y la secuencia aceptora por “splice” se construyó utilizando un oligómero sintético. Se sintetizaron químicamente un oligómero de 99 nucleótidos y un oligómero de 30 nucleótidos que tenían la secuencia siguiente para el intrón de IgG y el sitio aceptor por “splice” (Bothwell *et al.*, Nature, 290, 65-67 [1981]):

5
1 5' AGTAGCAAGCTTGACGTGTGGCAGGCTTGA...
31 GATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGA...
10 60 CATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGT...
88 GTCCACTCCCAG 3'
1 3' CAGGTGAGGGTGCAGCTTGACGTCGTCGGA 5'

15 La ADN polimerasa I (fragmento Klenow) relleno la pieza sintética y creó un fragmento de cadena doble. Wartell, R.M. and W.S. Reznikoff, Gene, 9, 307 (1980). A esto le siguió un digesto doble de *PstI* y *HindIII*. Este enlazador sintético se clonó en pUC13 (Veira and Messing, *op. cit.*) en los sitios *PstI* and *HindIII*. Los clones que contenían el oligonucleótido sintético, pUC1g.10 marcado, se digirieron con *PstI*. Se añadió un sitio *Clal* a este fragmento mediante el uso de un enlazador *PstI-Clal*. Después de la digestión con *HindIII* se aisló del gel un trozo de 118 pb que contenía parte del intrón de Ig y el aceptor por “splice” de la región variable de Ig.

25 3) La tercera parte del esquema de construcción reemplazó el extremo 3' del antígeno de la superficie de la hepatitis por el sitio de poliadenilación y el sitio de finalización de transcripción de la región temprana de SV40. Un vector, pUC.SV40, que contenía las secuencias de SV40 se insertó en pUC8 en el sitio *BamHI* descrito por Vieira y Messing, *op. cit.* A continuación, se digirió pUC.SV40 con *EcoRI* y *HpaI*. A partir de este digesto se aisló del gel un fragmento de 143 pb que contenía la secuencia de poliadenilación de SV40. Tras la digestión de of pSVE.8c1D se aislaron del gel dos fragmentos adicionales. (Publicación de Patente Europea No. 160,457). El fragmento de 4,8 kb generado por la digestión con *EcoRI* y *Clal* contiene la unidad de transcripción de SV40-DHFR, el origen de replicación de pML y el marcador de resistencia a ampicilina. El fragmento de 7,5 kb producido después de la digestión con *Clal* y *HpaI* contiene el ADNc para el Factor VIII. La unión de las tres partes produjo pSVE.8c24D. Este plásmido intermedio se digirió con *Clal* y *SaII* para dar un fragmento de 9611 pb que contiene el ADNc para el Factor VIII con una poli A de SV40 seguida por la unidad de transcripción de DHFR de SV40.

35 Para producir pF8CIS la unión final de las tres partes utilizó: a) el fragmento de *SaII-HindIII* de 3123 pb que contenía el origen de replicación, el marcador de resistencia a ampicilina, y el potenciador, el promotor y el sitio dador por “splice” de CMV; b) el fragmento de *HindIII-Clal* de 118 pb que contenía el intrón de Ig y el sitio aceptor por “splice”; y c) un fragmento de *Clal-SaII* de 9611 pb que contenía el ADNc para el Factor VIII, el sitio de poliadenilación de SV40, y la unidad de transcripción de DHFR de SV40.

40 A.2. Construcción de cCIS2.8c28D

pCIS2.8c28D comprende una subunidad de 90 kd del Factor VIII unido a una subunidad de 73 kd del Factor VIII. La subunidad de 90 kd comprende los aminoácidos 1 a 740 y la subunidad de 73 kd los aminoácidos 1690 a 2332. Esta construcción se preparó mediante una unión de tres partes de los siguientes fragmentos: a) el fragmento de *Clal-SstII* de 12617 pb de pF8CIS (aislado de una cepa dam y tratado con BAP); b) el fragmento de *SstII-PstI* de 216 pb de pF8CIS; y c) un oligonucleótido sintético corto de *PstI-Clal* que se quinasó.

50 La Figura 4 también muestra la subclonación de los fragmentos de *BamHI-HindIII* de 408 pb y de *BamHI-PstI* de 416 pb de pSVEFVIII (Publicación de Patente Europea No. 160,457) que contenía las regiones de ADN 5' y 3' del Factor VIII para fusionarse para formar pCIS2.8c28D.

55 La Figura 5 muestra la unión de tres partes utilizada para construir la región de fusión de pCIS2.8c28D. Se clonaron dos fragmentos diferentes, A y B, en el mismo vector pUC1 18*BamHI-PstI* BAP. El fragmento A era el fragmento de *BamHI-HindIII* de 408 pb de pUC408BH y el fragmento B era un oligonucleótido de *HindIII-PstI*. Este oligonucleótido se utilizó sin quinasar para evitar su polimerización durante la unión.

Tras la unión de los fragmentos A y B en el vector, las secuencias de unión esperadas se confirmaron mediante secuenciación de ADN de las regiones comprendidas por los nucleótidos.

60 El plásmido resultante, pCIS2.8c28D, se construyó con una unión de cuatro partes. Se cortó el plásmido de fusión con *BamHI* y *PstI* y se aisló el fragmento de 443 pb. Los tres fragmentos restantes de la unión de cuatro partes fueron: 1) *Clal-BamHI* de 1944 pb de pSVEFVIII (Publicación de Patente Europea No. 160,457); 2) un fragmento de *BamHI-XbaI* de 2202 pb de pSVEFVIII, que fue adicionalmente digerido parcialmente con *PstI* y se aisló el fragmento de *PstI-XbaI* de 1786 pb, y 3) el fragmento con BAP de *XbaI-Clal* de 5828 pb de pCIS2.8c24D. Se determinó la secuencia de ADN traducida de la variante resultante en la región de unión de fusión exacta de pCIS2.8c28D y se correlacionó.

ES 2 309 990 T3

A.3. Construcción de pRK5

El plásmido de partida para la construcción de pRK5 fue pCIS2.8c28D. Los números de bases en los párrafos 1 a 6 se refieren a pCIS2.8c28D con la base uno de la primera T del sitio *EcoRI* anterior al promotor de CMV. El promotor temprano y el intrón de citomegalovirus y el origen de y la señal poli A SV40 se colocaron en plásmidos separados.

1. El promotor temprano del citomegalovirus se clonó como un fragmento *EcoRI* a partir de pCIS2.8c28D (9999-1201) en el sitio *EcoRI* de pUC118 descrito anteriormente. Se seleccionaron doce colonias y se cribaron por la orientación en la cual el ADN de una sola cadena fabricado a partir de pUC118 permitiría la secuenciación a partir del sitio *EcoRI* en 1201 hasta el sitio *EcoRI* en 9999. Este clon fue llamado pCMVE/P.

2. Se fabricó ADN de una sola cadena a partir de pCMVE/P con el objetivo de insertar un promotor de SP6 (Green, MR *et al.*, Cell 32, 681-694 [1983]) mediante mutagénesis dirigida de sitio. Se utilizó un oligómero sintético de 110 nucleótidos que contenía las secuencias desde -69 hasta +5 del promotor de SP6 (véase Nucleic Acids Res., 12, 7041 [1984]) junto con fragmentos de 18 pb en cualquier extremo del oligómero correspondiente a las secuencias de CMVE/P. La mutagénesis se realizó mediante técnicas estándar y se cribó utilizando un oligonucleótido de 110 nucleótidos marcado a alta y baja astringencia. Se seleccionaron y se secuenciaron seis clones potenciales. Se identificó un clon positivo y se marcó como pCMVE/PSP6.

3. Se comprobó el promotor de SP6 y se observó que era activo, por ejemplo, mediante la adición de ARN polimerasa de SP6 y la comprobación del ARN del tamaño adecuado.

4. Se sintetizó un adaptador de *Cla-NotI-Sma* para comprender la localización desde el sitio de *ClaI* (912) hasta el sitio *SmaI* de pUC118 en pCMVE/p (etapa 1) y pCMVE/PSP6 (etapa 2). Este adaptador se unió en el sitio *ClaI-SmaI* de pUC118 y se cribó para obtener los clones correctos. Se secuenció el enlazador en ambos y los clones se marcaron como pCMVE/PSP6-L y pCMVE/P-L.

5. Se cortó el pCMVE/PSP6-L con *SmaI* (en la unión enlazador/pUC118) y *HindIII* (en pUC118). Se insertó un fragmento de *HpaI* (5573)-a-*HindIII* (6136) de pSVORAADRI 11, descrito más adelante, en *SmaI-HindIII* de pCMVE/PSP6-L. Se cribó esta unión y se aisló un clon y se denominó pCMVE/PSP6-L-SVORAADRI.

a) El origen y la señal de poliA de SV40 se aislaron como el fragmento *XmnI* (5475) - *HindIII* (6136) de pCIS2.8c28D y se clonó en los sitios de *HindIII* a *SmaI* de pUC119 (descrito en in Vieira y Messing, *op. cit.*). Este clon se denominó pSVORAA.

b) Se extrajo el sitio de *EcoRI* en 5716 mediante la digestión parcial con *EcoRI* y se rellenó con Klenow. Se cribaron las colonias obtenidas a partir de la auto-unión tras el relleno y se aisló el clon correcto y se denominó pSVORAADRI 11. Se comprobó el sitio de *EcoRI* eliminado mediante secuenciación y se demostró que era correcto.

c) Se aisló el fragmento desde *HpaI* (5573) a *HindIII* (6136) de pSVORAADRI 11 y se insertó en pCMVE/PSP6-L (ver párrafo 4).

6. Se cortó el pCMVE/PSP6-L-SVOrAADRI (etapa 5) con *EcoRI* en 9999, se quitaron los extremos y se auto-unió. Se identificó un clon sin un sitio *EcoRI* y se denominó pRK.

7. Se cortó pRK con *SmaI* y *BamHI*. Se rellenó con Klenow y se relegó. Se cribaron las colonias. Se identificó un clon positivo y se denominó pRKDBam/Sma3.

8. El sitio *HindIII* de pRKDBam/Sma3 se convirtió en un sitio *HpaI* utilizando un conversor. (Un conversor es una pieza de ADN utilizada para cambiar un sitio de restricción por otro. En este caso un extremo sería complementario con un extremo "pegajoso" de *HindIII* y el otro extremo tendría un sitio de reconocimiento para *HpaI*). Se identificó un clon positivo y se denominó pRKDBam/Sma, HIII-*HpaI* 1.

9. Se cortó pRKDBam/Sma, HIII-*HpaI* 1 con *PstI* y *NotI* y se unió en el mismo un enlazador de *EcoRI-HindIII* y un enlazador de *HindIII-EcoRI*. Se encontraron clones para cada enlazador. No obstante, también se determinó que habían entrado demasiados conversores de *HpaI* (dos o más conversores generan un sitio *PvuII*). Por lo tanto, estos clones tuvieron que cortarse con *HpaI* y se auto-unieron.

10. Se cortaron el clon 3 de RI-HIII y el clon 3 de HIII-RI con *HpaI*, se diluyeron y se autounieron. Se identificaron los positivos. El clon de RI-HIII se denominó pRK5.

B. Construcción de pRK5.vegf.6

El clon I.vegf.6 se trató con *EcoRI* y la inserción de *EcoRI* se aisló y se unió dentro en el fragmento del vector de pRK5 obtenido mediante la digestión de pRK5 con *EcoRI* y el aislamiento del fragmento grande. La unión de dos partes de estos fragmentos produjo el vector de expresión, pRK5.vegf.6, que se cribó por la correcta orientación de la secuencia que codifica VEGF con respecto al promotor.

ES 2 309 990 T3

Pueden obtenerse detalles adicionales concernientes a la construcción del vector pRK5 básico en la Patente de Estados Unidos 5.332.671 concedida el 26 de julio de 1994.

Ejemplo 2

5

El siguiente ejemplo detalla l metodología utilizada generalmente para preparar diversos mutantes cubiertos por la presente invención. El vector de expresión básico se preparó tal como se indica a continuación:

10 Se obtuvo el vector SDVF₁₆₅ que contenía el ADNc de VEGF₁₆₅ y se representa en la figura 13 de la presente invención. El ADNc para VEGF₁₆₅ se aisló de SDVF₁₆₅ mediante digestión por restricción con HindIII y EcoRI.

15 Esta inserción aislada se unión en el plásmido pRK5 aprovechando la existencia en el mismo de los sitios Eco RI y Hind III - véase la construcción tal como se representa en la figura 14 de la presente invención. El plásmido resultante se transformó en células de *E. coli* Cj236 competentes para fabricar una plantilla para una mutagénesis dirigida de sitio. El oligonucleótido correspondiente que contenía el sitio mutado se preparó a continuación - ver a continuación - y se realizó la etapa de mutagénesis dirigida de sitio *in vitro* según procedimientos conocidos utilizando el kit de mutagénesis Bio-Rad Muta-Gene. Después de la secuenciación para determinar que el sitio mutagenizado se incorporó en el vector de expresión final, el vector resultante se transfectó en células 293 de riñón humano para la expresión transitoria. En la figura 15 se hace referencia al respecto proporcionando una representación general de la construcción de dichos vectores de expresión.

20

Se prepararon los siguientes oligonucleótidos con el fin de fabricar el producto mutado final. La Tabla 2 proporciona dicha información.

25

TABLA 2

MUTACIÓN	SECUENCIA 5'----3'
E5A	CCCTCCTCCGGCTGCCATGGGTGC
H11A, H12A, E13A	CTTCACCACGGCGGCATTCTGCCCTCC
K16A, D19A	CTGATAGACGGCCATGAAGGCCACCACTTCGTG
35 R23A	GCAGTAGCTGGCCTGATAGACATC
H27A, E30A	CACCAGGGTGGCGATTGGGGCGCAGTAGCTGCG
D34A, E38A	ATCAGGGTAGGCCTGGAAGATGGCCACCAGGGTCTC
40 D41A, E42A, E44A	GAAGATGTAGGCGATGGCGGCAGGGTACTCCTG
K48A	ACAGGATGGGGCGAAGATGTACTC
R56A	GCCCCGCAGGCCATCAGGGGCAC
45 D63, AE64, AE67A	GGGCACACAGGCCAGGCCGGCGGCATTGCAGCAGCC
E72A, E73A	GATGTTGGAGGCGGCAGTGGGCACACA
R82A, K84A, H86A	CTGGCCTTGGGCAGGGGCGATGGCCATAATCTGCAT
50 H90A, E93A	GAAGCTCATGGCTCCTATGGCCTGGCCTTGGTG
H99A, K101A	GCATTACAGGCGTTGGCCTGTAGGAAGCT
E103A	TGGTCTGCAGGCACATTTGTTGTG
55 K107A, K108A, D109A, R110A	TTGTCTTGCGGCGGCGGCGGCTGGTCTGCATTC
K107A, K108A	TGCTCTATCGGCGGCTGGTCTGCATTC
60 D109A, R110A	TTGTCTTGCGGCGGCTTTCTTTGGTCT
R105A	TTTCTTTGGGGCGCATTACATTT
R112A, E114A	ACAGGGATTGGCTTGGGCTGCTCTATCTTT
65 N75A	CATGGTGATGGCGGACTCCTCAGT
H12T	CACCACTTCGGTATGATTCTGCC

ES 2 309 990 T3

5	E64T	CTCCAGGCCGGTGTTCATTGCAGCA
	D143T	GCAACGCGAGGTTGTGTTTTTGCA
	R156T	TCTGCAAGTGGTTTCGTTTAACTC
	H11A	CACCACTTCGTGGGCATTCTGCCCTCC
10	H12A	CTTCACCACTTCGGCATGATTCTGCCC
	E13A	GAACTTCACCACGGCGTGATGATTCTG
	K16A	GACATCCATGAAGGCCACCACTTCGTG
15	D19A	GCGCTGATAGACGGCCATGAACTTCACCAC
	H27A	GGTCTCGATTGGGGCGCAGTAGCTGCG
20	D34A	CTCCTGGAAGATGGCCACCAGGGTCTC
	E38A	CTCATCAGGGTAGGCCTGGAAGATGTC
	D41A	GTAATCGATCTCGGCAGGGTACTCCTG
25	E30A	GTCCACCAGGGTGGCGATTGGATGGCA
	E42A	GATGTACTCGATGGCATCAGGGTACTC
30	E44A	CTTGAAGATGTAGGCGATCTCATCCAG

35 De este modo, preparados según la inserción de los oligonucleótidos indicados en la Tabla 2 anterior, columna izquierda, se preparan en la correspondiente mutación en la molécula de VEGF según la notación indicada en la columna izquierda titulada "Mutación". La denominación del compuesto se corresponde con la convención para las denominaciones. De este modo, para la primera entrada, a la mutación se hace referencia como "E5A". Esto significa que en la posición 5 de la molécula de VEGF el ácido glutámico (E) se mutó para insertar una alanina (A) en la posición 5.

40 Según lo anterior, también se insertaron las siguientes mutaciones en la molécula de VEGF.

45 TABLA 3

50	N62A	K84E
	G65A	H86E
	L66A	R82E, K84E, H86E
55	M78A	
	Q79A	
60	I80A	

65

ES 2 309 990 T3

5 M81A
 I83A
 P85A
 Q87A
 G88A
 10 Q89A
 I91A
 G92A
 15 H27A
 D63K
 E64R
 20 E67K
 D63K, E64R, E67K
 25 R82E

30 Los efectos de dichas mutaciones dirigidas por sitio en la molécula de VEGF se indican en las Tablas 4 y 5 de la presente invención:

TABLA 4

Variantes de VEGF humano		Concentración inhibidora en la mitad del máximo (ng/ml)		Concentración eficaz en la mitad del máximo (ng/ml)
Promedio	Mutación	KDR-IgG	FLT-IgG	Células endoteliales
63	D63A	0,18	1,54	2,47
64	E64A	8,0	0,94	1,65
64	E64S		1,90	6,25
64,7	D63A, E64A, E67A	2,8	44,6	1,05
65	E64N, L66S		35,6	2,70
67	E67A	0,61	0,47	1,99
82	R82A	0,87	1,23	1,95
83	RIK(82-84)NLS	> 10000	1,63	> 100
84	K84A	6,3	1,91	2,00
84	R82A, K84A, H86A	1340	1,70	19,8

ES 2 309 990 T3

86	H86A	2,0	1,19	1,75	
5	natural	VEGF (célula CHO)	1,32	0,95	0,54
10	natural	VEGF (célula 293)	1,14		1,08
Número de residuo promedio					
La secuencia en negrita indica las mutaciones que potencialmente alteran la glicosilación de VEGF					

TABLA 5

Variantes de VEGF humano		Concentración inhibidora en la mitad del máximo (ng/ml)		Concentración eficaz en la mitad del máximo (ng/ml)
Promedio	Mutación	KDR-IgG	FLT-IgG	Células endoteliales
5	E5A			0,88
12	H11A, H12A, E13A	1,2	0,62	2,55
17,5	K16A, D19T	2,1	0,73	2,05
23	R23A	2,0	1,0	2,40
27	H27A	na.	na.	na.
30	E30A			0,92
34	D34A	0,54	0,59	1,23
38	E38A	0,41	0,87	0,95
41	D41A			0,65
42	E42A	0,26	0,51	0,77
43	E42N, E44S	0,59	0,77	1,00
44	E44A	0,17	0,54	0,49
48	K48A	0,77	1,08	1,09
56	R56A	na.	na.	na.
72,5	E72A, E73A	1,3	0,91	1,75
75	N75A		1,26	0,44
91,5	H90A, E93A	1,3	0,77	1,28
100	H99A, K101A	1,26	1,33	1,25

ES 2 309 990 T3

103	E103A	2,34	0,74	1,25
105	R105A	1,63	1,57	3,20
107,5	K107A, K108A	2,99	2,94	0,95
108,5	KKDR(107-110)AAAA	2,94	2,42	1,00
109,5	D109A, R110A	1,17	1,42	
113	R112A, E114A	1,52	0,56	1,10
natural	VEGF (célula CHO)	1,32	0,95	0,54
natural	VEGF (célula 293)	1,14		1,08
Número de residuo promedio				
La secuencia en negrita indica las mutaciones que potencialmente alteran la glicosilación de VEGF				

Los datos presentados anteriormente en las Tablas 4 y 5 también se pueden expresar como la concentración inhibidora en la mitad del máximo en pM y la concentración eficaz en la mitad del máximo en pM tal como se indica en la Tabla 6:

TABLA 6

Efectos de las mutaciones dirigidas por sitio en VEGF				
Variantes de VEGF humano		Concentración inhibidora ¹ en la mitad del máximo (pM)		Concentración eficaz en la mitad del máximo (pM)
Promedio ²	Mutación ³	KDR-IgG	FLT-IgG	Células endoteliales
5	E5A	37 ± 1	22 ± 1	23 ± 2
12	H11A, H12A, E13A	31 ± 2	20 ± 1	61 ± 6
17,5	K16A, D19T	26 ± 3	19 ± 1	53 ± 14
23	R23A	51 ± 1	30 ± 2	63 ± 5
27	H27A	na.	na.	na.
30	E30A	29 ± 1	28 ± 1	24 ± 1
34	D34A	14 ± 4	11 ± 2	30 ± 1
38	E38A	11 ± 1	15 ± 2	29 ± 8

ES 2 309 990 T3

	41	D41A	36 ± 1	22 ± 1	17 ± 1
	42	E42A	7 ± 1	8 ± 1	20 ± 3
5	43	E42N, E44S	15 ± 1	13 ± 1	27 ± 14
	44	E44A	4 ± 1	9 ± 1	13 ± 1
	48	K48A	20 ± 10	26 ± 1	29 ± 6
10	56	R56A	na.	na.	na.
	63	D63A	5 ± 2	26 ± 1	64 ± 23
15	64	E64A	208 ± 5	16 ± 1	43 ± 5
	64,7	D63A, E64A, E67A	73 ± 9	780 ± 120	24 ± 4
20	65	E64N, L66S	153 ± 11	980 ± 5	82 ± 12
	67	E67A	16 ± 1	8 ± 1	52 ± 19
25	natural	VEGF (célula CHO)	28 ± 1	19 ± 1	16 ± 8
	natural	VEGF (célula 293)	30 ± 4	22 ± 2	28 ± 10
30	72,5	E72A, E73A	33 ± 1	30 ± 2	46 ± 12
	75	N75A	23 ± 17	22 ± 1	11 ± 2
35	82	R82A	32 ± 3	20 ± 1	38 ± 9
	83	RIK(82-84)NLS	> 100000	29 ± 5	> 2000
	84	K84A	167 ± 6	24 ± 3	54 ± 5
40	84	R82A, K84A, H86A	> 10000	48 ± 3	520 ± 150
	86	H86A	53 ± 1	15 ± 1	43 ± 13
45	91,5	H90A, E93A	34 ± 1	26 ± 1	33 ± 8
	100	H99A, K101A	34 ± 5	30 ± 3	33 ± 1
50	103	E103A	61 ± 4	17 ± 1	33 ± 6
	105	R105A	42 ± 5	38 ± 1	84 ± 34
	107,5	K107A, K108A	78 ± 7	66 ± 3	25 ± 6
55	108,5	KKDR(107- 110)AAAA	77 ± 4	54 ± 5	26 ± 3
	109,5	D109A, R110A	30 ± 3	35 ± 1	20 ± 1
60	113	R112A, E114A	40 ± 2	13 ± 2	29 ± 5
	natural	VEGF (célula	28 ± 1	19 ± 1	16 ± 8

65

ES 2 309 990 T3

	CHO)			
5	natural VEGF (célula 293)	30 ± 4	22 ± 2	28 ± 10
10	¹ Los valores para IC50 en los estudios de unión de KDR-IgG y FLT-IgG son en ausencia de heparina (15 µg/ml) Los errores asociados con estos valores son ± S.E.M.			
15	² Número de residuo promedio indica la posición promedio de la mutación o mutaciones.			
20	³ La secuencia en negrita indica las mutaciones que potencialmente alteran la glicosilación de VEGF			

Se entenderá que un experto en la materia siguiendo los detalles anteriores concernientes a la preparación de diversos mutantes de la presente invención puede preparar otras mutaciones de la molécula de VEGF de acuerdo con los parámetros generales de la presente invención tal y como se expone en detalle anteriormente. Obsérvense las Figuras 16 a 18 en las que se proporcionan datos sobre las actividades biológicas de un número de variantes.

Comparación de las secuencias de VEGF, PLGF y PDGF - La plasmina cataliza la división del carboxi terminal, la región de unión a heparina (111-165) que libera el dímero VEGF₁₁₀ que muestra bioactividad en el ensayo de crecimiento celular endotelial y en el ensayo de permeabilidad de Miles [Houck *et al.*, J. Biol. Chem. 267, 26031-26037 (1992)]. Como tal, se comparó la secuencia de la región de unión del receptor de VEGF (es decir 1-110) con secuencias de proteínas homólogas, PLGF, PDGFa y PDGFb. Se alinearon las secuencias con respecto a las ocho cisteínas compartidas por esta familia de proteínas. Seis cisteínas forman puentes disulfuros en el interior de la cadena y dos cisteínas son enlaces covalentes entre cadenas entre monómeros según la homología con PDGFb [Haniu *et al.*, Biochemistry 32, 2431-2437 (1993) y Pötgens *et al.*, J. Biol. Chem. 269, 32879-32885 (1994)]. Dos espacios cortos, insertados en las secuencias de VEGF y PLGF, se localizan en el ápice de los bucles externos en base a la estructura cristalina del dímero de PDGFb [Oefner *et al.*, The EMBO J. 11, 3921-3926 (1992)]. VEGF₁₁₀ comparte un 47%, 15%, y 19% de identidad en la secuencia y un 63%, 24%, y 28% de similitud con PLGF, PDGFa y PDGFb, respectivamente [George *et al.*, Meth. Enzymol. 183, 333-351 (1990)]. La inspección de la similitud y la divergencia de secuencia entre estos factores de crecimiento ofrece una pequeña información acerca de los epítomos específicos que median la unión del receptor de VEGF. El mapeo funcional de VEGF se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida de sitio.

Mutagénesis de rastreo agrupado cargado en alanina - Se construyeron treinta mutantes de VEGF₁₆₅ mediante mutagénesis dirigida de sitio donde los grupos de entre uno y cuatro aminoácidos próximos cargados (Arg, Lys, His, Asp, y Glu) se reemplazaron con alanina (Tabla 6). El ADN plásmido que codifica estos mutantes se transfirió de manera transitoria en células 293 de riñón humano y se determinó la cantidad de VEGF en el medio celular condicionado utilizando dos ensayos inmunoquímicos específicos de VEGF. En la Figura 19 los resultados de un ELISA policlonal/monoclonal se comparan con aquellos obtenidos con un ensayo monoclonal dual. En el ensayo policlonal/monoclonal, el anticuerpo policlonal purificado por afinidad reaccionó con múltiples epítomos, mientras que el anticuerpo monoclonal 5F8 es específico para determinantes en el carboxi terminal, la región de unión de heparina (111-165) de VEGF. En cambio, el ELISA monoclonal dual utilizó anticuerpos monoclonales neutralizantes y no neutralizantes (Mabs A4.6.1 y 5F8, respectivamente). El uso de dos procedimientos de detección inmunoquímicos ayudó en la determinación exacta de la concentración de VEGF mutante en el medio celular condicionado. Para la mayoría de mutantes de VEGF, los resultados de los dos análisis inmunoquímicos concordaban con los niveles de expresión transitoria que variaban de 0,2 a 2 µg/ml de antígeno de VEGF en el medio condicionado. Casi todos los mutantes de VEGF se expresaron con un rendimiento variable para transfecciones repetitivas, con la excepción destacada del mutante R56A de VEGF. No se detectó ninguna proteína inmunopositiva con la mutación R56A a pesar de la reconstrucción de la variante y numerosos intentos de transfección. Es interesante indicar que la arginina se conserva rigurosamente en la posición 56 en VEGF, PLGF y PDGF, sugiriendo que este aminoácido juega un papel vital en la integridad estructural y/o el plegamiento de la proteína nativa. De un modo significativo, las mutaciones en la región del 82 al 86 fueron sistemáticamente cuantificados a la baja en el ELISA monoclonal dual en comparación con los resultados obtenidos con el ensayo policlonal/monoclonal, indicando que el epítomo reconocido por el anticuerpo monoclonal neutralizante, A4.6.1, incluye este determinante en VEGF. La sustitución de un solo aminoácido, R82A, produce un mutante de VEGF que muestra una pérdida casi completa de reactividad inmunoquímica con Mab A4.6.1 (Figura 19). Además, las mutaciones de VEGF H90A, E93A mostraron una pérdida parcial de reactividad con Mab A4.6.1. Estos datos sugieren que el epítomo de un anticuerpo monoclonal neutralizante se localiza en una región de VEGF que incluye a los aminoácidos de 82 a 93.

Análisis SDS-PAGE no Reductor de Mutantes de VEGF - Se analizó un grupo representativo de sobrenadantes transfectados de manera transitoria (de células 293) que contenían aproximadamente de 10 a 20 ng de VEGF o mutante de VEGF mediante SDS-PAGE no reductor. Se transfirieron y se “mancharon” los geles tal y como se describe anteriormente utilizando un grupo de 5 anticuerpos de VEGF₁₆₅ anti-humanos monoclonales murinos. La autorradiografía de las inmunotransferencias indicó una banda mayor a 45 kDa para las formas natural y mutante de VEGF. Esta banda de proteína inmunopositiva migró conjuntamente con el VEGF₁₆₅ dimérico purificado, derivado de células CHO. Para algunos mutantes de VEGF, y para el VEGF natural derivado de células 293 (pero no el VEGF derivado de células CHO), apareció una banda menor adicional en aproximadamente 70 kDa. Los pesos moleculares aparentes para todos los mutantes de VEGF del rastreo de alanina, tal y como indica mediante SDS-PAGE, eran equivalentes a los observados para VEGF₁₆₅ natural derivado de células 293 o células CHO. No hubo indicios de formas degradadas de VEGF que produjeran especies de peso molecular menor tal y como se ha observado para la división por plasmina de VEGF [Houck *et al.*, J. Biol. Chem. 267, 26031-26037 (1992) y Keyt *et al.*, The VIIIth International Symposium on the Biology of Vascular Cells; Heidelberg, Germany, p. 48 (1994)].

La unión de VEGF con el receptor KDR está mediada principalmente por R82, K84, y H86 - La unión de mutantes de VEGF con KDR-IgG soluble se evaluó mediante desplazamiento competitivo de VEGF₁₆₅ marcado con ¹²⁵I en ausencia o presencia de heparina. En la Tabla 6 se indica la lista de mutaciones. Además de las sustituciones de aminoácidos específicos, la tabla indica el número de residuo promedio para la posición de la mutación o mutaciones. Para un mutante dado, este número es el promedio de las posiciones alteradas. En la Figura 6 se muestran los resultados para 27 mutantes de rastreo cargado en alanina de VEGF en estudios de unión a KDR-IgG, representados con respecto a la posición de la mutación o mutaciones. El VEGF₁₆₅ natural expresado en células 293 y en células CHO era equivalente con respecto al desplazamiento de VEGF₁₆₅ marcado con ¹²⁵I en la unión de KDR. Las concentraciones requeridas para conseguir la mitad de la inhibición máxima (IC₅₀) fueron 31 pM y 29 pM para el VEGF₁₆₅ derivado de 293 o CHO, respectivamente (n = 8 réplicas para cada una). Los valores de IC₅₀ para el VEGF natural no fueron significativamente diferentes en ausencia frente a presencia de 15 µg/ml de heparina.

Muchas de las proteínas mutantes mostraron una unión comparable con el VEGF natural. De hecho, la unión a KDR para 19 de los 25 mutantes de rastreo de alanina era similar a la del VEGF natural; la IC₅₀ promedio para mutantes con fenotipo natural fue 29 ± 18 pM (n = 19). No obstante, el efecto más significativo en la unión se observó con el mutantes de VEGF R82A, K84A, H86A que mostró una afinidad disminuida en 1000 veces para el receptor KDR en ausencia de heparina, en relación con la del VEGF natural (Figura 6). De modo interesante, en presencia de heparina la unión de este mutante triple disminuyó sólo 10 veces en comparación con la del VEGF natural. Estos resultados concuerdan con la unión de VEGF a KDR como una función de dos sitios de interacción, un sitio independiente de heparina en el dímero 1-110 y un sitio de unión dependiente de heparina en el dominio 111-165. En ausencia de heparina, la unión de VEGF₁₆₅ a KDR está mediada completamente por la región 1-110. Sin heparina, las mutaciones en 82, 84 y 86 dificultan seriamente la unión de VEGF a KDR. Para evaluar la contribución relativa de los residuos individuales, se construyeron mutantes de VEGF con sustitución de un solo aminoácido. Se observó que las mutaciones individuales, R82A, K84A y H86A mostraban disminuciones más modestas con respecto a la unión de KDR en ausencia de heparina (Figura 10). El VEGF R82A mostró unión de KDR natural, mientras que el VEGF K84A y el VEGF H86A disminuyeron 5,5 veces y 2 veces aproximadamente en la unión en comparación con la del VEGF natural, respectivamente. Todos los mutantes de reemplazo de una sola alanina tuvieron una afinidad de unión normal en presencia de heparina. Mientras que la posición 84 de VEGF era la más dominante en el mutante de alanina triple, la combinación de mutaciones en 82, 84 y 86 mostró claramente un efecto sinérgico en la interacción con el receptor KDR.

Además del determinante de unión de KDR principal, se observó un sitio menor en la región de 63 a 67. El mutante triple VEGF D63A, E64A, E67A se redujo 3 veces en la unión a KDR tanto en presencia como en ausencia de heparina. Las mutaciones de un solo aminoácido en esta región mostraron características diferentes. La unión de tipo natural a KDR se observó para VEGF D63A y VEGF E67A. En cambio, el VEGF E64A tenía una unión disminuida 8 veces y 3 veces en ausencia y en presencia de heparina, respectivamente. Aunque modestos en comparación con los efectos principales observados con VEGF R82A, K84A, H86, los efectos más potentes se observaron con la sustitución de una sola alanina de aminoácidos cargados para VEGF E64A y VEGF K84A.

La Unión de VEGF al Receptor FLT-1 Implica la Interacción con D63, E64 y E67. Tal y como se observa para la unión a KDR, la mayoría de los mutantes de VEGF de rastreo de alanina se unieron a FLT-1 con una afinidad similar a la del VEGF natural (Figura 7). En comparación con KDR, apareció un menor efecto de la heparina en la unión a FLT-1 de VEGF natural o la mayoría de mutantes que mostraban una unión fenotípica natural a FLT-1. Los valores de IC₅₀ para el VEGF natural fueron 22 ± 8 y 15 ± 8 pM en ausencia y presencia de heparina, respectivamente (n = 13). El análisis de mutantes de VEGF de rastreo de alanina indicó dos sitios de interacción con FLT-1 que se localizaron conjuntamente con los determinantes de unión de KDR. Un sitio principal para la unión de FLT-1 implica la región 63 a 67 de VEGF tal y como indicó mediante la reducción de aproximadamente 30 veces en la afinidad con VEGF D63A, E64A, E67A en ausencia de heparina. Esto contrasta con los resultados con KDR que indicaron que las mutaciones en la región 63-67 de VEGF mostraron sólo efectos modestos en la unión de KDR. En presencia de heparina, la unión de VEGF D63A, E64A, E67A a FLT-1 disminuyó aproximadamente 20 veces en comparación con el VEGF natural. El sitio principal de interacción de KDR (la región 82-86) produjo solo efectos menores con respecto a la unión de FLT-1. El VEGF R82A, K84A, H86A se redujo ligeramente en la unión a FLT-1 en presencia o ausencia de heparina. Los sitios mutacionales adicionales en el carboxi terminal se asociaron con efectos menores en la unión de FLT-1. De un modo interesante, el sitio principal que mediaba la interacción con KDR, que se localizaba en la región 82 a 86

ES 2 309 990 T3

de VEGF, mostró sólo un efecto modesto en la unión a FLT-1. En cambio, el sitio principal para la unión a FLT-1 se localizó en la región 63-67 de VEGF, que mostró efectos menores en la unión a KDR. Los roles relativos de los sitios de unión de receptor principal y menor se invierten para FLT-1 en comparación con los de KDR.

5 *El Efecto de la Glicosilación en el la Unión de Receptor* - Se alteraron los sitios de glicosilación de VEGF para confirmar y ampliar los resultados observados con la mutagénesis de rastreo de alanina. En primer lugar, se evaluó el papel de un solo sitio putativo de glicosilación por N en la posición 75 para VEGF. Se construyó una forma no glicosilada de VEGF, se expresó en células 293 y se visualizó mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia (Figura 20). Este mutante, VEGF N75A, pareció que tenía un peso molecular más bajo, lo cual concordaba con la falta de glicosilación en la posición 75, y por deducción, este resultado confirma que el VEGF natural expresado en células 293 contiene efectivamente carbohidrato unido por N en ese sitio. La unión de VEGF N75A fue indistinguible de la del VEGF natural tanto para el receptor soluble KDR como para FLT-1 en presencia y ausencia de heparina. Para la proteína natural, el carbohidrato unido por N en Asn⁷⁵ no parece jugar un papel en la mediación de la unión del receptor de VEGF.

15 Los sitios de neoglicosilación potenciales se insertaron en tres sitios nuevos en VEGF para observar los efectos de adición de carbohidrato en o cerca del sitio putativo de unión del receptor. Los sitios de superficie accesibles se consideraron óptimos en bucles externos o giros tal y como se predijo sobre la base de la estructura cristalina del dímero de pDGFb [Oefner *et al.*, The EMBO J. 11, 3921-3926 (1992)]. Dicho sitio (la región 42-44) se seleccionó como un control ya que no se identificaron determinantes de unión de receptor en esta región mediante mutagénesis de rastreo cargado en alanina. El sitio de neocarbohidratos en VEGF E42N, E44S se glicosiló aparentemente tal y como indica mediante el aumento del peso molecular observado en inmunotransferencias de SDS-PAGE (Figura 20). El carbohidrato unido por N en la posición 42 no interfirió en la unión a los receptores KDR o FLT-1 tal y como indicaron los valores de IC₅₀ de 15 pM y 13 pM, respectivamente.

25 *Sitio de Glicosilación Potencial en la Posición 82 Da Lugar a una Unión a KDR Ampliamente Disminuida* - Las mutaciones de VEGF en el sitio de unión a KDR introdujeron un nuevo sitio de glicosilación potencial unido por N en la posición 82. Se construyó el VEGF RIK(82-84)NLS, se expresó en células 293 y se evaluó mediante inmunotransferencia SDS-PAGE (Figura 20). La extensión de la glicosilación adicional en Asn82 no fue clara en la inmunotransferencia para el VEGF RIK(82-84)NLS en comparación con el cambio en la movilidad electroforética observada con VEGF E42N, E44S. Aunque la mutación RIK(82-84)NLS tenía un efecto pequeño en el peso molecular aparente, el efecto en la unión de KDR fue bastante significativo. El VEGF RIK(82-84)NLS sólo mostró un desplazamiento parcial del VEGF marcado en los ensayos de la unión a KDR en ausencia de heparina (Figura 9A). La concentración en la mitad de la inhibición máxima para VEGF RIK(82-84)NLS se estimó que era 10.000 veces mayor que la observada para VEGF natural. Este mutante que prácticamente no mostró afinidad por el KDR soluble en ausencia de heparina, fue capaz del desplazamiento completo de VEGF en presencia de heparina, aunque a concentraciones más altas. La afinidad relativa de VEGF RIK(82-84)NLS por KDR disminuyó 50 veces en comparación con la del VEGF natural con 15 µg/ml de heparina. De un modo interesante, esta mutación de extra-glicosilación putativa dio como resultado un mutante que mostró una afinidad normal por FLT-1 (Figura 9B). El VEGF RIK(82-84) NLS y el VEGF natural mostraron una afinidad de unión de FLT-1 similar en presencia y ausencia de heparina. Las mutaciones en la región de 82 a 86 (R82A, K84A, H86A y RIK(82-84)NLS) proporcionaron de un modo significativo una menor interacción con KDR y una unión normal a FLT-1. Como tal, el VEGF RIK(82-84)NLS es una variante de VEGF altamente selectiva de FLT-1.

45 *Mutante del Sitio de Extra-glicosilación en la Posición 64 Disminuye la Unión a FLT-1, pero no a KDR* - Se diseñó un mutante de VEGF para introducir un sitio de neo-glicosilación en la región (63-67) que se ha observado que media en la unión a FLT-1. Se construyó VEGF E64N, L66S, se expresó en células 293 y se evaluó mediante inmunotransferencia para demostrar la glicosilación. Se observó VEGF E64N, L66S como una banda tenue con un claro aumento del peso molecular en SDS-PAGE (Figura 20). Los estudios de unión indicaron que VEGF E64N, L66S se redujo 40 veces en la unión a FLT-1 en ausencia de heparina (Figura 9B). En contraste con los resultados observados con las mutaciones específicas para KDR en la región 82-86, el mutante de extraglicosilación putativo (VEGF E64N, L66S) mostró una afinidad de unión a FLT-1 similar al del mutante triple de VEGF (D63A, E64A, E67A). Como con el mutante triple correspondiente, VEGF E64N, L66S mostró un cambio pequeño en la unión a FLT-1 dependiendo de la presencia frente a la ausencia de heparina (IC₅₀: 650 pM frente 980 pM, respectivamente). Los mutantes que tenían efectos específicos sobre FLT-1 mostraron unión modestamente disminuida con el receptor KDR. La unión relativa de VEGF D63A, E64A, E67A y VEGF E64N, L66S a KDR soluble disminuyó aproximadamente 3 veces y 6 veces, respectivamente. Las mutaciones en la región 63-67 de VEGF proporcionan selectividad por KDR debido a que estos mutantes se unen a KDR de modo similar a VEGF natural, pero disminuye la unión a FLT-1.

60 *Los Mutantes de VEGF con una menor Unión a Receptor KDR son Mitógenos de Células Endoteliales Débiles* - Las actividades mitogénicas de VEGF y de mutantes de VEGF se determinaron utilizando células endoteliales capilares corticales adrenales bovinas. El VEGF natural, derivado de células 293 o de células CHO, indujo una proliferación en la mitad del máximo a 28 ± 10 pM (n = 6) y 16 ± 8 pM (n = 9), respectivamente. El medio celular condicionado de células 293 transfectadas de modo simulado no indujo la proliferación de células endoteliales. Las concentraciones eficaces en la mitad del máximo (EC₅₀) para la mayoría de los mutantes de VEGF fueron similares a las observadas para VEGF natural (Figura 21). El efecto más significativo en la proliferación de células endoteliales se observó con mutaciones en la región 82-86. El EC₅₀ de VEGF R82A, K84A, H86A aumentó hasta 520 ± 150 pM (n = 4) de tal modo que la potencia mitogénica de este mutante disminuyó hasta el 5% de VEGF natural. Para confirmar y ampliar

esta observación, también se evaluó la potencia mitogénica relativa del mutante por el sitio de neo-glicosilación. La inducción de la proliferación por parte de VEGF RIK(82-84)NLS se redujo hasta tal punto que no se consiguió el crecimiento a nivel de VEGF natural a la concentración más alta probada (Figura 11). Para evaluar cuantitativamente la potencia de VEGF RIK(82-84)NLS, se comparó la concentración del mutante requerida para lograr un 20% de estimulación máxima inducida por VEGF. La diferencia en los valores de EC_{20} para VEGF natural y VEGF RIK(82-84)NLS (4 pM frente a 230 pM, respectivamente) indicó una potencia reducida 60 veces para el mutante con un sitio de neo-glicosilación en la región específica para la unión a KDR. El efecto de estas mutaciones sobre el crecimiento de células endoteliales concuerda con los datos de unión a KDR. La afinidad de VEGF R82A, K84A, H86A y VEGF RIK(82-84)NLS con KDR soluble (en presencia de heparina) se redujo 10 veces y 50 veces, respectivamente, en comparación con la observada con VEGF natural. Dado que las células endoteliales *in vitro* expresan sulfatos de heparina asociados a la matriz y a la superficie [Barzu *et al.*, Biochim. Biophys. Acta. 845, 196-203 (1985)], es apropiado comparar la respuesta mitogénica de las células endoteliales a VEGF o mutantes de VEGF con los datos de unión para las proteínas a receptores de VEGF solubles en presencia de heparina. Tomados conjuntamente, el análisis mutacional de VEGF mediante rastreo de alanina y extra-glicosilación proporciona una evidencia consistente de que la unión a los receptores KDR en células endoteliales es un suceso desencadenante para la inducción de la proliferación observada con VEGF.

Los Mutantes de VEGF con una menor Unión al Receptor FLT-1 son Mitógenos de Células Endoteliales Completamente Activos - Las sustituciones por rastreo de alanina en la región 63-67 de VEGF demostraron tener una unión normal a KDR y una unión menor a FLT-1 (Figuras 6 y 9). En los mutantes de alanina triple e individual (VEGF D63A, E64A, E67A, VEGF D63A, VEGF E64A, y VEGF E67A) se evaluó la inducción del crecimiento de células endoteliales. Todos esos mutantes mostraron una potencia mitogénica similar a la del VEGF natural (Figuras 21 y 11). El mutante con un sitio de extra-glicosilación putativo en la región 63-67, VEGF E64N, L66S, también mostró una actividad normal en células endoteliales (Figura 21). Estos datos refuerzan la observación de que los mutantes de VEGF deficientes de FLT-1 inducen una proliferación de células endoteliales similar a la del VEGF natural. Además, estos datos sugieren que la unión de VEGF con los receptores FLT-1 en las células endoteliales no está relacionada con la mitogénesis y la proliferación. Este análisis mutacional ha identificado variantes de VEGF que son relativamente selectivos por los receptores KDR o FLT-1. Los datos en este informe sugieren un componente electroestático de la interacción VEGF:receptor, de manera que los determinantes para KDR y FLT-1 incluyen predominantemente regiones de VEGF cargadas positiva o negativamente, respectivamente.

El procedimiento Phage ELISA (Li *et al.*, Science 270, 1657 (1995)) se utilizó para cribar rápidamente por la actividad de unión a KDR de estos mutantes. El homodímero de VEGF 1-109 se mostró en un formato de una sola copia en la superficie de partículas de fagémidos filamentosos (Figura 24a). Estas partículas de fagémidos se unían a una forma dimerica del KDR (KDR-IgG) con una afinidad elevada ($EC_{50} = 4$ nM, Figura 24b).

Los Phage ELISAs sobre las cincuenta mutaciones de alanina identificaron nueve mutaciones individuales que interrumpieron la unión a KDR en más de tres veces (Tabla 8, a continuación). Las proteínas solubles correspondientes a cada uno de estos mutantes, más algunas otras muchas próximas a las mismas, se expresaron en *Escherichia coli*, se replegaron, y se purificaron para un análisis más detallado. Se determinaron las afinidades de unión directa mediante la medición de la capacidad de cada mutante para desplazar VEGF 1-165 radioyodado de KDR-IgG (Tabla 7). Se observó que las cadenas laterales más importantes para la unión eran Ile 46 del bucle $\alpha 2$ - $\beta 2$, Ile 83 del bucle $\beta 5$ - $\beta 6$, y Glu 64 del bucle $\beta 3$ - $\beta 4$; cuando mutaron a alanina provocaron reducciones en la afinidad de 1600, 830 y 760 veces, respectivamente. Si se asume que los efectos son aditivos, estos tres residuos juntos representan el ~60% de la interrupción total en la energía libre de unión observada para todas las mutaciones de alanina. Los siguientes tres residuos más importantes fueron Phe 17 (de la hélice $\alpha 1$), Gln 79 (de la hebra $\beta 5$), e Ile 43 (del bucle $\alpha 2$ - $\beta 2$), que representan el ~35% de la interrupción en la energía libre de unión.

Cuando se mapean los seis determinantes de unión de cada monómero en la estructura del homodímero de VEGF forman dos superficies de unión simétricas, cada una localizada en cada polo de la molécula. En cada una de estas superficies los seis determinantes de unión se agrupan en dos parches cercanos o "puntos calientes", mostrados en la misma cara de cada molécula. Ambos puntos calientes están rodeados de cadenas laterales que podrían mutar a alanina con prácticamente ningún efecto en la afinidad de unión, sugiriendo que el análisis mutacional ha sido exhaustivo. De forma destacable, a pesar de que estos puntos calientes están altamente localizados, cada uno consiste en cadenas laterales aportadas por ambas subunidades homodímeras. El mayor punto caliente consiste en los tres residuos más importantes junto con uno de menor importancia: Ile 43, Ile 46 e Ile 83 agrupados junto con Glu 64' de la otra subunidad. El punto caliente más pequeño contiene un residuo de importancia moderada de cada subunidad (Phe 17' y Gln 79). Estas seis cadenas laterales son altamente accesibles al disolvente (Tabla 7). Los tres residuos más importantes están entre las cadenas laterales más accesibles (con áreas expuestas de 31 Å² a 114 Å²) y los siguientes tres son algo menos accesibles (de 20 Å² a 69 Å²). En total, el punto caliente más grande expone aproximadamente 300 Å² de área para los átomos de más allá del β -carbono de la cadena lateral, mientras que el punto caliente más pequeño expone aproximadamente 70 Å². El área accesible total de estas cadenas laterales funcionalmente importantes en VEGF (~370 Å²) está próxima al área accesible de las cadenas laterales funcionalmente importantes que interaccionan entre hGH (-400 Å²) y el receptor de hGH (~450 Å²).

Experimentos recientes de biofísica y biología celular han proporcionado la prueba evidente de que dos moléculas de KDR se unen a un solo dímero de VEGF. El agrupamiento de los puntos calientes en la estructura del homodímero de VEGF sugiere firmemente que la dimerización de KDR se consigue mediante la unión de un receptor a cada polo.

ES 2 309 990 T3

Por tanto, el VEGF posee dos sitios de unión a KDR simétricos idénticos definidos por las hebras $\beta 2$ (Ile 46) y $\beta 5$ (Gln 79, Ile 83) y el bucle $\beta 1$ - $\beta 2$ (Ile 43) de un monómero, junto con la hélice N-terminal (Phe 17) y el bucle $\beta 3$ - $\beta 4$ (Glu 64) del segundo monómero.

5

Mapeo de los epítomos para dos anticuerpos neutralizantes

Con el fin de investigar el mecanismo por el cual funcionan los anticuerpos anti-VEGF bloqueadores de dos receptores (MAb 3.2E3.1.1 y MAb A4.6.1), se sondaron los sitios de unión a anticuerpo. Se utilizaron Phage ELISAs para medir la unión de estos anticuerpos a los cincuenta mutantes de VEGF con alanina (Tabla 8). Este análisis reveló pequeños grupos de residuos discontinuos (cuatro para MAb3.2E3.1.1 y cinco para MAbA4.6.1) que provocaron la interrupción en la afinidad cuando se convertían en alanina. Los mutantes que interrumpían la unión a MAb A4.6.1 fueron F47A de la hebra $\beta 2$, M81A de la hebra $\beta 5$, G88A y Q89A del bucle $\beta 5$ - $\beta 6$ y M94A en la hebra $\beta 6$. Entre éstos, la Phe 47 está casi completamente enterrada en la estructura y probablemente indirectamente interrumpe la unión mediante la perturbación de los otros determinantes próximos. Los mutantes que interrumpieron la unión a MAb 3.2E3.1.1 fueron M18A, Y21A y Q22A en la hélice $\alpha 1$, e Y25A en el siguiente bucle. Los determinantes de unión para cada uno de estos anticuerpos se agrupan y mapean a los sitios específicos en la estructura de VEGF que son diferentes del sitio de unión de KDR. Mientras que el epítomo de MAb A4.6.1 se encuentra inmediatamente adyacente al punto caliente más grande de KDR, el epítomo de MAb 3.2E3.1.1 se encuentra junto al punto caliente más pequeño de KDR. De este modo, estos anticuerpos no bloquean la unión al receptor mediante competición directa para los mismos determinantes de unión, sino por efectos estéricos que bloquean sólo una parte del epítomo de KDR. Cabe mencionar que, a diferencia del sitio de unión a KDR, los epítomos de los anticuerpos no cruzan la interfase del dímero.

25 El sitio de unión del receptor de VEGF contiene un número de residuos hidrofóbicos que son importantes para la unión de KDR con una afinidad elevada. El considerable contenido hidrofóbico (Phe 17, Ile 43, Ile 46 e Ile 83) en este sitio de unión es consistente con la importancia demostrada de los contactos hidrofóbicos para las interacciones proteína-proteína en los casos de unión de la hormona del crecimiento humano a su receptor y para la unión del factor tisular al factor VIIa.

30

El análisis funcional con KDR y los dos anticuerpos monoclonales proporciona una base sólida de que las estructuras de los mutantes individuales de alanina no están extremadamente perturbadas con respecto al natural. Por ejemplo, los tres mutantes de alanina con más interrupciones en la unión a KDR (I46A, I83A y E64A) se unen con una afinidad próxima del natural a ambos anticuerpos (Tabla 8). De manera similar, los mutantes que más interrumpen en cada uno de los anticuerpos no afectan en la unión al otro anticuerpo o KDR. Sin embargo, los anticuerpos y KDR no se unen próximos entre sí y, de este modo, proporcionan sondas locales que muestran la conformación de los mutantes de alanina que no es significativamente diferente del VEGF natural.

35

Estos estudios sobre VEGF han demostrado que el sitio de unión funcional a KDR consiste en determinantes de unión aportados por ambas subunidades en el homodímero. Los contactos ligando-receptor que solapan las subunidades de ligandos oligoméricos se observan en las estructuras de rayos X del factor de necrosis tumoral β (TNF) trimérico unido a tres moléculas del receptor TNF-R55, así como en el interferón γ dimérico unido a dos moléculas del dominio extracelular de su receptor de afinidad elevada. Aunque los contactos no implican necesariamente interacciones energéticas, esto sugiere que en estos casos, el epítomo funcional puede encontrarse a través de la interfase de la subunidad. Aún queda por ver si las hormonas oligoméricas que oligomerizan sus receptores utilizarán generalmente modos de unión por solapamiento de subunidades.

45

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 309 990 T3

TABLA 7

Constantes de disociación relativa (Kd mutante/Kd natural) medidas para mutantes con alanina de VEGF 1-109

	Residuo VEGF	Superficie expuesta (Å ²)	Afinidad relativa (Kd mut/Kd nat)
5	nat		1 (33 pM)
	F17	20	64
10	M18	95	2,3
	I43	69	9,0
	I46	86	1600
15	F47	1	2,2
	E64	114	760
	Q79	50	58
	I83	31	830
20	K84	73	1,0
	P85	49	2,0
	K107	68	1,8

25 La Kd absoluta medida para VEGF 1-109 fue de 33 pM. Las anomalías en la afinidad medida mediante ensayo radioinmune (RIA) fueron significativamente más grandes que mediante Phage ELISA ya que el RIA tiene un rango dinámico mucho mayor. Esto es debido a las mayores concentraciones de hormona mutante que se pueden ensayar en el RIA, así como el hecho de que el VEGF fusionado al fago se une más débilmente a KDR que cuando está libre en el RIA: PROCEDIMIENTOS: Las afinidades de unión se determinaron mediante un RIA que midió el desplazamiento de VEGF 1-165 radioyodado de KDR-IgG mediante diluciones en serie de VEGF 1-109 mutante o natural frías. El tampón de unión consistía en tampón fosfato salino (PBS) con tween 20 al 0,1%. Se capturó el marcador unido mediante la incubación de soluciones de unión equilibradas con anti-IgG inmovilizadas en pocillos de placas de microtitulación durante 20 minutos. Las proteínas mutantes individuales se purificaron a partir de fermentación o cultivos en matraz de agitación de *E. coli* (27C7) que albergaban el vector fagémido descrito en la figura 24. Las pastas celulares se resuspendieron en 20 mM tris (pH 8) con EDTA 1 mM y se procesaron dos veces con un microfluidizador (Microfluidics Corporation, Newton, MA) para romper las células. Los cuerpos refráctiles se agruparon preferencialmente mediante dos centrifugaciones a baja velocidad consecutivas (4200 rcf durante 10 minutos). A continuación, los cuerpos refráctiles se solubilizaron en 20 mM tris (pH 8), 7,5 M de urea y 2 mM de ditiotreitól durante 60 minutos. La solución de proteína desnaturalizada se depuró mediante centrifugación, se diluyó 10 veces con 20 mM tris (pH 8), 1 mM cisteína.HCl y 5 mM de EDTA y se dejó para el repliegue durante 16 horas a 25°C. Este material replegado crudo se llevó a NH₄SO₄ 1 M, se cargó en una columna de interacción hidrofóbica fenil-650M (TosoHass, Filadelfia, PA.) y se fraccionó por gradiente. La fracción que contenía VEGF se dializó a continuación frente a 20 mM tris (pH 8), se concentró mediante filtración Amicon, y se fraccionó sobre una columna Mono Q (Pharmacia). La fracción que contenía VEGF se dializó a continuación frente a PBS y se concentró para su almacenamiento en alícuotas a -20°C.

TABLA 8

Afinidades de unión relativas medidas mediante Phage ELISAs para los cincuenta mutantes de alanina individuales de VEGF 1-109 para unirse a KDR-IgG o a cualquiera de los anticuerpos monoclonales anti-VEGF, A4.6.1 y 3.2E3.1.1

	Residuo de VEGF	Área superficial expuesta (Å ²)	Afinidad relativa (EC ₅₀ mut/EC ₅₀ nat)		
55			KDR	A4.6.1	3.2E3.1.1
	Natural	-	1,0	1,0	1,0
60	H11	-	2,5	1,7	1,2
	H12	-	1,8	1,1	1,0
	E13	-	0,8	1,3	0,9
65	V14	26	1,8	1,5	0,8
	V15	17	0,8	1,1	0,8

ES 2 309 990 T3

	K16	112	1,1	1,2	0,6
5	F17	20	·NB	1,2	0,9
	M18	95	·5,0	1,2	·24,0
	D19	64	0,6	0,7	0,9
10	Y21	52	2,8	2,6	·74,0
	Q22	96	2,2	1,4	·47,0
	R23	94	1,5	1,3	0,7
15	Y25	81	1,7	1,2	·NB
	F36	41	1,7	1,2	2,8
	Q37	61	1,5	1,0	2,0
20	E38	20	0,5	0,7	1,2
	Y39	80	1,3	1,5	1,5
25	P40	26	0,6	2,0	1,0
	D41	87	1,5	1,9	2,6
	E42	42	0,7	1,4	1,3
30	I43	69	·5,6	1,2	1,5
	E44	45	0,7	1,3	2,3
	Y45	2	1,6	2,2	1,7
35	I46	86	·NB	2,1	0,9
	F47	1	·3,6	·NB	0,8
40	K48	60	0,7	0,7	1,7
	natural	-	1,0	1,0	1,0
	N62	1	2,0	2,2	2,1
45	D63	66	0,5	0,9	1,2
	E64	114	·8,5	1,7	0,7
	G65	-	1,3	1,7	2,5
50	L66	57	0,3	1,6	0,7
	E67	56	0,3	1,6	1,5
	V69	47	0,6	1,4	0,8
55	Q79	50	·NB	0,7	1,1
	M81	42	2,0	·NB	0,8
60	R82	79	0,6	·I3,3	1,5
	183	31	·100,0	1,0	0,9
	K84	73	2,2	1,8	1,1

65

ES 2 309 990 T3

P85	49	· 5,0	1,0	1,9
H86	138	1,3	1,9	1,4
Q87	85	1,8	1,3	1,3
G88	-	1,0	· NB	0,7
Q89	48	2,5	· NB	1,4
H90	92	1,7	1,8	1,1
I91	66	1,0	1,2	2,1
G92	-	1,2	· 8,5	1,7
E93	85	0,5	· 6,6	1,0
M94	14	2,8	· NB	0,9
E103	72	1,1	2,3	1,2
R105	106	0,8	1,4	1,2

La Tabla muestra el residuo mutado a alanina, el área accesible de la superficie expuesta más allá del carbono β que se calcula para ser eliminado mediante la mutación de alanina, y los valores de EC_{50} relativos calculados como EC_{50} mutante/ EC_{50} natural. Los valores de afinidad relativa superiores a uno indican reducciones en la afinidad de unión para ese mutante. Cualquier variante que provoca una reducción de tres veces o superior en EC_{50} para KDR o cualquiera de los dos MAbs se marcan con un punto. Dado que los Phage ELISAs requieren una unión sustancial del fagémido mutante a la respectiva proteína diana para generar una señal para la medición, los no enlazadores (NB) no se pueden cuantificar de manera exacta pero se puede interpretar que tienen una afinidad de unión ampliamente reducida. Las pérdidas de afinidad de unión habituales observadas para los no enlazadores están en el intervalo de más de 100 veces, pero pueden variar considerablemente debido a las diferencias en la expresión.

Comentarios concluyentes

La descripción anterior detalla procedimientos específicos que se pueden utilizar para realizar la presente invención. Habiendo detallado dichos procedimientos específicos, los expertos en la materia sabrán suficientemente cómo idear procedimientos fiables alternativos para llegar a la misma información en el uso de los frutos de la presente invención. De este modo, por detallada que puede aparecer en el texto la descripción anterior, no debe interpretarse como limitante del alcance global de la presente invención; en cambio, el alcance de la presente invención debe determinarse sólo mediante la construcción legal de las reivindicaciones que se acompañan.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se muestra únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha tenido una gran precaución a la hora de recopilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 5332671 A [0034] [0157]
- US 4399216 A, Axel [0036]
- EP 266032 A [0048]
- WO 8705330 A [0056]
- US 3969287 A [0069]
- US 3691016 A [0069]
- US 4195128 A [0069]

ES 2 309 990 T3

- US 4247642 A [0069]
- US 4229537 A [0069]
- 5 • US 4330440 A [0069]
- EP 75444 A [0072]
- EP 0036776 A [0095]
- 10 • EP 133988 A [0118]
- US 3773919 A [0119]
- 15 • EP 58481 A [0119]
- US 3887699 A [0119]
- EP 158277 A [0119]
- 20 • CA 1176565 [0119]
- EP 160457 A [0148] [0151] [0154]
- 25 • US 08691791 B [0191]
- US 08567200 B [0191]
- US 60002827 B [0191]

30

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- **FERRARA** *et al. Biophys. Res. Comm.*, 1989, vol. 161, 851 [0003]
- 35 • Laboratory Investigation, 1995, vol. 72, 615 [0004]
- **COHEN**, S.N. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1972, vol. 69, 2110 [0036]
- **MANDEL** *et al. J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 53, 154 [0036]
- 40 • **GRAHAM**, F.; **VAN DER EB**, A. *Virology*, 1978, vol. 52, 456-457 [0036]
- **VAN SOLINGEN**, P. *et al. J. Bact.*, 1977, vol. 130, 946 [0036]
- 45 • **HSIAO**, C.L. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1979, vol. 76, 3829 [0036]
- **T. MANIATIS** *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory*, 1982, 133-134 [0043]
- 50 • **R. LAWN** *et al. Nucleic Acids Res.*, 1981, vol. 9, 6103-6114 [0044]
- **D. GOEDEL** *et al. Nucleic Acids Res.*, 1980, vol. 8, 4057 [0044]
- **E. SOUTHERN**. *J. Mol. Biol.*, 1975, vol. 98, 503-517 [0045]
- 55 • **T. MANIATIS** *et al. Cell*, 1978, vol. 15, 687-701 [0045]
- **FROEHLER** *et al. Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 14, 5399-5407 [0048]
- 60 • **D.K. STRUCK**; **W.J. LENNARZ**. *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans. Plenum Press*, 1980, 35 [0053]
- **R.D. MARSHALL**. *Biochem. Soc. Symp.*, 1974, vol. 40, 17 [0053]
- 65 • **WINZLER**, R.J. *Hormonal Proteins and Peptides. Academic Press*, 1973, 1-15 [0053]
- *The Plasma Proteins: Structure, Function and Genetic Control. Academic Press*, 1984, vol. 4, 271-315 [0055]

ES 2 309 990 T3

- **APLIN; WRISTON.** *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 1981, 259-306 [0056]
- **TANNER; LEHLE.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, vol. 906 (1), 81-99 [0057]
- 5 • **KUKURUZINSKA et al.** *Annu. Rev. Biochem.*, 1987, vol. 56, 915-944 [0057]
- **T.E. CREIGHTON.** *Proteins: Structure and Molecular Properties. W.H. Freeman & Co*, 1983, 79-86 [0071]
- **ADELMAN et al.** *DNA*, 1983, vol. 2, 183 [0075]
- 10 • **MESSING et al.** *Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA. Elsevier*, 1981
[0076]
- **VEIRA et al.** *Meth. Enzymol.*, 1987, vol. 153, 3 [0076]
- 15 • **CREA et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1978, vol. 75, 5765 [0077]
- **BOLIVAR et al.** *Gene*, 1977, vol. 2, 95 [0094]
- 20 • **CHANG et al.** *Nature*, 1978, vol. 375, 615 [0095]
- **ITAKURA et al.** *Science*, 1977, vol. 198, 1056 [0095]
- **GOEDEL et al.** *Nature*, 1979, vol. 281, 544 [0095]
- 25 • **GOEDEL et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1980, vol. 8, 4057 [0095] [0106]
- **SIEBENLIST et al.** *Cell*, 1980, vol. 20, 269 [0095]
- 30 • **STINCHCOMB et al.** *Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0096]
- **KINGSMAN et al.** *Gene*, 1979, vol. 7, 141 [0096]
- **TSCHEMPER et al.** *Gene*, 1980, vol. 10, 157 [0096]
- 35 • **JONES.** *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0096]
- **HITZEMAN et al.** *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 2073 [0097]
- 40 • **HESS et al.** *J. Adv. Enzyme Reg.*, 1968, vol. 7, 149 [0097]
- **HOLLAND et al.** *Biochemistry*, 1978, vol. 17, 4900 [0097]
- *Tissue Culture. Academic Press*, 1973 [0098]
- 45 • **FIERS et al.** *Nature*, 1978, vol. 273, 113 [0099]
- **URLAUB; CHASIN.** *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1980, vol. 77, 4216 [0102]
- 50 • **MESSING et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1981, vol. 9, 309 [0107]
- **MAXAM et al.** *Methods of Enzymology*, 1980, vol. 65, 499 [0107]
- **U. SIDMAN et al.** *Biopolymers*, 1983, vol. 22, 547 [0119]
- 55 • **R. LANGER et al.** *Chem. Tech.*, 1982, vol. 12, 98 [0119]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co*, 1980 [0128]
- 60 • **PARK et al.** *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 25646-25654 [0135]
- **KUNKEL.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1985, vol. 82, 488-492 [0136]
- **KUNKEL et al.** *Methods Enzymol.*, 1987, vol. 154, 367-382 [0136]
- 65 • **NAKAMAYE et al.** *Nucleic Acids Res.*, 1986, vol. 14, 9679-9698 [0136]
- **VIEIRA et al.** *Methods Enzymol.*, 1987, vol. 155, 3-11 [0136]

ES 2 309 990 T3

• **SAMBROOK** *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual part I. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989, vol. C5, 32 [0136]

5 • **JORDAN** *et al.* *Bio/Technology* (manuscript in preparation), 1994 [0137]

• **CHEN** *et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 1987, vol. 7, 2745-2752 [0137]

• **GORMAN** *et al.* *DNA and Protein Engineering Techniques*, 1990, vol. 2, 3-10 [0137]

10 • **GRAHAM** *et al.* *Virology*, 1973, vol. 52, 456-467 [0137]

• **AIELLO** *et al.* *N. Engl. J. Med.*, 1994, vol. 331, 1480-1487 [0138]

15 • **KIM** *et al.* *Growth Factors*, 1992, vol. 7, 53-64 [0138]

• **HUNTER** *et al.* *Nature*, 1962, vol. 194, 495-496 [0140]

• **FERRARA** *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1989, vol. 161, 851-859 [0142]

20 • **ULLRICH** *et al.* *Science*, 1977, vol. 196, 1313-1317 [0143]

• **FERRARA** *et al.* *Meth. Enzymol.* [0143]

• **FERRARA** *et al.* *Am. J. Physiol.* [0143]

25 • **AVIV** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1972, vol. 69, 1408-1412 [0143]

• **WICKENS** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1978, vol. 253, 2483-2495 [0143]

30 • **NORRIS** *et al.* *Gene*, 1979, vol. 7, 355-362 [0143]

• **BENTON** *et al.* *Science*, 1977, vol. 196, 180-182 [0144]

• **TAYLOR** *et al.* *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, vol. 442, 324-330 [0144]

35 • **SANGER** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 74, 5463-5467 [0146]

• **LUSKY, M.; BOTCHEN, M.** *Nature*, 1981, vol. 293, 79 [0148]

40 • **VIEIRA, J.; MESSING, J.** *Gene*, 1982, vol. 19, 259 [0148]

• **BOTHWELL** *et al.* *Nature*, 1981, vol. 290, 65-67 [0148]

• **WARTELL, R.M.; W.S. REZNIKOFF.** *Gene*, 1980, vol. 9, 307 [0148]

45 • **GREEN, MR** *et al.* *Cell*, 1983, vol. 32, 681-694 [0155]

• *Nucleic Acids Res.*, 1984, vol. 12, 7041 [0155]

50 • **HOUCK** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 26031-26037 [0167]

• **HANIU** *et al.* *Biochemistry*, 1993, vol. 32, 2431-2437 [0167]

55 • **PÖTGENS** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 32879-32885 [0167]

• **OEFNER** *et al.* *The EMBO J.*, 1992, vol. 11, 3921-3926 [0167] [0175]

• **GEORGE** *et al.* *Meth. Enzymol.*, 1990, vol. 183, 333-351 [0167]

60 • **HOUCK.** *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 26031-26037 [0169]

• **KEYT** *et al.* The VIIIth International Symposium on the Biology of Vascular Cells, 1994, 48 [0169]

65 • **BARZU** *et al.* *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, vol. 845, 196-203 [0178]

• **LI** *et al.* *Science*, 1995, vol. 270, 1657 [0180]

REIVINDICACIONES

5 1. Secuencia de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia que codifica una variante del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF), en la que dicha variante comprende:

(a) una o más sustituciones de aminoácidos en una región de unión del dominio de quinasa (KDR) y la región de unión de Tirosina Quinasa de tipo FMS (FLT-1), donde la variante de VEGF muestra una afinidad de unión modificada por el receptor FLT-1 o el receptor KDR en comparación con el VEGF nativo; o

10 (b) una o más sustituciones de aminoácidos en el KDR, donde la variante de VEGF sustituida muestra una afinidad de unión modificada por el receptor FLT-1 o el receptor KDR en comparación con el VEGF nativo; o

15 (c) una o más sustituciones de aminoácidos en el FLT-1, donde la variante de VEGF sustituida muestra una afinidad de unión modificada por el receptor FLT-1 o el receptor KDR en comparación con el VEGF nativo, y donde la variante de VEGF sustituida muestra una actividad mitogénica de la variante de VEGF en un ensayo de mitogénesis de células endoteliales que es similar a la actividad del VEGF nativo,

20 en la que la región de unión KDR corresponde a los residuos 78 a 95 de la SEC ID No. 2 de VEGF humano, y la región de unión FLT-1 corresponde a los residuos 60 a 70 de la SEC ID No. 2 de VEGF humano.

2. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 1, en el que la región de unión FLT-1 comprende los residuos 60 a 70 de la SEC ID No. 2.

25 3. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 1, en el que la región de unión KDR comprende los residuos de aminoácidos 78 a 95 de la SEC ID No. 2.

30 4. Ácido nucleico aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que codifica una variante de VEGF que está sustituida en los residuos de aminoácidos:

a) 63, 64 y 67; y/o

b) 82, 84 y 86.

35 5. Ácido nucleico aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que codifica una variante de VEGF que tiene las siguientes sustituciones de aminoácidos:

40 a) D63A, E64A, E67A; y/o

b) R82A, K84A, H86A.

45 6. Polipéptido variante del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF), que comprende:

(a) una o más sustituciones de aminoácidos en una región de unión del dominio de quinasa (KDR) y la región de unión de Tirosina Quinasa de tipo FMS (FLT-1), donde la variante de VEGF sustituida muestra una afinidad de unión modificada por el receptor FLT-1 o el receptor KDR en comparación con el VEGF nativo; o

50 (b) una o más sustituciones de aminoácidos en el KDR, donde la variante de VEGF sustituida muestra una afinidad de unión modificada por el receptor FLT-1 o el receptor KDR en comparación con el VEGF nativo; o

55 (c) una o más sustituciones de aminoácidos en el FLT-1, donde la variante de VEGF sustituida muestra una afinidad de unión modificada por el receptor FLT-1 o el receptor KDR en comparación con el VEGF nativo, y donde la variante de VEGF sustituida muestra una actividad mitogénica de la variante de VEGF en un ensayo de mitogénesis de células endoteliales que es similar a la actividad del VEGF nativo,

60 en la que la región de unión KDR corresponde a los residuos 78 a 95 de la SEC ID No. 2 de VEGF humano, y la región de unión FLT-1 corresponde a los residuos 60 a 70 de la SEC ID No. 2 de VEGF humano.

7. Polipéptido según la reivindicación 6, en el que la región de unión FLT-1 comprende los residuos de aminoácidos 60 a 70 de la SEC ID No. 2.

65 8. Polipéptido según la reivindicación 6, en el que la región de unión KDR comprende los residuos de aminoácidos 78 a 95 de la SEC ID No. 2.

ES 2 309 990 T3

9. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que la variante de VEGF contiene las sustituciones de aminoácidos en los residuos:

5 a) 63, 64 y 67; y/o

b) 82, 84 y 86.

10. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que la variante de VEGF contiene las siguientes sustituciones de aminoácidos:

a) D63A, E64A, E67A; y/o

15 b) R82A, K84A, H86A.

11. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, que contiene además modificaciones de aminoácidos que no afectan en ningún caso a la afinidad de unión del polipéptido por el receptor FLT-1 o el receptor KDR.

20 12. Vector de expresión replicable capaz de expresar el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en una célula huésped transformante.

13. Células huésped transformadas con un vector según la reivindicación 12.

25 14. Células huésped según la reivindicación 13, que son células de ovario de hámster chino.

15. Composición que comprende la variante de VEGF según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 mezclada con un portador farmacéuticamente aceptable.

30 16. Composición según la reivindicación 15, para su uso en un método de tratamiento médico.

35 17. Ensayo para identificar candidatos que tienen propiedades agonísticas o antagonísticas con respecto a la unión del receptor KDR y/o FLT, que comprende el contacto de dichos candidatos con un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, y la medición del efecto que dicho candidato tiene sobre las características de unión de dicho polipéptido a dichos receptores KDR y/o FLT-1.

40 18. Polipéptido que comprende una variante del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF), conteniendo dicha variante por lo menos una modificación de aminoácidos en la región del receptor de dominio de quinasa (KDR) definida por los aminoácidos:

a) Ile 46, Gln 79 e Ile 83; y/o

b) Ile 43, Phe 17 y Glu 64;

45 mostrando dicho polipéptido una afinidad de unión al receptor KDR funcionalmente reducida en comparación con el VEGF nativo.

19. Polipéptido según la reivindicación 18, en el que se modifica cada una de dichas posiciones de aminoácidos.

50 20. Polipéptido según la reivindicación 18, en el que se modifica uno o más de dichas posiciones de aminoácidos.

21. Polipéptido según la reivindicación 18, en el que se modifican Ile 46, Ile 83, Glu 64.

22. Polipéptido según la reivindicación 18, en el que se modifican Phe 17, Gln 79, Ile 43.

55 23. Polipéptido según la reivindicación 18, en el que se modifican Ile 46, Gln 79, Ile 83, Ile 43.

24. Polipéptido según la reivindicación 18, en el que se modifican Phe 17, Glu 64.

60 25. Polipéptido según la reivindicación 18, en el que se modifican Ile 46, Gln 79, Ile 83, Ile 43, Phe 17, Glu 64.

26. Polipéptido según la reivindicación 18, en el que se modifican Phe 17, Ile 46, Ile 83, Glu 64.

27. Polipéptido según la reivindicación 18, en el que se modifican Ile 43, Ile 46, Ile 83, Glu 64.

65 28. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 27, en el que dicha modificación se mediante la sustitución por alanina.

ES 2 309 990 T3

29. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 9 y 10 para la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento de células endoteliales.

5 30. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 6, 8, 9 y 10 para la preparación de un medicamento para activar el crecimiento de células endoteliales.

31. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 6, 8, 9 y 10 para la preparación de un medicamento para activar la proliferación de células endoteliales que rodean la lesión en un tejido vascular.

10 32. Uso según la reivindicación 31 ó 32, en el que la lesión comprende una incisión quirúrgica, una herida o una úlcera.

15 33. Uso según la reivindicación 32, en el que la herida es una laceración, incisión o penetración de un vaso sanguíneo.

34. Uso según la reivindicación 32, en el que la úlcera es una úlcera diabética, hemofílica o varicosa.

20 35. Uso de una variante de VEGF según cualquiera de las reivindicaciones 6, 8, 9 y 10 para la preparación de un medicamento para la estimulación de la vasculogénesis o angiogénesis.

36. Uso de una variante de VEGF según las reivindicaciones 6, 8, 9 y 10 para la preparación de un medicamento para la inhibición de la vasculogénesis o angiogénesis.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 309 990 T3

```

1  CAGTGTGCTG GCGGCCCGGC GCGAGCCGGC CCGGCCCGG TCGGGCCTCC
-26
    GAAACC   ATG AAC TTT CTG CTG TCT TGG GTG CAT TGG AGC
           M  N  F  L  L  S  W  V  H  W  S
           -26                               -20

90  CTC GCC TTG CTG CTC TAC CTC CAC CAT GCC AAG TGG TCC CAG
-15  L  A  L  L  L  Y  L  H  H  A  K  W  S  Q
           -10

    GCT|GCA CCC ATG GCA GAA GGA GGA GGG CAG AAT CAT CAC
    A |A P M A E G G G Q N H H
    -1 +1 → +5 +10

171 GAA GTG GTG AAG TTC ATG GAT GTC TAT CAG CGC AGC TAC TGC
13  E  V  V  K  F  M  D  V  Y  Q  R  S  Y  C
           +15 +20 +25

    CAT CCA ATC GAG ACC CTG GTG GAC ATC TTC CAG GAG TAC
    H  P  I  E  T  L  V  D  I  F  Q  E  Y
           +30 +35

252 CCT GAT GAG ATC GAG TAC ATC TTC AAG CCA TCC TGT GTG CCC
40  P  D  E  I  E  Y  I  F  K  P  S  C  V  P
    +40 +45 +50

    CTG ATG CGA TGC GGG GGC TGC TGC AAT GAC GAG GGC CTG
    L  M  R  C  G  G  C  C  N  D  E  G  L
           +55 +60 +65

333 GAG TGT GTG CCC ACT GAG GAG TCC AAC ATC ACC ATG CAG ATT
67  E  C  V  P  T  E  E  S  N  I  T  M  Q  I
           +70 +75 +80

    ATG CGG ATC AAA CCT CAC CAA GGC CAG CAC ATA GGA GAG
    M  R  I  K  P  H  Q  G  Q  H  I  G  E
           +85 +90

414 ATG AGC TTC CTA CAG CAC AAC AAA TGT GAA TGC AGA CCA AAG
94  M  S  F  L  Q  H  N  K  C  E  C  R  P  K
           +95 +100 +105

    AAA GAT AGA GCA AGA CAA GAA AAT CCC TGT GGG CCT TGC
    K  D  R  A  R  Q  E  N  P  C  G  P  C
           +110 +115 +120

495 TCA GAG CGG AGA AAG CAT TTG TTT GTA CAA GAT CCG CAG ACG
121 S  E  R  R  K  H  L  F  V  Q  D  P  Q  T
           +125 +130

    TGT AAA TGT TCC TGC AAA AAC ACA GAC TCG CGT TGC AAG
    C  K  C  S  C  K  N  T  D  S  R  C  K
    +135 +140 +145

```

FIG. 1A

ES 2 309 990 T3

576 GCG AGG CAG CTT GAG TTA AAC GAA CGT ACT TGC AGA TGT GAC
148 A R Q L E L N E R T C R C D
 +150 +155 +160

AAG CCG AGG CGG TGA GCCGGGCA GGAGGAAGGA GCCTCCCTCA
K P R R O
 +165

661 GGGTTTCGGG AACCAGATCT CTCACCAGGA AAGACTGATA CAGAACGATC
GATACAGAAA CCACGCTGCC GCCACCACAC CATCACCATC GACAGAACAG

761 TCCTTAATCC AGAAACCTGA AATGAAGGAA GAGGAGACTC TGCGCAGAGC
ACTTTGGGTC CGGAGGGCGA GACTCCGGCG GAAGCATTCC CGGGCGGGTG

861 ACCCAGCAGG GTCCCTCTTG GAATTGGATT CGCCATTTTA TTTTCTTGC
TGCTAAATCA CCGAGCCCGG AAGATTAGAG AGTTTTATTT CTGGGATTCC

961 TGTAGACACA CCGCGGCCGC CAGCACACTG

FIG. 1B

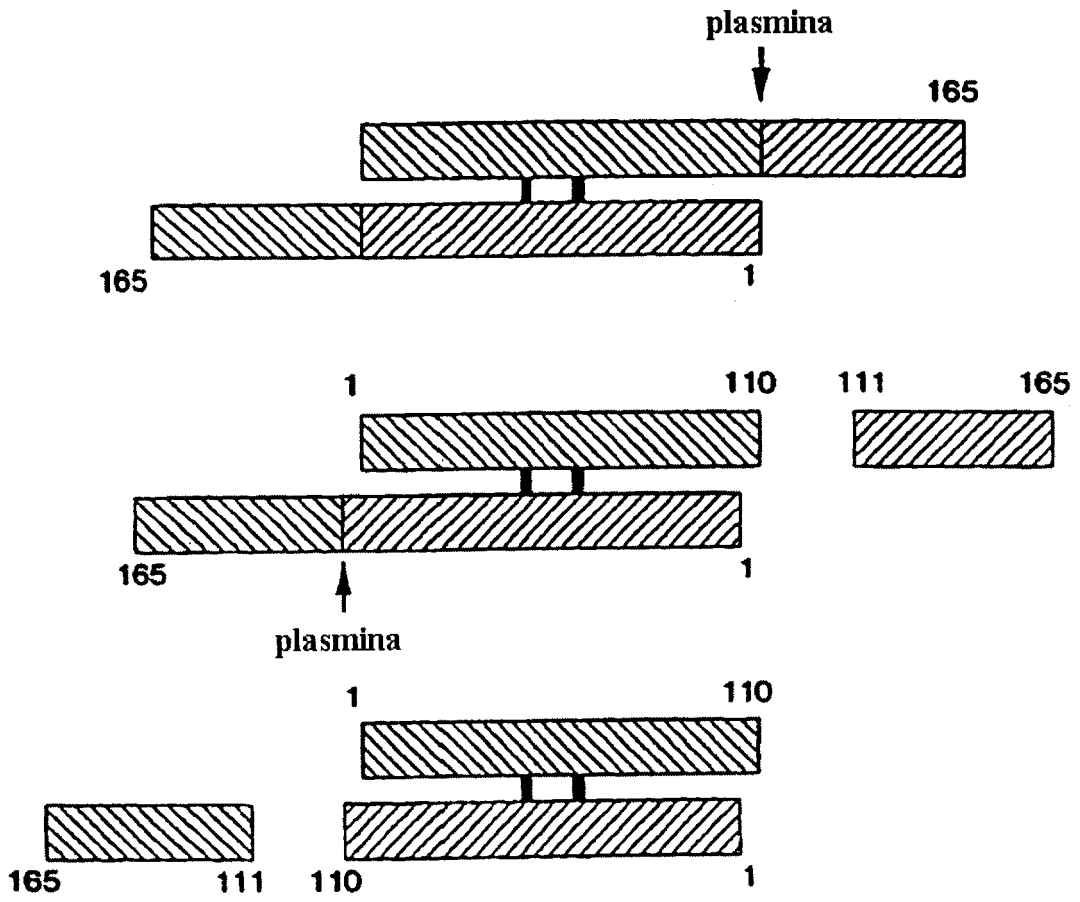


FIG. 2

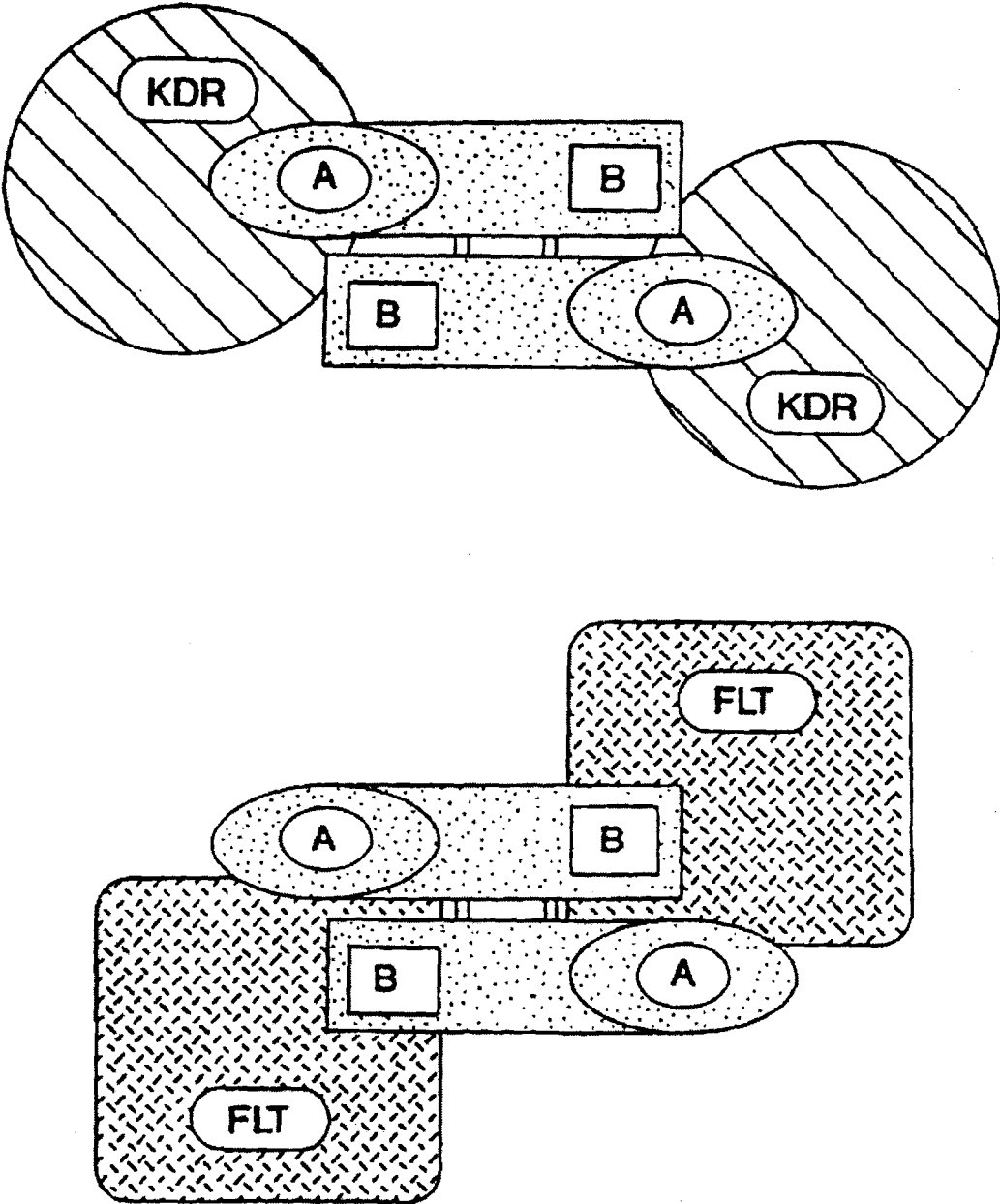


FIG. 3

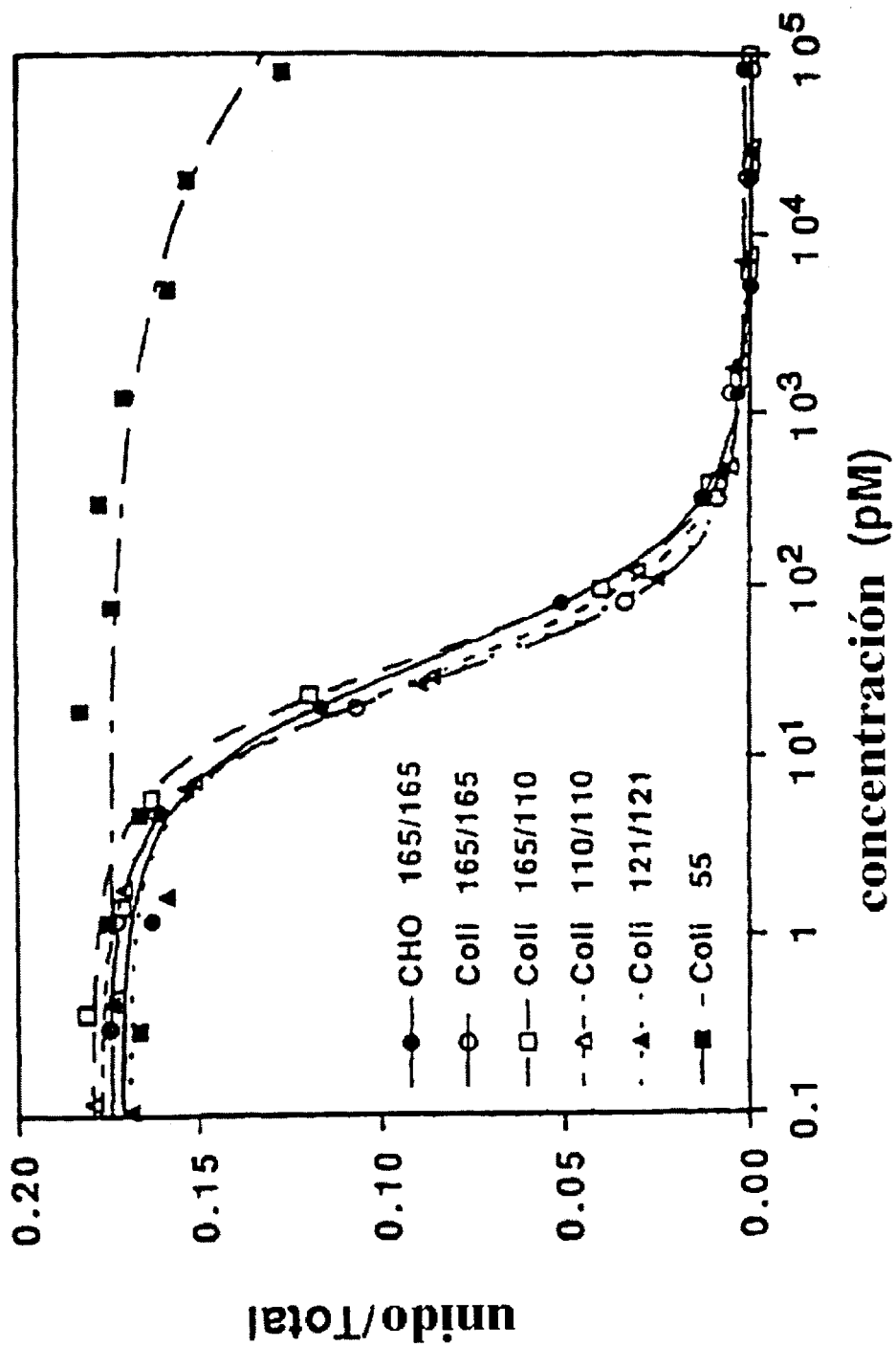


FIG. 4

<u>Loci</u>	<u>mutación</u>	<u>Loci</u>	<u>mutación</u>
5	E5A	64	E64A
12	H11A,H12A,E13A	64.7	D63A,E64A,E67A
17.5	K16A,D19T	67	E67A
23	R23A	72.5	E72A,E73A
27	H27A	82	R82A
28.5	H27A,E30A	84	K84A
30	E30A	84	R82A,K84A,H86A
34	D34A	86	H86A
36	D34A,E38A	91.5	H90A,E93A
38	E38A	100	H99A,K101A
41	D41A	103	E103A
42	E42A	105	R105A
42.3	D41A,E42A,E44A	107.5	K107A,K108A
44	E44A	108.5	KKDR(107-110)AAAA
48	K48A	109.5	D109A,R110A
56	R56A	113	R112A,E114A
63	D63A		

FIG. 5

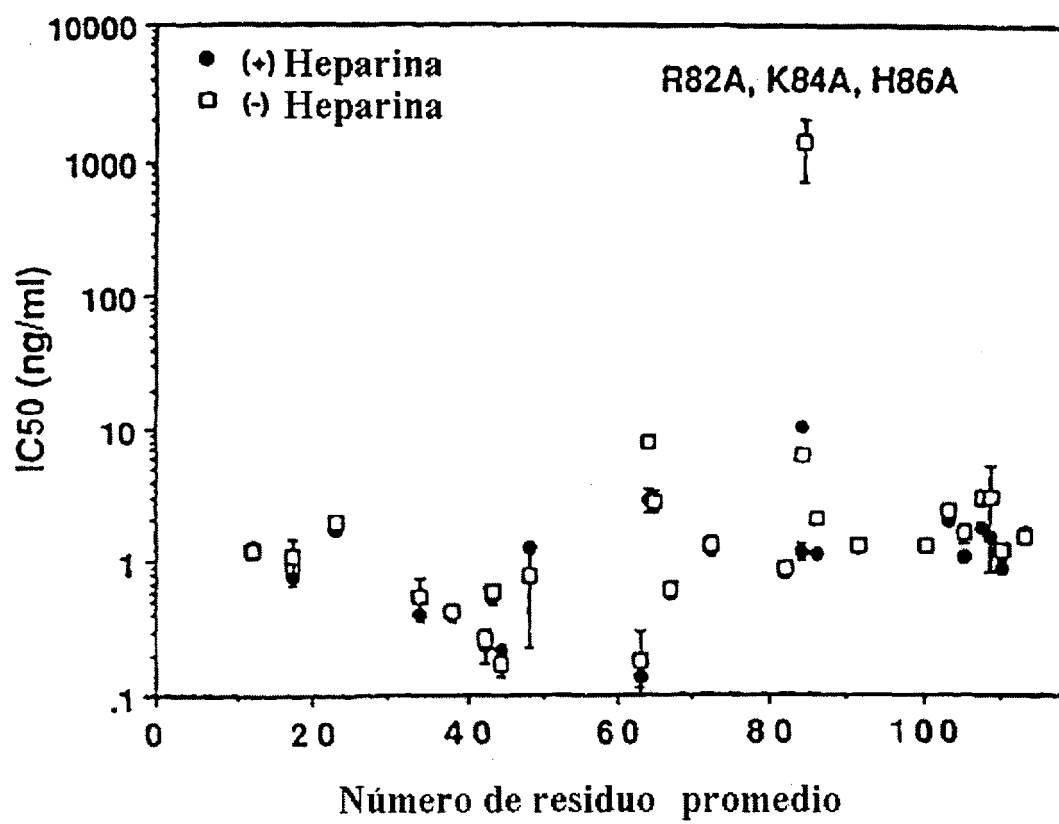


FIG. 6

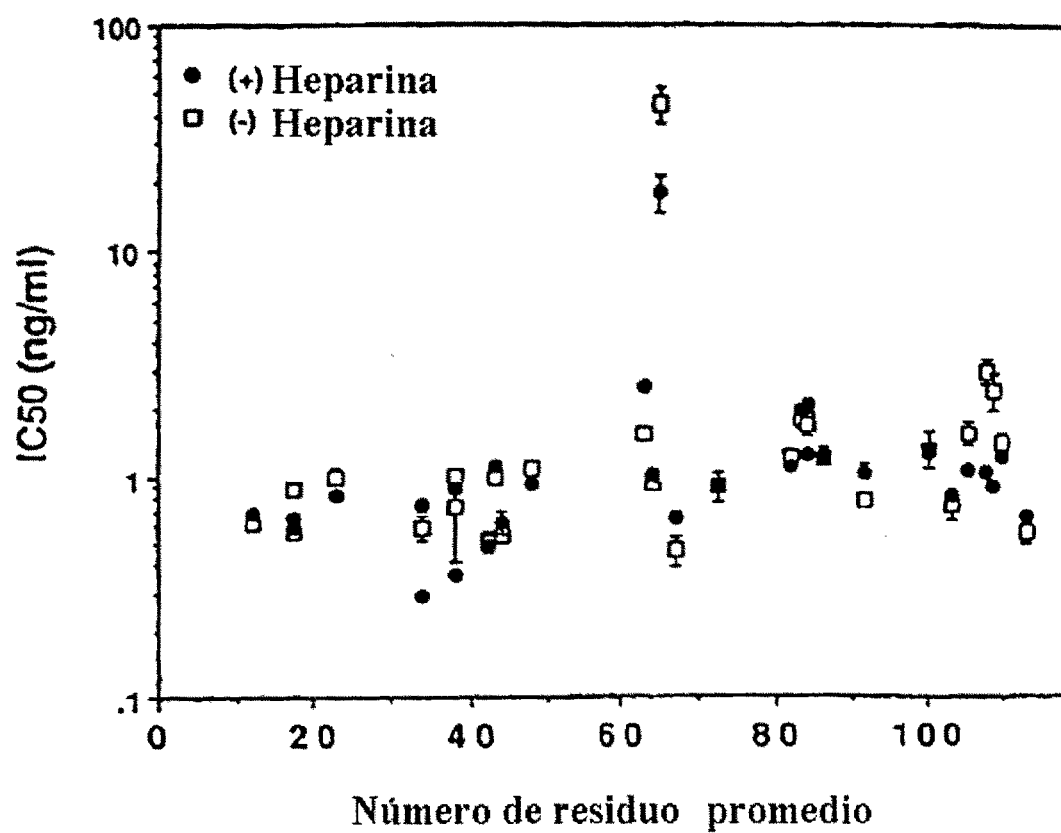


FIG. 7

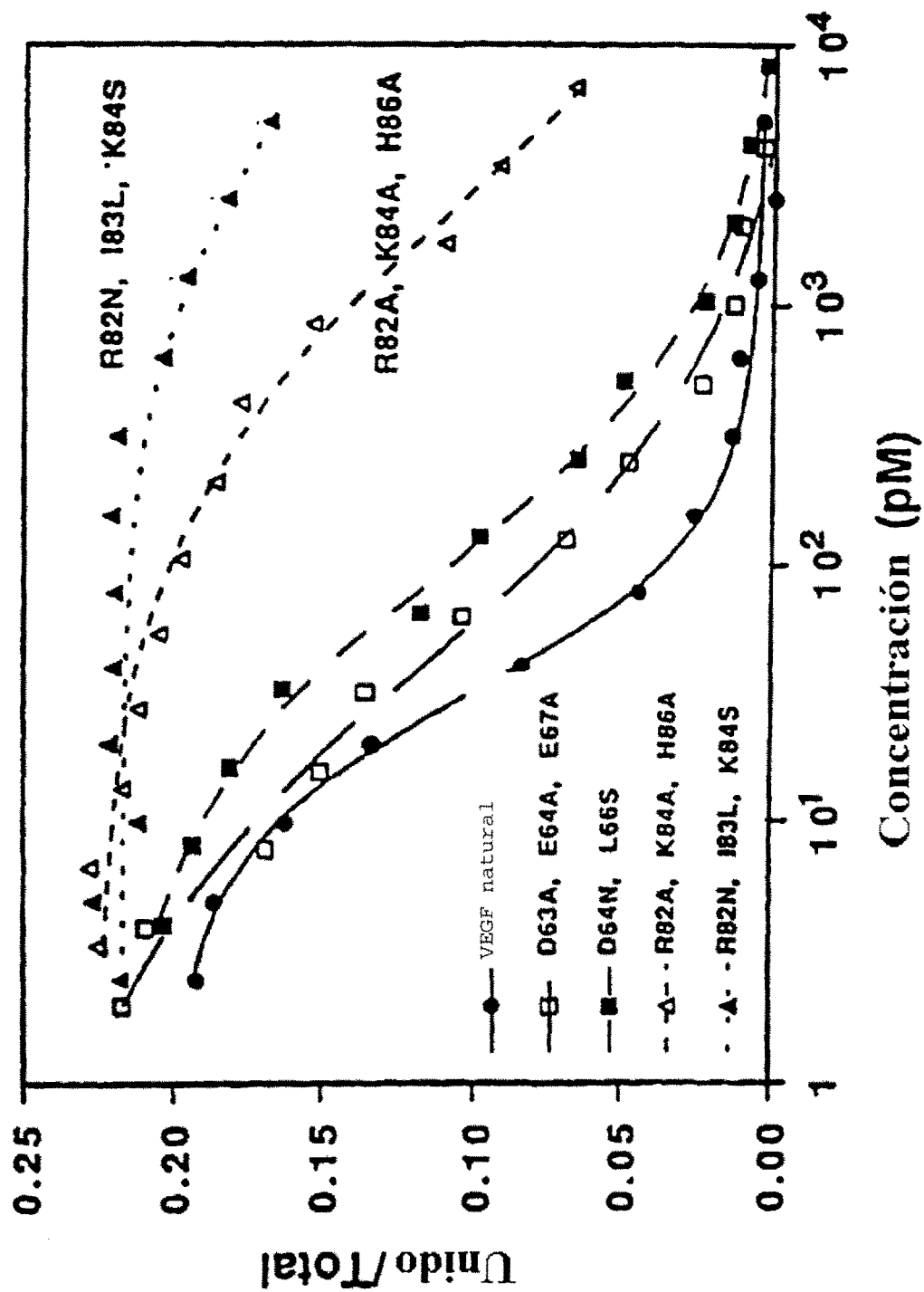


FIG. 8

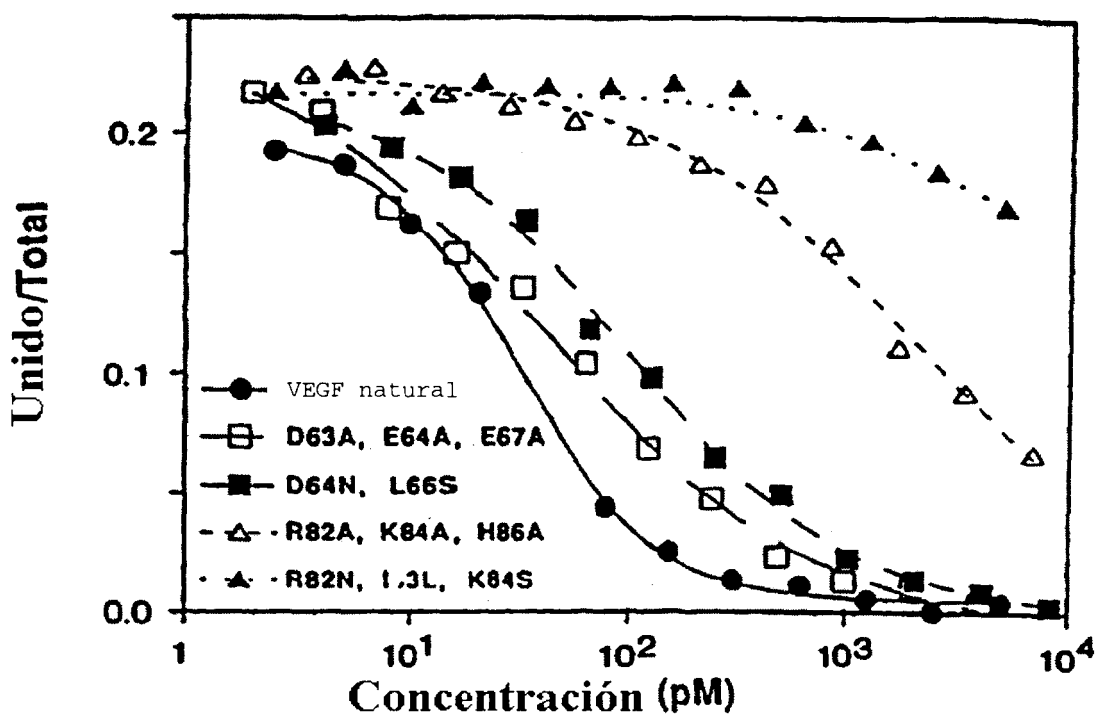


FIG. 9A

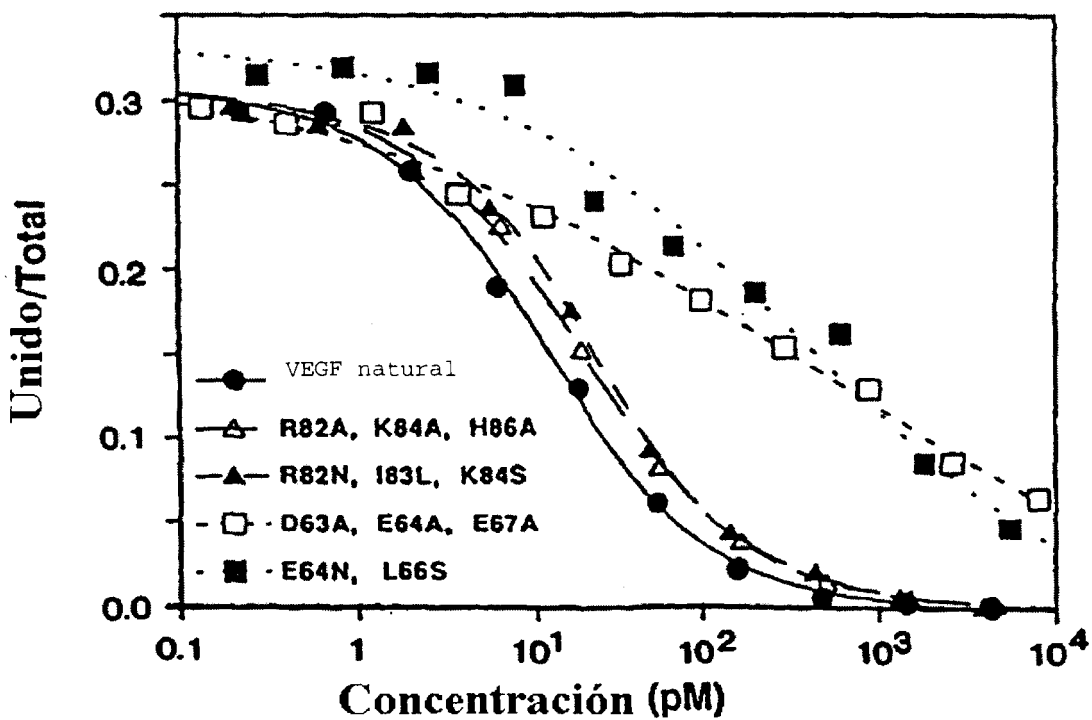


FIG. 9B

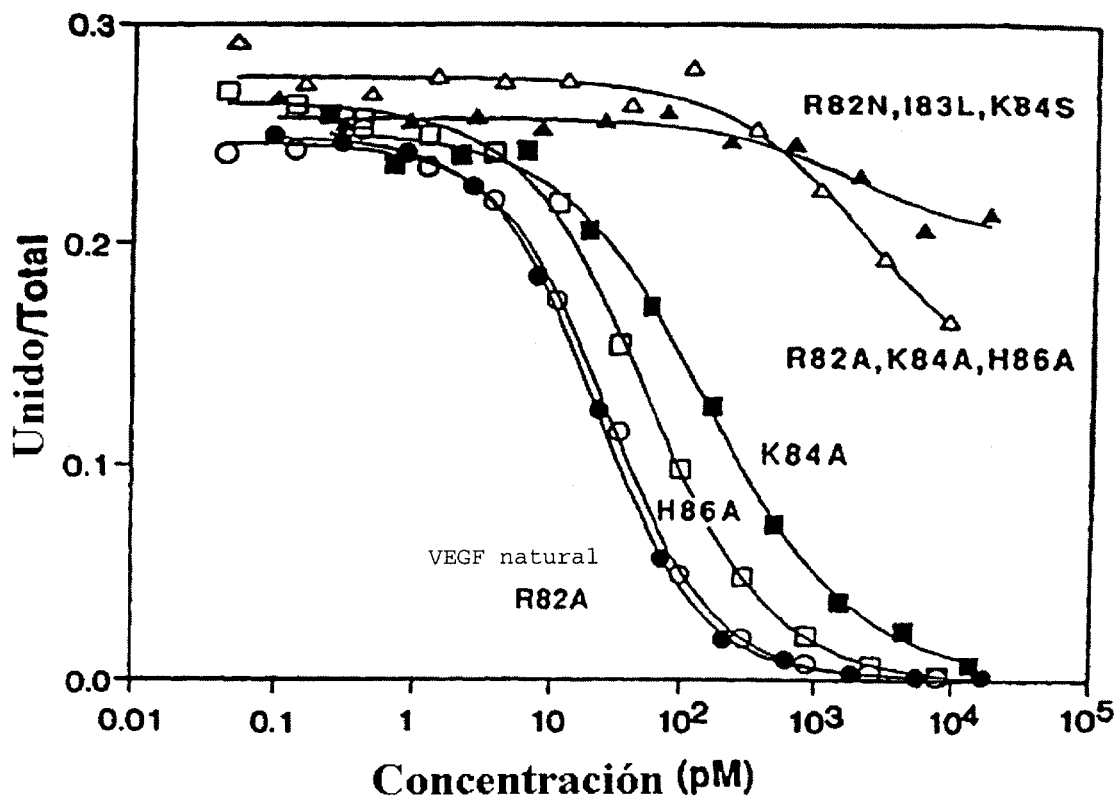


FIG. 10

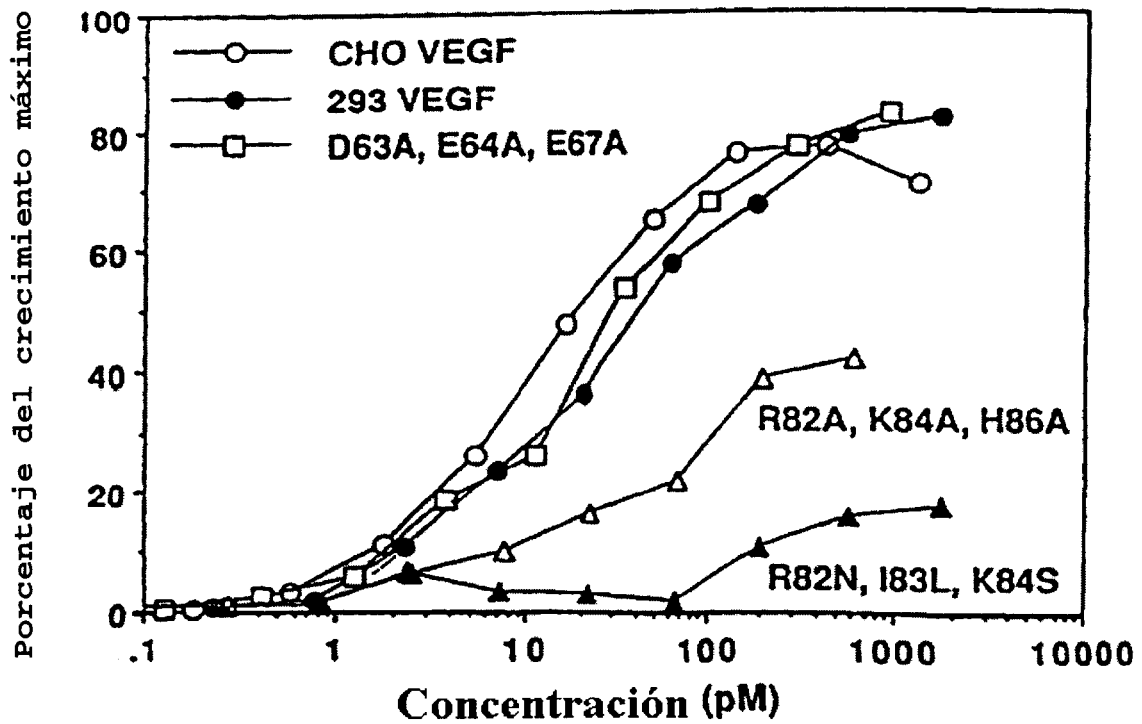


FIG. 11

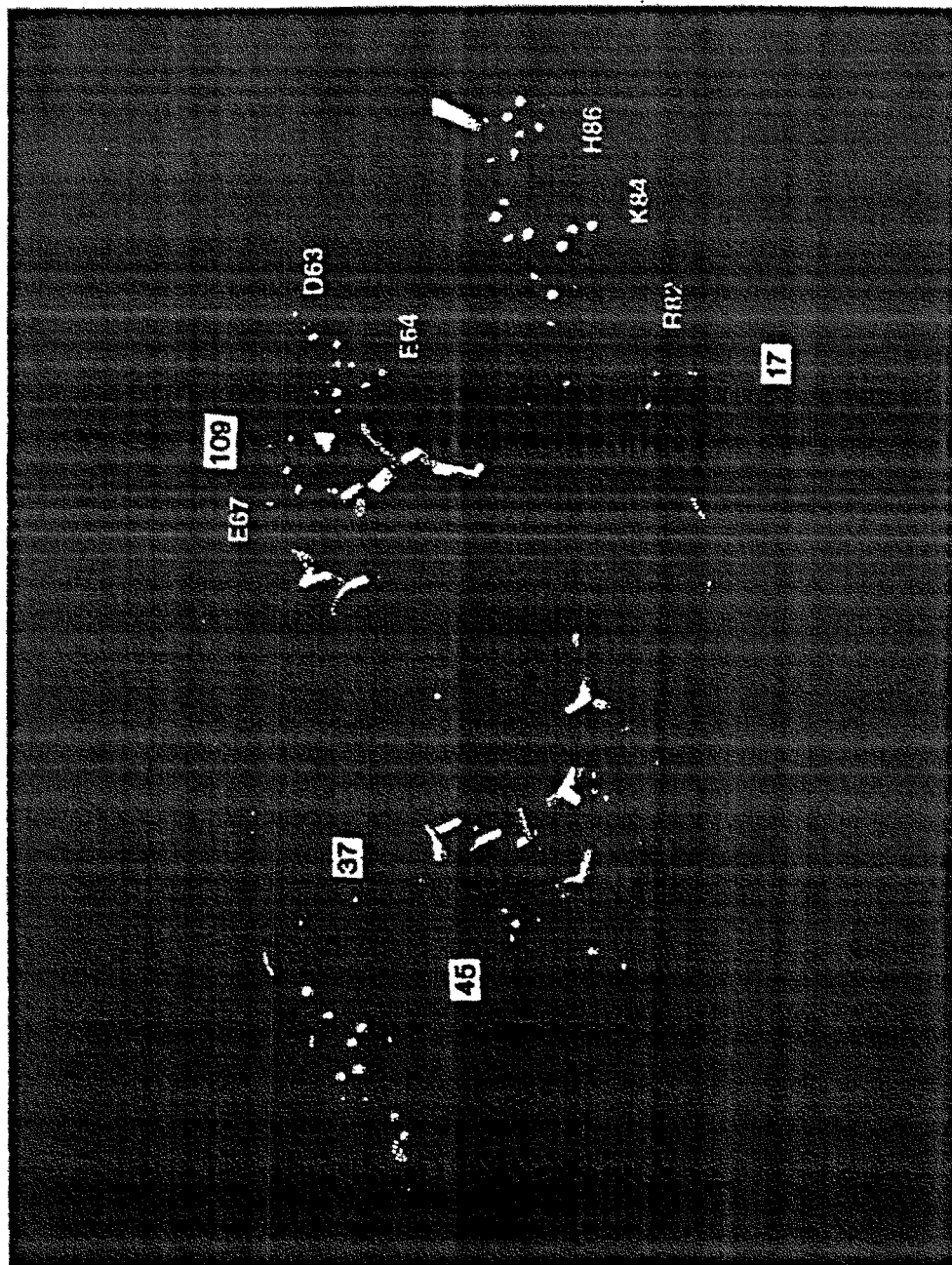


FIG. 12

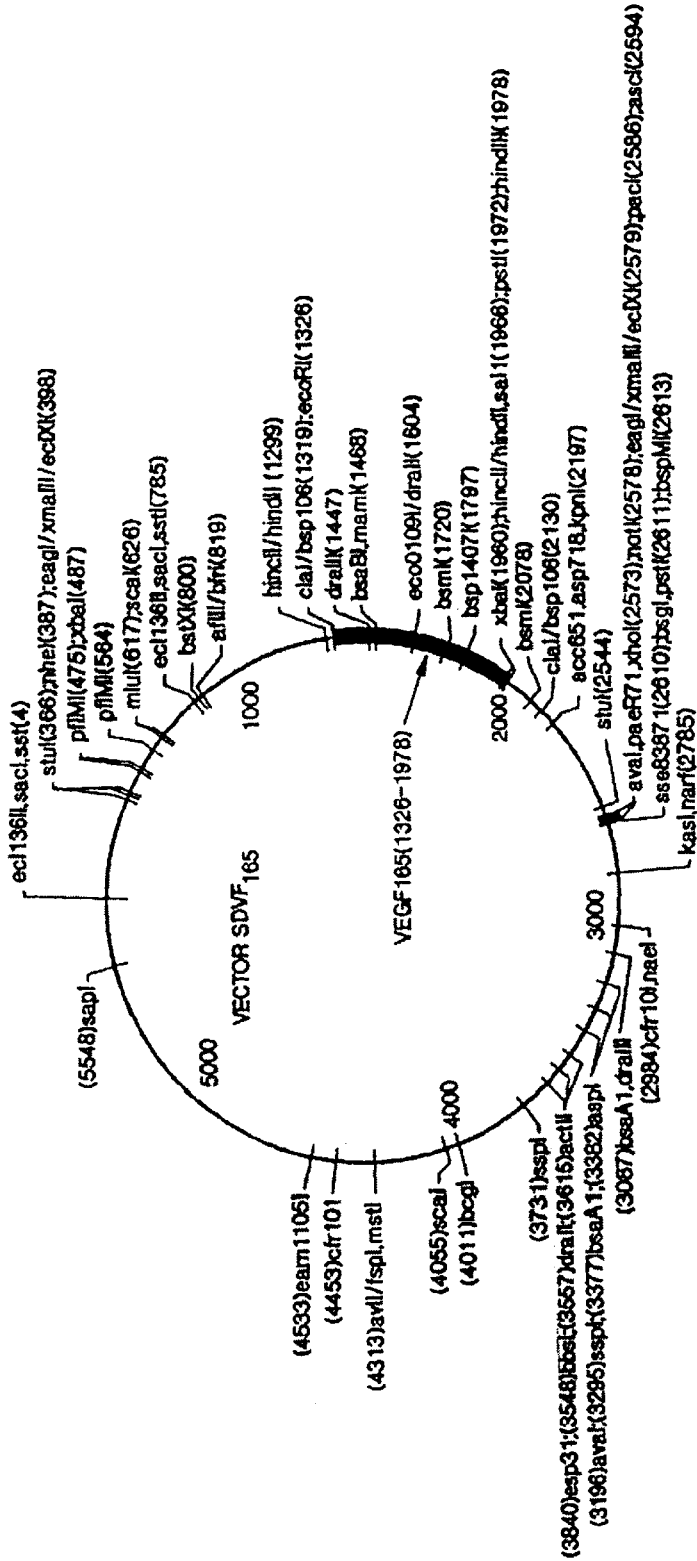


FIG. 13

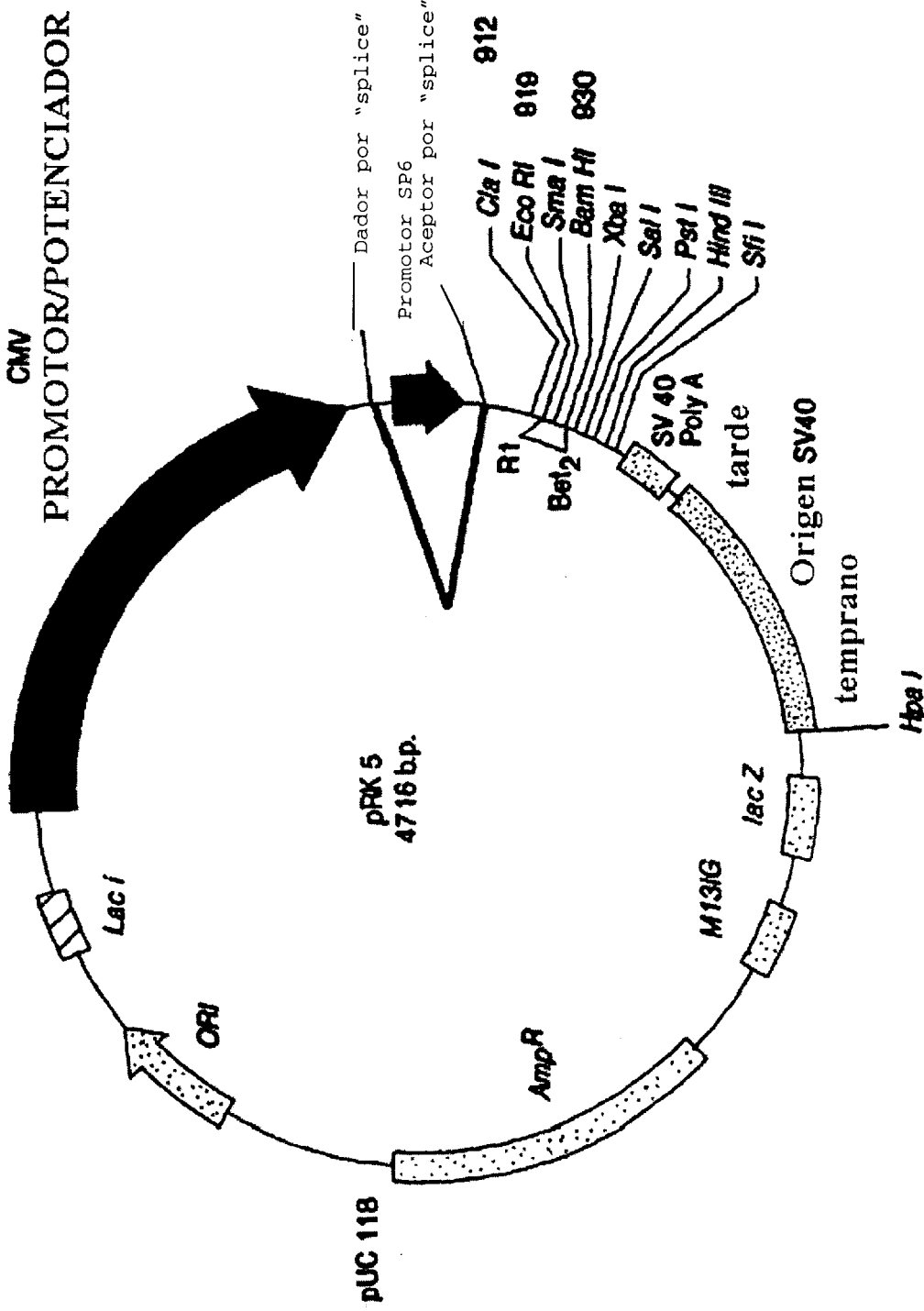


FIG. 14

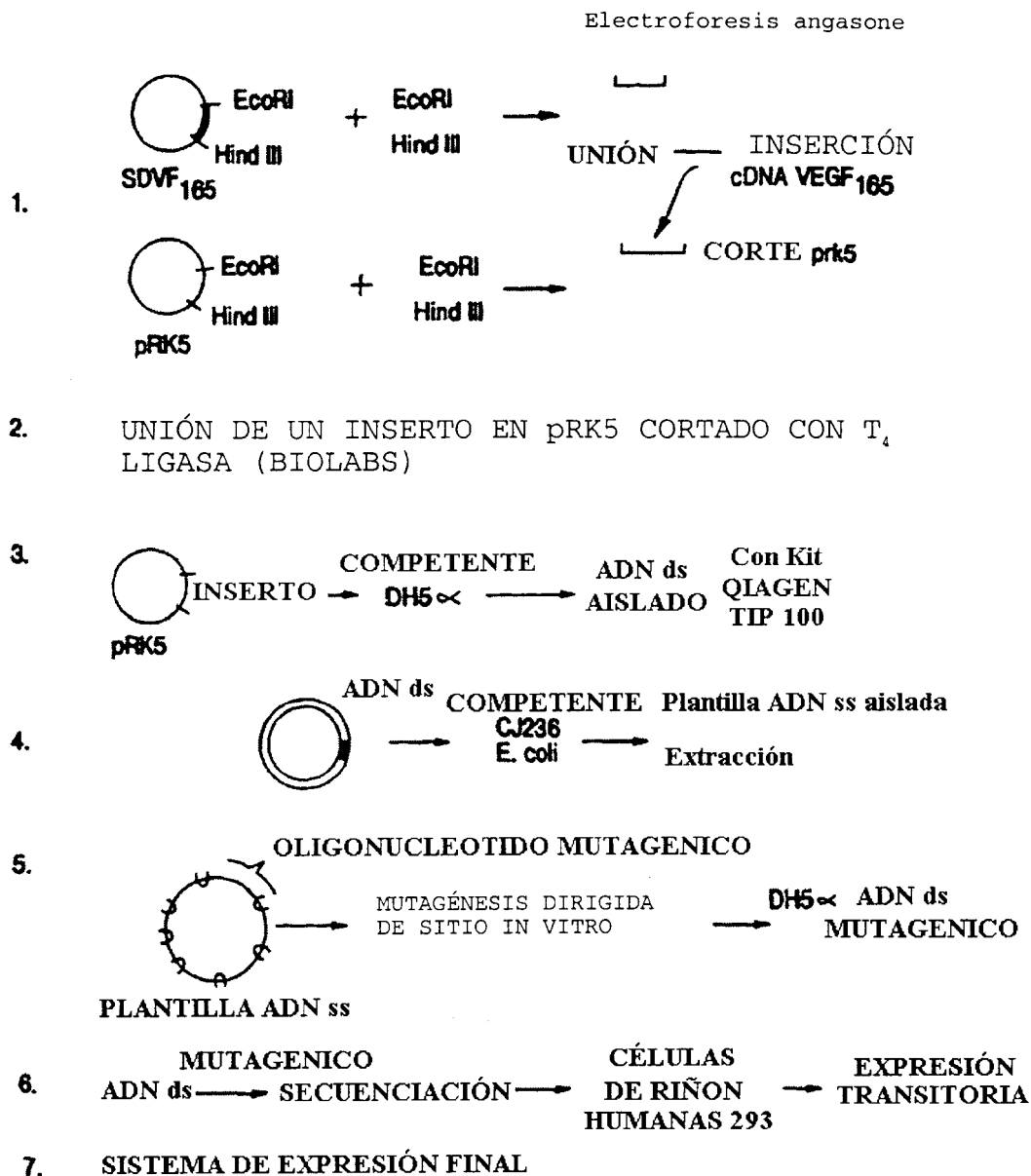
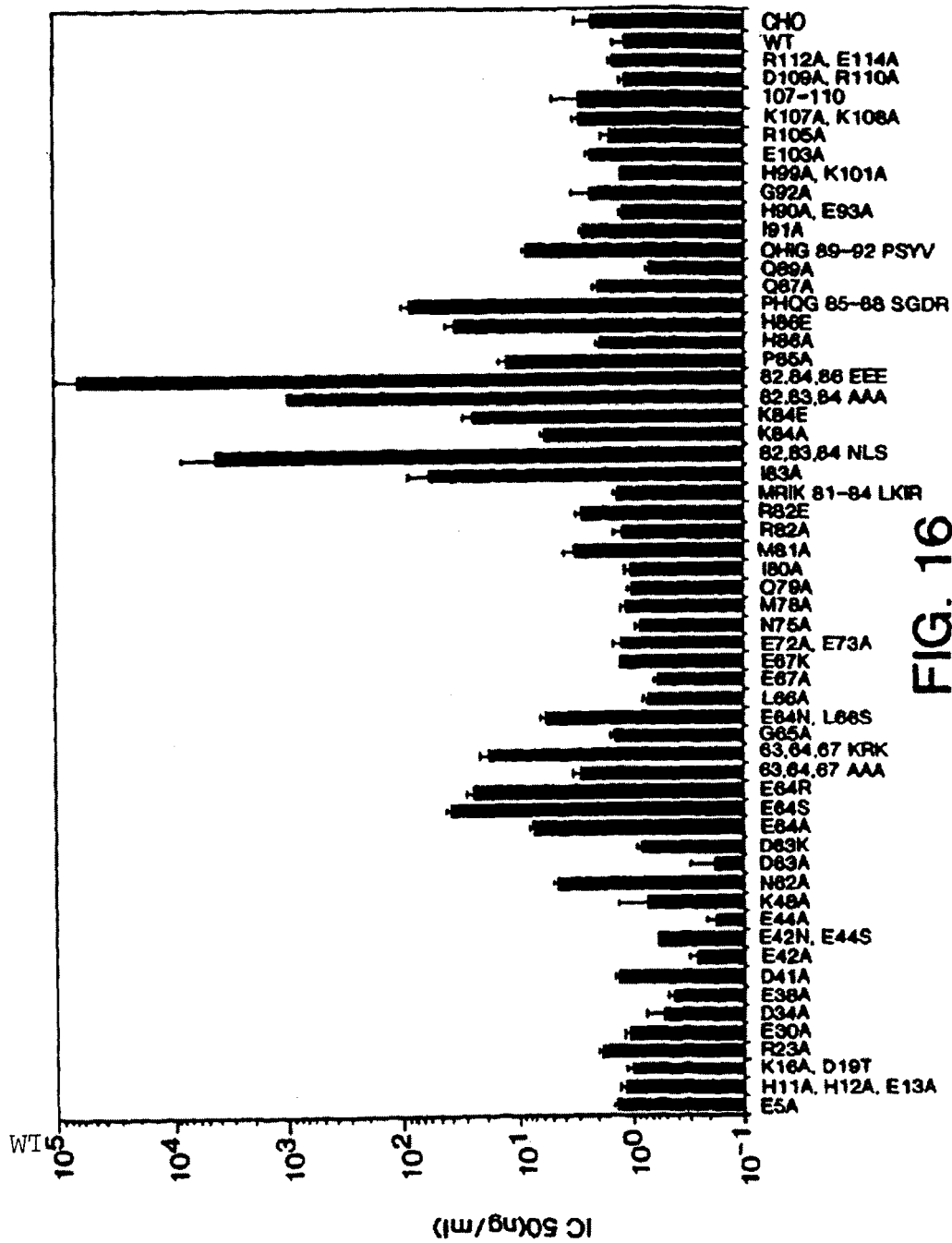


FIG. 15



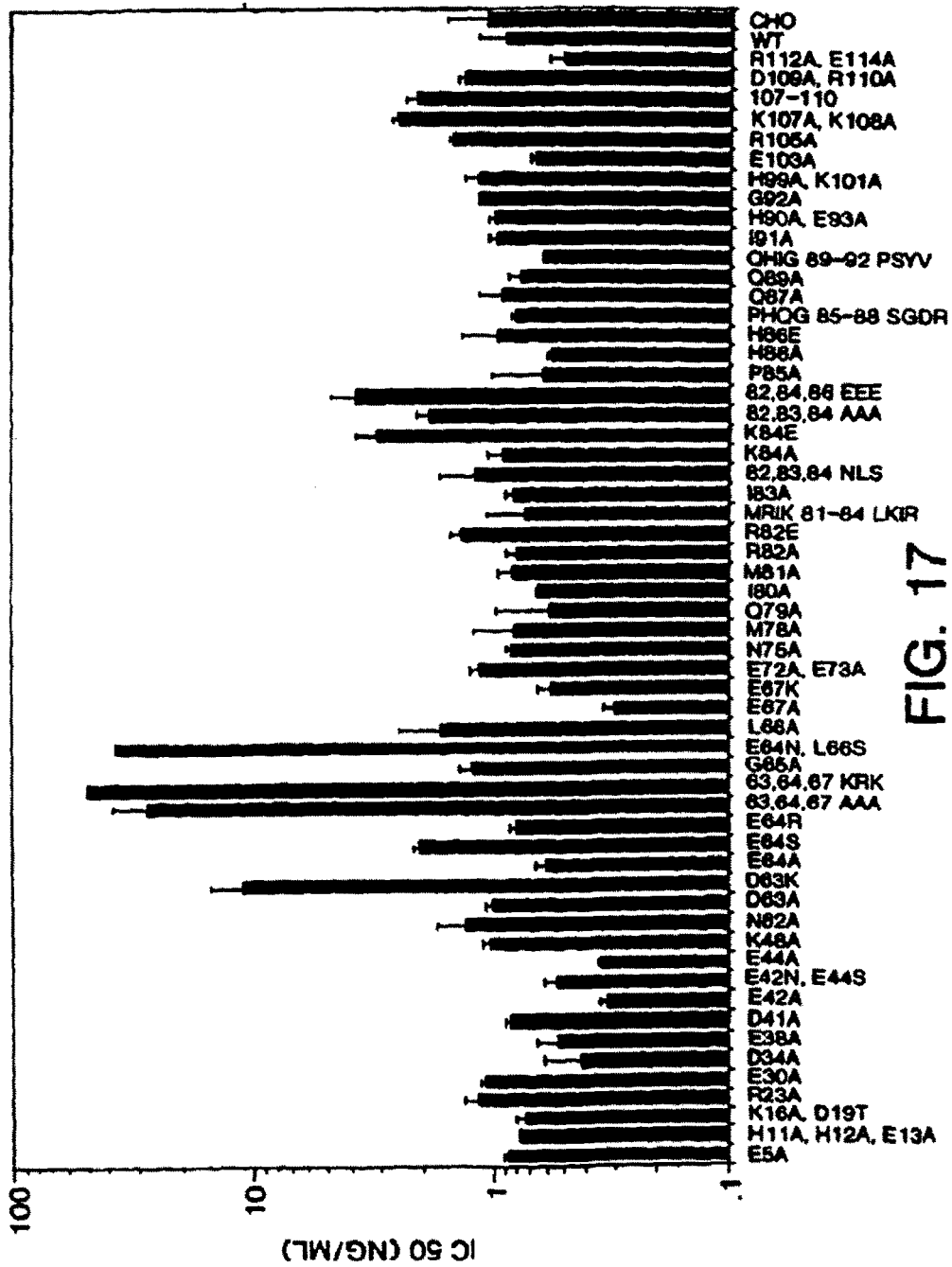


FIG. 17

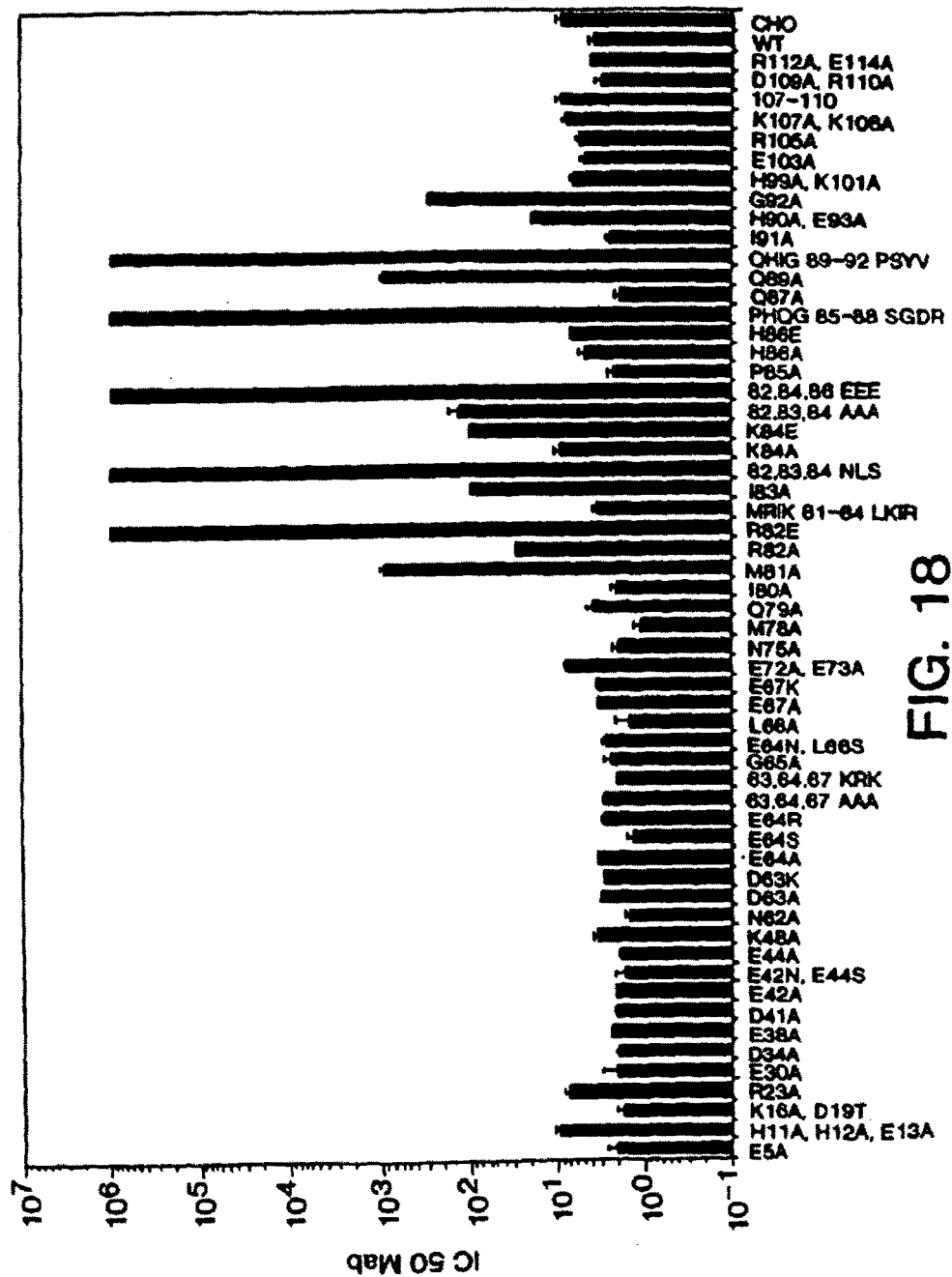


FIG. 18

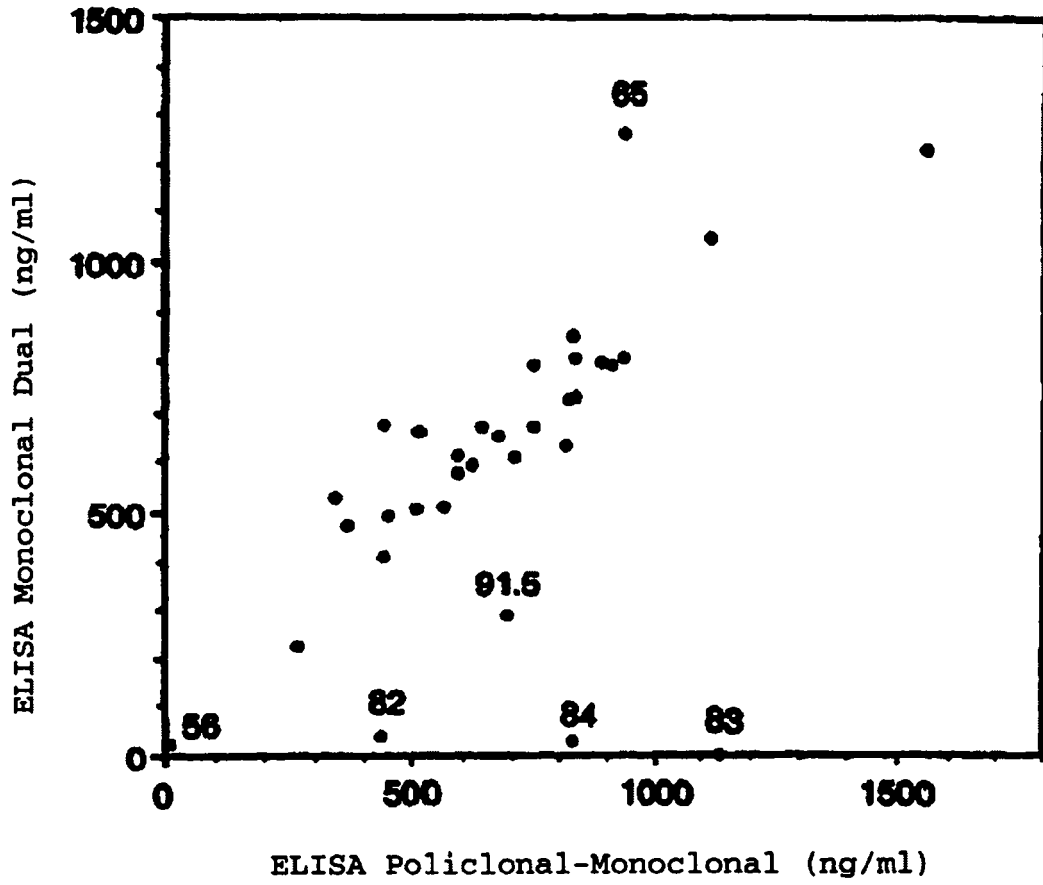


FIG. 19

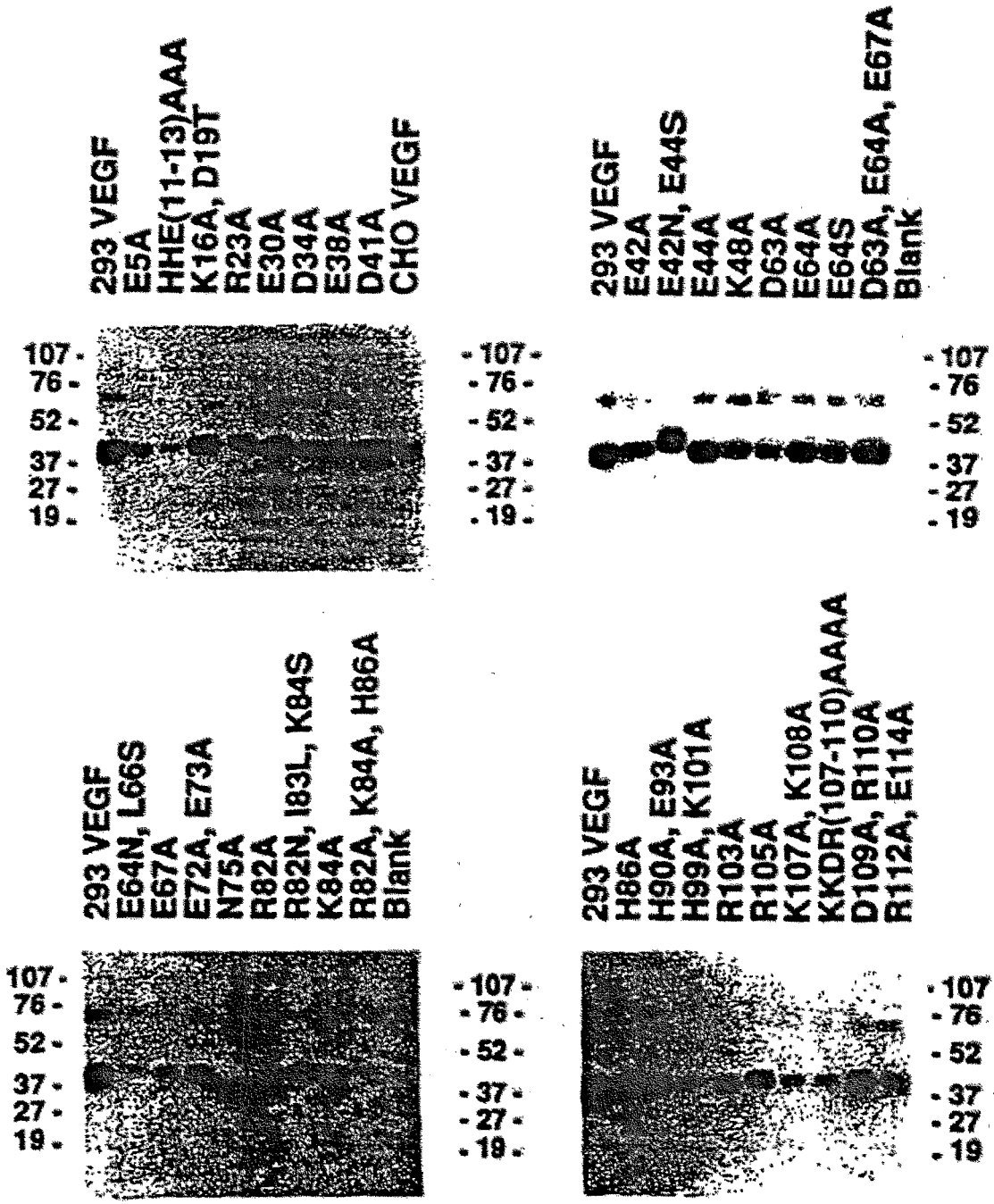


FIG. 20

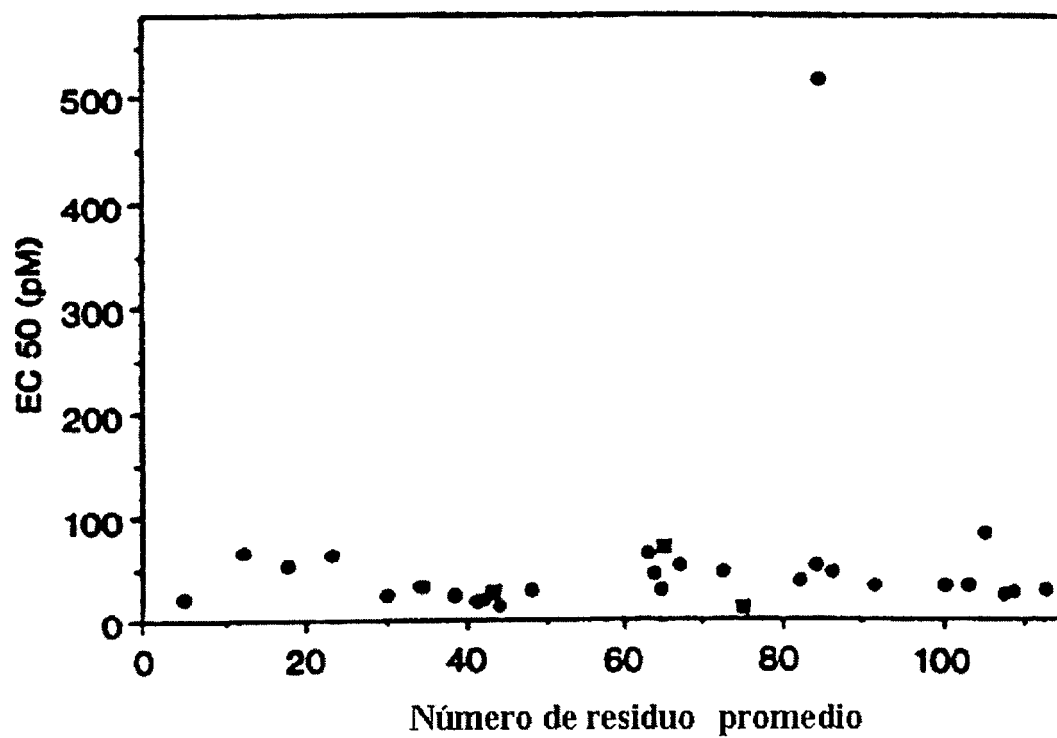


FIG. 21

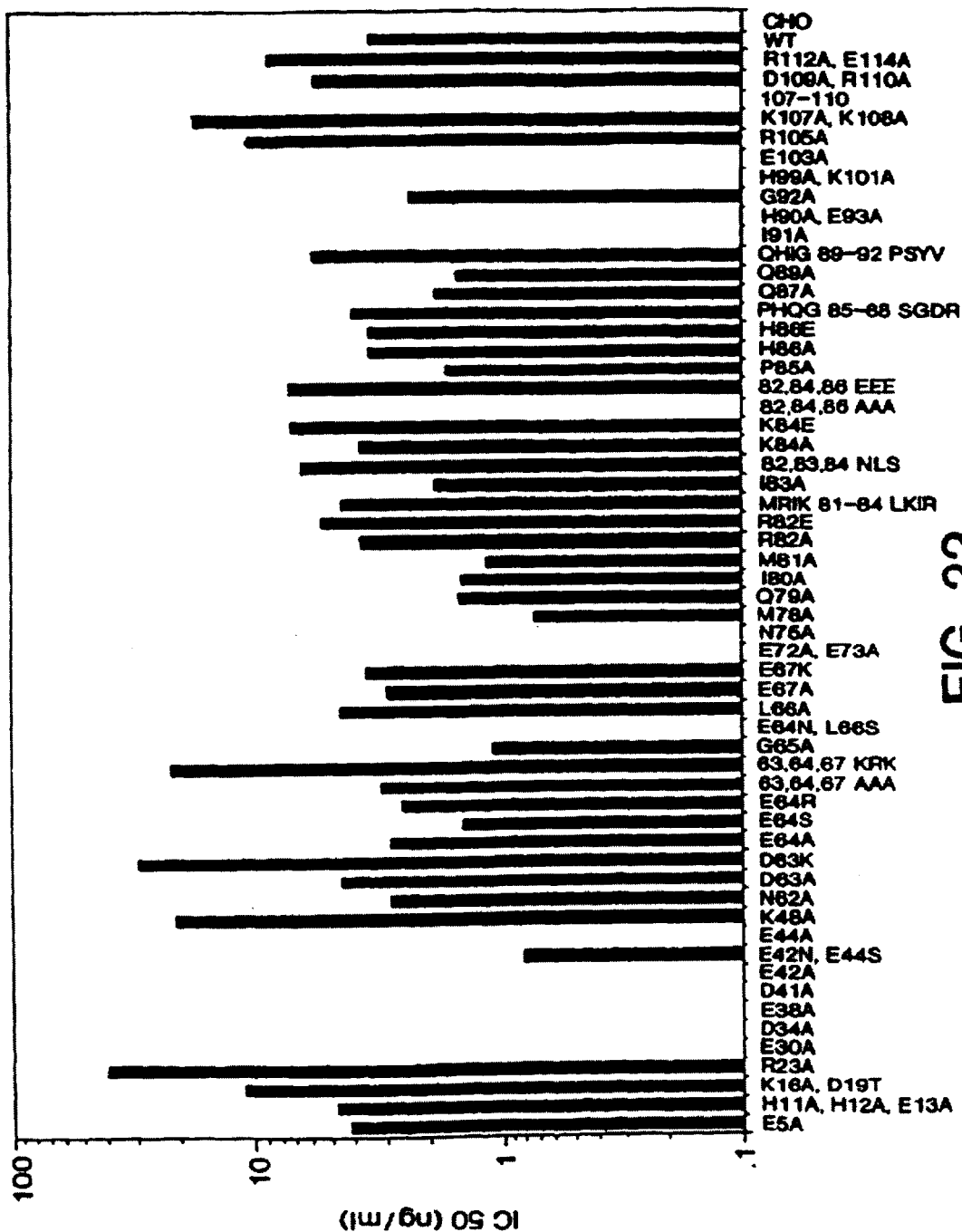


FIG. 22

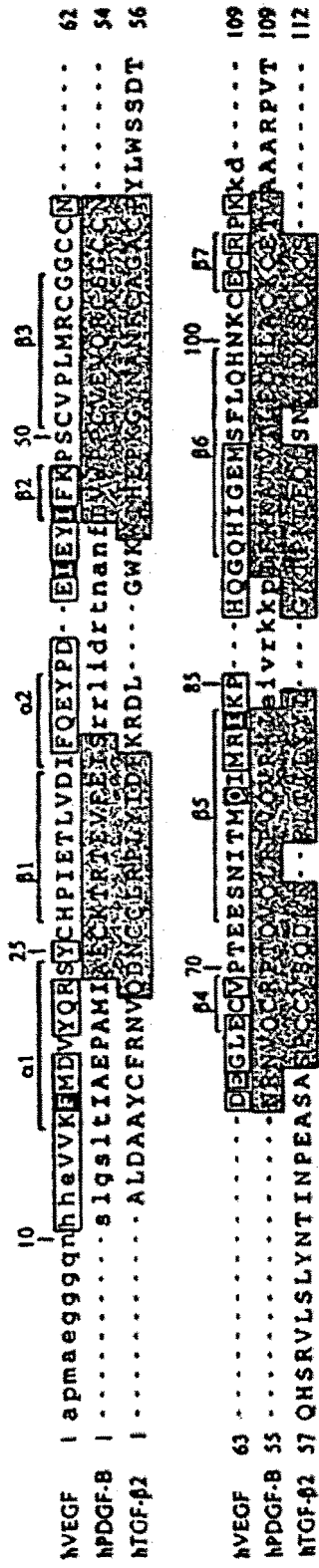


FIG. 23

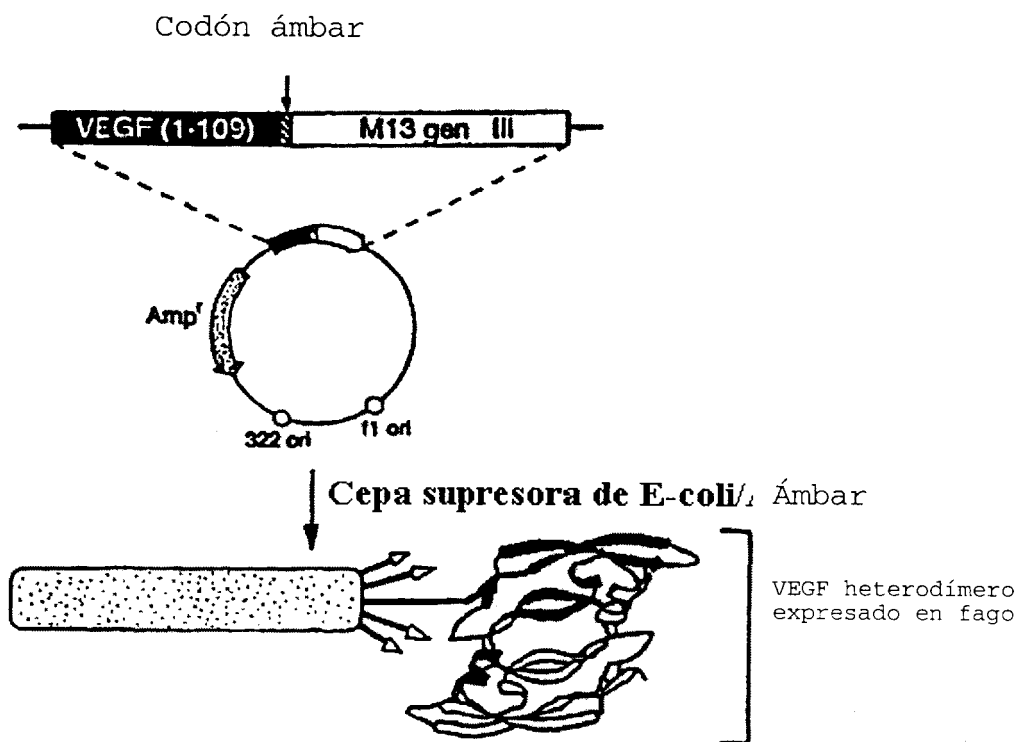


FIG. 24A

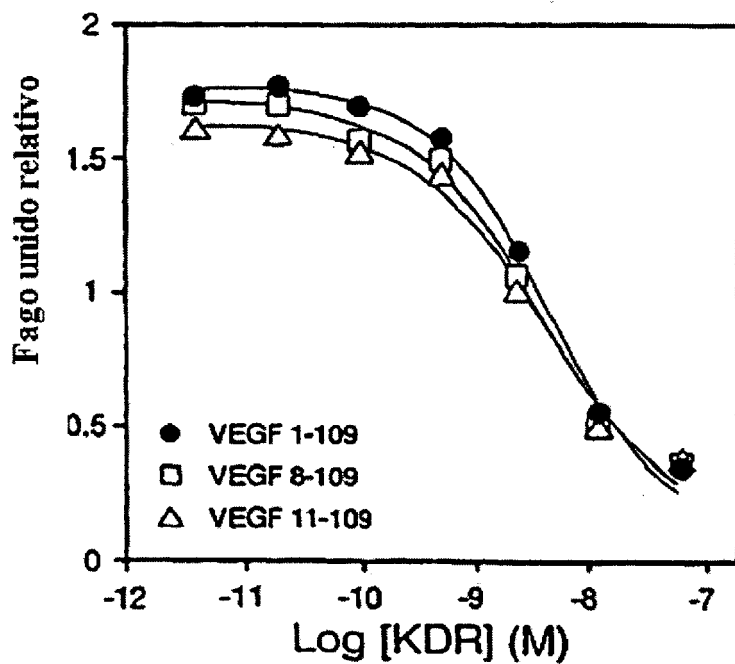


FIG. 24B

ES 2 309 990 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTE: Genentech, Inc.
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Variantes del Factor de Crecimiento de Células Endoteliales Vasculares, Sus Usos y Procesos para su Producción.
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 45
- (iv) DIRECCIÓN DE LA CORRESPONDENCIA:
- (A) DIRECCIÓN: Flehr, Hohbach, Test, Albritton & Herbert
 - 15 (B) CALLE: Four Embarcadero Center, Suite 3400
 - (C) CIUDAD: San Francisco
 - (D) ESTADO: California
 - (E) PAÍS: Estados Unidos

20 (F) CP: 94111-4187
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
 - 25 (B) ORDENADOR: PC IBM Compatible
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: Patentin Release #1.0, Versión #1.30
- 30 (vi) DATOS DE LA PRESENTE SOLICITUD:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 23/08/1996
 - 35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS DE LA SOLUCITUD PRIORITARIA:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/691,791
 - 40 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 23/08/1996
- (vii) DATOS DE LA SOLUCITUD PRIORITARIA:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/567,200
 - 45 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 05/12/1995
- (vii) DATOS DE LA SOLUCITUD PRIORITARIA:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 60/002,827
 - 50 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 25/08/1995
- (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/REPRESENTANTE:
- (A) NOMBRE: Dreger, Walter H.
 - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 24.190
 - 55 (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: A-63758/WHD
- (ix) INFORMACIÓN DE COMUNICACIONES:
- (A) TELÉFONO: (415)781-1989
 - 60 (B) TELEFAX: (415)398-3249
 - (C) TELEX: 910 277299

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 1:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 990 pares de bases

ES 2 309 990 T3

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 57.629

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 1:

15	CAGTGTGCTG GCGGCCCGGC GCGAGCCGGC CCGGCCCGG TCGGGCCTCC GAAACC	56
	ATG AAC TTT CTG CTG TCT TGG GTG CAT TGG AGC CTC GCC TTG CTG CTC	104
	Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu	
	1 5 10 15	
20	TAC CTC CAC CAT GCC AAG TGG TCC CAG GCT GCA CCC ATG GCA GAA GGA	152
	Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly	
	20 25 30	
25	GGA GGG CAG AAT CAT CAC GAA GTG GTG AAG TTC ATG GAT GTC TAT CAG	200
	Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln	
	35 40 45	
30	CGC AGC TAC TGC CAT CCA ATC GAG ACC CTG GTG GAC ATC TTC CAG GAG	248
	Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu	
	50 55 60	
35	TAC CCT GAT GAG ATC GAG TAC ATC TTC AAG CCA TCC TGT GTG CCC CTG	296
	Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu	
	65 70 75 80	
40	ATG CGA TGC GGG GGC TGC TGC AAT GAC GAG GGC CTG GAG TGT GTG CCC	344
	Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro	
	85 90 95	
45	ACT GAG GAG TCC AAC ATC ACC ATG CAG ATT ATG CGG ATC AAA CCT CAC	392
	Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His	
	100 105 110	
50	CAA GGC CAG CAC ATA GGA GAG ATG AGC TTC CTA CAG CAC AAC AAA TGT	440
	Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys	
	115 120 125	
55	GAA TGC AGA CCA AAG AAA GAT AGA GCA AGA CAA GAA AAT CCC TGT GGG	488
	Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly	
	130 135 140	

ES 2 309 990 T3

CCT TGC TCA GAG CGG AGA AAG CAT TTG TTT GTA CAA GAT CCG CAG ACG 536
 Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr
 145 150 155 160
 5 TGT AAA TGT TCC TGC AAA AAC ACA GAC TCG CGT TGC AAG GCG AGG CAG 584
 Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
 165 170 175
 10 CTT GAG TTA AAC GAA CGT ACT TGC AGA TGT GAC AAG CCG AGG CGG 629
 Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 180 185 190
 15 TGAGCCGGGC AGGAGGAAGG AGCCTCCCTC AGGGTTTCGG GAACCAGATC TCTCACCAGG 689
 AAAGACTGAT ACAGAACGAT CGATACAGAA ACCACGCTGC CGCCACCACA CCATCACCAT 749
 CGACAGAACA GTCCTTAATC CAGAAACCTG AATGAAGGA AGAGGAGACT CTGCGCAGAG 809
 20 CACTTTGGGT CCGGAGGGCG AGACTCCGGC GGAAGCATTTC CCGGGCGGGT GACCCAGCAC 869
 GGTCCCTCTT GGAATTGGAT TCGCCATTTT ATTTTCTTG CTGCTAAATC ACCGAGCCCG 929
 25 GAAGATTAGA GAGTTTTATT TCTGGGATTC CTGTAGACAC ACCGCGGCCG CCAGCACACT 989
 G 990

30 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 2:

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
 (A) LONGITUD: 191 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 2:

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

65

ES 2 309 990 T3

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 100 105 110
 5 Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
 115 120 125
 10 Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly
 130 135 140
 15 Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr
 145 150 155 160
 20 Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
 165 170 175
 Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 180 185 190

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 3:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 109 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) HEBRA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 3:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 4:

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 109 aminoácidos

ES 2 309 990 T3

- (B) TIPO: aminoácido
- (C) HEBRA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 4:

10 **Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu Cys**
1 5 10 15

15 **Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp Arg**
 20 25 30

20 **Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln Arg**
 35 40 45

25 **Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr Gln**
 50 55 60

30 **Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg Lys**
65 70 75 80

Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu Ala
 85 90 95

Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr
 100 105

35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

40

- (A) LONGITUD: 112 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) HEBRA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 5:

50

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys
1 5 10 15

55 **Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp**
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys
 35 40 45

60 **Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu**
 50 55 60

65

ES 2 309 990 T3

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser
65 70 75 80

5 **Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro**
85 90 95

10 **Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser**
100 105 110

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 6:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 59 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 6:

CCTATGGCTG AAGGCGGCCA GAAGCCTCAC GAAGTGGTGA AGTTCATGGA CGTGTATCA 59

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 7:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 99 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 7:

AGTAGCAAGC TTGACGTGTG GCAGGCTTGA GATCTGGCCA TACACTTGAG TGACAATGAC 60

45 ATCCACTTTG CCTTTCTCTC CACAGGTGTC CACTCCCAG 99

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 8:

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 8:

60 AGGCTGCTGC AGTTCGACGT GGGAGTGGAC 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 9:

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases

ES 2 309 990 T3

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 9:

10

CCCTCCTCCG GCTGCCATGG GTGC

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 10:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

20

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 10:

25

CTTCACCACG GCGGCGGCAT TCTGCCCTCC

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 11:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

35

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

40

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 11:

CTGATAGACG GCCATGAAGG CCACCACTTC GTG

33

45

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

50

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

55

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 12:

60

GCAGTAGCTG GCCTGATAGA CATC

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 13:

65

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 309 990 T3

- (C) HEBRA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 13:

CACCAGGGTG GCGATTGGGG CGCAGTAGCT GCG

33

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 36 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 14:

ATCAGGGTAG GCCTGGAAGA TGGCCACCAG GGTCTC

36

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 33 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 15:

GAAGATGTAG GCGATGGCGG CAGGGTACTC CTG

33

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 16:

ACAGGATGGG GCGAAGATGT ACTC

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: desconocida

ES 2 309 990 T3

- (D) TOPOLOGÍA: desconocida
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 17:
- GCCCCGCAG GCCATCAGGG GCAC 24
- 10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 18:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 36 pares de bases
- 15 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 18:
- GGGCACACAG GCCAGGCCGG CGGCATTGCA GCAGCC 36
- 25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 19:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 27 pares de bases
- 30 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida
- 35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 19:
- 40 GATGTTGGAG GCGGCAGTGG GCACACA 27
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 20:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 36 pares de bases
- 45 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: desconocida
- 50 (D) TOPOLOGÍA: desconocida
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 20:
- 55 CTGGCCTTGG GCAGGGGCGA TGGCCATAAT CTGCAT 36
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 21:
- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 33 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 65 (C) HEBRA: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

ES 2 309 990 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 21:

5 GAAGCTCATG GCTCCTATGG CCTGGCCTTG GTG 33

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 22:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 22:

GCATTCACAG GCGTTGGCCT GTAGGAAGCT 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 23:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30 (C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 23:

TGGTCTGCAG GCACATTTGT TGTG 24

40 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

45 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 24:

55 TTGTCTTGCG GCGGCGGCGG CTGGTCTGCA TTC 33

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 25:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

65 (C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

ES 2 309 990 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 25:

TGCTCTATCG GCGGCTGGTC TGCATTC

27

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

10

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 26:

TTGTCTTGCG GCGGCTTTCT TTGGTCT

27

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

25

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 27:

TTTCTTTGGG GCGCATTAC ATTT

24

35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

40

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 28:

ACAGGGATTG GCTTGGGCTG CTCTATCTTT

30

50

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

55

60

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

65

ES 2 309 990 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 29:

CATGGTGATG GCGGACTCCT CAGT

24

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

10

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 30:

CACCACTTCG GTATGATTCT GCCC

24

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

25

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 31:

CTCCAGGCCG GTGTCATTGC AGCA

24

35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

40

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 32:

GCAACGCGAG GTTGTGTTTT TGCA

24

50

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

55

60

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

65

ES 2 309 990 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 33:

TCTGCAAGTG GTTTCGTTTA ACTC

24

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

10

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 34:

CACCACTTCG TGGGCATTCT GCCCTCC

27

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

25

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 35:

CTTCACCACT TCGGCATGAT TCTGCCC

27

35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

40

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 36:

GAACTTCACC ACGGCGTGAT GATTCTG

27

50

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 37:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

60

65

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

ES 2 309 990 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 37:

GACATCCATG AAGGCCACCA CTTCGTG

27

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 38:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 38:

15 20 GCGCTGATAG ACGGCCATGA ACTTCACCAC

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 39:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 39:

30 35 GGTCTCGATT GGGGCGCAGT AGCTGCG

27

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 40:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 40:

45 50 CTCCTGGAAG ATGGCCACCA GGGTCTC

27

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 41:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 41:

ES 2 309 990 T3

CTCATCAGGG TAGGCCTGGA AGATGTC

27

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 42:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

10

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 42:

GTAATCGATC TCGGCAGGGT ACTCCTG

27

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 43:

20

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

25

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 43:

GTCCACCAGG GTGGCGATTG GATGGCA

27

35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 44:

40

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: desconocida

45

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 44:

50

GATGTACTCG ATGGCATCAG GGTACTC

27

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID No. 45:

55

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

60

(C) HEBRA: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

65

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID No. 45:

CTTGAAGATG TAGGCGATCT CATCCAG

27