



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 691**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12N 5/08** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97918811 .7**

96 Fecha de presentación : **25.04.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **0953046**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.11.1999**

54

Título: **Antígeno de células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas y métodos para su uso.**

30

Prioridad: **26.04.1996 US 639891**  
**23.04.1997 US 842382**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.11.2009**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.11.2009**

73

Titular/es: **Miltenyi Biotec GmbH**  
**Friedrich-Ebert-Strasse 68**  
**51429 Bergisch Gladbach, DE**

72

Inventor/es: **Miraglia, Sheri;**  
**Godfry, Wayne, G.;**  
**Yin, Amy y**  
**Buck, David**

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 327 691 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

Antígeno de células madre y progenitoras hematopoyéticas humanas y métodos para su uso.

5 **Introducción****Campo técnico**

Esta invención se refiere a antígenos expresados por células madre y células progenitoras hematopoyéticas y a  
10 métodos para usar tales antígenos, especialmente para separación y purificación de células.

**Antecedentes**

La alta renovación de células sanguíneas de mamífero requiere un suministro de células madre hematopoyéticas  
15 que sean capaces de dar lugar a otros linajes de células sanguíneas. La progenie inmediata de la célula madre hema-  
topoyética se denomina células progenitoras y es capaz de dar lugar a diversos tipos celulares dentro de uno o más  
linajes, es decir, los linajes eritroide, mieloide y linfoide. Las poblaciones de células madre y de células progenitoras  
constituyen solamente un pequeño porcentaje del número total de células en médula ósea, hígado fetal, etc. Estas  
20 poblaciones son de inmenso interés debido a su capacidad de repoblar el sistema hematopoyético.

En la bibliografía se han descrito varios métodos para la purificación o el enriquecimiento de poblaciones de células  
madre y células progenitoras hematopoyéticas. Existe un interés comercial significativo en estos métodos debido a que  
los progenitores hematopoyéticos tienen varios usos clínicos. El trasplante de células progenitoras se usa actualmente  
junto con quimioterapia y radiación para el tratamiento de leucemia, cáncer de mama y otros tumores. Frecuentemente  
25 se usan trasplantes autólogos para evitar el peligro de rechazo de injerto, pero existe un riesgo aumentado de reapari-  
ción de enfermedad, debido a la presencia de células tumorales en la población de células de injerto. Por lo tanto, se  
prefiere el trasplante de una fuente más purificada de células progenitoras.

También existe interés en el uso de células progenitoras hematopoyéticas como un vehículo para terapia génica.  
30 Aunque no se ha probado en la clínica, la longevidad de células madre hematopoyéticas y la diseminación de su proge-  
nie en la vasculatura son características deseables. Se han descrito varios vectores, que incluyen varias construcciones  
basadas en retrovirus y adenovirus, que pueden transfectar células madre hematopoyéticas.

Las proteínas y otros marcadores de superficie celular encontrados en poblaciones de células madre y células pro-  
35 genitoras hematopoyéticas son de gran interés, ya que son útiles para preparar reactivos para identificación, separación  
y aislamiento de estas poblaciones y para la caracterización adicional de estas importantes células. Aunque ahora se  
conoce que algunos antígenos se pueden usar en la identificación y separación (positiva y negativa) de células ma-  
dre, tales como (por ejemplo) el antígeno CD 34, que se encuentra en células madre pero no en células sanguíneas  
maduras, existe una necesidad del desarrollo de otros antígenos, particularmente uno que pueda simplificar la identi-  
40 ficación y separación de clases y subclases deseables de células, especialmente células madre y células progenitoras  
hematopoyéticas.

**Bibliografía anterior**

La Patente de Estados Unidos N° 5.061.620 describe una composición de células madre hematopoyéticas humanas  
sustancialmente homogénea y el modo para obtener tal composición. La hematopoyesis asociada a células estromales  
se describe por Paul *et al.* (1991) *Blood* **77**: 1723-1733. El fenotipo de células madre con tinción con rodamina se  
analiza en Spangrude y Johnson (1990) *P.N.A.S.* **87**: 7433-7437. La expresión de antígeno de superficie celular en la  
hematopoyesis se analiza en Strauss *et al.* (1983) *Blood* **61**: 1222-1231 y Sieff *et al.* (1982) *Blood* **60**: 703-713. Se  
50 encuentran descripciones de células hematopoyéticas pluripotenciales en McNiece *et al.* (1989) *Blood* **74**: 609-612  
y Moore *et al.* (1979) *Blood Cells* **5**: 297-311. La caracterización de una célula progenitora hematopoyética humana  
capaz de formar colonias que contienen blastocitos *in vitro* se encuentra en Gordon *et al.* (1987) *J. Cell. Physiol.*  
**130**: 150-156 y Brandt *et al.* (1988) *J. Clin. Invest.* **82**: 1017-1027. El uso de células progenitoras en trasplante se  
analiza en To *et al.* en *Progenitor Threshold in Transplantation* (ISBN 1-880854 17-1) págs. 15-20. Las utilidades para  
55 las composiciones celulares obtenidas usando los métodos y las composiciones de la invención se describen en estas  
publicaciones, entre otras.

El uso de separación magnética de alto gradiente para el aislamiento de células progenitoras hematopoyéticas hu-  
manas se describe en Thomas y Landsdorp (1992) en *Advances in Bone Marrow Purging* págs.537-544; y Kato y  
60 Radbruch (1993) *Cytometry* **14**: 384-392. Otros métodos de selección magnética para células progenitoras hematopo-  
yéticas humanas se describen en Bigas *et al.* (1992) en *Advances in Bone Marrow Purging* págs. 545-551; Oku *et al.*  
(1992) en *Advances in Bone Marrow Purging* págs. 553-560; y Hardwick *et al.* (1992) en *Advances in Bone Marrow*  
*Purging* págs. 583-589. Se describe la clasificación de células magnéticas de alto gradiente en Miltenyi *et al.* (1990)  
*Cytometry* **11**: 231-238. Molday, Patente de Estados Unidos N° 4.452.773 describe la preparación de microesferas de  
65 hierro magnético-dextrano y proporciona un resumen que describe los diversos medios de preparación de partículas  
adecuadas para la unión a materiales biológicos.

## Sumario de la invención

Se proporcionan métodos y composiciones para el enriquecimiento y la caracterización de células progenitoras y madre hematopoyéticas humanas. Se ha identificado un antígeno, denominado en este documento el antígeno AC133, que está presente en células madre y en células progenitoras y que se puede usar para la identificación y/o separación de estas importantes células de la gran mayoría de las células presentes en una fuente biológica (u otra) de células hematopoyéticas. Las composiciones de antígeno novedosas y los reactivos que reaccionan con las mismas, tales como anticuerpos, se proporcionan para el uso en los métodos de la invención y para la investigación adicional de biología de células progenitoras y madre hematopoyéticas. Por ejemplo, las células hematopoyéticas se pueden obtener de diversas fuentes, que incluyen médula ósea fetal y adulta, células de sangre periférica movilizadas por citoquinas e hígado fetal, y se pueden separar usando los reactivos y métodos de la invención.

En consecuencia, en un primer aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente al antígeno AC133, antígeno del cual se muestra la secuencia en la SEC ID N°: 2.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el enriquecimiento de células madre o progenitoras hematopoyéticas o ambas, comprendiendo dicho método:

combinar una población mixta de células humanas que comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas o ambas con un reactivo que se une específicamente al antígeno AC133, antígeno del cual se muestra la secuencia en la SEC ID N°: 2; y

seleccionar las células que se unen a dicho reactivo;

en el que dichas células seleccionadas están enriquecidas en actividad de células madre o progenitoras hematopoyéticas o ambas, dependiendo de si dicha población mixta de células humanas contenía células madre o progenitoras hematopoyéticas o ambas, respectivamente,

en el que dicho método no comprende la destrucción de un embrión humano.

En otro aspecto, la invención proporciona una población sustancialmente pura de células progenitoras hematopoyéticas, en la que dichas células se unen a un reactivo que se une específicamente al antígeno AC133, antígeno del cual se muestra la secuencia de aminoácidos como la SEC ID N°: 2, en la que dichas células no se obtienen directamente por un método que da como resultado la destrucción de un embrión humano.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que tiene una región codificante de aminoácidos para AC133 como se expone en la Figura 12 (SEC ID N°: 1), a condición de que si dicha molécula es una molécula de ARN, U sustituye a T en dicha secuencia de dicha molécula.

La invención también proporciona un polipéptido aislado, donde dicho polipéptido comprende (a) una secuencia de aminoácidos de AC133 como se expone en la SEC ID N°: 2; (b) una secuencia de aminoácidos en la que dicha secuencia es una subsecuencia de (a) y tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos y comprende un epítipo.

Un polipéptido aislado de la invención incluye uno que comprende la secuencia de aminoácidos de extremo N extracelular, aa 20-107; primera región transmembrana, aa 107-126; primer bucle citoplasmático, aa 127-157; segunda región transmembrana, aa 158-179; primer bucle extracelular, aa 180-435; tercera región transmembrana, aa 436-454; segundo bucle citoplasmático, aa 455-480; cuarta región transmembrana, aa 481-503; segundo bucle extracelular, aa 504-792; quinta región transmembrana, aa 793-816; o extremo C citoplasmático, aa 817-865; de la SEC ID N°: 2.

La invención proporciona adicionalmente un método para identificar un reactivo que se une a células madre hematopoyéticas humanas, que comprende detectar la unión del reactivo con un polipéptido de la invención. El reactivo puede ser uno que se une específicamente al antígeno AC133 de la SEC ID N°: 2 con una reactividad cruzada inferior al 5% con cualquier antígeno presente en células sanguíneas maduras.

## Breve descripción de los dibujos

La invención que se está describiendo ahora de forma general, se entenderá mejor con referencia a la siguiente descripción de realizaciones específicas junto con las figuras que forman parte de la presente memoria descriptiva, en la que:

La Figura 1 muestra un diagrama de puntos de análisis por separación de células activadas por fluorescencia (FACS) de células hepáticas fetales. El eje y representa tinción de células con anticuerpo de AC133 conjugado con ficoeritrina (PE). Las células se tiñeron con colorante de contraste con HPCA2-FITC (anti-CD34). Los números representan el porcentaje de células totales que entran dentro de los cuadrantes.

La Figura 2 es un gráfico que muestra el análisis FACS de la expresión del antígeno AC133 en células Y79.1 activadas por acetato de forbol miristato (PMA).

## ES 2 327 691 T3

La Figura 3 es un gráfico que muestra el análisis FACS del antígeno AC133 y la expresión de CD34 en células Y79.1 activadas por PMA.

La Figuras 4A y 4B muestran diagramas de puntos de análisis FACS de 3 colores de los anticuerpos de AC133, CD38 y HLA-DR en células hepáticas fetales. El eje *x* en la Figura 4 representa HLA-DR-FITC, y el eje *y* representa la tinción de células con AC133-PE. El eje *x* en la Figura 4B representa CD38-FITC, y el eje *y* representa la tinción de células con AC133-PE.

Las Figuras 5A, 5B, 5C y 5D muestran diagramas de puntos del análisis FACS de los anticuerpos CD38, HLA-DR, CD90 y CD117 en células positivas a AC133 purificadas a partir de hígado fetal. En la Figura 5A, el eje *x* representa la tinción con CD38-FITC y el eje *y* representa la tinción con HPCA2-PE. En las Figuras 5B, 5C y 5D, el eje *x* representa tinción con HPCA2-FITC. El eje *y* en la Figura 5B representa la tinción de células con anti-HLA-DR-PE. El eje *y* en la Figura 5C representa la tinción de células con anti-CD90-PE. El eje *y* en la Figura 5D representa la tinción de células con anti-CD117-PE. Los números representan el porcentaje de células totales que entran dentro de las entradas en cuadradas.

La Figura 6 es un gel que muestra los resultados de una inmunoprecipitación con anticuerpo de AC133 y las líneas celulares KG1a e Y79.1. Los carriles son los siguientes: 1) marcadores de peso molecular; 2) una dilución 1: 5 de lisado de KG1a no precipitado; 3) una dilución 1:50 de lisado de Y79.1 no precipitado; 4) lisado de KG1a precipitado con anticuerpo AC101 (CD34); 5) lisado de Y79.1 precipitado con anticuerpo AC101; 6) lisado de KG1a precipitado con anticuerpo HPCA2 (CD34); 7) lisado de Y79.1 precipitado con anticuerpo HPCA2; 8) lisado de KG1a precipitado con anticuerpo 16D11 (CD34); 9) lisado de Y79.1 precipitado con anticuerpo 16D11; 10) lisado de KG1a precipitado con anticuerpo de AC133; 11) lisado de Y79.1 precipitado con anticuerpo de AC133; 12) lisado mixto de KG1a e Y79.1 precipitado con una mezcla de anticuerpos de AC133 y HPCA2; 13) lisado de KG1a precipitado con anticuerpo 8A3 (anticuerpo CD109); 14) lisado de KG1a precipitado con anticuerpo 15G5 (anti-CD109).

Las Figuras 7A y 7B son gráficos que muestran el análisis FACS de la expresión del antígeno CD56 (Figura 7A) y AC133 (Figura 7B) en células Y79.1 activadas con PMA, tratadas o no tratadas con tunicamicina.

La Figura 8 es un diagrama de puntos que muestra el análisis FACS de la tinción con HPCA2-PE (eje *y*) de células hepáticas fetales purificadas magnéticamente para AC133. El eje *x* representa la tinción con un conjugado de glicoforina A-FITC.

Las Figuras 9A y 9B son diagramas de puntos que muestran el análisis FACS de tinción con HPCA2 de células mononucleares de sangre periférica de capa leuco-plaquetaria antes y después de separación magnética para AC133. El eje *y* muestra la tinción con HPCA2-PE, el eje *x* muestra la tinción con anticuerpos anti-CD45 y anti-CD15 conjugados con FITC.

La Figura 10 es un gráfico de barras que muestra la eficacia de clonación de células purificadas para AC133 y AC101 en un ensayo de capacidad de clonación.

La Figura 11 es un gráfico de barras que muestra la eficacia de cultivo en placas de células purificadas para AC133 y células negativas a AC133, positivas a CD34.

La Figura 12 es una fórmula química que muestra las secuencias de ADN y de aminoácidos para el antígeno AC133.

La Figura 13 es un diagrama esquemático de las regiones transmembrana y otras del antígeno AC133.

### 50 Descripción de realizaciones específicas

Se proporcionan métodos y composiciones que tienen uso en el enriquecimiento y/o la caracterización de células madre humanas y/o células progenitoras hematopoyéticas. La progenie inmediata de la célula madre hematopoyética, denominada en este documento células "progenitoras", es capaz de dar lugar a diversos tipos celulares dentro de uno o más linajes. En la presente invención, las células madre y/o un sub-conjunto de células progenitoras (es decir, células CFU-GM que se necesitan para injerto a corto plazo) se pueden identificar o seleccionar mediante el uso de reactivos que se unen específicamente a un antígeno descubierto recientemente denominado en este documento el antígeno (Ag) AC133, que es altamente específico para estas células. La alta especificidad tisular de la expresión del antígeno AC133 es particularmente ventajosa durante el enriquecimiento para poblaciones de células progenitoras altamente purificadas. Una población de células positivas a AC133 no está altamente enriquecida en células que son activas en ensayos que miden la actividad de células progenitoras, particularmente la actividad de CFU-GM. El subconjunto de células que es negativo a AC133 y positivo a CD34 está enriquecido en actividad de BFU-E, una medida de actividad de células progenitoras con destino eritroide.

Los reactivos que se unen específicamente al antígeno AC133 incluyen sin limitación ligandos fisiológicos, ligandos sintéticos, anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales. Un anticuerpo monoclonal de AC133 es cualquier anticuerpo monoclonal que interacciona específicamente con el antígeno de célula de AC133 expresado en un subconjunto de células progenitoras hematopoyéticas obtenido de médula ósea humana, médula ósea fetal e hígado, sangre

de cordón umbilical y sangre periférica de adulto. El subconjunto de células progenitoras reconocido por anticuerpos dirigidos a AC133 es CD34<sup>bright(muy positivo)</sup> y contiene sustancialmente toda la actividad de CFU-GM presente en el subconjunto de CD34<sup>+</sup> (así como las células que todavía son células madre recogidas en una colección de células progenitoras). Con propósitos de trasplante, las células activas en CFU-GM son de particular interés debido a que proporcionan la producción de neutrófilos. El uso de un anticuerpo de AC133 permite la inmunoselección positiva de poblaciones de células progenitoras hematopoyéticas, así como el análisis fenotípico de poblaciones de células progenitoras usando citometría de flujo. En particular, un anticuerpo contra AC133 no reconoce solamente células CFU-GM, que se necesitan para el injerto a corto plazo y la protección contra septicemia, sino también células de re-población a largo plazo primitivas que son necesarias para el injerto a largo plazo. Las células seleccionadas por expresión de antígeno AC133 se pueden purificar después adicionalmente y/o separar por selección para otros marcadores de célula madre y célula progenitora hematopoyética.

Como se perfila más adelante con detalle, las moléculas de interés en los diversos métodos de la invención incluyen el propio antígeno AC133, reactivos que se unen específicamente a AC133 o a un fragmento del mismo, secuencias de ácido nucleico que codifican el antígeno AC133 y una población de células que expresan el antígeno AC133 o cualquiera de sus fragmentos. El antígeno AC133 se puede aislar de fuentes naturales o producir usando tecnología de ADN recombinante. Los ácidos nucleicos pueden ser ADNc, ARN, una secuencia genómica o una secuencia sintética que comprende la secuencia codificante por sí misma o junto con regiones reguladoras de la transcripción u otras secuencias encontradas en vectores de expresión y/o clonación. El propio Ag AC133 se puede obtener en una forma purificada por aislamiento de células, que se pueden identificar como positivas por unión a anticuerpo de AC133 usando métodos de unión por afinidad conocidos en la técnica. La identificación positiva está disponible por digestión proteolítica de proteínas de membrana celular y comparación de secuencias con la secuencia de la proteína para AC133 expuesta en la Figura 12.

El mAb de AC133 es un anticuerpo con especificidad para un antígeno de superficie celular novedoso que se expresa en células CD34<sup>+</sup> brillantes. El antígeno se expresa en un subconjunto de células progenitoras hematopoyéticas obtenidas de médula ósea humana, médula ósea fetal e hígado, sangre de cordón umbilical y sangre periférica de adulto. El mAb de AC133 se puede usar en un sistema de perlas magnéticas para inmunoseleccionar poblaciones de células progenitoras hematopoyéticas, dando como resultado un beneficio terapéutico potencial, así como en el análisis fenotípico de poblaciones de células progenitoras usando técnicas de citometría de flujo. Para caracterizar adicionalmente la naturaleza de esta molécula novedosa, el antígeno AC133 se purificó por cromatografía de inmunoafinidad. El antígeno AC133 consiste en una única cadena polipeptídica con un peso molecular reducido de aproximadamente 120 kD y comprende una glucoproteína con un polisacárido ligados a N-glucosídico de aproximadamente 20 kDa. El antígeno AC133 reducido se reconoce por el mAb de AC133, sugiriendo un epítipo lineal o un epítipo de azúcar.

Se reconocerá por los especialistas en el campo de las glucoproteínas que no se espera que tales moléculas tengan estructuras de azúcar exactamente idénticas debido a la naturaleza enzimática de la síntesis de azúcar, que tiene lugar sin el molde (es decir, ARN mensajero) que existe para síntesis de péptidos, aunque con toda certeza existirán similitudes entre las estructuras de azúcar en una colección de moléculas de AC133 debido a la síntesis a partir de la misma estructura de péptido de partida. En consecuencia, "antígeno AC133" se refiere a proteínas que tienen la estructura de péptido mostrada en la Figura 12 (analizada más adelante) con estructuras de azúcar unidas en sitios de glucosilación. Debido a las variaciones naturales en estructuras de azúcar, también se espera una variedad de pesos moleculares para moléculas glucosiladas y entra dentro del alcance de la presente invención. En el caso del antígeno AC133, parece haber una variación relativamente baja en la estructura y el tamaño de restos de azúcar añadidos, en comparación con otras proteínas conocidas. Se observa que el peso molecular de AC133 está típicamente en el intervalo de 115 a 127 kD, independientemente de los detalles de la técnica experimental usada para medir el peso molecular.

El antígeno AC133 purificado se digirió con lisil endopeptidasa para generar péptidos que se aislaron por HPLC de fase inversa y se secuenciaron por degradación de Edman. Estos péptidos se usaron para diseñar oligonucleótidos degenerados usados en la reacción en cadena de la polimerasa con un molde de genoteca de ADNc WERI-Rb-1. Esta técnica proporcionó 1,7 kB de secuencia no ambigua que se usó después para aislar todo el clon de ADNc. Este ADNc codifica una única fase de lectura abierta de 2598 nucleótidos y predice una proteína de 865 aminoácidos con un peso molecular de 96,8 kDa, que se corresponde con el peso molecular de aproximadamente 90 kDa observado para el antígeno desglucosilado. El análisis de hidrofobicidad y helicidad transmembrana sugiere la presencia de cinco dominios transmembrana, dando como resultado dos bucles extracelulares grandes. Existe un total de 8 secuencias consenso para sitios de glucosilación ligada a N, todas en los dos bucles grandes (260 y 290 a.a.), respaldando el modelo estructural propuesto con dos bucles extracelulares grandes y una cola citoplasmática C-terminal de 50 aminoácidos. Una versión truncada del antígeno AC133 que carece de la cola citoplasmática todavía se reconoce por el mAb de AC133. Hay secuencias consenso para un motivo de cremallera de leucina en ambos bucles extracelulares, que pueden estar implicadas en interacción con receptor con su ligando fisiológico. Como se muestra en la Figura 13, el antígeno AC133 aparece como una proteína 5-transmembrana ("proteínas 5TM") con un extremo N extracelular y un extremo C citoplasmático.

Las familias de proteínas 4TM (también denominadas proteínas con cuatro dominios transmembrana), 7TM y 11TM se han caracterizado en la bibliografía. Aunque la función de la familia de cuatro dominios transmembrana no se conoce, las proteínas 7TM se piensa generalmente que las proteínas 7TM son receptores acoplados a proteína G que se unen a agonistas quimiotácticos y las proteínas 11TM representan una familia de receptores de canal iónico. Sin embargo, una molécula 5TM no se ha descrito previamente y la estructura del antígeno AC133 difiere de forma

marcada de los 7 miembros de la familia TM conocidos con respecto a peso molecular y tamaño de bucles extracelulares. Adicionalmente, el antígeno AC133 no comparte homología de secuencia con proteínas 4TM o 7TM, mientras que los miembros de la familia comparten homología significativa entre sí, particularmente dentro de los dominios transmembrana.

5 Fragmentos cortos del gen de AC133 están presentes en Genbank como EST (etiquetas de secuencia expresada), tales como retina de adulto, islotes pancreáticos y cerebro fetal. Sin embargo, la expresión del antígeno AC133 parece estar limitada a células madre hematopoyéticas primitivas y algunos tejidos derivados de cresta neural. El antígeno AC133 también se expresa en células de teratocarcinoma NT-2; sin embargo, la expresión se pierde cuando estas  
10 células se diferencian finalmente en neuronas. La interacción del ligando fisiológico con el antígeno AC133 (receptor) puede proporcionar señalización intracelular.

El anticuerpo monoclonal original descubierto para el antígeno AC133 es uno de un grupo de anticuerpos que define un antígeno novedoso de aproximadamente Pm 120.000, que se expresa selectivamente en células madre humanas y progenitoras hematopoyéticas CD38<sup>bright</sup>. Las células CD34<sup>bright</sup> soportan linfopoyesis de células B y mielopoyesis a largo plazo *in vitro* y median en la repoblación de T, B, mielomonocítica y megacariocítica *in vivo*. Las células CD34<sup>dim</sup> (poco positivas) no han conseguido proporcionar actividad hematopoyética a largo plazo *in vitro* o *in vivo*. La población CD34<sup>bright</sup> contiene toda la actividad de células madre primitiva y, por lo tanto, es la población de elección para estudios adicionales en trasplante de células madre hematopoyéticas y terapia génica. El anticuerpo de AC133 proporciona un medio para la selección positiva y el análisis fenotípico de células madre hematopoyéticas y un subconjunto de células progenitoras comprometidas. El anticuerpo específico original de AC133, un anticuerpo IgG<sub>1</sub> murino, se generó a partir de ratones inmunizados con células progenitoras humanas CD34<sup>+</sup> purificadas. Para determinar el fenotipo preciso del antígeno de células positivas a AC133, se examinaron células doblemente positivas a AC133 y CD34 en hígado fetal, médula ósea fetal y de adulto, sangre de cordón umbilical y sangre periférica usando análisis FACS de 3 y 4 colores. El subconjunto reconocido por el anticuerpo de AC133 en todos los tejidos son CD34<sup>bright</sup>, CD38<sup>-/+</sup>, HLA-DR<sup>+/-</sup>. Las poblaciones de células madre CD90<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup> y CD109<sup>+</sup> están incluidas dentro de la población positiva a AC133. Típicamente, AC133 tiñe el 20-60% de todas las células CD34<sup>+</sup>, una población que contiene toda la población CD34<sup>+</sup> sin destino de linaje así como células CD34<sup>+</sup> con destino a la ruta de granulocitos/monocítica. La expresión del antígeno AC133 no se ha demostrado en células mononucleares de sangre periférica, granulocitos, plaquetas o células endoteliales obtenidas de vena umbilical por procedimientos convencionales de FACS. El análisis FACS en un grupo de 50 líneas celulares humanas muestra que solamente 2 líneas de células de retinoblastoma, Y79.1 y WERI-Rb-1, expresan el antígeno AC133, junto con células de teratocarcinoma NT-2. El trasplante de células positivas a AC133 en oveja fetal ha demostrado la capacidad de injerto de células seleccionadas y se han recogido células humanas que se han alojado en la médula ósea de oveja fetal y se ha demostrado que se injertan en receptores secundarios, probando el potencial de re-población a largo plazo de células seleccionadas. El gen de AC133 codifica un polipéptido que consiste en 865 aa con un tamaño predicho de 96,8 kDa. Esta proteína tiene una estructura única, que atraviesa 5 veces la membrana. Por lo tanto, el antígeno AC133 define una nueva clase de proteínas de membrana 5TM de mamífero. De forma conjunta, estos datos demuestran que AC133 proporciona un sistema de antígeno alternativo para la identificación y separación de células madre hematopoyéticas.  
40

Los anticuerpos que se unen selectivamente a células madre y/o células progenitoras son de particular interés. Los anticuerpos para Ag AC133 se pueden obtener inmunizando un hospedador mamífero inmunocompetente xenogénico (tal como un hospedador murino, roedor, lagomorfo, ovino, porcino o bovino) con células progenitoras hematopoyéticas humanas. La elección de un hospedador particular es principalmente uno de conveniencia. Se obtiene una población de células progenitoras adecuadas para inmunización aislando células CD34<sup>+</sup> a partir de sangre periférica movilizada por citoquinas, médula ósea, hígado fetal u otra fuente de células progenitoras. Las células se pueden incubar con fitohemaglutinina antes de su uso como un inmunógeno.  
45

Las inmunizaciones se realizan de acuerdo con técnicas convencionales, en las que las células se pueden inyectar por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravascular en un hospedador. Normalmente se usarán de aproximadamente 10<sup>6</sup> a 10<sup>8</sup> células, que se pueden dividir en 1 o más inyecciones, habitualmente no más de aproximadamente 8 inyecciones, a lo largo de un periodo de aproximadamente una a tres semanas. Las inyecciones pueden tener lugar con o sin adyuvante. Los ejemplos de adyuvante incluyen adyuvante completo o incompleto de Freund, squalol y alumbre.  
50

En una realización preferida se usa la inmunización contralateral, como se describe en los siguientes ejemplos. Este método depende de la capacidad de tránsito de linfocitos inmunes para alojarse en el sitio de la estimulación con antígeno. Los animales se pre-inmunizan en un sitio localizado en un lado del cuerpo, tal como una almohadilla izquierda, con células que expresan muchos antígenos inmunodominantes pero irrelevantes. Se pueden usar diversas células hematopoyéticas maduras con este propósito. El inmunógeno de interés se inyecta en un sitio localizado en el lado opuesto del animal. Los linfocitos pre-inmunizados con y que responden a antígenos irrelevantes se atraen a los ganglios linfáticos que drenan el lado izquierdo, mientras que los linfocitos que responden al inmunógeno de interés estarán presentes en los ganglios linfáticos que drenan el lado derecho, por ejemplo, los ganglios linfáticos poplíteos para inyección en almohadilla. Este ganglio linfático poplíteo se puede usar como una fuente de células para fusión.  
55

Después de la finalización del protocolo de inmunización, el antisero se puede recoger de acuerdo con técnicas convencionales para proporcionar antiseros policlonales específicos para las proteínas de membrana de superficie de células progenitoras hematopoyéticas, incluyendo Ag AC133. Después, los linfocitos se pueden recoger del tejido  
60

linfoide apropiado, por ejemplo, bazo o ganglio linfático drenante y fusionar con un compañero de fusión apropiado, habitualmente una línea de mieloma, para producir un hibridoma que secreta un anticuerpo monoclonal específico. La selección de clones de hibridomas para la especificidad antigénica de interés se puede realizar de acuerdo con métodos convencionales.

5

Son de interés particular el anticuerpo monoclonal específico AC133 descrito en los siguientes Ejemplos; otros anticuerpos (tanto monoclonales como policlonales) que se unen al antígeno AC133, especialmente anticuerpos con reactividad cruzada (es decir, los que se unen al mismo epítipo e inhiben sustancialmente la unión simultánea); especies análogas de los mismos; fragmentos de unión de los mismos; y conjugados de los mismos. Se realizó un depósito de una línea celular de hibridoma murino que expresa un anticuerpo para el antígeno AC133 en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 12301 Parklawn Drive, Rockville MD 20852, el 23 de abril de 1997.

10

Estos anticuerpos tienen capacidad de inmunoselección para el subconjunto hematopoyético de interés.

15

Se conoce que los anticuerpos se pueden producir como una cadena única en vez de una estructura multimérica normal. Se describen anticuerpos de cadena única en Jost *et al.* (1994) *A.B.C.* **269**: 26267-73, y en numerosas otras publicaciones. Las secuencias de ADN que codifican la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera se ligan en un espaciador que codifica al menos aproximadamente 4 aminoácidos de aminoácidos neutros pequeños, que incluyen glicina y/o serina. La proteína codificada por esta fusión permite el ensamblaje de una región variable funcional que conserva la especificidad y afinidad del anticuerpo original.

20

También se conocen en la técnica métodos para humanizar anticuerpos. Un anticuerpo humanizado puede ser el producto de un animal que tenga genes de región constante de inmunoglobulina, humanos, transgénicos (véase, por ejemplo, las Solicitudes Internacionales de Patente WO 90/10077 y WO 90/04036). Alternativamente, el anticuerpo de interés se puede modificar por ingeniería genética mediante técnicas de ADN recombinante para sustituir los dominios CH1, CH2, CH3, bisagra y/o los restos flanqueantes con la correspondiente secuencia humana (véase el documento WO 92/02190).

25

El uso de ADNc de Ig para la construcción de genes de inmunoglobulina quiméricos se conoce en la técnica (Liu *et al.* (1987) *P.N.A.S.* **84**: 3439 y (1987) *J. Immunol.* **159**: 3521). En estas técnicas, se aísla ARNm a partir de un hibridoma u otra célula que produzca el anticuerpo y se usa para producir ADNc. El ADNc de interés se puede amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos (Patentes de Estados Unidos N° 4.683.195 y 4.683.202). Alternativamente se puede preparar una genoteca y explorar para aislar la secuencia de interés. La secuencia de ADN que codifica la región variable del anticuerpo se fusiona después con secuencias de región constante humanas. Las secuencias de genes de región constante humanos se pueden encontrar en Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, **N.I.H.** N° de publicación 91-3242. Los genes de región C humanos están disponibles de forma sencilla a partir de clones conocidos. Después, el anticuerpo quimérico, humanizado se puede expresar mediante métodos convencionales.

35

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fv, F(ab')<sub>2</sub> y Fab por escisión del anticuerpo intacto, por ejemplo, por escisión con proteasa o química. Alternativamente se puede diseñar un gen truncado. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción del fragmento F(ab')<sub>2</sub> podría incluir secuencias de ADN que codifican el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguido de un codón de terminación de la traducción para producir un fragmento de anticuerpo truncado.

40

Los anticuerpos para el antígeno AC133 se unen a una proteína que tiene un peso molecular aparente (en condiciones de transferencia de Western a partir de geles SDS-PAGE reductores, basados en patrones disponibles en el mercado) de aproximadamente 120 kD y generalmente parece estar en el intervalo de aproximadamente 115 a 127 kD. El anticuerpo parece reconocer un epítipo de azúcar, ya que el anticuerpo de AC133 no se puede inmunoprecipitar a partir de células WERI-Rb-1 tratadas con tunicamicina. El antígeno AC133 se expresa en un subconjunto de células CD34<sup>+</sup>, pero está ausente en endotelio y fibroblastos. En la población de células positivas a AC133 se incluyen células progenitoras HLA-DR<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup> y CD117<sup>+</sup> (el antígeno conocido anteriormente como CD90<sup>+</sup> se conoce ahora como CD90<sup>+</sup>; tanto células positivas y negativas a DR como positivas y negativas a CD38 se incluyen en esta población). Esta población contiene sustancialmente toda la actividad de células madre hematopoyéticas presente en el subconjunto CD34<sup>+</sup> de células hematopoyéticas.

55

Los reactivos que se unen específicamente al antígeno AC133 no están limitados a anticuerpos. Se puede usar cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica para detectar la unión de una especie a otra para ensayar la presencia de un reactivo de unión a antígeno AC133. Un ensayo que se puede adaptar de forma universal implica la distribución de radiactividad entre fases solubles y sólidas que se puede detectar usando compuestos de ensayo marcados de forma radiactiva y antígeno AC133 unido a una fase sólida. El antígeno AC133 se puede unir, por ejemplo, a una fase sólida en una columna y un compuesto de ensayo marcado con tritio o <sup>14</sup>C en un tampón fisiológico se puede pasar a través de la columna. La radiactividad unida se puede detectar directamente en la columna o por la resta de la radiactividad en la fase soluble que pasa a través de la columna de la radioactividad aplicada. La afinidad de unión se puede detectar midiendo los niveles de la radiactividad unida a diferentes concentraciones de compuesto de ensayo después de dejar un tiempo suficiente para que se equilibre la unión. La especificidad de la unión para AC133 se puede detectar determinando si los compuestos de ensayo que se unen a AC133 también se unen a antígenos presentes en células sanguíneas maduras (u otros antígenos de interés en un medio de ensayo preseleccionado). Los

65

## ES 2 327 691 T3

ligandos especialmente preferidos son los que son selectivos para AC133 con más del 10%, preferiblemente menos del 5%, de reactividad cruzada con cualquier antígeno presente en células sanguíneas maduras. La reactividad cruzada se puede medir mediante cualquier técnica convencional y se mide preferiblemente mediante un ensayo de unión competitiva entre antígeno AC133 puro, el ligando a ensayar, y el supuesto antígeno de reactividad cruzada usando una concentración de antígeno AC133 y ligando de ensayo en la que el ligando satura la mitad de la unión a AC133.

Una vez que se ha identificado un reactivo que se une específicamente a AC133, el reactivo (en su forma marcada radiactivamente, en una forma no radiactiva modificada para contener otro marcador o en ciertos usos en forma no marcada) se puede usar en diversos ensayos o usos biológicos que demandan la unión de un reactivo para AC133, tales como tinción fluorescente, separación de células o diferenciación de células, *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, la inmunoselección con un anticuerpo contra AC133 proporciona un medio para purificar células progenitoras y madre hematopoyéticas. Los anticuerpos también encuentran uso en diagnóstico para detectar o enumerar células progenitoras hematopoyéticas, para dividir la población positiva a CD34 en sub-poblaciones funcionalmente distintas, para el aislamiento de células progenitoras y para la preparación de progenitores para producir células sanguíneas maduras. Se pueden ensayar muestras biológicas (por ejemplo, sangre o derivados de la misma, biopsias y líquido sinovial) para la presencia de células que expresan la molécula de superficie unida por los anticuerpos del sujeto. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos en lisados celulares, células intactas o secciones congeladas para distinguir diferentes tipos de células.

Los anticuerpos del sujeto y otros reactivos que se unen específicamente a AC133 son útiles para la preparación de células progenitoras y madre hematopoyéticas humanas sustancialmente puras. Un subconjunto de células progenitoras se puede separar de otras células hematopoyéticas basándose en la unión a AC133 y se pueden separar adicionalmente entre sí por unión a otros marcadores de superficie conocidos en la técnica. Las fuentes de células hematopoyéticas incluyen médula ósea fetal o de adulto; hígado fetal, sangre de cordón umbilical y sangre periférica, particularmente sangre periférica movilizada por citoquinas (véase, por ejemplo, Campos *et al.* (1993) *Leukemia* 7: 1409-15 y Grigg *et al.* (1993) *Bone Marrow Transplant* 11, Supl 2: 23-9).

Se ha descrito que las células madre humanas tienen el fenotipo CD34<sup>bright</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD38<sup>dim/negativo</sup>, CD117 (c-Kit)<sup>dim</sup>, CD90 (Thy-1)<sup>+</sup>; y que carecen de expresión de una diversidad de marcadores específicos de linaje, que incluyen CD3, CD4, CD7, CD8, CD14, CD15 y CD19. Una indicación negativa indica que el nivel de tinción está en o por debajo de la intensidad del brillo de un control negativo coincidente con isotipo. Una indicación dim indica que el nivel de tinción puede estar próximo al nivel de una tinción negativa, pero también puede ser más brillante que un control coincidente con isotipo.

Los procedimientos para separación incluyen separación magnética usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo y cromatografía por afinidad o "selección" usando anticuerpo unido a una matriz sólida (por ejemplo, placa). Las técnicas que proporcionan separación precisa incluyen clasificadores de células activadas por fluorescencia, que pueden tener grados variables de sofisticación, tales como tener canales de color múltiple, canales de detección de dispersión de luz de ángulo bajo y obtuso o canales de impedancia. Las células muertas se pueden eliminar por selección con colorantes asociados con células muertas, por ejemplo (yoduro de propidio, LDS). Los glóbulos rojos se pueden eliminar (por ejemplo), por decantación, hemólisis o gradientes de Ficoll-Paque. Se puede emplear cualquier técnica que no sea innecesariamente perjudicial para la viabilidad de las células seleccionadas.

De forma práctica, los anticuerpos se pueden conjugar con marcadores para varios propósitos diferentes: por ejemplo, perlas magnéticas para permitir la facilidad de separación de un tipo celular particular; biotina, que se une con alta afinidad a avidina o estreptavidina; fluorocromos, que se pueden usar con un clasificador de células activadas por fluorescencia; haptenos; y similares. Se pueden emplear análisis multi-color con una FACS o en una combinación de separación inmunomagnética y citometría de flujo. El análisis multi-color es de interés para la separación de células basadas en antígenos de superficie múltiples: por ejemplo, AC133<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup> o CD117<sup>+</sup>, AC133<sup>-</sup> o CD34<sup>+</sup>. Los fluorocromos que se usan en un análisis multi-color incluyen fibobiliproteínas, por ejemplo, ficoeritrina y alofocianinas; fluoresceína y rojo Texas.

En una realización de la invención, un anticuerpo anti-AC133 se conjuga directamente o indirectamente con un reactivo magnético, tal como una micropartícula superparamagnética (micropartícula). La conjugación directa con una partícula magnética se consigue mediante el uso de diversos grupos de enlace químico como se conoce en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo se puede acoplar a las micropartículas mediante grupos amino de cadena lateral o sulfhidrilo y reactivos de entrecruzamiento heterofuncionales. Está disponible un gran número de compuestos heterofuncionales para el enlace con entidades. Un grupo de enlace preferido es éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 3-(2-piridiliditio)propiónico (SPDP) o éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxílico (SMCC) con un grupo sulfhidrilo reactivo en el anticuerpo y un grupo amino reactivo en la partícula magnética.

Alternativamente, un anticuerpo anti-AC133 se acopla indirectamente a partículas magnéticas. El anticuerpo se conjuga directamente con un hapteno y anticuerpos específicos de hapteno, de segunda etapa se conjugan con las partículas. Los haptenos adecuados incluyen digoxina, digoxigenina, FITC, dinitrofenilo, nitrofenilo, avidina y biotina. Los métodos para la conjugación del hapteno a una proteína se conocen en la técnica y los kits para tales conjugaciones están disponibles en el mercado.

## ES 2 327 691 T3

Para separación o identificación de células madre o células progenitoras se añade un anticuerpo a una muestra de células hematopoyéticas. La cantidad de un anticuerpo anti-AC133 necesaria para unirse a un subconjunto de células particular se determina empíricamente realizando una separación de ensayo y un análisis. Las células y un Ab anti-AC133 se incuban durante un periodo de tiempo suficiente para que se formen complejos, habitualmente al menos aproximadamente cinco minutos, más habitualmente al menos aproximadamente 10 minutos y habitualmente no más de una hora, más habitualmente no más de aproximadamente 30 minutos.

Las células se pueden incubar adicionalmente con anticuerpos o moléculas de unión específicas para los marcadores de superficie celular que se conoce que están presentes o ausentes en células progenitoras o madre hematopoyéticas. Por ejemplo, CD90, CD117 y HLA-DR son útiles en la selección positiva de células madre. Se pueden usar diversos marcadores que se conocen que están ausentes en células madre, tales como CD3, CD4, CD8, CD14, CD15 y CD19, para selección negativa. Las células marcadas se separan de acuerdo con la preparación de anticuerpo específica. Los anticuerpos marcados con fluorocromo son útiles para la separación por FACS y las partículas magnéticas para selección inmunomagnética o particularmente selección magnética de alto gradiente (HGMS). Se describen dispositivos de separación magnética ilustrativos en el documento WO/90/07380, el documento PCT/US96/00953 y el documento EP438.520, incorporados como referencia en este documento.

La población celular purificada se puede recoger en cualquier medio apropiado. Diversos medios están disponibles en el mercado y se pueden usar, incluyendo Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), Solución Salina Básica de Hank (HBSS), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS), RPMI, Medio de Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM) y solución salina tamponada con fosfato (PBS) con EDTA 5 mM, cualquiera de los cuales se puede suplementar con suero fetal de ternero (FCS), albúmina sérica bovina (BSA) o albúmina sérica humana (HSA).

Las composiciones altamente enriquecidas para células progenitoras y/o madre hematopoyéticas humanas (dependiendo de la fuente de células) se consiguen de este modo en una única etapa. Las células deseadas serán el o aproximadamente el 80% o más de la composición de células y serán preferiblemente el o al menos aproximadamente el 90% o más de la composición de células. Las poblaciones específicas de interés incluyen células de AC133<sup>+</sup>, que se caracterizan como CD34<sup>brigh</sup> y HLA-DR<sup>+/-</sup>. Esta población se puede seleccionar adicionalmente para las células que son CD90<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup> y/o CD38<sup>dim</sup>. Funcionalmente, estas células están altamente enriquecidas en actividad CFU-GM y en células de re-población a largo plazo. Otra población de interés es CD133<sup>-</sup> y CD34<sup>+</sup>, que está enriquecida en actividad de BFU-E. El uso de los anticuerpos sujeto para purificación es ventajoso con respecto al uso de CD34, debido a que AC133 se expresa por una población más restringida de células, permitiendo de este modo un subconjunto más enriquecido para la actividad específica de interés.

Una vez que se han aislado las células deseadas, se pueden propagar mediante cultivo en medio acondicionado a partir de células estromales, co-cultivo con tales células estromales o en medio que comprende factores de mantenimiento que soportan la proliferación de tales células progenitoras, por ejemplo, factor de células madre o combinaciones de interleuquinas. El medio empleado para cultivar las células es de forma práctica un medio enriquecido de forma definida, tal como IMDM o una mezcla de IMDM y RPMI 1640, y generalmente estará compuesto por sales, aminoácidos, vitaminas,  $\beta$ -mercaptoetanol  $5 \times 10^{-5}$  M, estreptomycin/penicilina y suero fetal de ternero al 10%, y se puede cambiar de vez en cuando, generalmente al menos de una a dos veces por semana.

Las composiciones de células sujeto se usarán en una diversidad de modos. Se pueden usar para reconstituir un hospedador irradiado y/o un hospedador sometido a quimioterapia. Proporcionando maduración, proliferación y diferenciación en uno o más linajes seleccionados mediante factores de crecimiento diferentes específicos, las células progenitoras se pueden usar como una fuente de células comprometidas. se pueden usar factores tales como eritropoyetina, factores estimulantes de colonias (por ejemplo, GM-CSF, G-CSF o M-CSF), interleuquinas (por ejemplo, IL-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9 o -10) o similares o células estromales para influir en el crecimiento y la diferenciación de células progenitoras.

Las células también se pueden usar en el aislamiento y la evaluación de factores asociados con la diferenciación y maduración de células hematopoyéticas, incluyendo reactivos que se unen específicamente al antígeno AC133. Por tanto, las células se pueden usar en ensayos para determinar la actividad de medios, tales como medio acondicionado; para evaluar fluidos para determinar actividad de factor de crecimiento o implicación con dedicación de linajes; o similares.

Las células se pueden usar para el tratamiento de enfermedades genéticas. Las enfermedades genéticas asociadas con células hematopoyéticas se pueden tratar mediante modificación genética de células madre autólogas o alogénicas para corregir un defecto genético o tratar de proteger contra enfermedad, por ejemplo, VIH. Por ejemplo, las enfermedades tales como  $\beta$ -talasemia, anemia de células falciformes, deficiencia de adenosina desaminasa, deficiencia de recombinasa o deficiencia de gen regulador de recombinasa se pueden corregir por introducción del gen de tipo silvestre en las células de sujeto, por recombinación homóloga o aleatoria. Alternativamente, se pueden trasplantar células progenitoras alogénicas normales. Se pueden tratar también enfermedades diferentes a las asociadas con células hematopoyéticas, en las que la enfermedad está relacionada con la ausencia de un producto secretado particular tal como hormonas, enzimas, interferón, factor o similares.

Las células se pueden congelar a temperaturas de nitrógeno líquido y almacenar durante largos períodos de tiempo, ya que se pueden descongelar y reutilizar. Las células se almacenarán habitualmente en DMSO al 5% y suero fetal de ternero al 95%. Una vez descongeladas, las células se pueden expandir mediante el uso de factores de crecimiento o células estromales asociadas con proliferación y diferenciación de células madre.

El antígeno AC133 se puede obtener en forma sustancialmente pura a partir de fuentes naturales o mediante técnicas recombinantes. A partir de fuentes naturales, las células positivas a antígeno se lisan y pasan a través de una columna de afinidad de anticuerpo monoclonal anti-AC133. Las células progenitoras hematopoyéticas se pueden aislar a partir de fuentes naturales mediante técnicas de separación convencionales o se pueden usar las líneas celulares descritas en la sección experimental como una fuente de antígeno. La proteína purificada por afinidad se eluye de la columna de afinidad con una solución salina apropiada o gradiente acuoso/orgánico, tal como acetonitrilo o etanol, habitualmente en presencia de una concentración de ácido baja, por ejemplo, ácido trifluoroacético al 0,1-1 por ciento. La proteína eludida se purifica después adicionalmente mediante cromatografía, electroforesis o similares de acuerdo con técnicas convencionales.

Los siguientes ejemplos describen el uso de un anticuerpo monoclonal para purificar el antígeno AC133 por cromatografía de afinidad dando como resultado un antígeno AC133 más del 95% puro. Los péptidos de una preparación purificada de este tipo se pueden preparar y aislar para análisis de secuencia, como resultado de lo cual se pueden diseñar sondas de ácido nucleico para el aislamiento de las secuencias génicas de AC133. La secuencia génica de AC133 expuesta en este documento (Figura 12) permite que se pueda obtener el antígeno mediante técnicas recombinantes. Por ejemplo, el ARN total se aísla a partir de células de las que se ha demostrado por unión a anticuerpo que expresan la proteína dirigida. El ADN residual se elimina de acuerdo con técnicas convencionales y el ARN poliadenilado se puede purificar adicionalmente, por ejemplo, en oligo-dT sepharose o por cromatografía en gel. Después se prepara ADNc de acuerdo con técnicas convencionales usando transcriptasa inversa (véase Sambrook *et al.*, anteriormente y los siguientes ejemplos). Después, el ADNc se introduce en un sistema de clonación apropiado, tal como  $\lambda$  gt11, donde se expresa el ADNc. Las placas de fago se pueden explorar después usando los anticuerpos sujeto o mediante empleo de antisueños policlonales. Alternativamente se puede usar un sistema de clonación que permite el sondaje con secuencias de ácido nucleico obtenidas de la secuencia proteica de antígeno AC133. Después, los insertos de ADNc se subclonan en otros vectores, si se desea. El ADNc se puede usar para sondaje adicional de la genoteca de ADNc para un transcrito completo. Alternativamente, la secuencia de ADNc se puede usar para sondar una genoteca genómica para identificar el gen genómico que codifica las proteínas sujeto (Véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a ed., J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, CSHL, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

El ADN de la invención incluye las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína AC133, así como secuencias de nucleótidos no codificantes 5' y 3' adyacentes implicadas en la regulación de expresión de la proteína codificada por los genes, e incluirá hasta aproximadamente la longitud del ARNm maduro o ADN genómico. Por tanto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislado, en el que la molécula comprende (1) una primera secuencia que tiene una región codificante de aminoácidos para AC133 como se expone en la Figura 1 (SEC ID N°: 1); una segunda secuencia en la que al menos un nucleótido de dicha primera secuencia se sustituye por un nucleótido diferente; o una tercera secuencia complementaria a la dicha primera o segunda secuencia; a condición de que (i) si dicha molécula es una molécula de ARN, U sustituye a T en dicha secuencia de dicha molécula, (ii) dicha segunda secuencia tiene una identidad de al menos el 90%, preferiblemente al menos el 95% con dicha primera secuencia y (iii) dicha tercera secuencia no son los nucleótidos 347-667, 1564-1696 ó 2110-2386 de la SEC ID N°: 1. También incluido como ADN de la invención está la secuencia genómica correspondiente, incluyendo intrones. Estas secuencias no codificantes incluyen secuencias de terminación y poliadenilación, secuencias de unión a proteína reguladora, secuencias de la transcripción y similares. Las moléculas que contienen las secuencias de ADNc de AC133 de longitud completa son útiles como fuentes de subsecuencias o como materiales de partida para la preparación de la propia molécula de AC133.

Una "subsecuencia" es un grupo de nucleótidos consecutivos de la secuencia de ADNc. Se puede usar cualquiera de estas secuencias en la identificación de presencia (o ausencia) del gen de AC133 o de la expresión del ARNm que codifica el antígeno AC133. Tales subsecuencias se pueden preparar mediante síntesis química a partir de nucleótidos de partida (como en un sintetizador de genes automático) o mediante manipulación bioquímica de las secuencias de longitud completa (por ejemplo, usando endonucleasas de restricción para preparar fragmentos, opcionalmente seguido de (1) escisión de nucleótidos terminales y exonucleasas y/o (2) clasificación por tamaño y/o captura por afinidad para seleccionar la secuencia deseada). Cualquier subsecuencia de la secuencia de AC133 descrita en la SEC ID N°: 1 de suficiente longitud para ser única entre los demás ácidos nucleicos presentes en las condiciones que se están usando es útil como uno de los dos cebadores usados en una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de todo o parte del gen de AC133 genómico. La longitud de una subsecuencia necesaria para hibridar de forma única con la secuencia diana deseada variará con el método particular que se está usando, y la selección de la longitud está dentro de la especialidad de los que realizan la identificación rutinaria de material genético. Una subsecuencia preferida tiene al menos 15 nt de longitud, más preferiblemente al menos 18 nt, aún más preferiblemente al menos 19, 20, 21, 25 ó 30 nt de longitud hasta la longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID N°: 1, preferiblemente menos de 200 nt de longitud si se usa como una sonda de hibridación o menos de 50 nt de longitud si se usa como un cebador de PCR.

Tres subsecuencias dentro de la región codificante de la SEC ID N°: 1 se registraron previamente en Genbank como EST de función desconocida. En consecuencia, estas subsecuencias de Genbank, los nucleótidos 347-667, 1564-1696

y 2010-2386 no se reivindican como subsecuencias de la invención. Adicionalmente, existen varias EST en Genbank de la región no traducida 3' de la SEC ID N°: 1, es decir, de función desconocida, específicamente en las regiones abarcadas por los nucleótidos 2684-3332 y 3408-3804. Las subsecuencias de estas dos regiones no se reivindican como parte de la presente invención.

5

Las composiciones de ácido nucleico de la invención sujeto pueden ser secuencias genómicas o de ADNc. Se pueden obtener fragmentos a partir de la secuencia de ADNc o genómica sintetizando químicamente oligonucleótidos de acuerdo con métodos convencionales, tal como por digestión con enzimas de restricción o mediante amplificación por PCR. Para la mayor parte, los fragmentos tendrán una longitud de al menos 12 NT, más habitualmente al menos 18 NT o una de las demás longitudes que se han descrito anteriormente. Los fragmentos preferidos incluirán un epítipo funcional. La secuencia que proporciona un epítipo funcional se puede determinar mediante expresión de la secuencia y ensayo para determinar la reactividad del producto de expresión con anticuerpos específicos mediante inmunoensayo convencional.

Se exponen secuencias ilustrativas de aminoácidos y de ADN de la invención en la SEC ID N°: 1 y 2 a continuación. En esta memoria descriptiva se usan abreviaturas convencionales para nucleótidos y aminoácidos. Los polipéptidos obtenidos del antígeno AC133 natural son realizaciones particularmente preferidas de la invención, aunque las variaciones basadas en las secuencias específicas de estos polipéptidos también son parte de la presente invención. En sus aspectos más amplios, la invención (ya que se refiere a los polipéptidos por sí mismos) incluye cualquier polipéptido seleccionado del grupo que consiste en (1) una primera secuencia de aminoácidos de AC133 como se expone en la SEC ID N°: 2; o (2) una segunda secuencia de aminoácidos en la que la segunda secuencia es una subsecuencia de las primeras secuencias y tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos y comprende un epítipo.

Dos secuencias de aminoácidos son homólogas si existe una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, una homología del 85% significa que el 85% de los aminoácidos son idénticos cuando las dos secuencias se alinean para coincidencia máxima. Se permiten huecos (en cualquiera de las dos secuencias que se están emparejando) para maximizar el emparejamiento. Se prefieren huecos de 5 o menos, prefiriéndose de 2 o menos. Alternativamente y preferiblemente, dos secuencias de proteína (o secuencias polipeptídicas obtenidas de las mismas de al menos 30 aminoácidos de longitud) son homólogas como se usa esta expresión en este documento, si tienen una puntuación de alineamiento de más de 5 (en unidades de desviación típica) usando el programa align con la matriz de datos de mutación y una penalización por hueco de 6 o más (Dayhoff, M. O., en Atlas of Protein Sequence and Structure, 1972, vol. 5, National Biomedical Research Foundation, págs. 101-110 y el suplemento 2 a este volumen, págs. 1-10). Las dos secuencias o partes de la misma son más preferiblemente homólogas si sus aminoácidos tienen más de o igual al 50% de identidad cuando se alinean de forma óptima usando el programa align.

35

Se consideran variaciones menores de aminoácidos a partir de los conjuntos de secuencia de aminoácidos naturales expuestas en la SEC ID N°: 2; en particular se consideran sustituciones conservativas de aminoácidos. Las sustituciones conservativas de las que tiene lugar dentro de una familia de aminoácidos están relacionadas en sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéticamente generalmente están divididos en cuatro familias: (1) ácido, aspartato, glutamato; (2) básico: lisina, arginina, histidina; (3) no polar: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polar no cargado: glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina en ocasiones se clasifican de forma conjunta como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina o una sustitución similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado no tendrá un efecto importante sobre las propiedades de unión de la molécula resultante, especialmente si la sustitución no implica ningún aminoácido como un sitio de unión implicado en la interacción de AC133 o sus derivados con un reactivo que se une específicamente a AC133. Si un cambio de aminoácidos da como resultado un péptido funcional se puede determinar de forma sencilla ensayando las propiedades de unión específicas del derivado polipeptídico.

50

Como se muestra en la Figura 13, existen varias regiones que tienen diferentes funciones en la estructura peptídica de AC133. Estas regiones se pueden describir (comenzando con el extremo amino) como un extremo N extracelular, una primera región transmembrana, un primer bucle citoplasmático, una segunda región transmembrana, un primer bucle extracelular, una tercera región transmembrana, un segundo bucle citoplasmático, una cuarta región transmembrana, un segundo bucle extracelular, una quinta región transmembrana y un extremo C citoplasmático. Los tamaños aproximados de las regiones se muestran en la Figura 13, que estima de mejor modo los aminoácidos presentes en las diferentes regiones del siguiente modo: extremo N extracelular, aa 20-107; primera región transmembrana, aa 107-126; primer bucle citoplasmático, aa 127-157; segunda región transmembrana, aa 158-179; primer bucle extracelular, aa 180-435; tercera región transmembrana, aa 436-454; segundo bucle citoplasmático, aa 455-480; cuarta región transmembrana, aa 481-503; segundo bucle extracelular, aa 504-792; quinta región transmembrana, aa 793-816; y extremo C citoplasmático, aa 817-865. Parece haber una secuencia señal escindible (aa 1-19) en el extremo amino del péptido codificado; esta secuencia no está incluida como parte de las regiones mostradas en la Figura 13 pero esta ahora presente en péptidos AC133 producidos de forma sintética.

También se muestran en la Figura 13 las ubicaciones aproximadas de dos segmentos peptídicos cortos (P1-P4) que se identificaron para verificar la estructura del antígeno AC133 y de sitios de glucosilación (indicados por una "Y" en el punto de unión). La Figura 12 también muestra los sitios de glucosilación (que se encasillan en la secuencia de aminoácidos) y regiones transmembrana (que están subrayadas). Dos sitios de glucosilación se solapan (NNTS,

65

## ES 2 327 691 T3

que consiste en un NNT y NTS solapantes) y se muestran por una caja de mayor tamaño con líneas discontinuas que indican los sitios de glucosilación consenso individuales.

5 Las secuencias de ADN se pueden obtener con pureza sustancial y se pueden obtener como una molécula aislada diferente a una secuencia de un cromosoma intacto. Habitualmente, el ADN se obtendrá de forma sustancialmente libre de otros compuestos de ácido nucleico, siendo generalmente al menos aproximadamente el 50%, habitualmente al menos aproximadamente 90% puro y son típicamente "recombinantes", es decir, están flanqueados por uno o más nucleótidos con los que normalmente no están asociados en un cromosoma natural.

10 Las secuencias de ADN se usan de una diversidad de maneras. Se pueden usar como sondas para identificar proteínas de superficie relacionadas en la misma especie u otra. El ADN también se puede usar para identificar células u órganos que se expresan en los genes del sujeto. Las técnicas en las que se exploran células para la presencia de secuencias de nucleótidos particulares, particularmente como ADN, ARNm o ADNc, están bien establecidas en la bibliografía y no requieren elaboración en este documento. De forma conveniente, el ARNm se puede aislar sin ADN y mediante el uso de transcriptasa inversa y PCR con cebadores específicos, el ADNc del sujeto de interés se puede expandir, separar en electroforesis de gel y después sondear usando transferencia de Southern o secuenciación. También se pueden usar otras técnicas.

20 Las secuencias homólogas son las que tienen similitud de secuencia sustancial con secuencias de antígeno AC133 incluidas dentro de la invención sujeto, es decir, con al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de la secuencia de ADN sujeto. La similitud de secuencia se calcula basándose en una secuencia de referencia, que puede ser un subconjunto de una secuencia de mayor tamaño, tal como un motivo conservado, región codificante o región flanqueante. Una secuencia de referencia habitualmente tendrá al menos aproximadamente 18 nt de longitud, más habitualmente al menos aproximadamente 30 nt de longitud y se puede extender hasta la secuencia completa que se está comparando. Tales secuencias de ácido nucleico homólogas se detectarán por hibridación en condiciones de baja rigurosidad, por ejemplo, a 50°C y SSC10X (NaCl 0,9 M/citrato sódico 0,09 M) y permanecer unidas cuando se someten a lavado a 55°C con SSC1X.

30 Para la expresión, las secuencias de ADN se pueden insertar en un vector de expresión apropiado, en el que se puede emplear la región de inicio de la transcripción nativa o una región de inicio de la transcripción exógena. El promotor se puede introducir mediante métodos recombinantes *in vitro* o como resultado de integración homóloga de la secuencia en un cromosoma. Se conoce una amplia diversidad de regiones de inicio de la transcripción para una amplia diversidad de hospedadores de expresión, donde los hospedadores de expresión pueden implicar procariontas o eucariotas, particularmente *E. coli*, *B. subtilis*, células de mamífero, tales como células CHO, células COS, células de riñón de mono, células linfoides, particularmente líneas celulares humanas y similares. Generalmente estará presente un marcador de selección operativo en el hospedador de expresión. El promotor puede estar unido de forma operativa a la secuencia codificante de los genes de interés para producir un transcrito de ARNm que se puede traducir. Los vectores de expresión tienen sitios de restricción convenientes localizados cerca de la secuencia promotora para proporcionar la inserción de secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas heterólogas. Los promotores en vectores de expresión adecuados pueden ser constitutivos o ser inducibles. Los vectores de expresión para la producción de proteínas de fusión, donde el péptido de fusión exógeno proporciona funcionalidad adicional, tal como síntesis de proteína aumentada, estabilidad, reactividad con antisueros definidos, o un marcador enzimático, por ejemplo,  $\beta$ -galactosidasa, son de particular interés.

45 Se pueden preparar casetes de expresión comparando la región de inicio de la transcripción, que puede ser constitutiva o inducible, con o sin una secuencia potenciadora, incluyendo la secuencia potenciadora endógena o heteróloga, el gen de AC133 o fragmento del mismo, y una región de terminación de la transcripción, que tiene opcionalmente una señal para la unión de una secuencia poli A. El gen puede ser genómico, incluyendo los intrones nativos, o un gen de ADNc o una parte del mismo. Es de interés particular el uso de secuencias que permiten la expresión de epítopos funcionales, habitualmente de al menos aproximadamente 24 nucleótidos de longitud, más habitualmente al menos aproximadamente 48 nucleótidos de longitud y hasta la fase de lectura abierta completa del gen.

55 Después de la introducción del ADN, las células que contienen la construcción se pueden seleccionar mediante un marcador de selección, se pueden expandir las células y después usar para la expresión. Cuando se desea la secreción, un péptido señal se puede unir a la secuencia que codifica las proteínas sujeto o fragmentos de las mismas, por lo que la proteína se expresará, trasladará a través de la membrana celular y procesará para retirar el péptido señal.

60 Los casetes de expresión se pueden introducir en una diversidad de vectores, donde los vectores normalmente se caracterizarán por la capacidad de proporcionar selección de células que comprenden los vectores de expresión. Los vectores pueden proporcionar mantenimiento extracromosómico, particularmente como plásmidos en bacterias o virus en células eucariotas o para integración, particularmente en células de mamífero. Cuando se desea el mantenimiento extracromosómico, se proporcionará una secuencia de origen para la replicación del plásmido, que puede ser un plásmido de bajo o alto número de copias. Una amplia diversidad de marcadores está disponible para selección, particularmente aquellos que protegen contra toxinas, más particularmente contra antibióticos. El marcador particular que se elige se seleccionará de acuerdo con la naturaleza del hospedador, donde en algunos casos, se puede emplear la complementación con hospedadores auxótrofos como, por ejemplo, levadura. La introducción de la construcción de ADN puede ser mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo, ADN precipitado con calcio, electroporación, fusión, transfección o infección con vectores víricos.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

## Ejemplos

5 *Generación del Anticuerpo Monoclonal de AC133 por Inmunización Contralateral.* A cinco ratones New Zealand Black (NZB) se inoculó un total de siete veces durante un periodo de veinte días, por la vía de la almohadilla, células progenitoras humanas positivas a CD34 purificadas, que se habían pre-incubado con fitohemaglutinina (PHA) (Gibco/BRL).

10 Los ratones se pre-inmunizaron el Día -3 en la almohadilla de mano izquierda con células que expresan muchos antígenos inmunodominantes pero irrelevantes. En este caso se usaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como una célula irrelevante, ya que expresan muchos antígenos tales como antígenos HLA de Clase I, HLA-DR, CD15, CD26, CD29, CD31, CD36, CD44, CD45, CD58, etc., que también se expresan en células madre hematopoyéticas: el día 0 se reinyectan PBMC en la almohadilla izquierda y se inyectan células madre purificadas en la almohadilla de la mano derecha. Las PBMC y las células madre purificadas se pre-incubaron con PHA durante diez minutos y se lavan con PBS antes de la inyección. Las células progenitoras se aislaron a partir de un paquete de leucocitoféresis de un donante movilizado por citoquinas usando perlas inmunomagnéticas. Este tratamiento proporciona efectos adyuvantes no específicos y elimina la necesidad de adyuvantes tales como el de Freund. A los ratones se les administra un total de 5-8 de tales inyecciones a intervalos de tres días.

20 El día 21, un día después de la última inyección, se retiraron los ganglios linfáticos poplíteos de la mano derecha del ratón. Se preparó una suspensión de linfocitos y las células se fusionaron con células de mieloma SP2/0 Ag14 usando una modificación del método descrito de forma original por Kohler y Milstein (1975) *Nature* **256**: 495-497. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos en DMEM + suero fetal de ternero al 20%, con hipoxantina  $10^{-4}$  M y 2  $\mu$ g/ml de azacitina (Buck *et al.* (1984) en *Monoclonal Antibodies and Functional Cell Lines* Kennet *et al.* eds., Plenum Press, New York págs. 275-309).

30 El día 10 eran evidentes colonias visibles de hibridoma. Se exploraron los sobrenadantes (s/n) de pocillos que contenían hibridoma para la unión a una preparación de células hepáticas fetales que contenía hasta el 15% de células CD34+, usando un ensayo de citometría de flujo de 2 colores. La unión de la Ig de ratón que contenía s/n a las células de ensayo se siguió con Ig de rata anti-ratón conjugada con ficoeritrina (IgPE) y se tiñó con colorante de contraste con un conjugado conocido de anticuerpo de ratón anti-CD34 (AC101). La Figura 1 muestra los resultados de este análisis FACS de dos colores usando el sobrenadante de AC133. Se demuestra que AC133 solamente tiñe las células positivas a CD34 brillantes en la preparación de hígado fetal. Se demostró que las células de hibridoma de AC133 secretan el anticuerpo IgG1/kappa. Las células se expandieron en cultivo y las soluciones madre se congelaron en nitrógeno líquido. Las células de AC133 se subclonaron por análisis de dilución limitante y una serie de subclones de secreción de forma positiva también se congelaron en nitrógeno líquido.

40 *Purificación y conjugación de anticuerpo.* Las células de AC133 se cultivaron inicialmente como tumor de ascitis en ratones desnudos, con recogida de líquido de ascitis rico en anticuerpos. Más recientemente, las células de AC133 se han cultivado hasta una densidad muy alta en un dispositivo de cultivo de fibra hueca (sistema capilar artificial Cellmax QUAD, Cellco Inc., Germantown, MD). Se preparó anticuerpo de IgG puro a partir de cultivos de fibra hueca o a partir de líquido de ascitis por cromatografía de proteína A. El anticuerpo puro se almacenó en solución salina tamponada con fosfato 0,01 M (PBS) con azida sódica 0,01% a 4°C. Esta solución madre de anticuerpo pura se usó para preparar isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Wofsy *et al.* (1980) en *Selected Methods in Cellular Immunology*, Mishell and Shiigi eds., W. H. Freeman y Co., San Francisco, págs. 294-295), ficoeritrina (PE) (Hardy (1986) en *Handbook of Experimental Immunology*. Weir *et al.*, eds. Blackwell Scientific Press, Oxford, pág. 31) o conjugados con perlas magnéticas, de acuerdo con protocolos convencionales.

50 *Expresión de AC133 en tejidos y líneas celulares normales.* Usando procedimientos de tinción FACS convencionales, no había tinción detectable de células mononucleares de sangre periférica, granulocitos o plaquetas o células endoteliales de vena umbilical humana con anticuerpo de AC133. El examen de un grupo de líneas celulares humanas por análisis FACS (datos mostrados en la Tabla 1) mostró que solamente tres líneas celulares ensayadas, las líneas celulares de retinoblastoma Y79.1 y WERI-Rb-1 y la línea celular de teratocarcinoma NT-2 expresan niveles detectables de antígeno AC133.

ES 2 327 691 T3

TABLA 1

*Expresión de AC133 en Líneas Celulares Humanas*

Línea Celular	Tipo Celular	AC133
8402	Línea de células T (CD34+)	-
8866	B-LCL	-
AZ676	Carcinosarcoma de mama	-
BAJB	Linfoma de Burkitt de América del Norte	-
BT474	Tumor de mama	-
BT549	Tumor de mama	-
BT20	Tumor de mama	-
CaCL74-36	Melanoma	-
Daudi	B-LCL-	-
Du4475	Tumor de mama (CD34+)	-
HEL92.1.7	Eritroleucemia	-
HL-60	Leucemia promielocítica	-
HPB-ALL	Leucemia linfocítica aguda	-
HS-R	Mieloma (EBV+)	-
HT1080	Fibrosarcoma	-
HT29	Adenocarcinoma de colon	-
IM-9	B-LCL	-
JM	Línea de células T	-
Jurkat	Línea de células T	-
KG1a	Leucemia mielógena aguda (CD34+)	-
KG1	Leucemia mielógena aguda (CD34+)	-
KG1a.5	Leucemia mielógena aguda (CD34+)	-
K562	Eritroleucemia	-
MOLT-4	Línea de células T	-
MCF-7	Tumor de mama	-
Raji	B-LCL	-
RPMI 8226	Mieloma	-
SK HEP-1	Hepatoma	-
U937	Linfoma histiocítico	-
WERI-Rb-1	Retinoblastoma	+
Y79.1	Retinoblastoma	+
NT-2	Teratocarcinoma	+

La activación de células Y79.1 con PMA se observó que aumentaba la expresión del antígeno AC133 (mostrado en la Figura 2). Sin embargo, la activación con PMA de varias otras líneas celulares o la activación con PHA de PBMC humanas fue incapaz de inducir la expresión de antígeno AC133 (los datos se muestran en la Tabla 2). La expresión del antígeno AC133 no fue detectable en ninguna de las líneas celulares CD34<sup>+</sup> ensayadas. Esta observación, junto con la ausencia de la expresión de CD34 en la línea celular Y79.1 (mostrada en la Figura 3) excluye la posibilidad de que AC133 este dirigido al antígeno CD34. La expresión del antígeno AC133 está limitada a células madre y progenitoras primitivas, a diferencia del antígeno CD34, que también se expresa en endotelio y fibroblastos (Krause *et al.* (1996) *Blood* **87**: 1-13).

El antígeno AC133 se expresa en la población CD34<sup>bright</sup> de células progenitoras humanas aisladas de médula ósea fetal y de adulto, hígado fetal, sangre de cordón umbilical, paquetes de leucocitoféresis (LP) y paquetes de LP de donantes movilizados por citoquinas. Típicamente, tiñe el 30-50% de todas las células CD34<sup>+</sup> en estas poblaciones.

TABLA 2

## Activación de Líneas Celulares

Adición de PMA a 1 ng/ml durante:						
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	144 h
Y79.1	dim +	+	+	+	+	+
KG1a	-	-	-	-	-	N/A
K562	-	-	-	-	-	N/A
HEL 92.1.7	-	-	-	-	N/A	N/A
Jurkat	-	-	-	N/A	N/A	N/A
8402	-	N/A	N/A	-	N/A	N/A
Adición de PWM a 10 µg/ml durante:						
	0 h	24 h	48 h			
Y79.1	dim +	+	+			
KG1a	-	-	-			

*Fenotipado de células positivas a AC133.* El fenotipado de células doblemente positivas a AC133 y CD34 se consiguió usando análisis FACS de 2 y 3 colores, empleando un grupo de anticuerpos conjugados directamente a estructuras de superficie celular que se conoce que se expresan en células progenitoras. Se usaron hígado fetal, médula ósea fetal y de adulto, sangre de cordón umbilical y sangre periférica para determinar el fenotipo preciso de células positivas a AC133. Las células de AC133 encontradas en todos estos tejidos son CD34<sup>bright</sup>, CD38<sup>+/-</sup> y HLA-DR<sup>-/+</sup>. Los datos se muestran en la Figura 4. Las poblaciones de células madre CD90 (Thy1)<sup>+</sup> y CD117 (c-kit)<sup>+</sup> están incluidas dentro de la población positiva a AC133, como se muestra en la Figura 5. En una serie de experimentos realizados con células hepáticas fetales purificadas inmunomagnéticamente de AC133, el anticuerpo conjugado con CD38-FITC tiñó el 74,5% de las células purificadas de AC133, mientras que el 24,8% eran negativas a CD38. Como se esperaba, HLA-DR tiñó la mayoría de las células (81,14%). Se demuestra que CD90 tiñe el 27,4% de las células de ensayo, mientras que CD117 tiñe el 90%. Generalmente se piensa que las células madre hematopoyéticas (de re-población) primitivas tienen el fenotipo de CD34<sup>bright</sup>, CD38<sup>dim/neg</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD117<sup>dim</sup> y CD90<sup>+</sup>. Por tanto, el anticuerpo de AC133 reconoce una población fenotípicamente importante de células progenitoras hematopoyéticas humanas.

*Inmunoprecipitación del antígeno AC133.* Los experimentos de inmunoprecipitación mostraron que el antígeno AC133 tiene un peso molecular de 120 kD. Se solubilizaron células Y79.1 y Weri-RB-1 marcadas con biotina (Pierce) activadas con tampón de lisis: Brij al 2,5% (Sigma), Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, NaCl 125 mM, EDTA 2,5 mM, aprotinina 2,2 µg/ml (Sigma) y PMSF 1 mM (Sigma). Los lisados se incubaron con AC133 y anticuerpos de control después del preaclaramiento. Los inmunocomplejos se recogieron en células de *Staphylococcus aureus* (CalBiochem) y se calentaron durante cinco minutos a 95°C en tampón de muestra SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol al 1%. Los inmunoprecipitados se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Novex). La visualización se consiguió usando estreptavidina ligada a peroxidasa de rábano rusticano (HRP) (Amersham) y el sistema de sustrato Supersignal CL-HRP (Pierce). CD49d, CD71 y CD98 se usaron como controles y sus bandas esperadas de 133 kD, 92 kD y 80/40 kD se observaron en los correspondientes carriles. La inmunoprecipitación con AC133 mostró una banda distinta correspondiente a un peso molecular de 120 kD. Esta banda estaba ausente en las muestras que se inmunoprecipitaron con los anticuerpos anti-CD34 AC101, HPCA1 y HPCA2, indicando que CD34 no se expresa en la línea celular Y79.1. Esto era coherente con los datos de FACS.

Los datos de un experimento adicional se muestran en la Figura 6, en la que células Y79.1 marcadas con biotina así como células KG1a confirmaron los datos de peso molecular de AC133 comparando los precipitados de CD34 y AC133 en el mismo gel. En este experimento, los antígenos CD34 e Y79.1 se precipitaron a partir de lisados de KG1a (CD34<sup>+</sup>) e Y79.1 biotinilados en carriles adyacentes. Los resultados demuestran claramente que 1) cada anticuerpo precipita su propio antígeno distinto y 2) que el peso molecular de estos dos antígenos es diferente de forma distintiva, siendo respectivamente 110 y 127 kD. En los carriles de control 6 y 8, HPCA2 y 16D11 (anti-CD34) precipita una banda de 110 kD de un lisado de KG1a, pero no precipita nada del lisado de Y79.1 (carriles 7 y 9). El AC133 precipita una proteína de 120 kD del lisado de Y79.1 (carril 10), pero nada del lisado de KG1a en el carril 11. En el carril 12, los lisados de KG1a e Y79.1 se mezclaron y se co-precipitaron en Ag AC133 y CD34. Los resultados muestran que los dos antígenos tienen diferentes pesos moleculares.

*Conjugación con perlas magnéticas de AC133.* El anticuerpo de AC133 purificado se conjugó con perlas de amino-dextrano magnéticas usando un protocolo convencional para éster de N-hidroxisuccinimida de ácido 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxílico (SMCC). Se añadió anticuerpo de AC133 a perlas activadas por SMCC a 5 µg por unidad de DO<sub>450</sub> y se incubó a temperatura ambiente durante dos horas. La reacción se detuvo por la adición de β-mercaptoetanol y NEM. El conjugado se purificó sobre dos columnas en presencia de un campo magnético y se eluyó. La concentración se ajustó hasta DO<sub>450</sub> = 10 y se añadió OPG para estabilización. El conjugado en PBS y azida sódica al 0,1% se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se almacenó a 4°C.

*Separación de células progenitoras hematopoyéticas humanas con conjugado de perlas magnéticas AC133.* Se prepararon conjugados de perlas magnéticas directas con AC133 y ensayaron en PBMC de capa leucoplaquetaria, WC1 de hígado fetal, médula ósea fetal y médula ósea de adulto. La Figura 8 muestra el diagrama de puntos de FACS de células hepáticas fetales purificadas con conjugado de perla - AC133 usando el sistema miniMACS y teñidas con glicoforina A-FITC y HPCA2-PE. El material de partida contenía el 7,4% de células CD34<sup>+</sup>, después de purificación de AC133, más del 90% de las células purificadas de AC133 eran CD34<sup>+</sup> brillantes. La Figura 9 muestra que el conjugado magnético de AC133 también era muy eficaz enriqueciendo las células CD34<sup>+</sup> de una capa leucoplaquetaria que contenía aproximadamente el 0,26% de células CD34<sup>+</sup>. La población purificada final era al 64% positiva para CD34, como se muestra por tinción con HPCA2-PE. Esta capacidad de separar células en un sistema de purificación magnética permite un estudio adicional de las propiedades funcionales y fenotípicas de AC133.

*Potencial Clonogénico de células positivas a AC133.* Las células seleccionadas por perlas magnéticas AC133 purificadas de paquetes de leucocitoféresis se ensayaron en ensayos de capacidad de clonación usando un kit disponible en el mercado (Stem Cell Technologies, Vancouver, B.C). Proporcionando un entorno de cultivo controlado utilizando factores de crecimiento humanos, este ensayo de cultivo identifica las principales unidades formadoras de colonias (UFC) dentro de una población de células positivas a CD34. Proporciona información sobre la composición de poblaciones de células progenitoras, con respecto a los porcentajes relativos de células destinadas a diferenciación específica de linaje particular. Típicamente, en poblaciones de células CD34<sup>+</sup> obtenidas de sangre periférica, BFU-e (unidades formadoras de explosión-eritroide) y CFU-GM (unidades formadoras de colonias-granulocitos macrófagos) son las colonias predominantes reconocidas, estando presentes a una proporción de 3:1. La Figura 10 muestra los resultados de un experimento de capacidad de clonación típico comparando células purificadas de AC133 y CD34 obtenidas a partir de un paquete de leucocitoféresis dividido. Las colonias obtenidas con células de control no fraccionadas típicamente son de forma predominante BFU-E (29,34%), con un menor número de CFU-GM (5,14%). Las células purificadas CD34 permiten una distribución similar con el 23,3% de BFU-E y el 5,58% de CFU-GM. Por el contrario, las células purificadas de AC133 muestran un patrón diferente, con el 13,1% de BFU-E y el 10,2% de CFU-GM. Los cálculos muestran que el 58% de CFU-GM se recuperaron en la fracción purificada de AC133, mientras que solamente se recuperaron el 13% de BFU-E.

La Figura 11 muestra los resultados de un ensayo de capacidad de clonación similar obtenido después de la purificación inmunomagnética de AC133. En este experimento, las células de AC133 se seleccionaron positivamente y después, las células positivas a CD34 se seleccionaron positivamente a partir del flujo negativo de AC133. Este diseño permitió la comparación directa de células de AC133<sup>+</sup> con células CD34<sup>+</sup> pero AC133<sup>-</sup> del mismo donante. Los resultados indican que el 93,8% de los progenitores de CFU-GM se recuperaron en la fracción positiva a AC133, recuperándose el restante 6,2% de la fracción CD34<sup>+</sup>/AC133<sup>-</sup>. Por el contrario, la fracción CD34<sup>+</sup>AC133<sup>-</sup> contenía el 78,0% de los progenitores BFU-E, mientras que el restante 22,0% estaba contenido en la fracción AC133<sup>+</sup>.

Los anteriores resultados experimentales excluyen la posibilidad de que un anticuerpo anti-AC133 sea un anticuerpo para receptores Fc o que un anticuerpo anti-AC133 se una a células madre por captación de receptor de Fc. Los experimentos adicionales excluyen la posibilidad de que la tinción de anticuerpo de AC133 se deba a PE libre. El anticuerpo de AC133 no se comporta como un anticuerpo para RTK, un receptor tirosina cinasa, TIE, una tirosina cinasa que contiene dominios similares a inmunoglobulina y dominios de homología de factor de crecimiento y que se expresa en células endoteliales vasculares y células hematopoyéticas. El anticuerpo de AC133 tampoco se comporta como un anticuerpo para P-glicoproteína, un producto de resistencia a múltiples fármacos de 170 kD que también se expresa en células hematopoyéticas.

Se ha demostrado que el anticuerpo de AC133 reconoce un antígeno expresado solamente en células CD34<sup>+</sup> brillantes en médula ósea, hígado fetal y sangre periférica. Este anticuerpo y su antígeno coinciden con el peso molecular o la distribución de cualquier antígeno CD conocido. Aparte de células madre, se ha demostrado que el anticuerpo de

## ES 2 327 691 T3

AC133 reacciona con una línea celular de retinoblastoma humano que es negativa para expresión de CD34. Además, el antígeno AC133 no se expresa en varias líneas de células CD34<sup>+</sup>.

5 A partir de los anteriores resultados es evidente que la invención sujeto proporciona un antígeno novedoso encontrado en células madre primitivas y un subconjunto de células progenitoras hematopoyéticas, así como anticuerpos que se unen específicamente al antígeno. La expresión del antígeno es altamente específica de tejidos. Se detecta solamente en un subconjunto de células progenitoras hematopoyéticas y está presente en sustancialmente todas las células que son activas en el ensayo de CFU-GM. Esta distribución altamente específica de antígeno AC133 hace que sea excepcionalmente útil como un reactivo para aislar y caracterizar células progenitoras y madre hematopoyéticas humanas.

15 *Purificación y caracterización del antígeno AC133.* La purificación y caracterización del antígeno AC133, así como el aislamiento de un clon de ADNc se describe en este documento. El análisis de secuencia de proteína y ácido nucleico de esta molécula indica que el antígeno AC133 es el primer miembro descrito de una nueva clase de receptores transmembrana, que tiene 5 dominios transmembrana con poca, si es que la tiene, homología con miembros de la familia de 7 transmembrana acoplados a proteína G.

20 El anticuerpo de AC133 se preparó y purificó como se ha descrito anteriormente y se conjugó con sepharose activada por CNBr. La sepharose activada por CNBr se adquirió en Pharmacia (Alameda, CA) y se preparó resina de afinidad de mAb de AC133 por el procedimiento de fabricación usando una reacción de acoplamiento de ligando de 25 minutos. Las líneas celulares de retinoblastoma COS-7 y WERI-Rb-1 se obtuvieron de la Colección América de Cultivos Tipo (Rockville, MD). Se sintetizaron cebadores personalizados por Operon Technologies (Alameda, CA).

25 *Purificación del Antígeno AC133.* El antígeno AC133 se aisló a partir de células de retinoblastoma Y79 activadas por PMA durante 96 horas (disponibles en el mercado, por ejemplo, en ATCC). Las células ( $2 \times 10^9$ ) se lavaron con PBS y se lisaron en NaCl 0,125 M, Tris 25 mM pH 8, NaN<sub>3</sub> al 0,005%, EDTA 2,5 mM y detergente Brij al 2,5% 99/96 (2:1) que contiene sulfonilfluoruro de fenilmetilo 1,0 mM (PMSF) y una dilución 1/1000 de una solución de aprotinina de 2,2 mg/ml que contenía 4,1 unidades de inhibidor de tripsina por mg (Sigma). Las células se agitaron vorticialmente de forma intermitentemente durante 5 minutos a temperatura ambiente y después se dejaron sobre hielo durante 20 minutos. Los núcleos y restos celulares se retiraron por centrifugación a 12.000 xg durante 10 minutos. El sobrenadante de lisado se filtró a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m antes de la carga en una columna de afinidad de 0,5 ml de mAb de AC133 equilibrada con tampón de lavado (NaCl 0,125 M, Tris 25 mM, pH 8,0, NaN<sub>3</sub> al 0,01%, EDTA 2,5 mM, Brij al 0,1%). La columna se lavó de forma cuidadosa con tampón de lavado y el antígeno se eluyó en etanolamina 50 mM pH 11,5, Brij al 0,1%, NaN<sub>3</sub> al 0,01%. El pH se ajustó de forma inmediata hasta neutro con HCl. El paso del eluato de antígeno por una columna de DEAE de 300  $\mu$ l de volumen de lecho equilibrada en tampón de lavado retiró muchas de las proteínas contaminantes y una segunda etapa de cromatografía de afinidad usando una columna de anticuerpo de AC133 como se ha descrito anteriormente dio como resultado un antígeno AC133 > 95% puro susceptible a proteólisis y análisis de secuencia de proteína. La pureza e identidad del antígeno AC133 se confirmaron por electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) y análisis de Western (Towbin, H., T. Staehelin y J. Gordon (1979) PNAS 76,4350-4354; Towbin, H. y J. Gordon (1984) J. Immunol. Meth 72: 313-340).

45 *Tratamiento con endogluconasa del antígeno AC133 purificado.* Un microgramo del antígeno AC133 se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua y 125  $\mu$ l de 2-mercaptoetanol 0,1 M y SDS al 0,5%. La proteína se desnaturalizó a 100°C durante 5 minutos. La mezcla desnaturalizada (35  $\mu$ l) se añadió a cada uno de 5 tubos, junto con 25  $\mu$ l de Tris 0,5 M pH 8, 10  $\mu$ l de agua, 10  $\mu$ l de NP-40 al 10%. 0-0,1 unidades de PNGasa F (Sigma) se añadieron a cada tubo y los tubos se incubaron a 30°C durante una noche. Se visualizó el antígeno desglucosilado en un gel de SDS-poliacrilamida teñido con plata.

50 *Digestión con lisil endopeptidasa del antígeno AC133 y aislamiento de péptidos.* El antígeno AC133 se precipitó a partir de 1,4 ml de 2  $\mu$ g/ml de eluato de columna de afinidad mediante la adición de TCA al 10%. La proteína seca precipitada se suspendió en 25  $\mu$ l de tampón de digestión de solución (urea 8 M, Tris 400 mM pH 7,8) a lo que se añadieron 5  $\mu$ l de DTT 45 mM y la mezcla se incubó a 50°C durante 15 min. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadieron 5  $\mu$ l de yodoacetamida 100 mM y la mezcla se incubó durante 15 minutos adicionales. Se añadió agua destilada (70  $\mu$ l), diluyendo la urea a 2 M y 2 pmol de la lisil endopeptidasa, LysC (disponible en el mercado de Wako Chemicals, EE.UU.). La digestión se realizó a 37°C durante 24 horas. Los péptidos se aislaron por separación por HPLC en una columna de fase inversa C18 de orificio estrecho VYDAC con un gradiente de acetonitrilo al 4-32% en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%.

60 *Análisis de secuencia de proteína de péptidos de antígeno AC133.* El análisis de secuencia N-terminal se determinó usando química de Edman (Edman, P., Begg, G. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 80-91; Huwick, R. M., Hunkapillar, M. W., Hood, L. E. y Dreyer, W. J. (1987) J. Biol Chem. 256, pág. 7990) en un secuenciador de proteína de pulso líquido de Applied Biosystems 477A o 473A. Los aminoácidos-PTH se separaron en una columna de fase inversa C-18 Brownlee (2,1 mm x 22 cm) a 55°C en tampón A (tetrahidrofurano al 3,5% con adición del 2 al 4% de concentrado de tampón Premix ABI de Applied Biosystems al tampón B (acetonitrilo), con un gradiente lineal de tampón B al 12-36% durante 18 min, seguido de un periodo isocrático de 13 min a B al 36%.

*Aislamiento y secuenciación de proteínas del antígeno AC133.* El antígeno AC133 de 120 kD se aisló por cromatografía de inmunoafinidad de una línea celular de retinoblastoma, Y79, que se activó por PMA durante 96 horas antes de la recogida. Se utilizaron cromatografía de afinidad secuencial y cromatografía con DEAE para generar antígeno AC133 > 95% puro por SDS-PAGE y tinción con plata y la identidad de la molécula purificada como el antígeno AC133 se confirmó por transferencia de Western. La des-glucosilación del antígeno con PGNase F para retirar azúcar ligado a N muestra que aproximadamente 30 kD del peso molecular se debe a glucosilación. Los intentos iniciales repetidos para secuenciar el extremo N del antígeno AC133 no tuvieron éxito, sugiriendo que esta proteína está bloqueada en el extremo amino. Sin embargo, la digestión del antígeno purificado con lisil endopeptidasa seguido de HPLC de fase inversa produjo cuatro secuencias peptídicas con longitudes de 12-16 aminoácidos. Las búsquedas en las bases de datos de proteína y ácido nucleico principal con el péptido y las secuencias oligonucleotídicas degeneradas resultantes indicaron que el antígeno AC133 no se podría identificar con ninguna molécula descrita. (Ahora, la secuencia de aminoácidos se ha deducido a partir de clonación de ADNc y se muestra en la Figura 12.).

*Clonación de ADNc.* Se aisló ARN total a partir de células de retinoblastoma WERI-Rb-1 (disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo; Rockville, MD) y se preparó ARN poli A<sup>+</sup> usando el sistema Poli A<sup>+</sup> Tract (Promega Corp., Madison, WI). Se sintetizó ADNc (Guebler, U. y BJ Hoffman (1983) *Gene* 25:263) usando transcriptasa inversa superscript (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) y un cebador de oligo dT. El ADNc cohesivo se ligó en adaptadores de Bst XI no auto-complementarios y se purificó en gel para eliminar adaptadores no ligados y fragmentos pequeños. Después, el ADNc de ligación se ligó en el vector de expresión pcDNA -I (Invitrogen, San Diego, CA) y se sometió a electroporación en la cepa de *Escherichia coli* MC1061/P3 (Dower, W. J. (1990) *Genetic Engineering* V. 12 Editado por J. K. Seflow, Plenum Press, New York 275-295. (Electroporation of Bacteria: a general approach to genetic transformation); Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Struhl. 1987-1994 *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley Sons; N. Y.). Se usó ADNc de una genoteca de WERI-Rb-1 (100 ng/reacción) como un molde de PCR con 100 pmol de cebadores degenerados con sentido y antisentido diseñados a partir de la secuencia de proteína de cuatro péptidos de antígeno AC133. Las reacciones de PCR se realizaron en tampón (KCl 50 mM, Tris 10 mM pH 9, Triton X-100 al 0,1%, MgCl 1,5 mM, dNTP 0,2 mM (cada uno)) con 5 unidades de ADM polimerasa de Taq por reacción (Promega Corp., Madison, WI). La amplificación se realizó en un instrumento de MJ Research (datos) del siguiente modo: 92°C durante 1 min, 55-37°C durante 1 min, 72°C durante 3 min, 35 ciclos. Después de la amplificación, las mezclas de reacción se procesaron en geles de agarosa al 1% y las bandas únicas que no aparecían en los controles de cebador individuales se purificaron en gel y se clonaron en pCR 2.1 usando un kit de clonación TA (Invitrogen, San Diego, CA). Los extremos 5' y 3' del gen se aislaron por PCR hemi-específica con conjuntos anidados de cebadores específicos de gen de antígeno AC133 y cebadores específicos de genoteca. Se realizaron veinte ciclos de PCR monocatenaria con cada cebador específico de gen en un volumen de reacción de 50 µl con 100 ng de la genoteca de ADNc y 10 pmol de cada cebador en tampón de reacción de PCR (se ha descrito anteriormente) con 5 unidades de polimerasa de Taq. Se retiró una alícuota (10 µl) de esta mezcla de reacción y se usó como molde para una segunda reacción de PCR, 35 ciclos, usando tanto el cebador específico de gen y el cebador específico de genoteca. Después se usó una alícuota (5 µl) de esta mezcla de reacción de PCR durante otros 35 ciclos de reacción usando cebadores específicos de genoteca y genes anidados. Las bandas correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen se purificaron en gel y se clonaron en pCR 2.1. Se secuenciaron los clones de ADNc solapantes por la reacción en cadena didesoxi usando terminadores de colorante fluorescente y un secuenciador de ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA.).

*Aislamiento de un clon de ADNc del antígeno AC133.* Para aislar el ADNc para esta proteína se preparó una genoteca de ADNc a partir de la línea celular de retinoblastoma WERI-Rb-1 que expresa aproximadamente 10 veces más antígeno AC133 que células Y79 activadas por PMA. Se usaron cebadores degenerados en reacciones de PCR de baja rigurosidad con la genoteca para proporcionar un fragmento de 1,7 kb que contenía la secuencia correcta del péptido 3 en el extremo 5' y la secuencia correcta del péptido 4 en el extremo 3'. Adicionalmente, la secuencia del péptido 2 se encontró dentro del fragmento en la fase de lectura correcta. La PCR hemi-específica con cebadores específicos de gen y cebadores específicos de genoteca proporcionó fragmentos adicionales de 1,2 kb y 2 kb correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen y solapantes con el clon inicial de 1,7 kb.

La secuenciación de los tres clones parciales proporcionó un ADNc de 4 kb que contenía una fase de lectura abierta de 3,0 kb, pero que también contenía un intrón de 128 pb que parecía estar asociada con la versión poli A<sup>+</sup> del gen y no contiene secuencias de corte y empalme consenso eucariotas. Para aislar un clon obtenido de células madre intacta sin el intrón se aislaron células madre AC133<sup>+</sup> de hígado fetal utilizando un conjugado magnético del mAb de AC133 y el sistema de separación magnética Miltenyi (Miltenyi Biotech, GMBH). Se aisló ARN total de estas células y se usó como un molde para reacciones de RT-PCR. Los cebadores se diseñaron para abarcar el intrón que genera un fragmento único de 582 pb con el molde de ADNc obtenido de poli A<sup>+</sup>, pero generan un fragmento único de 454 pb sin el intrón del ARN total en líneas celulares AC133<sup>+</sup> (Figura 3), sugiriendo que el ARNm de corte y empalme es el producto principal dentro del grupo de ARN total. Se utilizó RT-PCR para generar clones de ADNc que se originaron antes de empezar con la metionina y que contenía la secuencia completa de ADNc. El ADNc de longitud completa que codifica el antígeno AC133 predice una proteína de 863 aminoácidos con un peso molecular de 96,8 kD (Figura 4). El análisis de hidrofobicidad de la secuencia (Figura 5) y los algoritmos de hélice transmembrana indican que la proteína abarca la membrana celular un total de cinco veces (Figura 6) prediciendo la presencia de dos bucles extracelulares grandes (255 y 280 aminoácidos) y una cola citoplasmática C-terminal. Otras características estructurales sugeridas por la secuencia de proteína incluyen motivos de cremallera de leucina en los bucles extracelulares grandes supuestos y seis secuencias consenso para N-glucosilación.

## ES 2 327 691 T3

*Expresión del antígeno AC133 en células COS-7 transfectadas.* Se aislaron células positivas a AC133 ( $1 \times 10^7$ ) de hígado fetal como se ha descrito anteriormente. Se aisló ARN total usando RNazol (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), como se describe (Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* 162, 156). Se realizó RT-PCR usando el sistema de RT-PCR Promega Access (Promega Corp., Madison, WI) con 10 ng de molde de ARN total y cebadores dirigidos antes del inicio de la metionina y después del codón de terminación. La banda de 2,8 kb correspondiente a la región codificante del gen se clonó en el vector de clonación TA eucariota direccional de Invitrogen (pCR 3.1) que contenía el promotor de CMV. Se transfectaron células COS-7 subconfluentes (disponibles de la ATCC, Rockville, MD) con 5  $\mu$ g de ADN clonado por electroporación y se incubaron durante 48 horas antes del análisis FACS. Las células COS-7 transfectadas se tiñeron con 50 ng/100  $\mu$ l de mAb de ensayo AC133-PE y se analizaron con un explorador FACS Becton Dickenson (San Jose, CA).

*Expresión del antígeno AC133 en células COS.* Las células COS transfectadas con el gen del antígeno AC133 se tiñeron con mAb de AC133-PE y se analizaron por FACS (Figura 7). Las células COS transfectadas con el gen de antígeno AC133 se tiñeron de forma brillante con mAb de AC133-PE, sin embargo, las células no transfectadas, las células transfectadas con vector vacío o el gen para CD-8 no se tiñeron con este anticuerpo.

*Expresión de AC133 en diversas líneas celulares linfoides y no linfoides.* La presencia del transcrito del antígeno AC133 en una diversidad de líneas celulares se evaluó por análisis de Northern. Se realizó el análisis de transferencia de Northern usando transferencias Northern para múltiples tejidos de Clontech (Palo Alto, CA) y separando las muestras de ARN en un gel de agarosa al 1%-formaldehído 2 M y transferencia capilar durante una noche a membrana de nylon. Se aisló el ARN total con Tri reagent y se cargaron 15  $\mu$ g por carril. Se usó la tinción de la transferencia con azul de metileno para controlar las concentraciones de ARN. Un fragmento de EcoRI de 800 pb del ADNc se marcó con 32P-dCTP por cebado aleatorio y se usó como una sonda.

La presencia del transcrito del antígeno AC133 en una diversidad de líneas celulares se evaluó por análisis Northern. Un transcrito de ARNm de 4,4 kB se podía detectar en células WERI-Rb-1, así como en células Y79 y células de hígado fetal AC133<sup>+</sup> aisladas por MACS. Aunque la expresión del antígeno AC133 está aumentada en células Y79 después de la activación con PMA, el ARNm correspondiente parece estar regulado negativamente. En tejido hematopoyético normal, el mensaje del antígeno AC133 es detectable en hígado fetal y es débilmente detectable en médula ósea de adulto como se espera debido al hecho de que las células de AC133<sup>+</sup> en estos tejidos están en minoría. El transcrito del antígeno AC133 también se observó en tejidos no linfoides, particularmente en páncreas, riñón y placenta. Se observaron señales más débiles para hígado, pulmón, cerebro y corazón. Esto se contradice a la tinción inmunohistoquímica de secciones tisulares en parafina en las que la expresión del antígeno AC133 solamente era detectable en médula ósea.

De un modo similar, se han desarrollado otros anticuerpos que son específicos para el antígeno AC133. La siguiente tabla muestra anticuerpos, inmunógenos, isotipos y el bloqueo cruzado para un grupo de tales anticuerpos.

TABLA

Anticuerpo	Inmunógeno	Isotipo	AC133 de bloqueo cruzado
AC133	HSC	IgG1 Kappa	+++
AC139	WERI-Rb-1	IgG1 Kappa	+++
AC140	WERI-Rb-1	IgG1 Kappa	+/-
AC141	WERI-Rb-1	IgG1 Kappa	-
AC142	WERI-Rb-1	IgG1 Kappa	ND

# ES 2 327 691 T3

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que se une específicamente al antígeno AC133, antígeno del cual se muestra la secuencia de aminoácidos en la SEC ID N°: 2.
2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal producido por una línea celular de hibridoma.
- 10 3. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo se induce mediante inmunización contralateral.
4. Un método para el enriquecimiento de células madre o progenitoras hematopoyéticas o ambas, comprendiendo dicho método:
- 15 proporcionar una población mixta de células humanas que comprende células madre o progenitoras hematopoyéticas o ambas; y
- 20 seleccionar para células basándose en la presencia de las células de antígeno AC133, antígeno del cual se muestra la secuencia de aminoácidos en la SEC ID N°: 2;
- 25 en el que dichas células seleccionadas están enriquecidas en actividad de células madre o progenitoras hematopoyéticas o ambas, dependiendo de si dicha población mixta de células humanas contenía células madre o progenitoras hematopoyéticas o ambas, respectivamente, en el que dicho método no comprende el uso de un embrión humano.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además:
- 30 seleccionar células de la población mixta de células humanas basándose en la presencia de las células de al menos uno de los marcadores de superficie celular CD90, CD117 y HLA-DR.
6. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha selección se realiza combinando la población mixta de células humanas con reactivo que se une específicamente al antígeno AC133, antígeno del cual se muestra la secuencia de aminoácidos en la SEC ID N°: 2 y seleccionando células que se unen a dicho reactivo, en el que dicho reactivo es un anticuerpo, mezcla de anticuerpos, anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo humanizado, fragmento de anticuerpo, fragmento Fv, (F(ab')<sub>2</sub>), Fab o anticuerpo quimérico.
- 35 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que al menos uno de dichos reactivos está conjugado con fluorocromo.
- 40 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha selección con dichos reactivos conjugados con fluorocromo es por citometría de flujo.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que al menos uno de dichos reactivos se conjuga con partículas magnéticas.
- 45 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha selección con dichos reactivos conjugados con partículas magnéticas es por selección magnética de alto gradiente.
- 50 11. Una población sustancialmente pura de células progenitoras hematopoyéticas, en la que dichas células están unidas a un reactivo que se une específicamente al antígeno AC133, antígeno del cual se muestra la secuencia de aminoácidos en la SEC ID N°: 2, en la que dichas células no se obtienen mediante un método que comprende el uso de un embrión humano y en la que dicho reactivo es un reactivo como se define en la reivindicación 6.
- 55 12. Una población sustancialmente pura de células progenitoras hematopoyéticas de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicho reactivo es un anticuerpo monoclonal.
13. Una población sustancialmente pura de células progenitoras hematopoyéticas de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dichas células progenitoras se obtienen a partir de hígado fetal humano.
- 60 14. Una población sustancialmente pura de células progenitoras hematopoyéticas de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dichas células progenitoras se obtienen a partir de sangre periférica humana.
15. Una población sustancialmente pura de células progenitoras hematopoyéticas de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dichas células progenitoras se obtienen a partir de médula ósea humana.
- 65 16. Una población sustancialmente pura de células progenitoras hematopoyéticas de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicha médula ósea es adulta.

## ES 2 327 691 T3

17. Una población sustancialmente pura de células progenitoras hematopoyéticas de acuerdo con la reivindicación 15, en la que dicha médula ósea es fetal.

18. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que tiene una región codificante de aminoácidos para AC133 como se expone en la SEC ID N°: 1, a condición de que si dicha molécula es una molécula de ARN, U sustituye a T en dicha secuencia de dicha molécula.

19. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 90% con la región codificante de aminoácidos para AC133 como se expone en la SEC ID N°: 1, a condición de que si dicha molécula es una molécula de ARN, U sustituye a T en dicha secuencia de dicha molécula.

20. Una molécula de ácido nucleico aislado que consiste en ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de AC133 mostrada en la SEC ID N°: 2.

21. Un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20.

22. Una célula transfectada con el vector de expresión de la reivindicación 21.

23. Un polipéptido aislado, en el que dicho polipéptido comprende: (a) una secuencia de aminoácidos de AC133 como se expone en la SEC ID N°: 2; o (b) una secuencia de aminoácidos en la que dicha secuencia es una subsecuencia de (a) y tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos y comprende un epítipo.

24. El polipéptido aislado de la reivindicación 23, en el que dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos (a).

25. El polipéptido aislado de la reivindicación 23, en el que dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos (b).

26. El polipéptido de la reivindicación 23, que forma complejos con un anticuerpo.

27. Un polipéptido aislado, donde dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos del extremo N-extracelular, aa 20-107; primera región transmembrana, aa 107-126; primer bucle citoplasmático, aa 127-157; segunda región transmembrana, aa 158-179; primer bucle extracelular, aa 180-435; tercera región transmembrana aa 436-454; segundo bucle citoplasmático, aa 455-480; cuarta región transmembrana, aa 481-503, segundo bucle extracelular, aa 504-792; quinta región transmembrana, aa 793-816; o extremo C citoplasmático, aa 817-865; de la SEC ID N°: 2.

28. Un método para identificar un reactivo que se une a células madre hematopoyéticas humanas, que comprende detectar la unión de dicho reactivo con (a) una secuencia de aminoácidos de AC133 como se expone en la SEC ID N°: 2; o (b) una secuencia de aminoácidos en la que dicha secuencia es una subsecuencia de (a) y tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos y comprende un epítipo.

29. Un reactivo que se une específicamente a (a) una secuencia de aminoácidos de AC133 como se expone en la SEC ID N°: 2; o (b) una secuencia de aminoácidos en la que dicha secuencia es una subsecuencia de (a) y tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos y comprende un epítipo, donde dicho reactivo es un reactivo como se define en la reivindicación 6.

30. El reactivo de la reivindicación 29, en el que dicho reactivo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos monoclonales y policlonales.

31. El polipéptido de la reivindicación 23, en el que dicho polipéptido no está glucosilado.

32. El polipéptido de la reivindicación 23, en el que dicho polipéptido está glucosilado.

33. En un método para aislar células madre hematopoyéticas que usa una técnica de separación de células basada en identificación de células madre basándose en la presencia de un reactivo unido a un marcador de antígeno en dicha célula madre, una mejora que comprende:

utilizar como dicho marcador antigénico el antígeno AC133, antígeno del cual se muestra la secuencia de aminoácidos en la SEC ID N°: 2.

34. El método de la reivindicación 33, en el que dicho reactivo es un reactivo como se define en la reivindicación 6.

35. El método de la reivindicación 33, en el que dicho reactivo se une a una región extracelular de dicho antígeno AC133.

## ES 2 327 691 T3

36. El método de la reivindicación 33, en el que dicho reactivo se une al extremo N extracelular aa 20-107; primer bucle extracelular, aa 180-435; o segundo bucle extracelular, aa 504-792, de la SEC ID N°: 2.

5 37. El método de la reivindicación 33, en el que dicho reactivo se ha identificado determinando qué compuestos en un grupo de compuestos de ensayo se unen a dicho antígeno AC133 y seleccionando dicho reactivo entre compuestos que se unen específicamente a dicho antígeno AC133 con una reactividad cruzada inferior al 10% con cualquier antígeno presente en células sanguíneas maduras.

10 38. El método de la reivindicación 33, en el que la reactividad cruzada se mide mediante un ensayo de unión competitiva entre antígeno AC133 puro, dicho reactivo y dicho supuesto antígeno con reactividad cruzada mediante el uso de concentraciones de antígeno AC133 y dicho reactivo en el que dicho reactivo satura la mitad de la unión a AC133, en el que, del antígeno AC133 se muestra la secuencia de aminoácidos en la SEC ID N°: 2.

15 39. Un reactivo que se une específicamente al antígeno AC133, antígeno del cual se muestra la secuencia de aminoácidos en la SEC ID N°: 2, con una reactividad cruzada inferior al 5% con cualquier antígeno presente en células sanguíneas maduras, donde dicho reactivo es un reactivo como se define en la reivindicación 6.

20 40. El reactivo de la reivindicación 39, donde dicho reactivo está unido a un marcador de superficie o a un marcador detectable.

41. El reactivo de la reivindicación 40, en el que dicho marcador es un marcador fluorescente.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

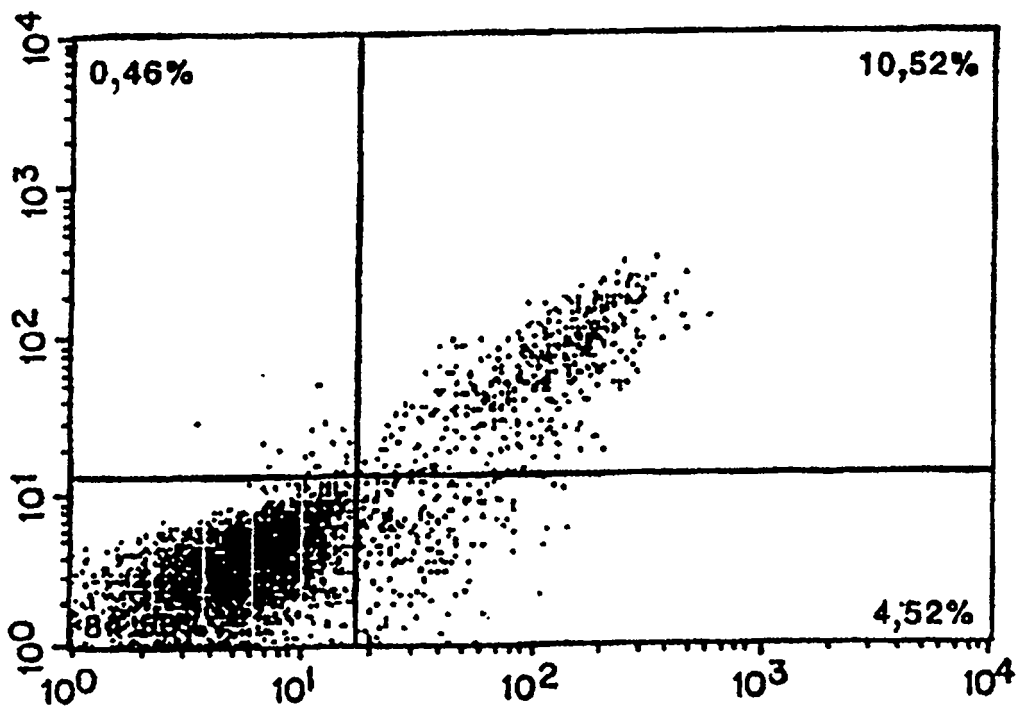


FIG. 2

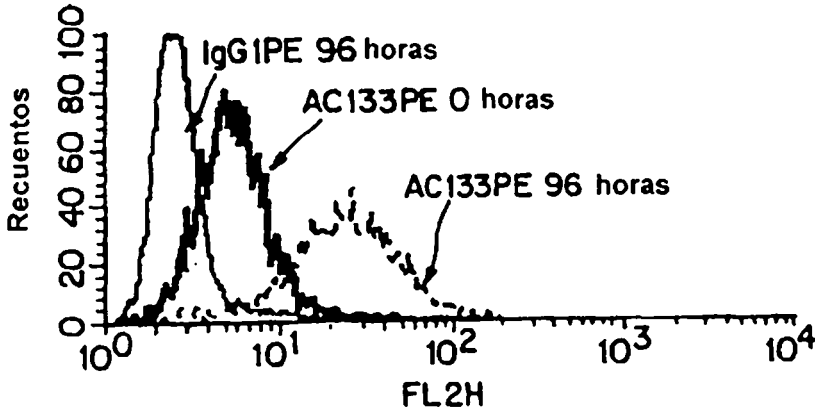


FIG. 3

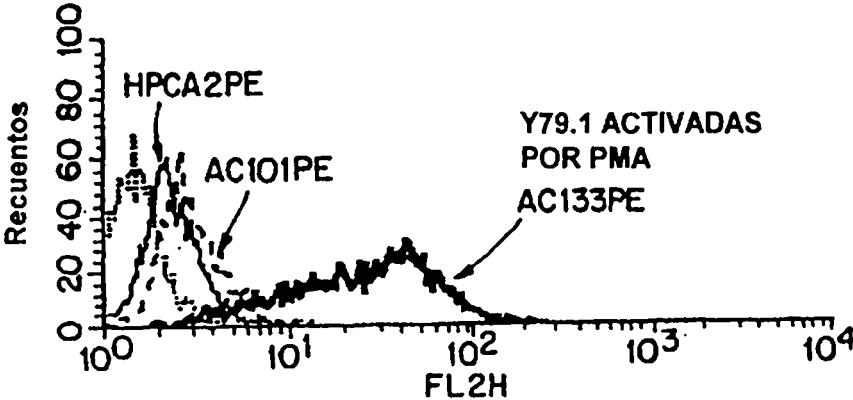


FIG.4A

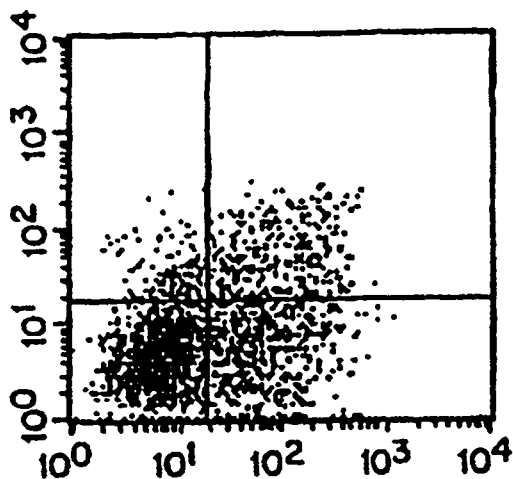


FIG.4B

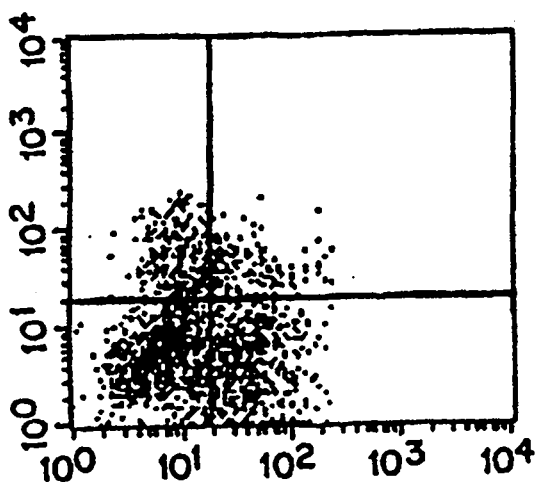


FIG.5A

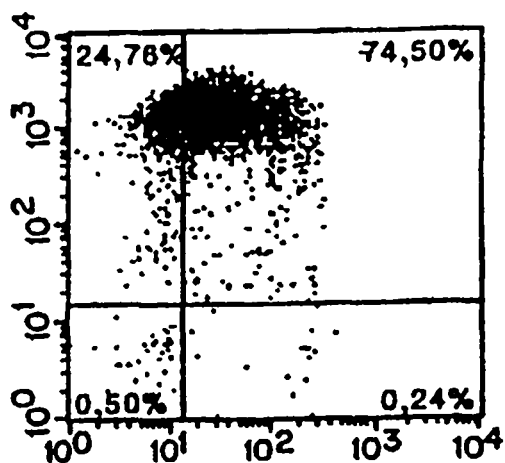


FIG.5B

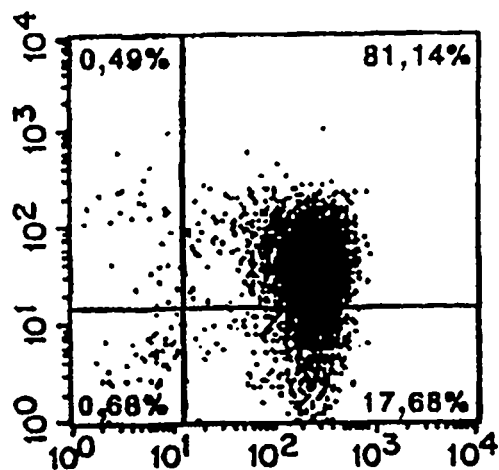


FIG.5C

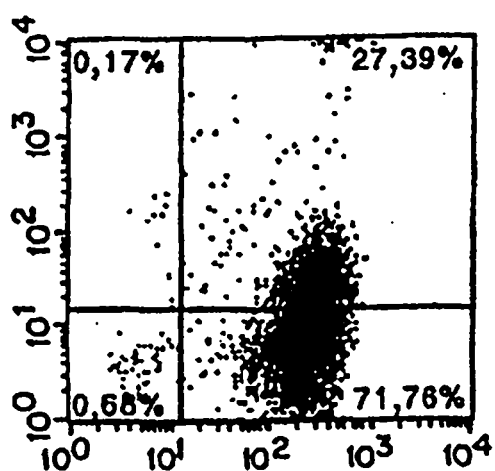


FIG.5D

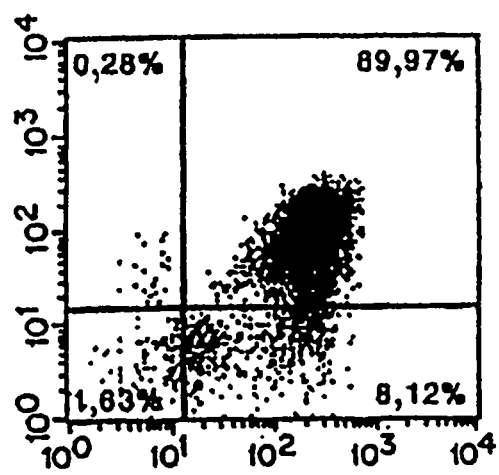


FIG.6

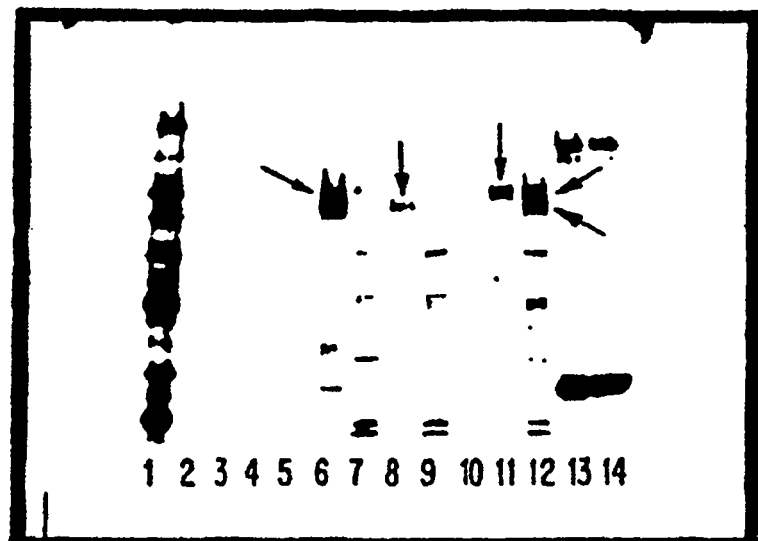


FIG. 7A

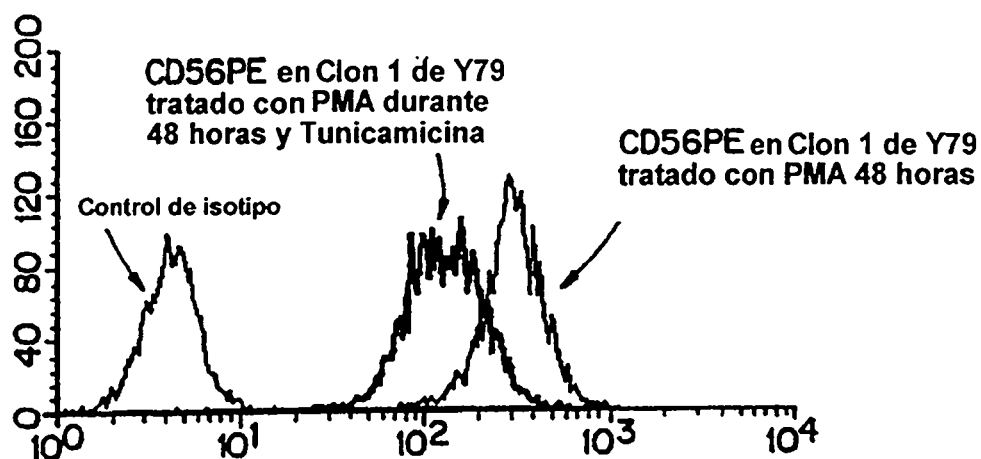


FIG. 7B

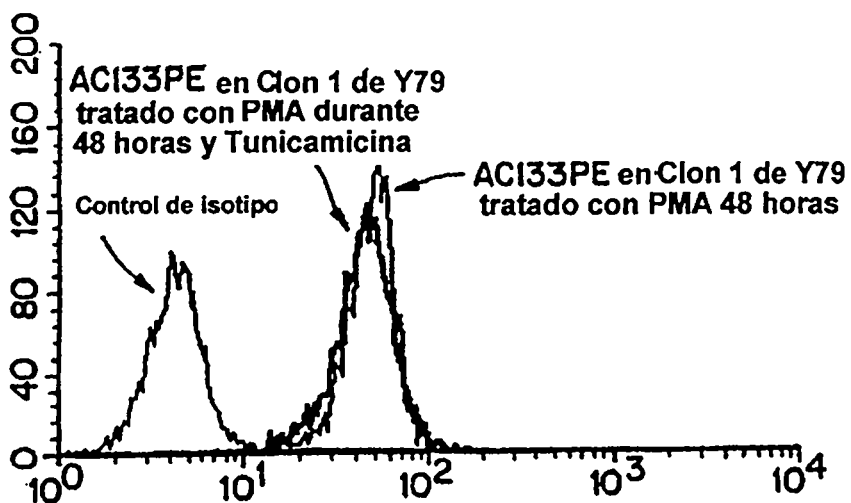


FIG.8

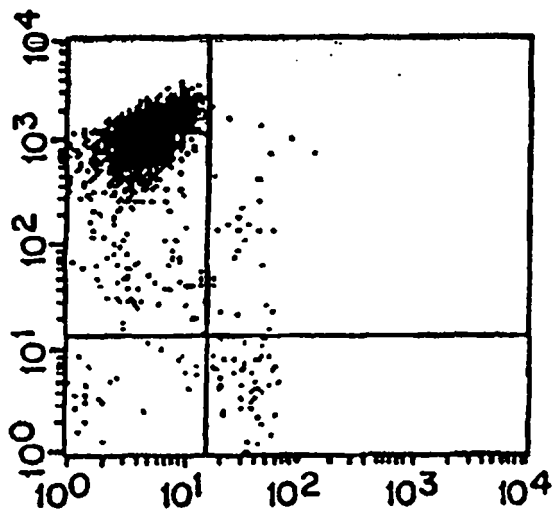


FIG.9A

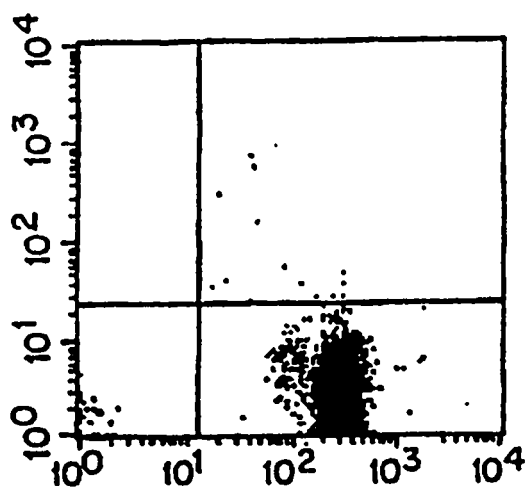


FIG.9B

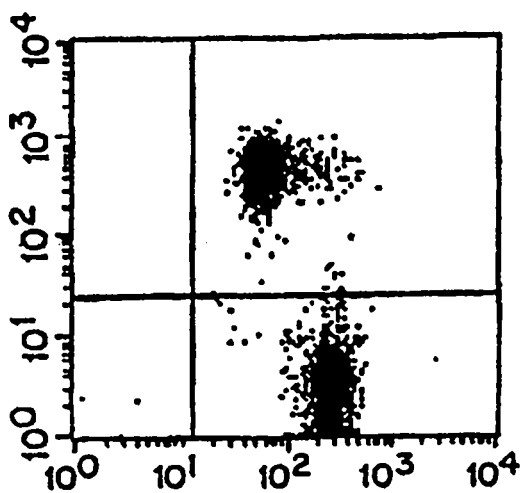
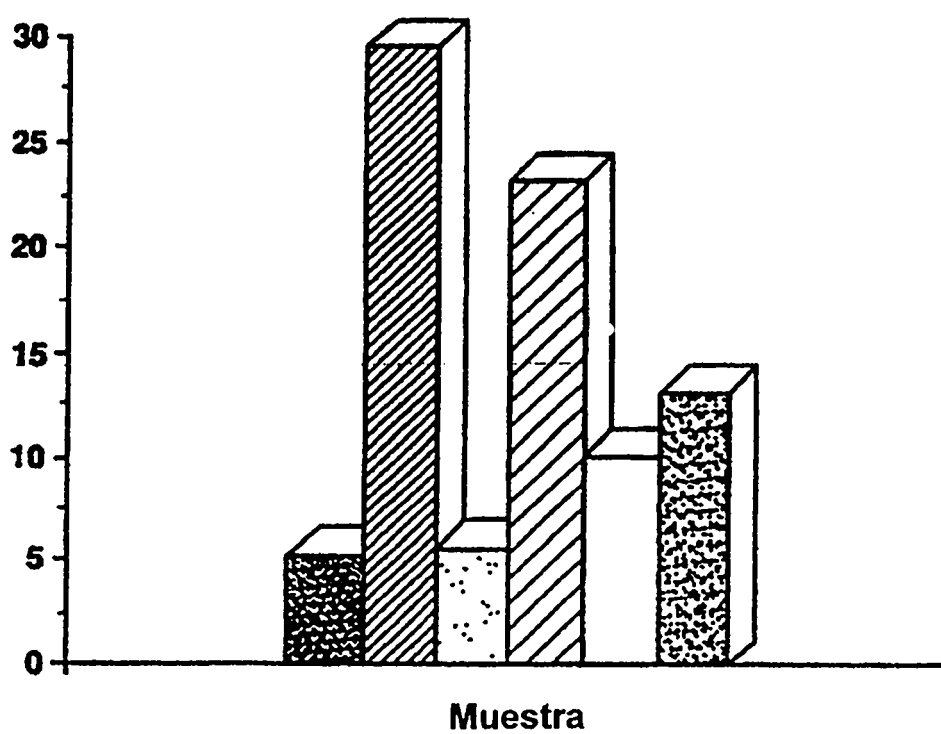


FIG.10









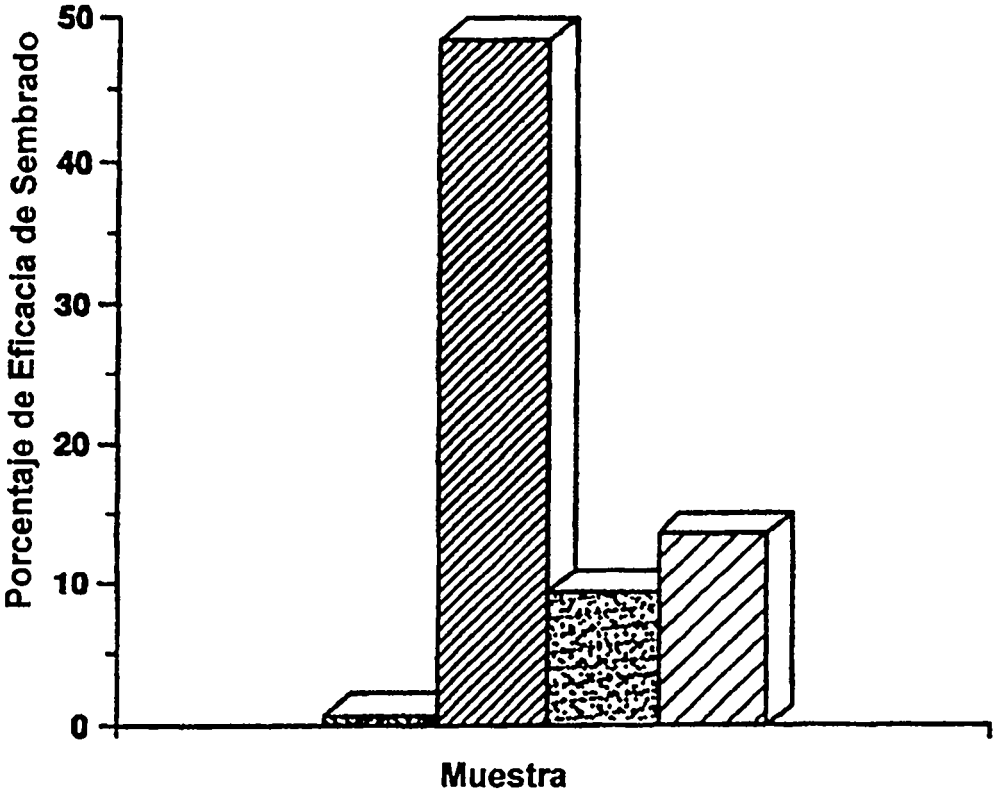
-  Control de LP/CFU-GM
-  Control de LP/BFU-E
-  C4-AC101/CFU-GM
-  C4-AC101/BFU-E
-  C4-AC133/CFU-GM
-  C4-AC133/BFU-E

FIG.11



- AC101/CFU-GM
- ▨ AC101/BFU-E
- ▩ AC133/CFU-GM
- ▧ AC133/BFU-E

# FIG. 12 - 1

CCAAGTTCTA CCTCATGTTT GGAGGATCTT GCTAGCT	ATG GCC CTC GTA CTC GGC	55
	Met Ala Leu Val Leu Gly	
	1 5	
TCC CTG TTG CTG CTG GGG CTG TGC GGG AAC TCC TTT TCA GGA GGG CAG		103
Ser Leu Leu Leu Leu Gly Leu Cys Gly Asn Ser Phe Ser Gly Gly Gln		
	10 15 20	
CCT TCA TCC ACA GAT GCT CCT AAG GCT TGG AAT TAT GAA TTG CCT GCA		151
Pro Ser Ser Thr Asp Ala Pro Lys Ala Trp Asn Tyr Glu Leu Pro Ala		
	25 30 35	
ACA AAT TAT GAG ACC CAA GAC TCC CAT AAA GCT GGA CCC ATT GGC ATT		199
Thr Asn Tyr Glu Thr Gln Asp Ser His Lys Ala Gly Pro Ile Gly Ile		
	40 45 50	
CTC TTT GAA CTA GTG CAT ATC TTT CTC TAT GTG GTA CAG CCG CGT GAT		247
Leu Phe Glu Leu Val His Ile Phe Leu Tyr Val Val Gln Pro Arg Asp		
	55 60 65 70	
TTC CCA GAA GAT ACT TTG AGA AAA TTC TTA CAG AAG GCA TAT GAA TCC		295
Phe Pro Glu Asp Thr Leu Arg Lys Phe Leu Gln Lys Ala Tyr Glu Ser		
	75 80 85	
AAA ATT GAT TAT GAC AAG CCA GAA ACT GTA ATC TTA GGT CTA AAG ATT		343
Lys Ile Asp Tyr Asp Lys Pro Glu Thr Val Ile Leu Gly Leu Lys Ile		
	90 95 100	
GTC TAC TAT GAA GCA GGG ATT ATT CTA TGC TGT GTC CTG GGG CTG CTG		391
Val Tyr Tyr Glu Ala Gly Ile Ile Leu Cys Cys Val Leu Gly Leu Leu		
	105 110 115	
TTT AIT ATT CTG ATG CCT CTG GTG GGG TAT TTC TTT TGT ATG TGT CGT		439
Phe Ile Ile Leu Met Pro Leu Val Gly Tyr Phe Phe Cys Met Cys Arg		
	120 125 130	
TGC TGT AAC AAA TGT GGT GGA GAA ATG CAC CAG CGA CAG AAG GAA AAT		487
Cys Cys Asn Lys Cys Gly Gly Glu Met His Gln Arg Gln Lys Glu Asn		
	135 140 145 150	
GGG CCC TTC CTG AGG AAA TGC TTT GCA ATC TCC CTG TTG GTG ATT TGT		535
Gly Pro Phe Leu Arg Lys Cys Phe Ala Ile Ser Leu Leu Val Ile Cys		
	155 160 165	
ATA ATA ATA AGC ATT GGC ATC TTC TAT GGT TTT GTG GCA AAT CAC CAG		583
Ile Ile Ile Ser Ile Gly Ile Phe Tyr Gly Phe Val Ala Asn His Gln		
	170 175 180	
GTA AGA ACC CGG ATC AAA AGG AGT CGG AAA CTG GCA GAT AGC AAT TTC		631
Val Arg Thr Arg Ile Lys Arg Ser Arg Lys Leu Ala Asp Ser Asn Phe		
	185 190 195	
AAG GAC TTG CGA ACT CTC TTG AAT GAA ACT CCA GAG CAA ATC AAA TAT		679
Lys Asp Leu Arg Thr Leu Leu Asn Glu Thr Pro Glu Gln Ile Lys Tyr		
	200 205 210	
ATA TTG GCC CAG TAC AAC ACT ACC AAG GAC AAG GCG TTC ACA GAT CTG		727
Ile Leu Ala Gln Tyr <u>Asn Thr Thr</u> Lys Asp Lys Ala Phe Thr Asp Leu		
	215 220 225 230	

# FIG.12-2

AAC AGT ATC AAT TCA GTG CTA GGA GGC GGA ATT CTT GAC CGA CTG AGA Asn Ser Ile Asn Ser Val Leu Gly Gly Ile Leu Asp Arg Leu Arg 235 240 245	775
CCC AAC ATC ATC CCT GTT CTT GAT GAG ATT AAG TCC ATG GCA ACA GCG Pro Asn Ile Ile Pro Val Leu Asp Glu Ile Lys Ser Met Ala Thr Ala 250 255 260	823
ATC AAG GAG ACC AAA GAG GCG TTG GAG AAC ATG AAC AGC ACC TTG AAG Ile Lys Glu Thr Lys Glu Ala Leu Glu Asn Met <u>Asn Ser Thr</u> Leu Lys 265 270 275	871
AGC TTG CAC CAA CAA AGT ACA CAG CTT AGC AGC AGT CTG ACC AGC GTG Ser Leu His Gln Gln Ser Thr Gln Leu Ser Ser Ser Leu Thr Ser Val 280 285 290	919
AAA ACT AGC CTG CGG TCA TCT CTC AAT GAC CCT CTG TGC TTG GTG CAT Lys Thr Ser Leu Arg Ser Ser Leu Asn Asp Pro Leu Cys Leu Val His 295 300 305 310	967
CCA TCA AGT GAA ACC TGC AAC AGC ATC AGA TTG TCT CTA AGC CAG CTG Pro Ser Ser Glu Thr Cys Asn Ser Ile Arg Leu Ser Leu Ser Gln Leu 315 320 325	1015
AAT AGC AAC CCT GAA CTG AGG CAG CTT CCA CCC GTG GAT GCA GAA CTT Asn Ser Asn Pro Glu Leu Arg Gln Leu Pro Pro Val Asp Ala Glu Leu 330 335 340	1063
GAC AAC GTT AAT AAC GTT CTT AGG ACA GAT TTG GAT GGC CTG GTC CAA Asp Asn Val Asn Asn Val Leu Arg Thr Asp Leu Asp Gly Leu Val Gln 345 350 355	1111
CAG GGC TAT CAA TCC CTT AAT GAT ATA CCT GAC AGA GTA CAA CGC CAA Gln Gly Tyr Gln Ser Leu Asn Asp Ile Pro Asp Arg Val Gln Arg Gln 360 365 370	1159
ACC ACG ACT GTC GTA GCA GGT ATC AAA AGG GTC TTG AAT TCC ATT GGT Thr Thr Thr Val Val Ala Gly Ile Lys Arg Val Leu Asn Ser Ile Gly 375 380 385 390	1207
TCA GAT ATC GAC AAT GTA ACT CAG CGT CTT CCT ATT CAG GAT ATA CTC Ser Asp Ile Asp <u>Asn Val Thr</u> Gln Arg Leu Pro Ile Gln Asp Ile Leu 395 400 405	1255
TCA GCA TTC TCT GTT TAT GTT AAT AAC ACT GAA AGT TAC ATC CAC AGA Ser Ala Phe Ser Val Tyr Val <u>Asn Asn Thr</u> Glu Ser Tyr Ile His Arg 410 415 420	1303
AAT TTA CCT ACA TTG GAA GAG TAT GAT TCA TAC TGG TGG CTG GGT GGC Asn Leu Pro Thr Leu Glu Glu Tyr Asp Ser Tyr Trp Trp <u>Leu Gly Gly</u> 425 430 435	1351
CTG GTC ATC TGC TCT CTG CTG ACC CTC ATC GTG ATT TTT TAC TAC CTG Leu Val Ile Cys Ser Leu Leu Thr Leu Ile Val Ile Phe Tyr Tyr Leu 440 445 450	1399
GGC TTA CTG TGT GGC GTG TGC GGC TAT GAC AGG CAT GCC ACC CCG ACC Gly Leu Leu Cys Gly Val Cys Gly Tyr Asp Arg His Ala Thr Pro Thr 455 460 465 470	1447

## FIG.12-3

ACC CGA GGC TGT GTC TCC AAC ACC GGA GGC GTC TTC CTC ATG GTT GGA	1495
Thr Arg Gly Cys Val Ser Asn Thr Gly Gly Val Phe Leu Met Val Gly	
475 480 485	
GTT GGA TTA AGT TTC CTC TTT TGC TGG ATA TTG ATG ATC ATT GTG GTT	1543
Val Gly Leu Ser Phe Leu Phe Cys Trp Ile Leu Met Ile Ile Val Val	
490 495 500	
CTT ACC TTT GTC TTT GGT GCA AAT GTG GAA AAA CTG ATC TGT GAA CCT	1591
Leu Thr Phe Val Phe Gly Ala Asn Val Glu Lys Leu Ile Cys Glu Pro	
505 510 515	
TAC ACG AGC AAG GAA TTA TTC CGG GTT TTG GAT ACA CCC TAC TTA CTA	1639
Tyr Thr Ser Lys Glu Leu Phe Arg Val Leu Asp Thr Pro Tyr Leu Leu	
520 525 530	
AAT GAA GAC TGG GAA TAC TAT CTC TCT GGG AAG CTA TTT AAT AAA TCA	1687
Asn Glu Asp Trp Glu Tyr Leu Ser Gly Lys Leu Phe <u>Asn Lys Ser</u>	
535 540 545 550	
AAA ATG AAG CTC ACT TTT GAA CAA GTT TAC AGT GAC TGC AAA AAA AAT	1735
Lys Met Lys Leu Thr Phe Glu Gln Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Asn	
555 560 565	
AGA GGC ACT TAC GGC ACT CTT CAC CTG CAG AAC AGC TTC AAT ATC AGT	1783
Arg Gly Thr Tyr Gly Thr Leu His Leu Gln Asn Ser Phe <u>Asn Ile Ser</u>	
570 575 580	
GAA CAT CTC AAC ATT AAT GAG CAT ACT GGA AGC ATA AGC AGT GAA TTG	1831
Glu His Leu Asn Ile Asn Glu His Thr Gly Ser Ile Ser Ser Glu Leu	
585 590 595	
GAA AGT CTG AAG GTA AAT CTT AAT ATC TTT CTG TTG GGT GCA GCA GGA	1879
Glu Ser Leu Lys Val Asn Leu Asn Ile Phe Leu Leu Gly Ala Ala Gly	
600 605 610	
AGA AAA AAC CTT CAG GAT TTT GCT GCT TGT GGA ATA GAC AGA ATG AAT	1927
Arg Lys Asn Leu Gln Asp Phe Ala Ala Cys Gly Ile Asp Arg Met Asn	
615 620 625 630	
TAT GAC AGC TAC TTG GCT CAG ACT GGT AAA TCC CCC GCA GGA GTG AAT	1975
Tyr Asp Ser Tyr Leu Ala Gln Thr Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Asn	
635 640 645	
CTT TTA TCA TTT GCA TAT GAT CTA GAA GCA AAA GCA AAC AGT TTG CCC	2023
Leu Leu Ser Phe Ala Tyr Asp Leu Glu Ala Lys Ala Asn Ser Leu Pro	
650 655 660	
CCA GGA AAT TTG AGG AAC TCC CTG AAA AGA GAT GCA CAA ACT ATT AAA	2071
Pro Gly Asn Leu Arg Asn Ser Leu Lys Arg Asp Ala Gln Thr Ile Lys	
665 670 675	
ACA ATT CAC CAG CAA CGA GTC CTT CCT ATA GAA CAA TCA CTG AGC ACT	2119
Thr Ile His Gln Gln Arg Val Leu Pro Ile Glu Gln Ser Leu Ser Thr	
680 685 690	
CTA TAC CAA AGC GTC AAG ATA CTT CAA CGC ACA GGG AAT GGA TTG TTG	2167
Leu Tyr Gln Ser Val Lys Ile Leu Gln Arg Thr Gly Asn Gly Leu Leu	
695 700 705 710	
GAG AGA GTA ACT AGG ATT CTA GCT TCT CTG GAT TTT GCT CAG AAC TTC	2215
Glu Arg Val Thr Arg Ile Leu Ala Ser Leu Asp Phe Ala Gln Asn Phe	
715 720 725	

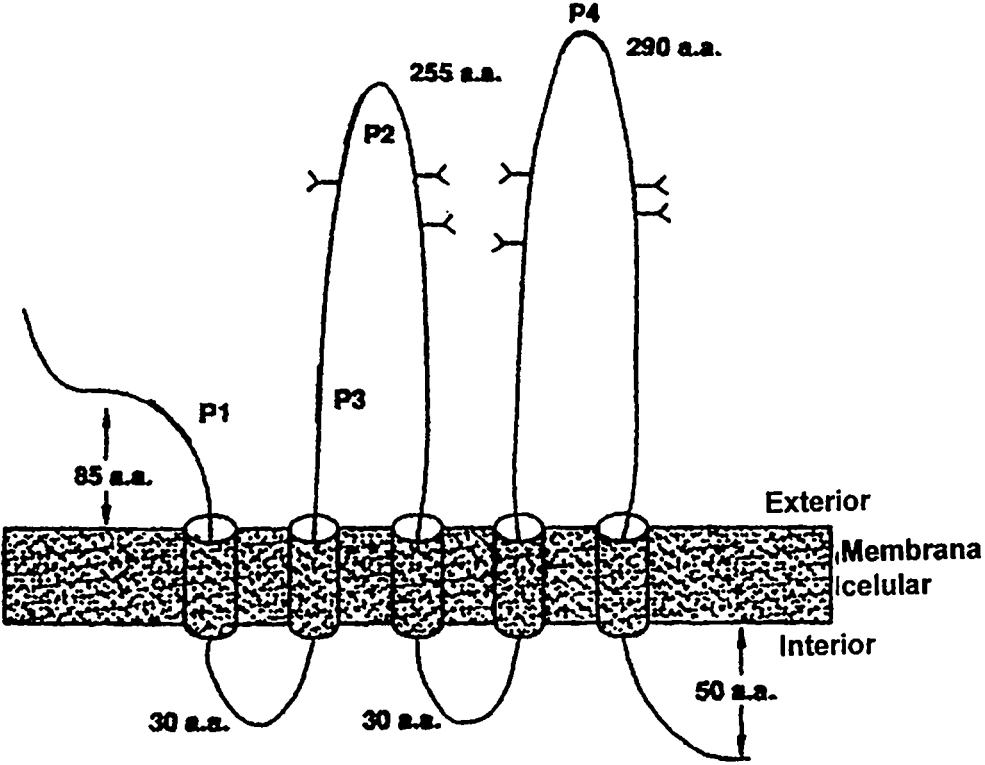
# FIG. 12-4

ATC ACA AAC AAT ACT TCC TCT GTT ATT ATT GAG GAA ACT AAG AAG TAT	2263
Ile Thr <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Asn Asn Thr Ser</span> Ser Val Ile Ile Glu Glu Thr Lys Lys Tyr	
730	735
740	
GGG AGA ACA ATA ATA GGA TAT TTT GAA CAT TAT CTG CAG TGG ATC GAG	2311
Gly Arg Thr Ile Ile Gly Tyr Phe Glu His Tyr Leu Gln Trp Ile Glu	
745	750
755	
TTC TCT ATC AGT GAG AAA GTG GCA TCG TGC AAA CCT GTG GCC ACC GCT	2359
Phe Ser Ile Ser Glu Lys Val Ala Ser Cys Lys Pro Val Ala Thr Ala	
760	765
770	
CTA GAT ACT GCT GTT GAT GTC TTT CTG TGT AGC TAC ATT ATC GAC CCC	2407
Leu Asp Thr Ala Val Asp Val Phe Leu Cys Ser Tyr Ile Ile Asp Pro	
775	780
785	790
TTG AAT TTG TTT TGG TTT GGC ATA GGA AAA GCT ACT GTA TTT TTA CTT	2455
Leu Asn <u>Leu Phe Trp Phe Gly Ile Gly Lys Ala Thr Val Phe Leu Leu</u>	
795	800
805	
CCG GCT CTA ATT TTT GCG GTA AAA CTG GCT AAG TAC TAT CGT CGA ATG	2503
Pro Ala <u>Leu Ile Phe Ala Val Lys Leu Ala Lys Tyr Tyr Arg Arg Met</u>	
810	815
820	
GAT TCG GAG GAC GTG TAC GAT GAT GTT GAA ACT ATA CCC ATG AAA AAT	2551
Asp Ser Glu Asp Val Tyr Asp Asp Val Glu Thr Ile Pro Met Lys Asn	
825	830
835	
ATG GAA AAT GGT AAT AAT GGT TAT CAT AAA GAT CAT GTA TAT GGT ATT	2599
Met Glu Asn Gly Asn Asn Gly Tyr His Lys Asp His Val Tyr Gly Ile	
840	845
850	
CAC AAT CCT GTT ATG ACA AGC CCA TCA CAA CAT T GATAGCTGAT	2643
His Asn Pro Val Met Thr Ser Pro Ser Gln His	
855	860
865	
GTTGAAACTG CTTGAGCATC AGGATACTCA AAGTGAAAG GATCACAGAT TTTTGGTAGT	2703
TTCTGGGTCT ACAAGGACTT TCCAAATCCA GGAGCAACGC CAGTGGCAAC GTAGTGA CTC	2763
AGGCGGGCAC CAAGGCAACG GCACCATTGG TCTCTGGGTA GTGCTTTAAG AATGAACACA	2823
ATCACGTTAT AGTCCATGGT CCATCACTAT TCAAGGATGA CTCCTCCCT TCTGTCTAT	2883
TTTTGTTTTT TACTTTTTTA CACTGAGTTT CTATTTAGAC ACTACAACAT ATGGGGTGT	2943
TGTTCCCAT TGGATGCATTT CTATCAAAC TCTATCAAAT GTGATGGCTA GATCTAACA	3003
TATTGCCATG TGTGGAGTGT GCTGAACACA CACCAGTTTA CAGGAAAGAT GCATTTTGTG	3063
TACAGTAAAC GGTGTATATA CCTTTTGTTA CCACAGAGTT TTTTAAACAA ATGAGTATTA	3123
TAGGACTTTC TTCTAAATGA GCTAAATAAG TCACCATTGA CTCTTGGTG CTGTGAAAA	3183
TAATCCATTT TCACTAAAAG TGTGTGAAAC CTACAGCATA TTCTTCACGC AGAGATTTTC	3243
ATCTATTATA CTTTATCAAA GATTGGCCAT GTTCCACTTG GAAATGGCAT GCAAAGCCA	3303
TCATAGAGAA ACCTGCGTAA CTCCATCTGA CAAATCAAA AGAGAGAGAG AGATCTTGAG	3363
AGAGAAATGC TGTTTCGTTCA AAAGTGGAGT TGTTTTAACA GATGCCAAT ACGGTGTACA	3423

## FIG.12-5

GTTTAACAGA	GTTTTCTGTT	GCATTAGGAT	AAACATTAAT	TGGAGTGCAG	CTAACATGAG	3483
TATCATCAGA	CTAGTATCAA	GTGTTCTAAA	ATGAAATATG	AGAAGATCCT	GTCACAATTC	3543
TTAGATCTGG	TGTCCAGCAT	GGATGAAACC	TTTGAGTTTG	GTCCCTAAAT	TTGCATGAAA	3603
GCACAAGGTA	AATATTCATT	TGCTTCAGGA	GTTTCATGTT	GGATCTGTCA	TTATCAAAAG	3663
TGATCAGCAA	TGAAGAAGTG	GTCGGACAAA	ATTTAACGTT	GATGTAATGG	AATTCAGAT	3723
GTAGGCATTC	CCCCCAGGTC	TTTTCATGTG	CAGATTGCAG	TTCTGATTCA	TTTGAATAAA	3783
AAGGAACTTG	GAAAAA AAAA	A				3804

FIG.13



# ES 2 327 691 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Miraglia, Sheri.  
Godfry, Wayne G.  
Yin, Amy H.  
Buck, David W.
- 10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: ANTÍGENO DE CÉLULAS MADRE Y PROGENITORAS HEMATO-  
POYÉTICAS HUMANAS Y MÉTODOS PARA SU USO
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2
- 15 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:  
(A) DIRECCIÓN: COOLEY GODWARD LLP  
(B) CALLE: 5 PALO ALTO SQUARE, 3000 EL CAMINO REAL  
(C) CIUDAD: PALO ALTO  
20 (D) ESTADO: CA  
(E) PAÍS: EEUU  
(F) CÓDIGO POSTAL: 94306-2155
- 25 (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR  
(A) TIPO DE MEDIO: Disquete  
(B) ORDENADOR: PC compatible con IBM  
30 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release # 1.0 Versión # 1.25
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL  
35 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:  
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 24-ABR-1997  
(C) CLASIFICACIÓN:
- 40 (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR  
(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/639.891  
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 26-ABR-1996
- 45 (viii) INFORMACIÓN DEL MANDATARIO/AGENTE  
(A) NOMBRE: Neeley, Richard L.  
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 30.092  
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: AMCE-012/1WO
- 50 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES  
(A) TELÉFONO: (415) 843-5070  
(B) TELEFAX: (415) 857-0663
- 55 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 1
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
60 (A) LONGITUD: 3804 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: doble  
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO



ES 2 327 691 T3

	75	80	85		
5	AAA ATT GAT TAT GAC AAG CCA GAA ACT GTA ATC TTA GGT CTA AAG ATT Lys Ile Asp Tyr Asp Lys Pro Glu Thr Val Ile Leu Gly Leu Lys Ile	90	95	100	343
10	GTC TAC TAT GAA GCA GGG ATT ATT CTA TGC TGT GTC CTG GGG CTG CTG Val Tyr Tyr Glu Ala Gly Ile Ile Leu Cys Cys Val Leu Gly Leu Leu	105	110	115	391
15	TTT ATT ATT CTG ATG CCT CTG GTG GGG TAT TTC TTT TGT ATG TGT CGT Phe Ile Ile Leu Met Pro Leu Val Gly Tyr Phe Phe Cys Met Cys Arg	120	125	130	439
20	TGC TGT AAC AAA TGT GGT GGA GAA ATG CAC CAG CGA CAG AAG GAA AAT Cys Cys Asn Lys Cys Gly Gly Glu Met His Gln Arg Gln Lys Glu Asn	135	140	145	487
25	GGG CCC TTC CTG AGG AAA TGC TTT GCA ATC TCC CTG TTG GTG ATT TGT Gly Pro Phe Leu Arg Lys Cys Phe Ala Ile Ser Leu Leu Val Ile Cys	155	160	165	535
30	ATA ATA ATA AGC ATT GGC ATC TTC TAT GGT TTT GTG GCA AAT CAC CAG Ile Ile Ile Ser Ile Gly Ile Phe Tyr Gly Phe Val Ala Asn His Gln	170	175	180	583
35	GTA AGA ACC CGG ATC AAA AGG AGT CGG AAA CTG GCA GAT AGC AAT TTC Val Arg Thr Arg Ile Lys Arg Ser Arg Lys Leu Ala Asp Ser Asn Phe	185	190	195	631
40	AAG GAC TTG CGA ACT CTC TTG AAT GAA ACT CCA GAG CAA ATC AAA TAT Lys Asp Leu Arg Thr Leu Leu Asn Glu Thr Pro Glu Gln Ile Lys Tyr	200	205	210	679
45	ATA TTG GCC CAG TAC AAC ACT ACC AAG GAC AAG GCG TTC ACA GAT CTG Ile Leu Ala Gln Tyr Asn Thr Thr Lys Asp Lys Ala Phe Thr Asp Leu	215	220	225	727
50	AAC AGT ATC AAT TCA GTG CTA GGA GGC GGA ATT CTT GAC CGA CTG AGA Asn Ser Ile Asn Ser Val Leu Gly Gly Gly Ile Leu Asp Arg Leu Arg	235	240	245	775
55	CCC AAC ATC ATC CCT GTT CTT GAT GAG ATT AAG TCC ATG GCA ACA GCG Pro Asn Ile Ile Pro Val Leu Asp Glu Ile Lys Ser Met Ala Thr Ala	250	255	260	823
60					
65					



ES 2 327 691 T3

5 Leu Val Ile Cys Ser Leu Leu Thr Leu Ile Val Ile Phe Tyr Tyr Leu  
 440 445 450

10 GGC TTA CTG TGT GGC GTG TGC GGC TAT GAC AGG CAT GCC ACC CCG ACC 1447  
 Gly Leu Leu Cys Gly Val Cys Gly Tyr Asp Arg His Ala Thr Pro Thr  
 455 460 465 470

15 ACC CGA GGC TGT GTC TCC AAC ACC GGA GGC GTC TTC CTC ATG GTT GGA 1495  
 Thr Arg Gly Cys Val Ser Asn Thr Gly Gly Val Phe Leu Met Val Gly  
 475 480 485

20 GTT GGA TTA AGT TTC CTC TTT TGC TGG ATA TTG ATG ATC ATT GTG GTT 1543  
 Val Gly Leu Ser Phe Leu Phe Cys Trp Ile Leu Met Ile Ile Val Val  
 490 495 500

25 CTT ACC TTT GTC TTT GGT GCA AAT GTG GAA AAA CTG ATC TGT GAA CCT 1591  
 Leu Thr Phe Val Phe Gly Ala Asn Val Glu Lys Leu Ile Cys Glu Pro  
 505 510 515

30 TAC ACG AGC AAG GAA TTA TTC CCG GTT TTG GAT ACA CCC TAC TTA CTA 1639  
 Tyr Thr Ser Lys Glu Leu Phe Arg Val Leu Asp Thr Pro Tyr Leu Leu  
 520 525 530

35 AAT GAA GAC TGG GAA TAC TAT CTC TCT GGG AAG CTA TTT AAT AAA TCA 1687  
 Asn Glu Asp Trp Glu Tyr Tyr Leu Ser Gly Lys Leu Phe Asn Lys Ser  
 535 540 545 550

40 AAA ATG AAG CTC ACT TTT GAA CAA GTT TAC AGT GAC TGC AAA AAA AAT 1735  
 Lys Met Lys Leu Thr Phe Glu Gln Val Tyr Ser Asp Cys Lys Lys Asn  
 555 560 565

45 AGA GGC ACT TAC GGC ACT CTT CAC CTG CAG AAC AGC TTC AAT ATC AGT 1783  
 Arg Gly Thr Tyr Gly Thr Leu His Leu Gln Asn Ser Phe Asn Ile Ser  
 570 575 580

50 GAA CAT CTC AAC ATT AAT GAG CAT ACT GGA AGC ATA AGC AGT GAA TTG 1831  
 Glu His Leu Asn Ile Asn Glu His Thr Gly Ser Ile Ser Ser Glu Leu  
 585 590 595

55 GAA AGT CTG AAG GTA AAT CTT AAT ATC TTT CTG TTG GGT GCA GCA GGA 1879  
 Glu Ser Leu Lys Val Asn Leu Asn Ile Phe Leu Leu Gly Ala Ala Gly  
 600 605 610

60 AGA AAA AAC CTT CAG GAT TTT GCT GCT TGT GGA ATA GAC AGA ATG AAT 1927  
 Arg Lys Asn Leu Gln Asp Phe Ala Ala Cys Gly Ile Asp Arg Met Asn

65

ES 2 327 691 T3

	615		620			625		630	
5	TAT GAC AGC TAC TTG GCT CAG ACT GGT AAA TCC CCC GCA GGA GTG AAT								1975
	Tyr Asp Ser Tyr Leu Ala Gln Thr Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Asn								
			635			640		645	
10	CTT TTA TCA TTT GCA TAT GAT CTA GAA GCA AAA GCA AAC AGT TTG CCC								2023
	Leu Leu Ser Phe Ala Tyr Asp Leu Glu Ala Lys Ala Asn Ser Leu Pro								
			650			655		660	
15	CCA GGA AAT TTG AGG AAC TCC CTG AAA AGA GAT GCA CAA ACT ATT AAA								2071
	Pro Gly Asn Leu Arg Asn Ser Leu Lys Arg Asp Ala Gln Thr Ile Lys								
			665			670		675	
20	ACA ATT CAC CAG CAA CGA GTC CTT CCT ATA GAA CAA TCA CTG AGC ACT								2119
	Thr Ile His Gln Gln Arg Val Leu Pro Ile Glu Gln Ser Leu Ser Thr								
			680			685		690	
25	CTA TAC CAA AGC GTC AAG ATA CTT CAA CGC ACA GGG AAT GGA TTG TTG								2167
	Leu Tyr Gln Ser Val Lys Ile Leu Gln Arg Thr Gly Asn Gly Leu Leu								
			695			700		710	
30	GAG AGA GTA ACT AGG ATT CTA GCT TCT CTG GAT TTT GCT CAG AAC TTC								2215
	Glu Arg Val Thr Arg Ile Leu Ala Ser Leu Asp Phe Ala Gln Asn Phe								
			715			720		725	
35	ATC ACA AAC AAT ACT TCC TCT GTT ATT ATT GAG GAA ACT AAG AAG TAT								2263
	Ile Thr Asn Asn Thr Ser Ser Val Ile Ile Glu Glu Thr Lys Lys Tyr								
			730			735		740	
40	GGG AGA ACA ATA ATA GGA TAT TTT GAA CAT TAT CTG CAG TGG ATC GAG								2311
	Gly Arg Thr Ile Ile Gly Tyr Phe Glu His Tyr Leu Gln Trp Ile Glu								
			745			750		755	
45	TTC TCT ATC AGT GAG AAA GTG GCA TCG TGC AAA CCT GTG GCC ACC GCT								2359
	Phe Ser Ile Ser Glu Lys Val Ala Ser Cys Lys Pro Val Ala Thr Ala								
			760			765		770	
50	CTA GAT ACT GCT GTT GAT GTC TTT CTG TGT AGC TAC ATT ATC GAC CCC								2407
	Leu Asp Thr Ala Val Asp Val Phe Leu Cys Ser Tyr Ile Ile Asp Pro								
			775			780		785	
55	TTG AAT TTG TTT TGG TTT GGC ATA GGA AAA GCT ACT GTA TTT TTA CTT								2455
	Leu Asn Leu Phe Trp Phe Gly Ile Gly Lys Ala Thr Val Phe Leu Leu								
			795			800		805	
60									
65									

ES 2 327 691 T3

5 CCG GCT CTA ATT TTT GCG GTA AAA CTG GCT AAG TAC TAT CGT CGA ATG 2503  
 Pro Ala Leu Ile Phe Ala Val Lys Leu Ala Lys Tyr Tyr Arg Arg Met  
 810 815 820

10 GAT TCG GAG GAC GTG TAC GAT GAT GTT GAA ACT ATA CCC ATG AAA AAT 2551  
 Asp Ser Glu Asp Val Tyr Asp Asp Val Glu Thr Ile Pro Met Lys Asn  
 825 830 835

15 ATG GAA AAT GGT AAT AAT GGT TAT CAT AAA CAT CAT GTA TAT GGT ATT 2599  
 Met Glu Asn Gly Asn Asn Gly Tyr His Lys Asp His Val Tyr Gly Ile  
 840 845 850

20 CAC AAT CCT GTT ATG ACA AGC CCA TCA CAA CAT T GATAGCTGAT 2643  
 His Asn Pro Val Met Thr Ser Pro Ser Gln His  
 855 860 865

25 GTTGAAACTG CTTGAGCATC AGGATACTCA AAGTGGAAAG GATCACAGAT TTTTGGTAGT 2703

30 TTCTGGGTCT ACAAGGACTT TCCAAATCCA GGAGCAACGC CAGTGGCAAC GTAGTGACTC 2763

35 ATCAGGTTAT AGTCCATGGT CCATCACTAT TCAAGGATGA CTCCTCCCT TCCTGTCTAT 2883

40 TTTGTPTTT TACTTTTTTA CACTGAGTTT CTATTTAGAC ACTACAACAT ATGGGGTGTT 2943

45 TGTTCCCATT GGATGCATTT CTATCAAAAC TCTATCAAAT GTGATGGCTA GATTCTAACA 3003

50 TATTGCCATG TGTGGAGTGT GCTGAACACA CACCAGTTTA CAGGAAAGAT GCATTTTGTG 3063

55 TACAGTAAAC GGTGTATATA CCTTTTGTTA CCACAGAGTT TTTTAAACAA ATGAGTATTA 3123

60 TAGGACTTTC TTCTAAATGA GCTAAATAAG TCACCATTGA CTTCTGGTG CTGTTGAAAA 3183

65 TAATCCATTT TCACTAAAG TGTGTGAAAC CTACAGCATA TTCTTCACGC AGAGATTTTC 3243

70 ATCTATTATA CTTTATCAA GATTGGCCAT GTTCCACTTG GAAATGGCAT GCAAAGCCA 3303

75 TCATAGAGAA ACCTGCGTAA CTCCATCTGA CAAATTCAA AGAGAGAGAG AGATCTTGAG 3363

80 AGAGAAATGC TGTTTCGTTCA AAAGTGGAGT TGTTTTAAACA GATGCCAAT ACGGTGTACA 3423

85 GTTTAACAGA GTTTTCTGTT GCATTAGGAT AAACATTAAT TGGAGTGCAG CTAACATGAG 3483

90 TATCATCAGA CTAGTATCAA GTGTTCTAAA ATGAAATATG AGAAGATCCT GTCACAATTC 3543

ES 2 327 691 T3

TTAGATCTGG TGTCCAGCAT GGATGAAACC TTTGAGTTTG GTCCCTAAAT TTGCATGAAA 3603  
 5 GCACAAGGTA AATATTCATT TGCTTCAGGA GTTTCATGTT GGATCTGTCA TTATCAAAG 3663  
 TGATCAGCAA TGAAGAACTG GTCGGACAAA ATTTAACGTT GATGTAATGG AATCCAGAT 3723  
 10 GTAGGCATTC CCCCCAGGTC TTTTCATGTG CAGATTGCAG TTCTGATTCA TTTGAATAAA 3783  
 AAGGAACTTG GAAAAAAAAA A 3804

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 2

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 865 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 2

30

Met Ala Leu Val Leu Gly Ser Leu Leu Leu Leu Gly Leu Cys Gly Asn  
 1 5 10 15

35

Ser Phe Ser Gly Gly Gln Pro Ser Ser Thr Asp Ala Pro Lys Ala Trp  
 20 25 30

40

Asn Tyr Glu Leu Pro Ala Thr Asn Tyr Glu Thr Gln Asp Ser His Lys  
 35 40 45

45

Ala Gly Pro Ile Gly Ile Leu Phe Glu Leu Val His Ile Phe Leu Tyr  
 50 55 60

50

Val Val Gln Pro Arg Asp Phe Pro Glu Asp Thr Leu Arg Lys Phe Leu  
 65 70 75 80

55

Gln Lys Ala Tyr Glu Ser Lys Ile Asp Tyr Asp Lys Pro Glu Thr Val  
 85 90 95

60

Ile Leu Gly Leu Lys Ile Val Tyr Tyr Glu Ala Gly Ile Ile Leu Cys  
 100 105 110

65

Cys Val Leu Gly Leu Leu Phe Ile Ile Leu Met Pro Leu Val Gly Tyr  
 115 120 125

ES 2 327 691 T3

Phe Phe Cys Met Cys Arg Cys Cys Asn Lys Cys Gly Gly Glu Met His  
 130 135 140  
 5  
 Gln Arg Gln Lys Glu Asn Gly Pro Phe Leu Arg Lys Cys Phe Ala Ile  
 145 150 155 160  
 10  
 Ser Leu Leu Val Ile Cys Ile Ile Ile Ser Ile Gly Ile Phe Tyr Gly  
 165 170 175  
 15  
 Phe Val Ala Asn His Gln Val Arg Thr Arg Ile Lys Arg Ser Arg Lys  
 180 185 190  
 20  
 Leu Ala Asp Ser Asn Phe Lys Asp Leu Arg Thr Leu Leu Asn Glu Thr  
 195 200 205  
 25  
 Pro Glu Gln Ile Lys Tyr Ile Leu Ala Gln Tyr Asn Thr Thr Lys Asp  
 210 215 220  
 30  
 Lys Ala Phe Thr Asp Leu Asn Ser Ile Asn Ser Val Leu Gly Gly Gly  
 225 230 235 240  
 35  
 Ile Leu Asp Arg Leu Arg Pro Asn Ile Ile Pro Val Leu Asp Glu Ile  
 245 250 255  
 40  
 Lys Ser Met Ala Thr Ala Ile Lys Glu Thr Lys Glu Ala Leu Glu Asn  
 260 265 270  
 45  
 Met Asn Ser Thr Leu Lys Ser Leu His Gln Gln Ser Thr Gln Leu Ser  
 275 280 285  
 50  
 Ser Ser Leu Thr Ser Val Lys Thr Ser Leu Arg Ser Ser Leu Asn Asp  
 290 295 300  
 55  
 Pro Leu Cys Leu Val His Pro Ser Ser Glu Thr Cys Asn Ser Ile Arg  
 305 310 315 320  
 60  
 Leu Ser Leu Ser Gln Leu Asn Ser Asn Pro Glu Leu Arg Gln Leu Pro  
 325 330 335  
 65  
 Pro Val Asp Ala Glu Leu Asp Asn Val Asn Asn Val Leu Arg Thr Asp  
 340 345 350  
 Leu Asp Gly Leu Val Gln Gln Gly Tyr Gln Ser Leu Asn Asp Ile Pro  
 355 360 365

ES 2 327 691 T3

Asp Arg Val Gln Arg Gln Thr Thr Thr Val Val Ala Gly Ile Lys Arg  
 370 375 380

5

Val Leu Asn Ser Ile Gly Ser Asp Ile Asp Asn Val Thr Gln Arg Leu  
 385 390 395 400

10

Pro Ile Gln Asp Ile Leu Ser Ala Phe Ser Val Tyr Val Asn Asn Thr  
 405 410 415

15

Glu Ser Tyr Ile His Arg Asn Leu Pro Thr Leu Glu Glu Tyr Asp Ser  
 420 425 430

20

Tyr Trp Trp Leu Gly Gly Leu Val Ile Cys Ser Leu Leu Thr Leu Ile  
 435 440 445

25

Val Ile Phe Tyr Tyr Leu Gly Leu Leu Cys Gly Val Cys Gly Tyr Asp  
 450 455 460

30

Arg His Ala Thr Pro Thr Thr Arg Gly Cys Val Ser Asn Thr Gly Gly  
 465 470 475 480

35

Val Phe Leu Met Val Gly Val Gly Leu Ser Phe Leu Phe Cys Trp Ile  
 485 490 495

40

Leu Met Ile Ile Val Val Leu Thr Phe Val Phe Gly Ala Asn Val Glu  
 500 505 510

45

Lys Leu Ile Cys Glu Pro Tyr Thr Ser Lys Glu Leu Phe Arg Val Leu  
 515 520 525

50

Asp Thr Pro Tyr Leu Leu Asn Glu Asp Trp Glu Tyr Tyr Leu Ser Gly  
 530 535 540

55

Lys Leu Phe Asn Lys Ser Lys Met Lys Leu Thr Phe Glu Gln Val Tyr  
 545 550 555 560

60

Ser Asp Cys Lys Lys Asn Arg Gly Thr Tyr Gly Thr Leu His Leu Gln  
 565 570 575

65

Asn Ser Phe Asn Ile Ser Glu His Leu Asn Ile Asn Glu His Thr Gly  
 580 585 590

Ser Ile Ser Ser Glu Leu Glu Ser Leu Lys Val Asn Leu Asn Ile Phe  
 595 600 605

ES 2 327 691 T3

5 Leu Leu Gly Ala Ala Gly Arg Lys Asn Leu Gln Asp Phe Ala Ala Cys  
     610                                    615                                    620

10 Gly Ile Asp Arg Met Asn Tyr Asp Ser Tyr Leu Ala Gln Thr Gly Lys  
     625                                    630                                    635                                    640

15 Ser Pro Ala Gly Val Asn Leu Leu Ser Phe Ala Tyr Asp Leu Glu Ala  
                                     645                                    650                                    655

20 Lys Ala Asn Ser Leu Pro Pro Gly Asn Leu Arg Asn Ser Leu Lys Arg  
                                     660                                    665                                    670

25 Asp Ala Gln Thr Ile Lys Thr Ile His Gln Gln Arg Val Leu Pro Ile  
                                     675                                    680                                    685

30 Glu Gln Ser Leu Ser Thr Leu Tyr Gln Ser Val Lys Ile Leu Gln Arg  
     690                                    695                                    700

35 Thr Gly Asn Gly Leu Leu Glu Arg Val Thr Arg Ile Leu Ala Ser Leu  
     705                                    710                                    715                                    720

40 Asp Phe Ala Gln Asn Phe Ile Thr Asn Asn Thr Ser Ser Val Ile Ile  
                                     725                                    730                                    735

45 Glu Glu Thr Lys Lys Tyr Gly Arg Thr Ile Ile Gly Tyr Phe Glu His  
                                     740                                    745                                    750

50 Tyr Leu Gln Trp Ile Glu Phe Ser Ile Ser Glu Lys Val Ala Ser Cys  
     755                                    760                                    765

55 Lys Pro Val Ala Thr Ala Leu Asp Thr Ala Val Asp Val Phe Leu Cys  
     770                                    775                                    780

60 Ser Tyr Ile Ile Asp Pro Leu Asn Leu Phe Trp Phe Gly Ile Gly Lys  
     785                                    790                                    795                                    800

65 Ala Thr Val Phe Leu Leu Pro Ala Leu Ile Phe Ala Val Lys Leu Ala  
                                     805                                    810                                    815

70 Lys Tyr Tyr Arg Arg Met Asp Ser Glu Asp Val Tyr Asp Asp Val Glu  
                                     820                                    825                                    830

75 Thr Ile Pro Met Lys Asn Met Glu Asn Gly Asn Asn Gly Tyr His Lys  
     835                                    840                                    845

ES 2 327 691 T3

Asp His Val Tyr Gly Ile His Asn Pro Val Met Thr Ser Pro Ser Gln  
850 855 860

5

His  
865

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65