



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 150 495**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

86 Número de solicitud europea: **94919120 .9**

86 Fecha de presentación : **18.05.1994**

87 Número de publicación de la solicitud: **0699236**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **06.03.1996**

54

Título: **Ligandos de Flt3 purificados de mamífero y agonistas y antagonistas de los mismos.**

30

Prioridad: **19.05.1993 US 65231**
07.07.1993 US 89263
16.07.1993 US 92549
13.08.1993 US 106340
24.08.1993 US 112391
19.11.1993 US 155111
03.12.1993 US 162413

45

Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.12.2000**

45

Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **16.02.2007**

45

Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **16.02.2007**

73

Titular/es: **SCHERING CORPORATION**
2000 Galloping Hill Road
Kenilworth, New Jersey 07033, US
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)

72

Inventor/es: **Hannum, Charles, H.;**
Lee, Frank, D.;
Birnbaum, Daniel y
Culpepper, Janice, A.

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 150 495 T5

DESCRIPCIÓN

Ligandos de Flt3 purificados de mamífero y agonistas y antagonistas de los mismos.

5 La presente invención se refiere a composiciones que actúan controlando el desarrollo y la diferenciación de células de mamíferos, p. ej. células de un sistema inmunitario de mamífero. En particular, se refiere a proteínas y miméticos que regulan el desarrollo, la diferenciación y la función de varios tipos de células, incluyendo las células hematopoiéticas.

10 **Fundamento de la invención**

Las proteína-tirosina-quinasas juegan con frecuencia importantes papeles en la transducción de señales que conducen a la proliferación celular. La gran familia de proteína-tirosina-quinasas incluye muchos receptores del factor de crecimiento. Véase, p. ej., Pawson *et al.* (1990) *Trends in Genetics* 6:350-356. Los receptores del factor de crecimiento son importantes en el control y la regulación de la fisiología y el desarrollo celulares. Aunque estos receptores se han encontrado en varios linajes de células, su papel específico en la regulación del desarrollo de diferentes linajes de células está por lo general poco explicado. Las sugerencias acerca de un papel para una proteína-tirosina-quinasa en la hematopoesis se han basado en gran medida en la identificación de la tirosina-quinasa del receptor c-kit como el locus W, en el que las mutaciones afectan a los linajes de eritroides y mastocitos. Véase, p. ej., Chabot *et al.* (1998) *Nature* 335:88-99, y Geissler *et al.* (1988) *Cell* 55: 185-192.

Además del producto génico del locus W, se ha aislado y caracterizado otra proteína-tirosina-quinasa. Véanse Matthews *et al.* (1991) *Cell* 65:1143-1152; y Rosnet *et al.* (1991) *Oncogene* 6:1641-1650. Esta proteína ha sido denominada tirosina-quinasa 3 similar a Fms (Flt3) o Flk2. Aunque se ha localizado para tipos de células particulares, p. ej. de la placenta, gónada, neurales y hematopoiéticas, sus efectos biológicos sobre la diferenciación y la fisiología de las células no han sido totalmente descritos.

Además, el receptor debe mediar en la transducción de la señal celular en respuesta a un ligando natural. La naturaleza del ligando ha de ser aún identificada, y sus efectos fisiológicos y especificidad del linaje celular siguen sin conocerse en gran parte. La distribución del receptor, sin embargo, sugiere que el ligando tiene un papel en la regulación de la fisiología y el desarrollo de las células en una multiplicidad de linajes celulares.

Así pues, existe la necesidad de conocimientos acerca de los propiedades estructurales, biológicas y fisiológicas de los factores reguladores que se unen naturalmente al receptor de la tirosina quinasa Flt3.

35 El documento W 94/28391 (publicado después de la fecha de presentación de la presente solicitud) describe un polipéptido que tiene la secuencia Met Thr Val Leu Ala Pro Ala Trp Ser Pro Thr Thr Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Gly Thr Gln Asp Cys Ser Phe Gln His Ser Pro Ile Ser Ser Asp Phe Ala Val Lys Ile Arg Glu Leu Ser Asp Tyr Leu Leu Gln Asp Tyr Pro Val Thr Val Ala Ser Asn Leu Gln Asp Glu Leu Cys Gly Gly Leu Trp Arg Leu Val Leu Ala Gln Arg Trp Met Glu Arg Leu Lys Thr Val Ala Gly Ser Lys Met Gln Gly Leu Leu Glu Arg Val Asn Thr Glu Ile His Phe Val Thr Lys Cys Ala Phe Gln Pro Pro Pro Ser Cys Leu Arg Phe Val Gln Thr Asn Ile Ser Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Glu Gln Leu Val Ala Leu Lys Pro Trp Ile Thr Arg Gln Asn Phe Ser Arg Cys Leu Glu Leu Gln Cys Gln Pro Asp Ser Ser Thr Leu Pro Pro Pro Trp Ser Pro Arg Pro Leu Glu Ala Thr Ala Pro Thr Ala Pro Gln Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Val Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Trp Cys Leu His Trp Gln Arg Thr Arg Arg Arg Thr Pro Arg Pro Gly Glu Gln Val Pro Pro Val Pro Ser Pro Gln Asp Leu Leu Leu Val Glu His.

Sumario de la invención

50 La presente invención, que se basa en parte en el descubrimiento de ligandos naturales para el receptor de la tirosina-quinasa Flt3, satisface la necesidad indicada. Esta invención se refiere a agonistas y antagonistas de los ligandos naturales, p. ej. mutaciones (muteínas) de las secuencias naturales, proteínas de fusión, miméticos químicos, anticuerpos y otros análogos estructurales o funcionales. Proporciona también ácidos nucleicos aislados que codifican proteínas de la invención. También se describen diversos usos de estas diferentes proteínas o composiciones de ácidos nucleicos.

55 De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un ligando de la tirosina-quinasa 3 similar a Fms (Flt3) murino aislado que se une específicamente a un receptor de la tirosina-quinasa Flt3, ligando de Flt3 que se une a un anticuerpo producido contra un ligando de Flt3 de murino, caracterizado por:

- 60 (a) un peso molecular aparente de aproximadamente 30 Kd en electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida;
- (b) presencia en un sedimento saturado al 60-86% durante la precipitación con sulfato amónico a 4°C;
- 65 (c) elución con (NH₄)₂SO₂ entre 900-750 mM en tampón Tris 20 mM, pH 7,5, durante cromatografía de interacción hidrofóbica de gradiente usando una columna de fenilo-5PW;
- (d) elución entre 130-250 mM en un gradiente de NaCl en tampón Tris 20 mM, pH 7,5, durante cromatografía de intercambio aniónico en columna Mono Q;

ES 2 150 495 T5

- (e) elución entre 440-540 mM en un gradiente de NaCl en tampón de citrato 10 mM, pH 3,0, durante cromatografía de intercambio catiónico en columna Mono S;
- (f) un peso molecular aparente de 70 kD en cromatografía de filtración en gel de SEPHACRYL® S200; y
- (g) elución entre 32-35% de acetonitrilo durante HPLC en fase inversa usando un gradiente de acetonitrilo en agua en TFA al 0,1% y una columna Poros R/H.

En un segundo aspecto, la invención proporciona además un ligando de tirosina-quinasa 3 similar a Fms (Flt3), que comprende la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID No: 19.

Ácidos nucleicos aislados que codifican dichos ligandos de Flt3, que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 19, forman otros aspectos de la presente invención, especialmente un ácido nucleico aislado que codifica dicho ligando de Flt3 que comprende la secuencia de codificación de SEQ ID No: 19, así como vectores recombinantes que comprenden dichos ácidos nucleicos y células hospedadoras que albergan a dichos vectores, y métodos para preparar dicho ligando de Flt3, que comprende cultivar las células hospedadoras anteriormente mencionadas, bajo condiciones en las que se expresa el ácido nucleico.

Anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos que se unen específicamente a los ligandos de Flt3 murinos definidos anteriormente, especialmente anticuerpos monoclonales, forman otros aspectos más de la invención.

También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo aceptable fisiológicamente y un ligando de Flt3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 19.

El ligando de Flt3 murino puede comprender al menos una secuencia polipeptídica murina mostrada en la Tabla 1. Además pueden mostrar un patrón de modificación post-traducciona distinto del ligando de Flt3 natural, incluyendo al menos una de las características descritas en la Tabla 2, o pueden inducir a receptores de Flt3 a la auto-fosforilación. La invención además se refiere a una composición que comprende tal ligando y un vehículo aceptable farmacéuticamente.

En las realizaciones del anticuerpo, el anticuerpo se puede producir contra una secuencia del péptido murino de la Tabla 1; el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal; o el anticuerpo está marcado.

La invención también se refiere a métodos para modular la fisiología o el desarrollo de una célula, que comprenden poner en contacto dicha célula con un agonista o antagonista de un ligando de Flt3. Por ejemplo, el antagonista podría ser un anticuerpo contra el ligando de Flt3 murino definido anteriormente o la célula puede ser una célula hematopoiética, incluyendo una célula linfoide; una célula placentaria; una célula gonadal; o una célula neural, incluyendo células neuronales o no neuronales.

Cuando se lee la siguiente descripción, ha de entenderse que el alcance de la protección está definido por las reivindicaciones adjuntas. En relación a las reivindicaciones que se refieren a secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos específicas (o reivindicaciones dependientes de estas), se entenderá que se requiere exactamente la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 19, o una secuencia de ácidos nucleicos que codifica esa secuencia de aminoácidos según sea apropiado.

Descripción de la invención

Todas las referencias citadas en el presente texto se incorporan al mismo como referencia en su totalidad.

General

La presente invención proporciona la secuencia de aminoácidos y las secuencias de DNA que codifican los ligandos del segundo aspecto, que muestran propiedades de unión a una proteína receptora de tirosina-quinasa. Los ligandos de la invención se denominan ligandos de Flt3 porque inicialmente fueron caracterizadas como proteínas que se unen a la proteína Flt3, una proteína que manifiesta características estructurales de un tipo de receptor de tirosina-quinasa.

Los ligandos naturales de la invención son capaces de mediar en varias respuestas bioquímicas que deben conducir a respuestas biológicas o fisiológicas en células diana. Estudios iniciales habían localizado la proteína en células tronco hematopoiéticas y progenitores primitivos no sensibilizados. La realización mejor caracterizada fue descrita inicialmente en ratones, pero en el presente texto se describe también un ligando humano. También deben estar disponibles secuencias adicionales para proteínas en otras especies de mamíferos, p. ej. humana. Las descripciones que siguen se dirigen, con fines de ejemplo, a un ligando de Flt3 de ratón, pero son igualmente aplicables a realizaciones relacionadas a partir de otras especies.

La proteína Flt3 de ratón aislada fue recientemente descrita como una proteína que muestra caracteres estructurales de un receptor de tirosina-quinasa. La proteína se localiza en tejidos placentario, gonadal, hematopoiético y neural, entre otros. Véanse Matthews *et al.* (1991) *Cell* 65:1143-1152; y Rosnet *et al.* (1991) *Oncogene* 6:1641-1650. El

receptor de Flt3 media en una respuesta bioquímica a la unión de un ligando hasta ahora no identificado que conduce a una transducción de la señal y a una respuesta celular.

En particular, el ligando ha sido aislado siguiendo un ensayo de auto-fosforilación, que probablemente refleja fosforilación cruzada de moléculas de receptor dimerizadas. El ligando ha sido aislado y caracterizado como una proteína que migra en electroforesis en gel de poliacrilamida con una movilidad característica de una proteína de aproximadamente 30 kD, aunque otras propiedades físicas se describen en la Tabla 2.

El ligando para Flt3 debe estar presente en los tipos de tejido mencionados, y la interacción del ligando con el receptor debe ser importante para mediar en otros diversos aspectos de la fisiología o el desarrollo celulares. La distribución de la proteína receptora de Flt3 en diferentes tejidos sugiere que ella y su ligando tienen papeles funcionales fuera del sistema inmunitario, p. ej. en la regulación del desarrollo en otros tipos de células. Véanse, p. ej., Gilbert (1991) *Developmental Biology* (3d ed.), Sinauer Associates, Sunderland, MA; Browder *et al.* (1991) *Developmental Biology* (3d ed.), Saunders, Philadelphia, PA; Russo *et al.* (1992) *Development: The Molecular Genetic Approach*, Springer-Verlag, Nueva York, N.Y.; y Wilkins (1993) *Genetic Analysis of Animal Development* (2d ed.) Wiley-Liss, Nueva York, N.Y.

Cuando se añadió ligando de Flt3 de ratón nativo altamente purificado con IL-3 a células tronco Thy^{lo} Sca-1⁺ lin⁻ de ratón, el número de colonias se incrementó significativamente. Estas condiciones produjeron colonias multilíneas, pero no contenían las abundantes células eritroides que se encuentran característicamente con ligando de c-kit y IL-3. Una modesta actividad co-estimuladora fue evidente en presencia de ligando de Flt3 y IL-6. Sin embargo, el ligando de Flt3 solo no tenía actividad estimuladora sobre estas células, ni siquiera cuando se usan en combinación con ligando de c-kit.

Cuando se usaron células progenitoras de hígado fetal humano clasificadas, el ligando de Flt3 tenía un efecto sinérgico similar en combinación con GM-CSF o IL-3. En este caso, los efectos co-estimuladores del ligando de Flt3 fueron observados en las células formadoras de colonias potenciales poco proliferantes (LPP-CFC: Low Proliferative Potential Colony-Forming Cells) así como en las más primitivas células formadoras de colonias potenciales altamente proliferantes (HPP-CFC: High Proliferative Potential Colony-Forming Cells). Sin embargo, al contrario que el ligando de c-kit, el ligando de Flt3 era menos capaz de aumentar el crecimiento de unidades eritroides de hígado fetal que forman estallido (BFU-E: Burst-Forming Units Erythroid). Así, el ligando de Flt3 potencia la respuesta de las células progenitoras tronco y primitivas a los factores del crecimiento pero de manera distinta a la del ligando de c-kit.

Con relación a los progenitores mieloides, el ligando de Flt3 tiene poco efecto solo sobre la proliferación, pero en combinación con factores tales como GM-CSF o IL-3, el ligando puede promover sinérgicamente el crecimiento de precursores mieloides tanto primitivos como más maduros.

El ligando de Flt3, en combinación con IL-7 o IL-12, activa subconjuntos de timocitos específicos para que proliferen. Los timocitos CD4⁺, CD8⁺ y CD4^{lo} son algunos de los subconjuntos que responden a las combinaciones de citoquinas.

El ligando de Flt3 fue también ensayado en timocitos fetales del día 14 que están enriquecidos, en cuanto a precursores de células T. El ligando Flt3 en combinación con IL-7 o IL-12 indujo una proliferación significativa. La IL-12 también induce la proliferación de timocitos fetales en combinación con ligando de c-kit. Estos resultados apoyan más un papel para el ligando de Flt3 en el desarrollo de células T.

La proliferación de células de linaje B tempranas, p. ej. una línea de células pro B o células de la médula ósea enriquecidas en células pro B y pre B, mejora significativamente en presencia de ligando de Flt3, en particular en combinación con IL-7. Las poblaciones de células en fase temprana de desarrollo que dan lugar a células del linaje B sensibilizadas también proliferan en respuesta al ligando de Flt3, en particular en combinación con otros factores celulares estromales.

La identificación del ligando para Flt3 proporciona medios para encarar algunas de las cuestiones surgidas por estas observaciones.

Ligando de Flt3 purificado

Las secuencias de aminoácidos del ligando de Flt3 humano y de ratón se muestran en la Tabla 1. Estas secuencias de aminoácidos, mostradas del término amino al carboxi, son importantes para proporcionar información de secuencia en el ligando que permite distinguir la proteína de otras proteínas. Además, las secuencias peptídicas permiten la preparación de péptidos para generar anticuerpos para reconocer tales segmentos, y permiten la preparación de sondas de oligonucleótido, de las cuales ambas son estrategias para el aislamiento, p. ej., clonación, de genes que codifican tales secuencias.

En particular, el material aislado MB8 contiene un inserto de 29 aminoácidos que contiene sitios de procesamiento proteolítico que permitirán que el dominio de citoquina helicoidal del ligando sea segmentado a partir de una unión a la membrana. Se han observado similitudes con otras citoquinas. Véanse, p. ej., Bosenberg *et al.* (1992) *Cell* 71:1157-1165; Huang *et al.* (1992) *Molecular Biology of the Cell* 3:349-362; y Pandiella *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* 267:24028-

ES 2 150 495 T5

24033. Esto evitará ciertos problemas de trabajar o de administrar una proteína unida a la célula, y proporciona un conocimiento sobre posibles mecanismos de especificidad celular.

TABLA 1

5

Secuencias del fragmento peptídico del ligando de
Flt3.

10

1. FVQT (N/C/S/T) I (S) (H) LLK
2. DYPVTVAV (N) LQ (D) E (K)
3. TPD (V/A) YF (S) (H) (S) PIS (S) (N) (F) (K)
4. WIEQLK (Q) (P) (G) (S)
5. ELT (V) (H) LLK
6. ILFXLFLO (Y) (R)
7. S (H) (S) PISSNF
8. (W) IEQLK
9. DYPVTVAVNLQ
10. DAYFSHSPISSNFKVKFREL (T) (V)
11. DYPVTVA (A)

15

20

25

Lo siguiente proporciona secuencias de consenso:

12. TPDAYFSHSPISSNFKVKFRELTVHLLK
13. WIEQLK
14. FVQTXISHLLK
15. ILFXLFAQYR
16. DYPVTVAVNLQ

30

35

La alineación con otros ligandos para receptores similares a Flt3 y otras consideraciones sugieren una secuencia N-terminal de proteína madura:

40

17. TPDICYFSHSP ISSNFKVKFR ELT (V) HLLKDY PVTVAVNLDQ EK

45

La secuenciación de ácidos nucleicos de un clon proporciona la secuencia siguiente:

18. TPDICYFSHSP ISSNFKVKFR ELTDHLLKDY PVTVAVNLDQ ERHCKALWSL
FLAQRWIEQL KTVAGSKMQT LLEDVNTTEIH FVTSCTFQPL PECLRFVQIN
I

50

Cinco variantes de mamífero distintas tienen las secuencias siguientes:

55

MoT118/T110	M T V L A P A W S P N S S L L L L L L L L S P C L	25
HuS86/S109	M T V L A P A W S P . T T Y L L L L L L L S S G L	24

60

MoT118/T110	<u>R G T P D C Y F S H S P I S S N F K V K F R E L T</u>	50
HuS86/S109	S G T Q D C S F Q H S P I S S D F A V K I R E L S	49

65

MoT118/T110	<u>D H I L L K D Y P V T V A V N L O D E K H C K A L W</u>	75
HuS86/S109	D Y L L Q D Y P V T V A S N L Q D E E L C G A L W	74

MoT118/T110	<u>S L F L A Q R W I E Q L K T V A G S K M Q T L L E</u>	100
HuS86/S109	R L V L A Q R W M E R L K T V A G S K M Q G L L E	99

ES 2 150 495 T5

```

MoT118/T110  D V N T E I H F V T S C T F N P L P E C L R F V Q 125
HuS86/S109   R V N T E I H F V T K C A F Q P P P S C L R F V Q 124

5  MoT118/T110  T N I S H L L K D T C T Q L L A L K P C I G K A C 150
HuS86/S109   T N I S R L L Q E T S E Q L V A L K P W I T R . . 147

10 MoT118      Q N F S R C L E V Q C Q P G N G G P R A Q H H G A 175
MoT110      Q N F S R C L E V Q C Q P D S S T L L P P R S P I 175
HuS86       Q N F S R C L E L Q C Q P D S S T L P P P W S P R 172
HuS109      Q N F S R C L E L Q C Q P G A P R P Q S P G P A A 172

15 MoT118      T R L T A T A L L T V C P G L L L P L V G T S H M 200
MoT110      A L E A T E L P E P R P R Q L L L L L L L L L L P L 200
HuS86       P L E A T A P T A P Q P P L L L L L L P V G L L L 197
HuS109      C G A L T W P R P H P G E D T E A H R G E S P A R 197

20 MoT118      F F L P Y F L S F L S S F L K M Y L Y V 220
MoT110      T L V L L A A W G L R W Q R A R R R R G E L H P G . 224
HuS86       . . . L A A A W C L H W Q R T R R R T P R P G E Q 219
HuS109      G C I A W T Q R K L A R G R S L P W A P L I P S P 222

25 MoT110      V . P L P S H P 231
HuS86       V P P V P S P Q D L L L V E H 234
HuS109      E W R Q R Q N P A P A P F T Q L C T K P L S P 245

```

Los restos en **negrita** están conservados con CSF's; las secuencias subrayadas son secuencias peptídicas descritas anteriormente; # es la posición de un inserto en un clon; el signo . indica cuándo comienza la divergencia de secuencias en aislados de variantes y el punto de inserción del inserto de 29 aminoácidos encontrado en el material aislado MB8. El material aislado MB8 tiene un inserto de 29 aminoácidos que tiene la secuencia:

DRVSLLCRLGLTLNSLQSSCL-SVLSAGIT.

Las secuencias mostradas en la Tabla 1 están también definidas en la Lista de Secuencias, en la que las secuencias de los péptidos 1-18 están definidas por las SEQ ID NOs: 1-18 respectivamente. Algunos restos de aminoácidos en las secuencias están indicados como Xaa cuando había alguna incertidumbre en las determinaciones de las secuencias.

Otras secuencias mostradas en la Tabla 1 se definen en la Lista de Secuencias de la forma que sigue:

Péptido	SEQ ID No:
HuS86/S109 (hasta término C S86)	19
HuS109 (región terminal C)	20
MoT118/110 (hasta término C T110)	21
MoT118 (región terminal C)	22
Material aislado MB8	23

La secuencia de nucleótidos para la región terminal C de MoT118 se define por la SEQ ID NO: 24.

ES 2 150 495 T5

TABLA 2

Propiedades físicas del ligando de Flt3 de ratón

- 5 (1) Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida: migración reducida aproximadamente 30 Kd; presumiblemente una glicoproteína.
- 10 (2) Precipitación con sulfato amónico (a 4°C): se encuentra actividad en el sedimento de (NH₄)₂SO₄ saturado al 60-85%.
- 15 (3) Cromatografía de interacción hidrofóbica [gradiente de (NH₄)₂SO₄ en Tris 20 mM, pH 7,5 en una columna Phenyl-5PW]: la actividad eluyó entre 900-750 (NH₄)₂SO₄.
- 20 (4) Cromatografía de intercambio aniónico (gradiente de NaCl en Tris 20 mM, pH 7,5 en columna Mono Q): la actividad eluyó entre 130-250 mM NaCl.
- 25 (5) Cromatografía de intercambio catiónico (gradiente de NaCl en citrato 10 mM, pH 3,0 en columna Mono S): el grueso de la actividad eluyó entre 440-540 mM NaCl.
- (6) Filtración en gel (columna SEPHACRYL[®] S200): la actividad corrió con un peso molecular aparente de 70 kD.
- (7) HPLC de fase inversa (gradiente agua a acetonitrilo en TFA al 0,1% en una columna Poros R/H): la actividad eluyó entre 32-35% de acetonitrilo.

Como se usa en el presente texto, la expresión “ligando de Flt3 de ratón” debe comprender, cuando se usa en el contexto de una proteína, una proteína que tiene secuencias de aminoácidos de ratón mostradas en la Tabla 1. También se refiere a un polipéptido derivado de ratón que muestra una función biológica similar o interacciona con componentes de unión específica del ligando de Flt3. Estos componentes de unión, p. ej. anticuerpos, se unen típicamente a un ligando de Flt3 con alta afinidad, p. ej. al menos aproximadamente 100 nM, normalmente mejor que aproximadamente 30 nM, preferentemente mejor que aproximadamente 10 nM y más preferentemente mejor que aproximadamente 3 nM. Se encontrarían proteínas homólogas en especies de mamíferos aparte del ratón, p. ej. ratas. Las especies no de mamíferos deben poseer también genes y proteínas relacionados estructural o funcionalmente.

El término “polipéptido” como se usa en el presente texto incluye un segmento o fragmento significativo, y abarca una extensión de restos de aminoácidos de al menos aproximadamente 8 aminoácidos, generalmente al menos 10 aminoácidos, más generalmente al menos 12 aminoácidos, frecuentemente al menos 14 aminoácidos, más frecuentemente al menos 16 aminoácidos, típicamente al menos 18 aminoácidos, más típicamente al menos 20 aminoácidos, habitualmente al menos 22 aminoácidos, más habitualmente al menos 24 aminoácidos, preferentemente al menos 26 aminoácidos, más preferentemente al menos 28 aminoácidos, y, en realizaciones particularmente preferidas, al menos aproximadamente 30 o más aminoácidos.

La expresión “composición de unión” se refiere a moléculas que se unen con especificidad al ligando de Flt3, por ejemplo de una forma del tipo ligando-receptor, una interacción antígeno-anticuerpo, o compuestos, p. ej. proteínas, que específicamente se asocian con ligando de Flt3, p. ej. en una interacción natural proteína-proteína fisiológicamente relevante, covalente o no covalente. La molécula puede ser un polímero o un reactivo químico. No se expone ninguna implicación en cuanto a si el ligando de Flt3 es el ligando o el receptor de una interacción ligando-receptor, aparte de que la interacción muestra una especificidad similar, p. ej. afinidad específica.

Un análogo funcional puede ser un ligando con modificaciones estructurales, o puede ser una molécula totalmente no relacionada, p. ej., que tiene una forma molecular que interacciona con los determinantes de unión del ligando apropiados. Los ligandos pueden servir como agonistas o antagonistas del receptor, véase, p. ej., Goodman *et al.* (ed.) (1990) *The Pharmacological Bases of Therapeutics* (8th ed.), Pergamon Press.

Sustancialmente pura significa típicamente que la proteína está libre de otras proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias biológicas contaminantes derivadas del organismo fuente original. La pureza puede ensayarse por métodos estándar, y será normalmente de al menos aproximadamente un 40% de pureza, más normalmente de al menos aproximadamente un 50% de pureza, generalmente de al menos aproximadamente un 60% de pureza, más generalmente de al menos aproximadamente un 70% de pureza, frecuentemente de al menos aproximadamente un 75% de pureza, más frecuentemente de al menos aproximadamente un 80% de pureza, típicamente de al menos aproximadamente un 85% de pureza, más típicamente de al menos aproximadamente un 90% de pureza, preferentemente de al menos aproximadamente un 95% de pureza, más preferentemente de al menos aproximadamente un 98% de pureza, y, en las realizaciones más preferidas, de al menos un 99% de pureza.

La solubilidad de un polipéptido o de un fragmento depende del entorno y del polipéptido. Muchos parámetros afectan a la solubilidad de un polipéptido, incluyendo la temperatura, la presencia de electrolitos en el entorno, el tamaño y las características moleculares del polipéptido, y la naturaleza del disolvente. Típicamente, la temperatura a

ES 2 150 495 T5

la que se usa el polipéptido varía entre aproximadamente 4°C y aproximadamente 65°C. Normalmente la temperatura en el momento de su empleo es mayor que aproximadamente 18°C y más normalmente mayor que aproximadamente 22°C. Para fines de diagnóstico, normalmente la temperatura será aproximadamente la temperatura ambiente o más alta, pero menor que la temperatura de desnaturalización de los componentes del ensayo. Para fines terapéuticos, la temperatura será normalmente la temperatura corporal, típicamente aproximadamente 37°C para las personas, aunque bajo ciertas situaciones la temperatura puede subirse o bajarse *in situ* o *in vitro*.

Los electrolitos se aproximarán normalmente a las condiciones fisiológicas *in situ*, pero pueden ser modificados para conseguir una fuerza iónica más alta o más baja cuando sea conveniente. Los iones reales pueden modificarse, p. ej., para conformarlos a tampones estándar usados en contextos fisiológicos o analíticos.

El tamaño y la estructura del polipéptido deben estar generalmente en un estado sustancialmente estable, y normalmente no en estado desnaturalizado. El polipéptido puede estar asociado con otros polipéptidos en una estructura cuaternaria, p. ej., para conferir solubilidad, o asociado con lípidos o detergentes de una forma que se aproxima a las interacciones bicapa de lípidos naturales.

Normalmente el disolvente será un tampón compatible biológicamente, del tipo de los usados para preservar las actividades biológicas, y normalmente se aproximará a un disolvente fisiológico. Normalmente el disolvente tendrá un pH neutro, típicamente entre aproximadamente 5 y 10, y preferentemente aproximadamente 7,5. En algunas ocasiones, se añadirá un detergente, típicamente uno suave y que no desnaturalice, p. ej. CHS o CHAPS, o una concentración suficientemente baja como para evitar una rotura significativa de las propiedades estructurales o fisiológicas del ligando.

La solubilidad se refleja por la sedimentación medida en unidades Svedberg, que son una medida de la velocidad de sedimentación de una molécula bajo condiciones particulares. La determinación de la velocidad de sedimentación se realizaba clásicamente en una ultracentrífuga analítica, pero ahora se realiza en una ultracentrífuga estándar. Véanse Freifelder (1982) *Physical Biochemistry* (2d ed.), W.H. Freeman; y Cantor y Schimmel (1980) *Biophysical Chemistry*, partes 1-3, W.H. Freeman and Co., San Francisco. Como determinación en crudo, una muestra que contiene un polipéptido putativamente soluble se centrifuga en una ultracentrífuga estándar calibrada a aproximadamente 50 K rpm durante aproximadamente 10 minutos, y las moléculas solubles quedarán en el sobrenadante. Una partícula o polipéptido soluble será típicamente menos de aproximadamente 30S, más típicamente menos de aproximadamente 15S, normalmente menos de aproximadamente 10S, más normalmente menos de aproximadamente 6S, y, en realizaciones particulares, preferentemente menos de aproximadamente 4S, y más preferentemente menos de aproximadamente 3S.

Más adelante se describen dos actividades biológicas específicas del ligando de Flt3. La primera es una actividad dependiente del ligando conferida en células transformadas por receptor o células de ensayo apropiadas. La segunda es una autofosforilación del receptor dependiente del ligando. Estas dos actividades biológicas han sido utilizadas para aislar un ligando apropiado.

Variantes físicas

En este texto también se describen proteínas o péptidos que tienen una sustancial homología en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del ligando de Flt3. Las variantes incluyen variantes de especie o alélicas.

La homología de la secuencia de aminoácidos, o identidad de secuencias, se determina optimizando coincidencias de los restos, si es necesario, introduciendo los huecos que se necesiten. Esto cambia cuando se consideran sustituciones conservadoras como coincidencias. Las sustituciones conservadoras incluyen típicamente sustituciones dentro de los grupos siguientes: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. Se supone típicamente que las secuencias homólogas de aminoácidos incluyen variaciones naturales alélicas e interespecies en cada secuencia de proteína respectiva. Las proteínas o péptidos homólogos típicos tendrán de 25-100% de homología (si pueden introducirse huecos) a 50-100% de homología (si se incluyen sustituciones conservadoras) con la secuencia de aminoácidos del ligando de Flt3. Las medidas de homología serán al menos aproximadamente 35%, generalmente al menos 40%, más generalmente al menos 45%, frecuentemente al menos 50%, más frecuentemente al menos 55%, típicamente al menos 60%, más típicamente al menos 65%, habitualmente al menos 70%, más habitualmente al menos 75%, preferentemente al menos 80%, más preferentemente al menos 80%, y en realizaciones particularmente preferidas al menos 85% o más.

Véase también Needleham *et al.* (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; Sankoff *et al.* (1983) Capítulo Primero de *Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison Addison-Wesley*, Reading, MA; y paquetes de *software* de IntelliGenetics, Mountain View, CA; y el University of Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, WI.

El DNA del ligando de Flt3 aislado puede ser fácilmente modificado mediante sustituciones de nucleótidos, deleciones o borrado de nucleótidos, inserciones de nucleótidos e inversiones de expansiones de nucleótidos. Estas modificaciones producen nuevas secuencias de DNA que codifican estos antígenos, sus derivados o proteínas que

ES 2 150 495 T5

5 tienen similar actividad fisiológica, inmunogénica o antigénica. Estas secuencias modificadas pueden usarse para producir antígenos mutantes o para mejorar la expresión. La mejora de la expresión puede implicar amplificación génica, incremento de la transcripción, incremento de la traducción u otros mecanismos. Tales derivados del ligando de Flt3 mutantes incluyen mutaciones predeterminadas o específicas del sitio de la correspondiente proteína o de sus fragmentos. “Ligando de Flt3 mutante” comprende un polipéptido que de otra forma cae dentro de la definición de homología del ligando de Flt3 de ratón como se expuso anteriormente, pero que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la del ligando de Flt3 tal como se encuentra en la naturaleza, sea por medio de delección, sustitución o inserción.

10 En particular, “ligando de Flt3 mutante específico del sitio” incluye generalmente proteínas que tienen una homología significativa con un ligando que tiene secuencias de la Tabla 1, y que comparten varias actividades biológicas, p. ej. antigénica o inmunogénica, con aquellas secuencias, y en realizaciones preferidas contienen la mayoría de las secuencias descritas.

15 Aunque los sitios de mutación específica del sitio están predeterminados, los mutantes no necesitan ser específicos del sitio. La mutagénesis del ligando de Flt3 puede ser realizada haciendo inserciones o delecciones de aminoácidos. Pueden generarse sustituciones, delecciones, inserciones o cualquier combinación para llegar a una construcción final. Las inserciones incluyen fusiones amino- o carboxi-terminales. Puede realizarse mutagénesis aleatoria en un codón diana y los mutantes expresados pueden ser después cribados en cuanto a la actividad deseada. Los métodos para hacer mutaciones por sustitución en sitios predeterminados en DNA que tiene una secuencia conocida son bien conocidos en la técnica, p. ej. por técnicas de mutagénesis de cebador M13 o reacción en cadena de polimerasa (PCR). Véanse también Sambrook *et al.* (1989) y Ausubel *et al.* (1987 y Suplementos).

25 Las mutaciones en el DNA normalmente no deben poner secuencias de codificación fuera de marcos de lectura y preferentemente no crearán regiones complementarias que puedan hibridar para producir estructuras de mRNA secundarias tales como lazos u horquillas.

30 La presente invención proporciona también proteínas recombinantes, proteínas de fusión heterólogas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 19. Una proteína de fusión heteróloga es una fusión de proteínas que de forma natural no se fusionan normalmente de la misma manera. Así, el producto de fusión de una inmunoglobulina con un polipéptido de ligando de Flt3 es una molécula de proteína continua que tiene secuencias fusionadas en una unión peptídica típica, hecha típicamente como un único producto de traducción y que muestra propiedades derivadas de cada péptido fuente. Un concepto similar es válido para secuencias heterólogas de ácidos nucleicos.

35 Además, pueden hacerse nuevas construcciones combinando dominios funcionales similares de otras proteínas. Por ejemplo, pueden intercambiarse segmentos de unión con el ligando entre diferentes nuevos polipéptidos o fragmentos de fusión. Véanse, p. ej., Cunningham *et al.* (1989) *Science* 243:1330-1336; y O’Dowd *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15992-15992. Así, nuevos polipéptidos quiméricos que muestran nuevas combinaciones de especificidades resultarán de la unión funcional de especificidades de unión con el ligando y otros dominios funcionales.

40 El método de la fosforamidita descrito por Beaucage y Carruthers (1981) *Tetra. Letts.* 22:1859-1862, producirá fragmentos de DNA sintéticos adecuados. Un fragmento bicatenario se obtendrá frecuentemente sintetizando la hebra complementaria y reasociando la hebra bajo condiciones apropiadas o bien añadiendo la hebra complementaria usando DNA polimerasa con una secuencia cebadora apropiada, p. ej. técnicas de PCR.

45 *Variantes funcionales*

50 El bloqueo de la respuesta fisiológica a ligandos de Flt3 puede ser el resultado de la inhibición de la unión del ligando al receptor de Flt3, probablemente por inhibición competitiva. Así, los ensayos *in vitro* usarán frecuentemente proteína aislada, membranas procedentes de células que expresan un ligando de Flt3 asociado a membrana recombinante, fragmentos solubles que comprenden segmentos de unión del receptor de estos ligandos, o fragmentos unidos a sustratos en fase sólida. Estos ensayos permitirán también la determinación diagnóstica de los efectos de mutaciones y modificaciones del segmento de unión o bien de mutaciones y modificaciones del ligando, p. ej. análogos del ligando.

55 Esta invención contempla también el uso de ensayos competitivos de cribado de fármacos, p. ej. cuando anticuerpos neutralizantes contra fragmentos de antígeno o receptor compiten con un compuesto de ensayo por la unión con la proteína. De esta manera, los anticuerpos pueden usarse para detectar la presencia de cualquier polipéptido que comparta uno o más sitios de unión antigénica del ligando y puede también usarse para ocupar sitios de unión en la proteína que, de otra forma, podrían interaccionar con un receptor.

60 Adicionalmente, pueden usarse anticuerpos neutralizantes contra el ligando de Flt3 y fragmentos solubles del ligando que contienen un sitio de unión del receptor de alta afinidad, para inhibir la función del ligando en tejidos, p. ej. tejidos que experimentan una fisiología anómala.

65 Los “derivados” de antígenos del ligando de Flt3 incluyen mutantes de la secuencia de aminoácidos, variantes de glicosilación y conjugados covalentes o de agregado con otros restos químicos. Los derivados covalentes pueden prepararse por unión de funcionalidades a grupos que se encuentran en cadenas laterales de aminoácidos del ligando

de Flt3 en los términos N o C, por medios que son bien conocidos en la técnica. Estos derivados pueden incluir, sin limitación, ésteres alifáticos o amidas del término carboxilo, o de restos que contienen cadenas laterales carboxilo, derivados O-acilo de restos que contienen grupos hidroxilo, y derivados N-acilo del aminoácido amino terminal o restos que contienen grupos amino, p. ej. lisina o arginina. Los grupos acilo se eligen entre el grupo de restos alquilo que incluye alquilo normal C3 a C18, formando así especies alcanoil aroílo. la unión covalente a proteínas portadoras puede ser importante cuando los restos inmunogénicos son haptenos.

En particular, se incluyen alteraciones por glicosilación, p. ej., hechas modificando los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento, o en otras etapas de procesamiento. Los medios particularmente preferidos para realizar esto son exponiendo el polipéptido a enzimas de glicosilación derivadas de células que normalmente proporcionan tal procesamiento, p. ej. enzimas de glicosilación de mamífero. También se consideran enzimas de desglicosilación. También están incluidas versiones de la misma secuencia primaria de aminoácidos que tienen otras modificaciones menores, incluyendo restos de aminoácidos fosforilados, p. ej. fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

Un grupo mayoritario de derivados son conjugados covalentes del ligando de Flt3 o fragmentos del mismo con otras proteínas o polipéptidos. Estos derivados pueden ser sintetizados en cultivo recombinante tal como fusiones N- o C-terminales o mediante el empleo de agentes conocidos en la técnica por su utilidad en la reticulación de proteínas a través de grupos secundarios reactivos. Los sitios de derivatización del ligando preferidos con agentes de reticulación están en grupos amino libres, restos de carbohidrato y restos de cisteína.

También se proporcionan polipéptidos de fusión entre ligandos de Flt3 y otras proteínas homólogas o heterólogas. Muchos factores de crecimiento y citoquinas son entidades homodiméricas y una construcción repetida puede tener varias ventajas, incluyendo una menor susceptibilidad a la segmentación proteolítica. Además, muchos receptores requieren dimerización para transducir una señal, y pueden ser deseables varios ligandos diméricos o repeticiones de dominios. Los polipéptidos homólogos pueden ser fusiones entre diferentes marcadores de superficie, dando por resultado, p. ej., una proteína híbrida que muestra especificidad de unión del receptor. Del mismo modo, pueden construirse fusiones heterólogas que exhibirían una combinación de propiedades o actividades de las proteínas del derivado.

Ejemplos típicos son fusiones de un polipéptido informador, p. ej. luciferasa, con un segmento o dominio de un ligando, p. ej. un segmento de unión al receptor, de forma que puede ser fácilmente determinada la presencia o localización del ligando fusionado. Véase, p. ej., Dull *et al.*, patente de EE.UU. n° 4.859.609. Otros compañeros de fusión génica incluyen β -galactosidasa bacteriana, trpE, Proteína A, β -lactamasa, alfa-amilasa, alcohol-deshidrogenasa y factor sexual alfa de levadura. Véase, p. ej., Godowski *et al.* (1988) *Science* 241:812-816.

El método de la fosforamida descrito por Beaucage y Carruthers (1981) *Tetra. Letts.* 22:1859-1862, producirá fragmentos de DNA sintéticos adecuados. Frecuentemente se obtendrá un fragmento bicatenario sintetizando la hebra complementaria y reanillando la hebra bajo condiciones apropiadas o bien añadiendo la hebra complementaria usando DNA polimerasa con una secuencia cebadora apropiada.

Tales polipéptidos pueden tener también restos de aminoácidos que han sido modificados químicamente por fosforilación, sulfonación, biotilación, o por adición o eliminación de otros restos, en particular aquellos que tienen formas moleculares similares a las de los grupos fosfato. En algunas realizaciones, las modificaciones serán útiles reactivos de marcaje o servirán como dianas de purificación, p. ej. ligandos de afinidad.

Las proteínas de fusión se harán típicamente por métodos de ácidos nucleicos recombinantes o bien por métodos de polipéptidos sintéticos. Las técnicas para la manipulación y la expresión de ácidos nucleicos se describen de un modo general, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory. Las técnicas para la síntesis de polipéptidos se describen, por ejemplo, en Merrifield (1963) *J. Amer. Chem. Soc.* 85: 2149-2156; Merrifield (1986) *Science* 232: 341-347; y Atherton *et al.* (1989) *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford.

Esta invención contempla también el uso de derivados de ligandos de Flt3 distintos de las variaciones en la secuencia de aminoácidos o la glicosilación. Tales derivados pueden implicar asociación covalente o agregativa con restos químicos. Generalmente estos derivados caen dentro de tres clases: (1) sales, (2) modificaciones covalentes de cadenas secundarias y restos terminales, y (3) complejos de adsorción, por ejemplo con membranas celulares. Tales derivados covalentes o agregativos son útiles como inmunógenos, como reactivos en inmunoensayos o en métodos de purificación tales como la purificación por afinidad de ligandos u otros ligandos de unión. Por ejemplo, un antígeno de ligando de Flt3 puede ser inmovilizado por unión covalente a un soporte sólido tal como SEPHAROSE® activada con bromuro de cianógeno, por métodos que son bien conocidos en la técnica, o ser adsorbido sobre superficies de poliolefina, con o sin entrecruamiento con glutaraldehído, para su uso en el ensayo de purificación de anticuerpos anti-ligando de Flt3 o su receptor.

Los ligandos de Flt3 pueden ser también marcados con un grupo detectable, por ejemplo radioyodados por el procedimiento de la cloramina T, unidos covalentemente a quelatos de tierras raras o conjugados con otro resto fluorescente para su uso en ensayos de diagnóstico. La purificación del ligando de Flt3 puede ser efectuada por anticuerpos o receptores inmovilizados.

ES 2 150 495 T5

Un ligando de Flt3 solubilizado o un fragmento como se ha descrito en esta invención pueden usarse como inmunógeno para la producción de antisueros o anticuerpos específicos para el ligando o cualquier fragmento del mismo. Los ligandos purificados pueden usarse para cribar anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión del ligando preparados por inmunización con varias formas de preparados impuros que contienen la proteína. En particular, el término “anticuerpos” comprende también fragmentos de unión de antígeno de anticuerpos naturales. Los ligandos de Flt3 purificados pueden usarse también como reactivo para detectar anticuerpos generados en respuesta a la presencia de niveles elevados de ligando o de fragmentos celulares que contienen el ligando, de los que ambos pueden ser diagnóstico de una situación fisiológica anómala o específica, o de una enfermedad.

Adicionalmente, los fragmentos del ligando pueden servir también como inmunógenos para producir los anticuerpos de la presente invención, como se describe inmediatamente a continuación. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden producir contra secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de nucleótidos que se muestran en la Tabla 1, o fragmentos de proteínas que las contienen. En particular, esta invención contempla anticuerpos que tienen afinidad de unión para fragmentos específicos, o que han sido producidos contra ellos, que se prevé que están fuera de la bicapa lipídica.

La presente invención contempla el aislamiento de variantes de especie adicionales estrechamente relacionadas. Los análisis de transferencia Southern y Northern deben establecer que existen entidades genéticas similares en otros mamíferos. Es probable que los ligandos de Flt3 estén diseminados en variantes de especie, por ejemplo roedores, lagomorfos, carnívoros, artiodáctilos, perisodáctilos y primates.

La invención proporciona también medios para aislar un grupo de antígenos relacionados que muestran tanto disparidades como similitudes en estructura, expresión y función. La dilucidación de muchos de los efectos fisiológicos de los ligandos se verá acelerada en gran medida por el aislamiento y la caracterización de distintas variantes de especie de los ligandos. En particular, la presente invención proporciona sondas útiles para identificar entidades genéticas homólogas adicionales en especies diferentes.

Los genes aislados permitirán la transformación de células carentes de expresión de un correspondiente ligando de Flt3, p. ej., tipos de especies o células que carecen de los ligandos correspondientes y muestran una actividad de fondo negativa. La expresión de los genes transformados permitirá el aislamiento de líneas celulares antigénicamente puras, con variantes de especie definidas o únicas. Este planteamiento permitirá una detección y discriminación más sensible de los efectos fisiológicos de cualquier proteína del receptor de Flt3. Pueden aislarse y usarse fragmentos subcelulares, p. ej. citoplastos o fragmentos de la membrana.

La disección de elementos estructurales críticos que realizan las diversas funciones de diferenciación proporcionadas por los ligandos es posible usando técnicas estándar de la biología molecular moderna, en particular comparando miembros de la clase relacionada. Véanse, p. ej., la técnica de mutagénesis de barrido de homólogos descrita en Cunningham, *et al.* (1989) *Science* 243: 1339-1336; y planteamientos usados en O'Dowd *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15985-15992; y Lechteiler *et al.* (1990) *EMBO J.* 9:4381-4390.

En particular, los segmentos de unión con el receptor pueden ser sustituidos entre variantes de especie para determinar qué características estructurales son importantes tanto en la afinidad como en la especificidad de la unión con el receptor, así como en la transducción de señal. Se usará un conjunto de diferentes variantes de ligando para cribar ligandos que muestren propiedades combinadas de interacción con diferentes variantes de especie del receptor.

Las funciones intracelulares implicarían probablemente segmentos del receptor que son normalmente accesibles al citosol. Sin embargo la internalización del ligando puede ocurrir bajo ciertas circunstancias, y puede tener lugar interacción entre componentes intracelulares y segmentos “extracelulares”. Los segmentos específicos de interacción del ligando de Flt3 con otros componentes intracelulares pueden identificarse por mutagénesis o medios bioquímicos directos, p. ej. métodos de entrecruzamiento o de afinidad. También serán aplicables los análisis estructurales por métodos cristalográficos u otros métodos físicos. La posterior investigación del mecanismo de transducción de señal incluirá el estudio de componentes asociados que pueden ser aislables por métodos de afinidad o por medios genéticos, p. ej. análisis de complementación de mutantes.

Seguirán otros estudios de la expresión y el control del ligando de Flt3. Los elementos controladores asociados con los ligandos pueden mostrar desarrollo diferencial, específico del tejido, u otros patrones de expresión. Son de interés regiones genéticas corriente arriba o corriente abajo, p. ej. elementos de control. En particular se han encontrado variantes de desarrollo o fisiológicas, p. ej. formas múltiples del ligando procesadas alternativamente. Véase p. ej. la Tabla 3. Así, el empalme diferencial del mensaje puede conducir a formas unidas a la membrana, formas solubles y versiones modificadas del ligando.

Los estudios estructurales de los ligandos conducirán al diseño de nuevos ligandos, en particular análogos que muestran propiedades agonistas o antagonistas sobre el receptor. Esto puede combinarse con métodos de cribado anteriormente descritos para aislar los ligandos que muestren el espectro de actividades deseado.

La expresión en otros tipos de células tendrá frecuentemente por resultado diferencias de glicosilación en un ligando en particular. Varias variantes de especie pueden mostrar diferentes funciones basadas en diferencias estructurales

distintas de la secuencia de aminoácidos. Las modificaciones diferenciales pueden ser responsables de la función diferencial, y se ha hecho ahora posible la dilucidación de los efectos.

Así pues, la presente invención proporciona importantes reactivos relacionados con una interacción ligando-receptor fisiológica.

Anticuerpos

Pueden producirse anticuerpos contra varios ligandos de Flt3, incluyendo variantes de especie o alélicas, y fragmentos de los mismos, tanto en sus formas naturales como en sus formas recombinantes. Adicionalmente, pueden producirse anticuerpos contra ligandos de Flt3 en sus formas activas o bien en sus formas inactivas. También se consideran anticuerpos anti-idiotípicos.

Los anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión y versiones de cadena simple, contra fragmentos predeterminados de los ligandos, pueden ser producidos por inmunización de animales con conjugados de los fragmentos con proteínas inmunogénicas. Los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de células que segregan el anticuerpo deseado. Estos anticuerpos pueden ser cribados en relación con la unión a ligandos de Flt3 normales o defectuosos, o cribados en cuanto a la actividad agonista o antagonista, p. ej., mediada a través del receptor. Estos anticuerpos monoclonales se unirán normalmente con al menos un valor de K_D de aproximadamente 1 mM, más normalmente al menos aproximadamente 300 μ M, típicamente al menos aproximadamente 100 μ M, más típicamente al menos aproximadamente 30 μ M, preferentemente al menos aproximadamente 10 μ M, y más preferentemente al menos aproximadamente 3 μ M, o mejor.

Los anticuerpos de esta invención, incluyendo fragmentos de unión con el antígeno, pueden tener un importante valor diagnóstico o terapéutico. Pueden ser potentes antagonistas que se unen al receptor e inhiben la unión con el ligando o inhiben la capacidad de un ligando para desencadenar una respuesta biológica. También pueden ser útiles como anticuerpos no neutralizantes y pueden ser acoplados a toxinas o radionucleidos de forma que, cuando el anticuerpo se une al ligando, una célula que lo exprese, p. ej. en su superficie, es muerta. Además, estos anticuerpos pueden ser conjugados con fármacos o con otros agentes terapéuticos, bien sea directamente o indirectamente por medio de un enlazador, y pueden realizar una diana del fármaco.

Los anticuerpos de esta invención pueden ser también útiles en aplicaciones de diagnóstico. Como anticuerpos de captura o no neutralizantes, pueden ser cribados en relación con su capacidad para unirse a los ligandos sin inhibir la unión con el receptor. Como anticuerpos neutralizantes, pueden ser útiles en ensayos de unión competitiva. También serán útiles para detectar o cuantificar el ligando de Flt3 o sus receptores.

Los fragmentos de ligando pueden estar unidos a otros materiales, en particular a polipéptidos, en forma de polipéptidos fusionados o unidos covalentemente para usarlos como inmunógenos. Un ligando y sus fragmentos puede estar fusionado o unido covalentemente a una diversidad de inmunógenos tales como hemocianina de la lapa bocallave, albúmina de suero bovino, toxoide del tétanos, etc. Véanse *Microbiology*, Hoeber Medical Division, Harper and Row, 1969; Landsteiner (1962) *Specificity of Serological reactions*, Dover Publications, Nueva York, y Williams *et al.* (1967) *Methods in Immunology and Immunochemistry*, Vol. I, Academic Press, Nueva York, para descripciones de métodos para preparar antiseros policlonales. Un método típico implica la hiperinmunización de un animal con un antígeno. Después se recoge la sangre del animal poco después de las inmunizaciones repetidas y se aísla la gamma-globulina.

En algunos casos es deseable preparar anticuerpos monoclonales a partir de varios hospedadores mamíferos tales como ratones, roedores, primates, seres humanos, etc. La descripción de las técnicas para preparar tales anticuerpos monoclonales puede encontrarse, p. ej., en Stites *et al.* (ed.) *Basic and Clinical Immunology* (4th ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y referencias citadas en ese texto; Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2d ed.) Academic Press, Nueva York; y en particular en Kohler y Milstein (1975) en *Nature* 256: 495-497, que discute un método para generar anticuerpos monoclonales.

Brevemente resumido, este método implica inyectar a un animal un inmunógeno. El animal es después sacrificado y se recogen las células de su bazo, que después se fusionan con células de mieloma. El resultado es una célula híbrida o "hibridoma" que es capaz de reproducirse *in vitro*. Después se somete a cribado la población de hibridomas para aislar clones individuales, cada uno de los cuales segrega una única especie de anticuerpo contra el inmunógeno. De esta manera, las especies de anticuerpo individual obtenidas son los productos de células B individuales immortalizadas y clonadas procedentes del animal inmune generadas en respuesta a un sitio específico reconocido en la sustancia inmunogénica.

Otras técnicas adecuadas implican la exposición *in vitro* de linfocitos a los polipéptidos antigénicos o alternativamente a una selección de genotecas de anticuerpos en vectores de fago o similares. Véanse Huse *et al.* (1989) "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire en Phage Lambda" *Science* 246: 1275-1281; y Ward *et al.* (1989) *Nature* 341: 544-546. Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención pueden ser usados con o sin modificación, incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados. Frecuentemente, los polipéptidos y anticuerpos serán marcados uniéndoles, bien sea covalentemente o no covalentemente, a una sustancia que proporcione una señal detectable.

ES 2 150 495 T5

Se conoce una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación y se exponen ampliamente en la bibliografía científica y en la de patentes. Los marcadores adecuados incluyen radionucleidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de tales marcadores incluyen las patentes de EE.UU. núm. 3.817.837, 3.850.752, 3.939.350, 3.996.345, 4.277.437, 4.275.149 y 4.366.241. También pueden producirse inmunoglobulinas recombinantes; véase Cabilly, patente de EE.UU. n° 4.816.567.

Los anticuerpos de esta invención pueden usarse también para cromatografía de afinidad en el aislamiento de la proteína. Pueden prepararse columnas en las que los anticuerpos están unidos a un soporte sólido, p. ej. partículas tales como agarosa, SEPHA-DEX® o similares, en donde se puede hacer pasar por la columna un lisado celular, se lava la columna y a continuación se van aumentando las concentraciones de un desnaturalizante suave, con lo que se liberará la proteína del ligando de Flt3 purificada.

Los anticuerpos pueden usarse también para cribar genotecas de expresión en cuanto a productos de expresión concretos. Usualmente los anticuerpos usados en tal procedimiento estarán marcados con un resto que permita la detección fácil de la presencia de antígeno por unión del anticuerpo.

Los anticuerpos producidos contra cada ligando de Flt3 serán también útiles para producir anticuerpos anti-idiotípicos. Estos serán útiles para detectar o diagnosticar varias condiciones inmunológicas relacionadas con la expresión de los antígenos respectivos.

Ácidos nucleicos

Las secuencias peptídicas descritas y los reactivos relacionados son útiles para aislar un clon de DNA que codifica ligando de Flt3, p. ej. de una fuente natural. Típicamente, será útil para aislar un gen de ratón, y se aplicarán procedimientos similares para aislar genes de otras especies, p. ej. animales de sangre caliente tales como aves y mamíferos. Véase la Tabla 3. La hibridación cruzada permitirá el aislamiento de ligando de otras especies. Varios planteamientos distintos deben estar disponibles para aislar con éxito un clon de ácido nucleico adecuado.

La proteína purificada o los péptidos definidos son útiles para generar anticuerpos por métodos estándar, como se describió anteriormente. Los péptidos sintéticos o la proteína purificada pueden ser presentados a un sistema inmune para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Véanse, p. ej., Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Green; y Harlow y Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press. Alternativamente, el receptor de Flt3 puede usarse como reactivo de unión específica, y puede sacarse provecho de su especificidad de unión, como si se usase un anticuerpo.

Por ejemplo, la composición de unión específica podría usarse para cribar una genoteca de expresión hecha a partir de una línea celular que expresa un ligando de Flt3. El cribado puede ser teñido estándar de ligando expresado en la superficie, o por separación por adsorción. El cribado de expresión intracelular puede también realizarse por varios procedimientos de tinción o de inmunofluorescencia. Las composiciones de unión podrían usarse para purificar por afinidad o clasificar células que expresan el ligando.

Los segmentos de péptido pueden también ser usados para predecir los oligonucleótidos apropiados para cribar una genoteca. El código genético puede usarse para seleccionar los oligonucleótidos apropiados útiles como sondas para cribado. Véase, p. ej., la Tabla 3. En combinación con técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR), los oligonucleótidos sintéticos serán útiles para seleccionar los clones correctos entre una genoteca. También se usarán secuencias complementarias como sondas o cebadores. Basándose en la identificación del término amino probable, el tercer péptido debe ser particularmente útil, p. ej., acoplado con técnicas de PCR complementarias de vector anclado o de poli-A o con DNA complementario de otros péptidos.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 150 495 T5

TABLA 3

Secuencias peptídicas del ligando de Flt3 y sondas/cebadores de oligonucleótidos predichos ejemplares.

1. F V Q T (NCST) I (S) (H) L L R
 - a) TT(T/C) GTN CA(G/A) ACN AA(C/T) AT(A/C/T)
 - b) TT(T/C) GTN CA(G/A) ACN TG(T/C) AT(A/C/T)
 - c) TT(T/C) GTN CA(G/A) ACN AG(C/T) AT(A/C/T)
 - d) TT(T/C) GTN CA(G/A) ACN TCH AT(A/C/T)
 - e) TT(T/C) GTN CA(G/A) ACN ACN AT(A/C/T)

2. D Y P V T V A V (N) L Q (D) E

GA(T/C) TA(T/C) CCN GTN ACN GTN

3. T P D C Y F S H S

ACN CCN GA(T/C) TG(T/C) TA(T/C) TT(T/C)

4. W I E Q L K (Q) (P) (G) (S)
 - a) TGG AT(A/C/T) GA(G/A) CA(G/A) CTN AA(G/A)
 - b) TGG AT(A/C/T) GA(G/A) CA(G/A) TT(A/G) AA(G/A)

5. N F K V R F

AA(T/C) TT(T/C) AA(A/G) GTN AA(A/G) TT(T/C)

y secuencia:

ACT CCT GAC TGT TAC TTC AGC CAC AGT CCC ATC TCC TCC AAC TTC
AAA GTG AAG TTT AGA GAG TTG ACT GAC CAC CTG CTT AAA GAT

Secuencias de diversas variantes del ligando de Flt3 de mamífero son:

T110/MB8/T118 de ratón

GAATTCCGGCCCGCCCTCGAGCCCTGGCCGGACTGAGCCCGAGACCTGCCCTCCTGTC

ACTTCCAAGAACCTGTACAGGCATGAGGGGTCCCCGGCAGAG ATG ACA GTG CTG GCC CCA
MET Thr Val Leu Ala Pro 6

GCC TGG AGC CCA AAT TCC TCC CTG TIG CTG CTG TTG CTG CTG CTG AGT CCT
Ala Trp Ser Pro Asn Ser Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Pro 23

TGC CTG CGG GCG ACA CCT GAC TGT TAC TTC AGC CAC AGT CCC ATC TCC TCC
Cys Leu Arg Gly Thr Pro Asp Cys Tyr Phe Ser His Ser Pro Ile Ser Ser 40

AAC TTC AAA GTG AAG TTT AGA GAG TTG ACT GAC CAC CTG CTT AAA GAT TAC
Asn Phe Lys Val Lys Phe Arg Glu Leu Thr Asp His Leu Leu Lys Asp Tyr 57

CCA GTC ACT GTG GCC GTC AAT CTT CAG GAC GAG AAG CAC TGC AAG GCC TTG
Pro Val Thr Val Ala Val Asp Leu Gln Asp Glu Lys His Cys Lys Ala Leu 74

TGG AGC CTC TTC CTA GCC CAG CGC TGG ATA GAG CAA CTG AAG ACT GTG GCA
Trp Ser Leu Phe Leu Ala Gln Arg Trp Ile Glu Gln Leu Lys Thr Val Ala 91

ES 2 150 495 T5

TABLA 3 (continuación)

5	GGG TCT AAG ATG CAA ACG CTT CTG GAG GAC GTC AAC ACC GAG ATA CAT TTT Gly Ser Lys Met Gln Thr Leu Leu Glu Asp Val Asn Thr Glu Ile His Phe	108
	GTC ACC TCA TGT ACC TTC CAG CCC CTA CCA GAA TGT CTG CGA TTC GTC CAG Val Thr Ser Cys Thr Phe Gln Pro Leu Pro Glu Cys Leu Arg <u>Phe Val Gln</u>	125
10	ACC AAC ATC TCC CAC CTC CTG AAG GAC ACC TGC ACA CAG CTG CTT GCT CTG <u>Thr Asn Ile</u> Ser His Leu Leu Lys Asp Thr Cys Thr Gln Leu Leu Ala Leu	142
15	AAG CCC TGT ATC GGG AAG GCC TGC CAG AAT TTC TCT CGG TCC CTG GAG GTG Lys Pro Cys Ile Gly Lys Ala Cys Gln Asn Phe Ser Arg Cys Leu Glu Val	159
	T110	
	CAG TGC CAG CCG A GAC TCC TCC ACC CTG CTG CCC CCA AGG AGT CCC ATA GCC Gln Cys Gln Pro A Asp Ser Ser Thr Leu Leu Pro Pro Arg Ser Pro Ile Ala	176
20	CTA GAA GCC ACG GAG CTC CCA GAG CCT CGG CCC AGG CAG CTG TTC CTC CTG Leu Glu Ala Thr Glu Leu Pro Glu Pro Arg Pro Arg Gln Leu Leu Leu Leu	193
25	CTG CTG CTG CTG CTG CCT CTC ACA CTG GTG CTG CTG CCA GCC GCC TGG GGC Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Thr Leu Val Leu Leu Ala Ala Ala Trp Gly	210
	CTT CCC TGG CAA AGG GCA ACA AGG AGC GCG GAG CTC CAC CCT GGG GTC CCC Leu Arg Trp Gln Arg Ala Arg Arg Arg Gly Glu Leu His Pro Gly Val Pro	227
30	CTC CCC TCC CAT CCC TAGGATCGGAGCCCTTCTGCATCGTTGACTCAGCCAGGGTCTTATCTC Leu Pro Ser His Pro	232
35	GACTTCGGAAACCAAAAACAAGGAACAAGCTAGCCAACTGCTGTGCTGAGTTACATCCCCAGCCCCAGAG GACACACTGCTCGGGTATGCGGATGGACACTGTAAATCCAGTCCCTTCTGGATTGGACATGCTGA AAC TGCATACTGACTTTAAGAAAAACAGAAAGGAAGAACCCCCC	
	inserto de MB8 (29 aminoácidos)	
	(TGC CAG CCG) GAT AGG GTC TCA TTA TTA TGC AGG CTA GCC CTC ACC CTG ... Asp Arg Val Ser Leu Leu Cys Arg Leu Gly Leu Thr Leu	Δ13
40	AAC TCA AAG CAA TCC TCC TGC CTC AGT GTC CTG AGT GCT GGG ATT ACA (GAC TCC) Asn Ser Lys Gln Ser Ser Cys Leu Ser Val Leu Ser Ala Gly Ile Thr ...	Δ29
	T118	
45	... GGT AAC GGT GGC CCC AGA GCC CAG CAC CAT GGT GCC ACC ... Gly Asn Gly Gly Pro Arg Ala Gln His His Gly Ala Thr	176
	AGG CTC ACA GCC ACA GCC TTG CTA ACT GTG TGT CCA GGG CTT CTG CTC CCA Arg Leu Thr Ala Thr Ala Leu Leu Thr Val Cys Pro Gly Leu Leu Leu Pro	193
50	CTA GTT GGC ACT TCA CAC ATG TTC TTT CTC CCT TAT TTT CTC TCT TTT CTT Leu Val Gly Thr Ser His Met Phe Phe Leu Pro Tyr Phe Leu Ser Phe Leu	210
55	TCT TCT TTT TTA AAG ATG TAT CTT TAT GTG TGAGTGTTTTACCTACATGCCCTGTAAG Ser Ser Phe Leu Lys Met Tyr Leu Tyr Val	220
60		
65		

ES 2 150 495 T5

TABLA 3 (continuación)

5	TGCAC TGAATGTGTCTCTGGTGCCTGCAGAGGCCAGAAAGAGGGCACCAGATCCCCTGAAACTGGAGT CTCTTGGCTCCGTGTGAACCACCACGTTGGTCTCTGGGACCCAGGTCCAATCCAAGAGCACCCAGGCTT CTTACCTGCTGA	
10	S86/S109 humana GAAAGGGCTGTTCACCCGGCTTGGCCCCCTTCCACACCCCAACTGGGGCAAGCC	
15	TGACCCGGGGACAGGAGGCATGAGGGGCCCCCGGCCGAA ATG ACA GTG CTG GCG CCA GCC MET Thr Val Leu Ala Pro Ala	7
20	TGG AGC CCA ACA ACC TAT CTC CTC CTG CTG CTG CTG CTG AGC TCG GGA CTC Tyr Ser Pro Thr Thr Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ser Gly Leu	24
25	AGT GGG ACC CAG GAC TGC TCC TTC CAA CAC AGC CCC ATC TCC TCC GAC TTC Met Gly Thr Gln Asp Cys Ser Phe Gln His Ser Pro Ile Ser Ser Asp Phe	41
30	GCT GTC AAA ATC CGT GAG CTG TCT GAC TAC CTG CTT CAA GAT TAC CCA GTC Ala Val Lys Ile Arg Glu Leu Ser Asp Tyr Leu Leu Gln Asp Tyr Pro Val	58
35	ACC GTG GCC TCC AAC CTG CAG GAC GAG GAG CTC TGC GGG GCG CTC TGG CCG Thr Val Ala Ser Asn Leu Gln Asp Glu Glu Leu Cys Gly Ala Leu Tyr Arg	75
40	CTG GTC CTG GCA CAG CGC TCG ATG GAG CGC CTC AAG ACT GTC GCT GGG TCC Leu Val Leu Ala Gln Arg Tyr Met Glu Arg Leu Lys Thr Val Ala Gly Ser	92
45	AAG ATG CAA GGC TTG CTG GAG CGC GTG AAC ACG GAG ATA CAC TTT GTC ACC Lys Met Gln Gly Leu Leu Glu Arg Val Asn Thr Glu Ile His Phe Val Thr	109
50	AAA TGT GCC TTT CAG CCC CCC CCC AGC TGT CTT CGC TTC GTC CAG ACC AAC Lys Cys Ala Phe Gln Pro Pro Pro Ser Cys Leu Arg Phe Val Gln Thr Asn	126
55	ATC TCC CGC CTC CTG CAG GAG ACC TCC GAG CAG CTG GTG GCG CTC AAG CCC Ile Ser Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Glu Gln Leu Val Ala Leu Lys Pro	143
60	TGG ATC ACT CGC CAG AAC TTC TCC CGG TGC CTG GAG CTG CAG TGT CAG CCC Tyr Ile Thr Arg Gln Asn Phe Ser Arg Cys Leu Glu Leu Gln Cys Gln Pro	160
65	### GAC TCC TCA ACC CTG CCA CCC CCA TGG AGT CCC CGG CCC CTG GAG GCC ACA Asp Ser Ser Thr Leu Pro Pro Pro Tyr Ser Pro Arg Pro Leu Glu Ala Thr	177
70	GCC CCG ACA GCC CCG CAG CCC CCT CTG CTC CTC CTA CTG CTG CTG CCC GTG Ala Pro Thr Ala Pro Gln Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Val	194
75	GGC CTC CTG CTG CTG GCC GCT GCC TGG TGC CTG CAC TGG CAG AGG ACG CGG Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Tyr Cys Leu His Tyr Gln Arg Thr Arg	211
80	CGG AGG ACA CCC CGC CCT GGG GAG CAG GTG CCC CCC GTC CCC AGT CCC CAG Arg Arg Thr Pro Arg Pro Gly Glu Gln Val Pro Pro Val Pro Ser Pro Gln	228
85	GAC CTG CTG CTT GTG GAG CAC TGACCTGGCCAGGCCCTCATCCTGGGGAGGATACCTAGG Asp Leu Leu Leu Val Glu His	235
90	CACACAGAGGGGAGTCACCAGCC	

ES 2 150 495 T5

TABLA 3 (continuación)

5	o S109	
	GOT GCC CCC CCT CCC CAG TCC CCA GGA CCT GCT GCT TGT GGA GCA CTG ACC	
	Gly Ala Pro Arg Pro Gln Ser Pro Gly Pro Ala Ala Cys Gly Ala Leu Thr	177
	TGG CCA AGG CCT CAT CCT GGG GAG GAT ACT GAG GCA CAC AGA GGG GAG TCA	
	Trp Pro Arg Pro His Pro Gly Glu Asp Thr Glu Ala His Arg Gly Glu Ser	194
10	CCA GCC AGA GGA TGC ATA GCC TGG ACA CAG AGG AAG TTG GCT AGA GGC CGC	
	Pro Ala Arg Gly Cys Ile Ala Trp Thr Gln Arg Lys Leu Ala Arg Gly Arg	211
	TCC CTT CCT TGG GCC CCT CTC ATT CCC TCC CCA GAA TGG AGG CAA CGC CAG	
15	Ser Leu Pro Trp Ala Pro Leu Ile Pro Ser Pro Glu Trp Arg Gln Arg Gln	228
	AAT CCA GCA CCG GCC CCA TTT ACC CAA CTC TGT ACA AAG CCC TTG TCC CCA	
	Asn Pro Ala Pro Ala Pro Phe Thr Gln Leu Cys Thr Lys Pro Leu Ser Pro	245
20	TGAARTTGATATATAAATCATCCTTTTCTACCAAAAAAAAAAAAAAAAA	

Desde luego las secuencias complementarias son también útiles.

Las secuencias mostradas en la Tabla 3 se definen también en la Lista de Secuencias como sigue:

Péptido	SEQ ID No:
1.a)	25
b)	26
c)	27
d)	28
e)	29
2.	30
3.	31
4.a)	32
b)	33
5.	34
Secuencia de nucleótidos	35
MoT110/T118	21
MB8	23
T118	
Secuencia de nucleótidos	24
Secuencia de aminoácidos	22
HuS86/S109	19
S109	20

Se ha aislado y secuenciado un ácido nucleico aislado que codifica un segmento aminoterminal, y proporciona la secuencia siguiente: ACT CCT GAC TGT TAC TTC AGC CAC AGT CCC ATC TCC TCC AAC TTC AAA GTG AAG TTT AGA GAG TTG ACT GAC CAC CTG CTT AAA GAT. Esta puede usarse como sonda para aislar un clon más largo o de longitud completa, y conducirá al aislamiento de otras variantes de especie o alélicas u otros genes relacionados estrechamente. Véanse la Tabla 3 y la Tabla 5, más adelante.

Esta invención contempla el uso del DNA aislado o fragmentos para codificar un polipéptido de ligando de Flt3 correspondiente biológicamente activo. Además, esta invención se refiere a DNA aislado o recombinante que codifica una proteína o polipéptido biológicamente activos que es capaz de hibridar bajo condiciones apropiadas con las secuencias de DNA descritas en el presente texto. Dicha proteína o polipéptido biológicamente activos pueden ser un ligando intacto, o fragmento, y tiene una secuencia de aminoácidos como se describe en la Tabla 1. Además, esta invención se refiere al uso de DNA aislado o recombinante, o fragmentos del mismo, que codifica proteínas que

ES 2 150 495 T5

son homólogas respecto a un ligando de Flt3 o que fue aislado usando cDNA que codifica un ligando de Flt3 como sonda. El DNA aislado puede tener las secuencias reguladoras respectivas en los flancos 5' y 3', p. ej. promotores, potenciadores, señales de adición de poli-A, y otras.

5 Un ácido nucleico "aislado" es un ácido nucleico, p. ej. un RNA, un DNA o un polímero mixto, que está sustancialmente separado de otros componentes que acompañan de forma natural a una secuencia nativa, p. ej. ribosomas, polimerasas y secuencias genómicas flanqueantes procedentes de la especie de origen. El término comprende una secuencia de ácidos nucleicos que ha sido retirada de su entorno natural, e incluye aislados de DNA recombinante o clonado y análogos sintetizados químicamente o análogos sintetizados biológicamente por sistemas heterólogos. Una molécula sustancialmente pura incluye formas aisladas de la molécula.

15 Un ácido nucleico aislado será generalmente una composición homogénea de moléculas, pero en algunas realizaciones contendrá una heterogeneidad minoritaria. Esta heterogeneidad se encuentra típicamente en los extremos del polímero o porciones no críticas para una función o actividad biológica deseada.

20 Un ácido nucleico "recombinante" se define por su método de producción o bien por su estructura. En referencia a su método de producción, p. ej., un producto hecho por un procedimiento, el procedimiento es el uso de técnicas de ácidos nucleicos recombinantes, p. ej. que implican la intervención humana en la secuencia de nucleótidos, típicamente selección o producción. Alternativamente, puede ser un ácido nucleico hecho generando una secuencia que comprende la fusión de dos fragmentos que no son naturalmente contiguos entre sí, pero se entiende que excluye productos de la naturaleza, por ejemplo mutantes naturales. Así, por ejemplo, están comprendidos productos hechos transformando células con cualquier vector no natural, como son los ácidos nucleicos que comprenden una secuencia derivada usando cualquier procedimiento de oligonucleótidos sintéticos. Esto se hace frecuentemente para reemplazar un codón con un codón redundante que codifica el mismo aminoácido o un aminoácido conservador, introduciendo o eliminando típicamente al mismo tiempo un sitio de reconocimiento de la secuencia.

25 Alternativamente, se realiza para unir segmentos de ácidos nucleicos de funciones deseadas, para generar una única entidad genética que comprende una combinación de funciones deseada que no se encuentra en las formas naturales disponibles normalmente. Los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción son frecuentemente la diana de tales manipulaciones artificiales, pero pueden incorporarse mediante diseño otras dianas específicas del sitio, p. ej. promotores, sitios de replicación de DNA, secuencias de regulación, secuencias de control, u otras características útiles. Se supone un concepto similar para un polipéptido recombinante, p. ej. de fusión. Están específicamente incluidos ácidos nucleicos sintéticos que, por redundancia del código genético, codifican polipéptidos similares a fragmentos de estos antígenos, y fusiones de secuencias de diversas variantes de especie distintas.

35 Un "fragmento" significativo en el contexto de un ácido nucleico es un segmento contiguo de al menos aproximadamente 17 nucleótidos, generalmente al menos 20 nucleótidos, más generalmente al menos 23 nucleótidos, ordinariamente al menos 26 nucleótidos, más ordinariamente al menos 29 nucleótidos, frecuentemente al menos 32 nucleótidos, más frecuentemente al menos 35 nucleótidos, típicamente al menos 38 nucleótidos, más típicamente al menos 41 nucleótidos, usualmente al menos 44 nucleótidos, más usualmente al menos 47 nucleótidos, preferentemente al menos 50 nucleótidos, más preferentemente al menos 53 nucleótidos, y en realizaciones particularmente preferidas será al menos 56 nucleótidos o más.

45 Un DNA que codifica una proteína ligando de Flt3 será particularmente útil para identificar especies de genes, mRNA y cDNA que codifican ligando relacionados u homólogos, así como DNAs que codifican proteínas homólogas procedentes de especies diferentes. Probablemente hay homólogos en otras especies, incluyendo primates. Varias proteínas de ligando de Flt3 deben ser homólogas. Sin embargo, incluso las proteínas que tienen una relación evolutiva más distante respecto del ligando pueden ser aisladas fácilmente bajo condiciones apropiadas usando estas secuencias si son suficientemente homólogas. Las proteínas de ligando de Flt3 de primate son de especial interés.

50 Esta invención se refiere además a moléculas de DNA recombinante y fragmentos que tienen una secuencia de DNA idéntica o muy homóloga respecto a los DNAs aislados expuestos en el presente texto. En particular, las secuencias estarán con frecuencia unidas operativamente a segmentos de DNA que controlan la transcripción, la traducción y la replicación del DNA. Alternativamente, clones recombinantes derivados de las secuencias genómicas, p. ej. que contienen intrones, serán útiles para estudios transgénicos, incluyendo p. ej. células y organismos transgénicos, y para terapia génica. Véanse, p. ej., Goodnow (1992) "Transgenic Animals" en Roitt (ed.) *Encyclopedia of Immunology* Academic Press, San Diego, pág. 1502-1504; Travis (1992) *Science* 256: 1392-1394; Kuhn et al. (1991) *Science* 254: 707-710; Capecchi (1989) *Science* 244: 1288; Robertson (1987) (ed.) *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach* IRL Press, Oxford; y Rosenberg (1992) *J. Clinical Oncology* 10: 180-199.

60 Las secuencias homólogas de ácidos nucleicos, al compararlas, muestran una similitud significativa. Los patrones para la homología en ácidos nucleicos son medidas de homología usadas generalmente en la técnica por comparación de secuencias o bien se basan en condiciones de hibridación. Las condiciones de hibridación se describen con más detalle a continuación.

65 Homología sustancial en el contexto de la comparación de secuencias de ácidos nucleicos significa que, bien los segmentos o bien sus cadenas complementarias, al hacer la comparación, son idénticos cuando se alinean óptimamente, con las apropiadas inserciones o deleciones de nucleótidos, en al menos aproximadamente el 50% de los nucleótidos,

ES 2 150 495 T5

generalmente en al menos el 56%, más generalmente en al menos el 59%, ordinariamente en al menos el 62%, más ordinariamente en al menos el 65%, frecuentemente en al menos el 68%, más frecuentemente en al menos el 71%, típicamente en al menos el 74%, más típicamente en al menos el 77%, usualmente en al menos el 80%, más usualmente en al menos aproximadamente el 85%, preferentemente en al menos aproximadamente el 90%, más preferentemente en al menos aproximadamente del 95 al 98% o más, y, en realizaciones concretas, tan alta como aproximadamente el 99% de los nucleótidos o más.

Alternativamente, existe homología sustancial cuando los segmentos se hibriden, bajo condiciones de hibridación selectivas, con una cadena, o su complemento, típicamente usando una secuencia derivada de la Tabla 2. Típicamente, la hibridación selectiva ocurrirá cuando haya al menos aproximadamente un 55% de homología en una extensión de al menos aproximadamente 30 nucleótidos, preferentemente al menos aproximadamente 65% en una extensión de al menos aproximadamente 25 nucleótidos, más preferentemente al menos aproximadamente 75%, y lo más preferentemente al menos aproximadamente 90%, sobre aproximadamente 20 nucleótidos. Véase Kanehisa (1984) *Nuc. Acids Res.* 12: 203-213.

La longitud de comparación de homología, como se ha descrito, puede ser sobre extensiones más largas, y en ciertas realizaciones será sobre una extensión de al menos aproximadamente 17 nucleótidos, usualmente al menos aproximadamente 20 nucleótidos, más usualmente al menos aproximadamente 24 nucleótidos, típicamente al menos aproximadamente 28 nucleótidos, más típicamente al menos aproximadamente 40 nucleótidos, preferentemente al menos aproximadamente 50 nucleótidos, y más preferentemente al menos aproximadamente de 75 a 100 nucleótidos o más.

Las condiciones restrictivas, en referencia a la homología en el contexto de la hibridación, serán condiciones restrictivas combinadas de sal, temperatura, disolventes orgánicos y otros parámetros, típicamente los controlados en las reacciones de hibridación. Las condiciones de temperatura restrictivas incluirán usualmente temperaturas por encima de aproximadamente 30°C, más usualmente por encima de aproximadamente 37°C, típicamente por encima de aproximadamente 45°C, más típicamente por encima de aproximadamente 55°C, preferentemente por encima de aproximadamente 65°C, y más preferentemente por encima de aproximadamente 70°C. Las condiciones salinas restrictivas serán ordinariamente menos que aproximadamente 1000 mM, usualmente menos que aproximadamente 500 mM, más usualmente menos que aproximadamente 400 mM, típicamente menos que aproximadamente 300 mM, preferentemente menos que aproximadamente 200 mM, y más preferentemente menos que aproximadamente 150 mM. Sin embargo, la combinación de parámetros es mucho más importante que la medida de cualquier parámetro individual. Véase, p. ej., Wetmur y Davidson (1968) *J. Mol. Biol.* 31: 349-370.

El ligando de Flt3 de otra especie de mamífero puede ser clonado y aislado por hibridación de especies cruzadas de especies estrechamente relacionadas. Véase, p. ej., más adelante. La homología puede ser relativamente baja entre especies lejanamente relacionadas y por ello es aconsejable la hibridación de especies relacionadas de forma relativamente próxima. Alternativamente, la preparación de un preparado de anticuerpo que muestre menos especificidad por la especie puede ser útil en planteamientos de clonación de expresión.

Preparación de ligando de Flt3: miméticos

El DNA que codifica el ligando de Flt3 o fragmentos del mismo puede ser obtenido por síntesis química, cribado de genotecas de cDNA o por cribado de genotecas preparadas a partir de una amplia variedad de líneas de células o muestras de tejidos.

Este DNA puede ser expresado en una amplia variedad de células hospedadoras para la síntesis de un ligando de longitud completa, o fragmentos, que a su vez pueden ser utilizados, por ejemplo, para generar anticuerpos monoclonales o policlonales, para estudios de unión, para la construcción y la expresión de moléculas modificadas, y para estudios de estructura/función. Cada antígeno, o sus fragmentos, puede ser expresado en células hospedadoras que son transformadas o transfectadas con vectores de expresión apropiados. Estas moléculas pueden ser sustancialmente purificadas para que queden libres de contaminantes proteicos o celulares distintos de los derivados del hospedador recombinante, y por tanto son particularmente útiles en composiciones farmacéuticas cuando se combinan con un vehículo y/o diluyente aceptable farmacéuticamente. El antígeno, o porciones del mismo, puede ser expresado como fusiones con otras proteínas.

Los vectores de expresión son típicamente construcciones de DNA o RNA auto-replicantes que contienen el gen del antígeno deseado o sus fragmentos, usualmente unido operativamente a elementos de control genético adecuados que son reconocidos en una célula hospedadora adecuada. Estos elementos de control son capaces de efectuar la expresión dentro de un hospedador adecuado. El tipo específico de elementos de control necesarios para realizar la expresión dependerá de la célula hospedadora que se haya usado en su caso. Generalmente, los elementos de control genético pueden incluir un sistema promotor procariótico o un sistema de control de la expresión de promotor eucariótico, y típicamente incluyen un promotor transcripcional, un operador adicional para controlar el establecimientos de la transcripción, potenciadores de la transcripción para elevar el nivel de expresión del mRNA, una secuencia que codifica un sitio de unión con el ribosoma adecuado, y secuencias que terminan la transcripción y la traducción. Los vectores de expresión también contienen usualmente un origen de la replicación que permite que el vector se replique independientemente de la célula hospedadora.

Los vectores de esta invención contienen DNA que codifica un ligando de Flt3 del segundo aspecto, que típicamente codifica un polipéptido activo biológicamente. El DNA puede estar bajo el control de un promotor viral y puede codificar un marcador de selección. Esta invención contempla además el uso de tales vectores de expresión que son capaces de expresar cDNA eucariótico que codifica un ligando de Flt3 en un hospedador procariótico o eucariótico, en donde el vector es compatible con el hospedador y en donde el cDNA eucariótico que codifica el ligando es insertado en el vector de forma que el desarrollo del hospedador que contiene el vector expresa el cDNA en cuestión. Usualmente, los vectores de expresión se diseñan para replicación estable en sus células hospedadoras o para amplificación para aumentar en gran medida el número total de copias del gen deseable por célula. No siempre es necesario el requisito de que un vector de expresión se replique en una célula hospedadora, p. ej. es posible realizar la expresión transitoria del ligando o sus fragmentos en varios hospedadores usando vectores que no contienen un origen de la replicación que sea reconocido por la célula hospedadora. También es posible usar vectores que produzcan la integración de un gen del ligando de Flt3 o sus fragmentos en el DNA del hospedador por recombinación, o integrar un promotor que controle la expresión de un gen endógeno.

Los vectores, como se usa en el presente texto, comprenden plásmidos, virus, bacteriófagos, fragmentos de DNA integrables y otros vehículos que permiten la integración de fragmentos de DNA en el genoma del hospedador. Los vectores de expresión son vectores especializados que contienen elementos de control genético que efectúan la expresión de genes enlazados operativamente. Los plásmidos son la forma de vector usada más comúnmente, pero son adecuadas para ser usadas en la presente invención todas las demás formas de vectores que sirvan para una función equivalente y que son o van a ser conocidas en la técnica. Véanse, p. ej., Pouwels *et al.* (1985 y suplementos) *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., y Rodriguez *et al.* (1988) (ed.) *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworth, Boston, MA.

Las células transformadas incluyen células, preferentemente de mamífero, que han sido transformadas o transfectadas con vectores que contienen el gen del ligando de Flt3 construidos usando técnicas de DNA recombinante. Las células hospedadoras transformadas expresan usualmente el ligando o sus fragmentos pero, para los propósitos de la clonación, la amplificación y la manipulación de su DNA, no necesitan expresar la proteína. Esta invención contempla además cultivar células transformadas en un medio nutriente, permitiendo así que la proteína se acumule en el cultivo. La proteína puede ser recuperada, bien sea del cultivo o bien del medio de cultivo.

Para los fines de esta invención, las secuencias de DNA están unidas operativamente cuando están relacionadas funcionalmente entre ellas. Por ejemplo, el DNA para una presecuencia o conductor secretorio está unido operativamente a un polipéptido si se expresa como una preproteína o participa en dirigir al polipéptido a la membrana de la célula o en la secreción del polipéptido. Un promotor está unido operativamente a una secuencia de codificación si controla la transcripción del polipéptido; un sitio de unión con el ribosoma está unido operativamente a una secuencia de codificación si está situado para permitir la traducción. Usualmente, unido operativamente significa contiguo y en el marco de lectura, aunque ciertos elementos genéticos tales como genes represores no están unidos de forma contigua pero se unen aún a secuencias operadoras que a su vez controlan la expresión.

Las células hospedadoras adecuadas incluyen procariotas, eucariotas inferiores y eucariotas superiores. Los procariotas incluyen tanto los organismos gram negativos como los gram positivos, p. ej. *E. coli* y *B. subtilis*. Los eucariotas inferiores incluyen levaduras, p. ej. *S. cerevisiae* y *Pichia*, y especies del género *Dictyostelium*. Los eucariotas superiores incluyen líneas de células de cultivo de tejidos establecidas procedentes de células de animales, tanto procedentes de no mamíferos, p. ej. células de insectos y aves, como de mamíferos, por ejemplo personas, primates y roedores.

Los sistemas hospedador procariótico-vector incluyen una amplia variedad de vectores para muchas especies diferentes. Como se usa en el presente texto, *E. coli* y sus vectores se usan genéricamente para incluir vectores equivalentes usados en otros procariotas. Un vector representativo para amplificar DNA es pBR322 o muchos de sus derivados. Los vectores que pueden usarse para expresar los ligandos de Flt3 o sus fragmentos incluyen, pero sin limitarse a ellos, vectores tales como los que contienen el promotor lac (serie pUC), el promotor trp (pBR322-trp), el promotor Ipp (la serie pIN), los promotores lambda-pP o pR (pOTS), o promotores híbridos tales como ptac (pDR540). Véase Brosius *et al.* (1988) "Expression Vectors Employing Lambda-, trp-, lac- and Ipp-derived Promoters", en Rodriguez y Denhardt (ed.) *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworth, Boston, capítulo 10, pág. 205-236.

Los eucariotas inferiores, p. ej. levaduras y *Dictyostelium*, pueden ser transformados con vectores que contienen la secuencia del ligando de Flt3. Para los fines de esta invención, el hospedador eucariótico inferior más común es la levadura de panadería, *Saccharomyces cerevisiae*. Se usará para representar genéricamente eucariotas inferiores, aunque también están disponibles otras varias cepas y especies distintas. Los vectores de levadura constan típicamente de un origen de replicación (a menos que sea del tipo de integración), un gen de selección, un promotor, DNA que codifica la proteína deseada o sus fragmentos, y secuencias para la terminación de la traducción, poliadenilación y terminación de la transcripción.

Los vectores de expresión adecuados para levadura incluyen promotores constituyentes tales como promotores génicos de 3-fosfoglicerato quinasa y otras varias enzimas glicolíticas o promotores inducibles tales como el promotor de alcohol deshidrogenasa 2 o promotor de metalotionina. Los vectores adecuados incluyen derivados de los tipos siguientes: bajo número de copias auto-replicantes (tales como la serie YRp), alto número de copias auto-replicantes (tales como la serie YEp); tipos integrantes (tales como la serie YIp) o mino-cromosomas (tales como la serie YCp).

ES 2 150 495 T5

Las células de cultivos de tejidos eucarióticas superiores son las células hospedadoras preferidas para la expresión de la proteína del ligando de Flt3 funcionalmente activa. En principio, es aprovechable cualquier línea de células de cultivo de tejidos eucarióticas superiores, p. ej. sistemas de expresión de baculovirus de insectos, de fuentes de invertebrados o de vertebrados. Sin embargo, se prefieren las células de mamíferos en el procesamiento co-traduccionally y post-traduccionally. La transformación o transfección y propagación de tales células se han convertido en un procedimiento de rutina.

Los ejemplos de líneas de células útiles incluyen células HeLa, líneas de células de ovario de hamster chino (CHO), líneas de células de riñón de cachorro de rata (BRK), líneas de células de insectos, líneas de células de aves y líneas de células de mono (COS). Los vectores de expresión para tales líneas de células incluyen usualmente un origen de la replicación, un promotor, un sitio de iniciación de la traducción, sitios de empalme de RNA (si se usa DNA genómico), un sitio de poliadenilación y un sitio de terminación de la transcripción. Estos vectores contienen también usualmente un gen de selección o gen de amplificación.

Vectores de expresión adecuados pueden ser plásmidos, virus, o retrovirus que llevan promotores derivados, p. ej., de fuentes tales como adenovirus, SV40, parvovirus, virus vaccinia o citomegalovirus. Los ejemplos representativos de vectores de expresión adecuados incluyen pCDNA1; pCD, véase Okayama *et al.* (1985) *Mol. Cell Biol.* 5: 1136-1142; pMC1neo Poly-A, véase Thomas *et al.* (1987) *Cell* 51:503-512, y un vector de baculovirus tal como pAC 373 o pAC 610.

Frecuentemente se deseará expresar un polipéptido ligando de Flt3 en un sistema que proporciona un patrón de glicosilación específico o definido. En este caso, el patrón usual será el proporcionado de forma natural por el sistema de expresión. Sin embargo, el patrón será modificable exponiendo el polipéptido, p. ej. una forma no glicosilada, a proteínas de glicosilación apropiadas introducidas en un sistema de expresión heterólogo. Por ejemplo, el gen del ligando de Flt3 puede ser co-transformado con uno o más genes que codifican enzimas de mamíferos o otras enzimas de glicosilación. Usando este planteamiento, ciertos patrones de glicosilación de mamífero serán alcanzables o aproximados en células procariontas u otras células.

El ligando de Flt3, o un fragmento del mismo, puede ser construido por ingeniería genética para ser un fosfatidil inositol (PI) unido a una membrana celular, pero puede ser eliminado de las membranas por tratamiento con una enzima de segmentación del fosfatidil inositol, p. ej. fosfatidil inositol fosfolipasa-C. Esta libera el antígeno en una forma biológicamente activa y permite la purificación por procedimientos estándar de la química de las proteínas. Véanse, p. ej., Low (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 988:427-454; Tse *et al.* (1985) *Science* 230:1003-1008; y Brunner *et al.* (1991) *J. Cell Biol.* 114:1275-1283.

Ahora que el ligando de Flt3 ha sido caracterizado, pueden prepararse fragmentos o derivados del mismo por procedimientos convencionales para sintetizar péptidos. Estos incluyen procedimientos tales como los descritos en Stewart y Young (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; Bodanszky y Bodanszky (1984) *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Nueva York; y Bodanszky (1984) *The Principles of Peptide Synthesis*, Springer Verlag, Nueva York.

Por ejemplo, pueden usarse un procedimiento con azida, un procedimiento con ácido clorhídrico, un procedimiento con anhídrido de ácido, un procedimiento con anhídrido mixto, un procedimiento con éster activo (p. ej. éster de p-nitrofenilo, éster de N-hidroxisuccinimida, o éster de cianometilo), un procedimiento de carbodiimidazol, un procedimiento oxidante-reductor, o un procedimiento de diciclohexilcarbodiimida (DCCD)/aditivo. Las síntesis en fase sólida y en fase solución son aplicables ambas para los procedimientos anteriores.

El ligando de Flt3, los fragmentos o los derivados se preparan adecuadamente de acuerdo con los procedimientos anteriores, como se aplican típicamente en la síntesis de péptidos, generalmente mediante un llamado proceso en etapas que comprende condensar un aminoácido al aminoácido terminal, uno a uno secuencialmente, o bien acoplando fragmentos de péptidos al aminoácido terminal. Los grupos amino que no están siendo usados en la reacción de acoplamiento son típicamente protegidos para evitar el acoplamiento en una posición incorrecta.

Si se adopta una síntesis en fase sólida, el aminoácido C-terminal se une a un portador o soporte insoluble a través de su grupo carboxilo. El portador insoluble no está particularmente limitado siempre y cuando tenga la capacidad de unirse a un grupo carboxilo reactivo. Los ejemplos de tales portadores insolubles incluyen resinas de halometilo, tales como resina de clorometilo o resina de bromometilo, resinas de hidroximetilo, resinas de fenol, resinas terciarioalcoxycarbonil-hidrazidadas, y similares.

Un aminoácido con el grupo amino protegido se une en secuencia mediante condensación de su grupo carboxilo activado y el grupo amino reactivo del péptido o de la cadena formados anteriormente, para sintetizar el péptido paso a paso. Después de sintetizar la secuencia completa, el péptido se desprende del portador insoluble para producir el péptido. Este planteamiento en fase sólida es descrito de un modo general por Merrifield *et al.* (1963) en *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2156.

El ligando preparado y los fragmentos del mismo pueden ser aislados y purificados de la mezcla de reacción mediante separación de péptidos, por ejemplo por extracción, precipitación, electroforesis y diversas formas de cromatografía, y similares. Los ligandos de Flt3 de esta invención pueden ser obtenidos en grados de pureza variables,

dependiendo del uso deseado. La purificación puede realizarse usando las técnicas de purificación de proteínas descritas en el presente texto o usando los anticuerpos descritos en el presente texto en cromatografía de afinidad con inmunoabsorbente.

5 Esta cromatografía de afinidad con inmunoabsorbente se lleva a cabo uniendo primero los anticuerpos a un soporte sólido y después poniendo en contacto los anticuerpos unidos con lisados solubilizados de células fuente apropiadas, lisados de otras células que expresan el ligando, o lisados o sobrenadantes de células que producen el ligando de Flt3 como resultado de técnicas de DNA (véase más adelante).

10 *Usos*

La presente invención proporciona reactivos que encontrarán empleo en aplicaciones para diagnóstico como se describe en otra parte en el presente texto, p. ej. en la descripción general para anomalías de desarrollo, o más adelante en la descripción de *kits* para diagnóstico.

15 Esta invención proporciona también reactivos con un gran valor terapéutico. El ligando de Flt3 (de origen natural o recombinante), fragmentos del mismo y anticuerpos contra el mismo, junto con compuestos identificados como poseedores de afinidad de unión con el ligando de Flt3, deben de ser útiles en el tratamiento de condiciones asociadas con la fisiología o el desarrollo anormales, incluyendo la proliferación anormal, p. ej. en condiciones cancerosas, o
20 condiciones degenerativas. En particular, la modulación del desarrollo de células linfoides es probable, pero la más amplia distribución de tejido en tejidos no linfoides, p. ej. gónadas y células neurales, sugiere que el desarrollo de esos tejidos presentará igualmente respuesta.

25 La proliferación anormal, regeneración, degeneración y atrofia pueden ser moduladas por un tratamiento terapéutico apropiado usando las composiciones proporcionadas por esta invención. Por ejemplo, una enfermedad o un trastorno asociados con la expresión anormal o la señalización anormal por un ligando de Flt3 debe ser una diana probable para un agonista o antagonista del ligando. El ligando desempeña probablemente un papel en la regulación o desarrollo de células hematopoiéticas, p. ej. células linfoides, que afectan a respuestas inmunológicas, p. ej. trastornos autoinmunes.

30 Se conocen otras condiciones de desarrollo anormal en cada uno de los tipos de células que se ha demostrado que poseen mRNA de receptor de Flt3 por análisis de transferencia Northern. Véanse Berkow (ed.) *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, Merck and Co., Rahway, NJ.; y Thorn *et al.*, *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill, N-Y. Por ejemplo, anomalías neurales y cerebrales existen, p. ej. en enfermedades cerebrovasculares, neoplasmas del CNS, enfermedades desmielinizantes y distrofias musculares. Trastornos hepáticos, trastornos
35 renales, trastornos cardiopulmonares y otros problemas producen frecuentemente síntomas médicos. Estos problemas pueden ser susceptibles de prevención o tratamiento usando composiciones proporcionadas por la presente invención.

40 Pueden purificarse y después administrarse a un paciente Flt3 recombinante o anticuerpos del ligando de Flt3. Estos reactivos pueden combinarse para uso terapéutico con ingredientes activos o inertes adicionales, p. ej. en vehículos o diluyentes convencionales aceptables farmacéuticamente, p. ej. coadyuvantes inmunógenos, junto con estabilizantes y excipientes fisiológicamente inocuos. Estas combinaciones pueden someterse a filtración esterilizante y ponerse en formas de dosificación, por ejemplo mediante liofilización en viales de dosificación, o almacenamiento en preparados
45 acuosos estabilizados. Esta invención contempla también el uso de anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos, incluyendo formas que no son unión de complemento.

Puede llevarse a cabo un cribado de fármacos usando receptor de Flt3 o fragmentos del mismo, para identificar compuestos que tienen afinidad de unión con el ligando de Flt3, incluyendo el aislamiento de componentes asociados.
50 Después pueden utilizarse ensayos biológicos subsiguientes para determinar si el compuesto tiene actividad estimuladora intrínseca y por tanto es un bloqueante o antagonista por cuanto bloquea la actividad del ligando. Del mismo modo, un compuesto que tiene actividad estimuladora intrínseca puede activar al receptor y por tanto es un agonista por cuanto estimula la actividad de ligando de Flt3. Esta invención contempla además el uso terapéutico de anticuerpos contra ligando de Flt3 como antagonistas. Esta solución debe ser particularmente útil con otras variantes de especie
55 del ligando de Flt3.

Las cantidades de reactivos necesarias para una terapia efectiva dependerán de muchos factores distintos, incluyendo los medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, y otros medicamentos administrados. Así, las dosificaciones de tratamiento deben ser valoradas para optimizar la seguridad y la eficacia. Típicamente, las dosifi-
60 caciones usadas *in vitro* pueden proporcionar una guía útil en las cantidades útiles para administración *in situ* de estos reactivos. La prueba con animales de las dosis efectivas para el tratamiento de trastornos particulares, proporcionará una mayor indicación predictiva de la dosificación en personas.

Se describen varias consideraciones, p. ej., en Gilman *et al.* (ed.) (1990) *The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 8th ed., Pergamon Press; y Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 17th ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn. En esos textos se discuten métodos para la administración, p. ej. para administración oral, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular, difusión transdérmica y otros.

ES 2 150 495 T5

Los vehículos aceptables farmacéuticamente incluyen agua, solución salina, tampones y otros compuestos descritos, p. ej., en el *Merck Index*, Merck and Co., Rahway, New Jersey. Puede esperarse que los márgenes de dosificación estén de ordinario en cantidades inferiores a concentraciones de 1 mM, típicamente menor que aproximadamente 10 μ M, habitualmente menor que aproximadamente 100 nM, preferentemente menor que aproximadamente 10 pM (picomolar) y lo más preferentemente menor que aproximadamente 1 fM (femtomolar), con un vehículo apropiado. Frecuentemente se utilizarán, para administración continua, formulaciones de liberación lenta, o un aparato para liberación lenta.

El ligando de Flt3, fragmentos del mismo, y anticuerpos contra él o sus fragmentos, antagonistas y agonistas, pueden ser administrados directamente al hospedador a tratar o, dependiendo del tamaño de los compuestos, puede ser deseable conjugarlos con proteínas portadoras, tales como ovoalbúmina o seroalbúmina, antes de su administración. Las formulaciones terapéuticas pueden ser administradas en cualquier formulación de dosificación convencional.

Aunque es posible administrar sólo el ingrediente activo, es preferible presentarlo como formulación farmacéutica. Las formulaciones comprenden típicamente al menos un ingrediente activo, como se define anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables para los mismos. Todo vehículo debe ser aceptable tanto farmacéutica como fisiológicamente, en el sentido de que ha de ser compatible con los otros ingredientes y no ser nocivo para el paciente. Las formulaciones incluyen aquellas que son adecuadas para administración oral, rectal, nasal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica).

Las formulaciones pueden ser presentadas convenientemente en forma de unidad de dosificación y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Véanse Gilman *et al.* (ed.) (1990). *The Pharmacological Bases of Therapeutics*, *supra*, y Remington's *Pharmaceutical Sciences*, *supra*; Avis *et al.* (ed.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications* Dekker, Nueva York; Lieberman *et al.* (ed.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Dekker, Nueva York; y Lieberman *et al.* (ed.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Dekker, Nueva York. La terapia de esta invención puede ser combinada o usada en asociación con otros agentes quimioterapéuticos o quimiopreventivos.

Tanto la forma de origen natural como la recombinante de los ligandos de Flt3 de esta invención son particularmente útiles en *kits* y métodos de ensayo que son capaces de cribar compuestos en cuanto a la actividad de unión con las proteínas. En los últimos años se han desarrollado varios métodos de automatización de ensayos, para permitir el cribado de decenas de miles de compuestos en un breve periodo. Véase, p. ej., Fodor *et al.* (1991) *Science* 251:767-773, que describe medios para ensayar la afinidad de unión mediante una diversidad de polímeros definidos sintetizados sobre un sustrato sólido. El desarrollo de ensayos adecuados puede ser facilitado en gran medida por la disponibilidad de grandes cantidades de ligando de Flt3 soluble purificado, proporcionado por esta invención.

Por ejemplo, normalmente pueden encontrarse antagonistas una vez que el ligando ha sido definido estructuralmente. La prueba de análogos de ligando potenciales es ahora posible por el desarrollo de métodos de ensayo altamente automatizados que utilizan un receptor de Flt3 purificado. En particular, se descubrirán nuevos agonistas y antagonistas usando técnicas de cribado descritas en el presente texto. De importancia particular son compuestos que se ha encontrado que tienen una afinidad de unión combinada para múltiples receptores de Flt3, p. ej. compuestos que pueden servir como antagonistas para variantes de especie del ligando de Flt3.

Esta invención es particularmente útil para el cribado de compuestos usando receptores recombinantes en cualquiera de una diversidad de técnicas de cribado de fármacos. Las ventajas de usar una proteína recombinante en el cribado en cuanto a ligandos específicos incluye: (a) fuente renovable mejorada del receptor de Flt3 a partir de una fuente específica; (b) potencialmente mayor número de ligandos por célula, que dan una mejor relación señal ruido en los ensayos; y (c) especificidad de variantes de especie (que da teóricamente mayor especificidad biológica y de la enfermedad).

Un método de cribado de fármacos utiliza células hospedadoras eucariotas o procariotas que son transformadas establemente con moléculas de DNA recombinante que expresan el receptor de Flt3. Pueden aislarse células que expresan un receptor en aislamiento a partir de cualquier otra. Tales células, bien sea en forma viable o fija, pueden usarse para ensayos estándar de unión ligando/receptor. Véanse también Parce *et al.* (1989) *Science* 246:243-247, y Owicki *et al.* (1990) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87:4007-4011 describen métodos sensibles para detectar respuestas celulares.

Son particularmente útiles los ensayos competitivos en los que las células (fuente de ligando de Flt3) se ponen en contacto y se incuban con un receptor marcado o anticuerpo que tiene una afinidad de unión con el ligando conocida, tal como anticuerpo- 125 I, y una muestra de ensayo cuya afinidad de unión con la composición de unión se está midiendo. Después se separan las composiciones de unión marcadas, unidas y libres, para evaluar el grado de unión del ligando.

La cantidad de compuesto de ensayo unido es inversamente proporcional a la cantidad de receptor marcado que se une a la fuente conocida. Puede usarse una cualquiera de las numerosas técnicas para separar el ligando unido del libre, para evaluar el grado de unión del ligando. Esta etapa de separación podría implicar típicamente un procedimiento tal como la adhesión a filtros seguida de lavado, adhesión a plásticos seguida de lavado, o centrifugación de las membranas celulares. También podrían usarse células viables para hacer un cribado en cuanto a los efectos de fármacos sobre funciones mediadas por el ligando de Flt3, p. ej. los niveles de segundo mensajero, es decir Ca^{++} ; proliferación celular;

ES 2 150 495 T5

cambios del *pool* de inositol fosfato; y otros. Algunos métodos de detección permiten la eliminación de una etapa de separación, p. ej. un sistema de detección sensible de proximidad. Los colorantes sensibles al calcio serán útiles para detectar niveles de Ca^{++} , con un fluorímetro o un aparato de clasificación de células por fluorescencia.

5 Otro método utiliza membranas procedentes de células hospedadoras eucariotas o procariotas transformadas, como fuente de ligando de Flt3. Estas células son transformadas establemente con vectores de DNA que dirigen la expresión de un ligando de Flt3, p. ej. una forma unida a la membrana de ingeniería genética. Esencialmente, las membranas se separarían de las células y se usarían en cualquier ensayo de unión de receptor/ligando tal como el ensayo competitivo expuesto anteriormente.

10 Otro planteamiento más es usar ligando de Flt3 solubilizado no purificado o solubilizado purificado procedente de células hospedadoras procariotas o eucariotas transformadas. Esto permite un ensayo de unión "molecular" con las ventajas de una mayor especificidad, la capacidad de automatizarse y una elevada capacidad de ensayo de fármacos.

15 Otra técnica para el cribado de fármacos implica un planteamiento que proporciona una elevada capacidad de cribado para compuestos que tienen una adecuada afinidad de unión con el receptor de Flt3 y se describe con detalle en Geysen, solicitud de patente europea 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. En primer lugar, se sintetiza un gran número de diferentes compuestos de ensayo peptídicos pequeños, sobre un sustrato sólido, p. ej. púas de plástico o alguna otra superficie apropiada. Después todas las púas se hacen reaccionar con receptor de Flt3 solubilizado no purificado o solubilizado purificado, y se lavan. La siguiente etapa implica detectar la unión del receptor de Flt3.

20 El diseño racional de fármacos puede basarse también en estudios estructurales de las formas moleculares del ligando de Flt3 y otros efectores o análogos. Los efectores pueden ser otras proteínas que median otras funciones en respuesta a la unión del ligando, u otras proteínas que normalmente interaccionan con el receptor. Un medio para determinar qué sitios interaccionan con otras proteínas específicas es una determinación de la estructura física, p. ej. cristalografía de rayos X o técnicas de NMR bidimensionales. Esto proporcionará una orientación en cuanto a qué restos de aminoácidos forman las regiones de contacto molecular. Para una descripción detallada de la determinación estructural de proteínas, véase, p. ej., Blundell y Johnson (1976) *Protein Crystallography*, Academic Press, Nueva York.

30 El ligando de Flt3 purificado puede ser aplicado como recubrimiento directamente sobre placas para ser usadas en las técnicas de cribado de fármacos antes mencionadas. Sin embargo, pueden usarse anticuerpos no neutralizantes contra estos ligandos como anticuerpos de captura para inmovilizar sobre la fase sólida al ligando correspondiente.

35 *Kits*

Esta invención contempla también el uso de proteínas de ligando de Flt3, fragmentos de las mismas, péptidos y sus productos de fusión, en una diversidad de *kits* para diagnóstico y métodos para detectar la presencia de ligando o un receptor de Flt3. Típicamente el *kit* tendrá un compartimento que contiene un péptido de ligando de Flt3 definido o bien un segmento génico o un reactivo que reconoce a uno o a otro, p. ej. fragmentos de receptor o anticuerpos.

40 Un *kit* para determinar la afinidad de unión de un compuesto de ensayo con un ligando de Flt3 comprendería típicamente un compuesto de ensayo; un compuesto marcado, por ejemplo un receptor o anticuerpo que tiene una afinidad de unión con el ligando conocida; una fuente de ligando de Flt3 (de origen natural o recombinante); y un medio para separar el compuesto marcado unido del libre, tal como una fase sólida para inmovilizar el ligando. Una vez que los compuestos han sido cribados, aquellos que tienen la adecuada afinidad de unión con el ligando pueden ser evaluados en ensayos biológicos adecuados, como es bien sabido en la técnica, para determinar si actúan como agonistas o como antagonistas respecto del receptor. La disponibilidad de polipéptidos del ligando de Flt3 recombinantes proporciona también patrones bien definidos para calibrar tales ensayos.

50 Un *kit* preferido para determinar la concentración, por ejemplo, de un ligando de Flt3 en una muestra, comprendería típicamente un compuesto marcado, p. ej. un receptor o un anticuerpo, que tiene una afinidad de unión para el ligando conocida, una fuente de ligando (de origen natural o recombinante) y un medio para separar el compuesto marcado unido del libre, por ejemplo una fase sólida para inmovilizar el ligando de Flt3. Normalmente se proporcionarán compartimentos que contienen los reactivos, e instrucciones.

60 Los anticuerpos, incluyendo los fragmentos de unión con el antígeno, específicos para el ligando de Flt3 o fragmentos del ligando, son útiles en aplicaciones de diagnóstico para detectar la presencia de niveles elevados de ligando de Flt3 y/o sus fragmentos. Tales ensayos de diagnóstico pueden emplear lisados, células vivas, células fijadas, inmunofluorescencia, cultivos celulares, fluidos corporales y además pueden implicar la detección de antígenos relacionados con el ligando en suero, o similares. Los ensayos para diagnóstico pueden ser homogéneos (sin una etapa de separación entre reactivo libre y complejo antígeno-ligando) o heterogéneos (con una etapa de separación). Existen varios ensayos comerciales tales como radioinmunoensayo (RIA), ensayo de inmunosorbente ligado a una enzima (ELISA), inmunoensayo enzimático (EIA), técnica de inmunoensayo multiplicado por una enzima (EMIT), inmunoensayo de fluorescencia marcado en un sustrato (SLFIA), y similares. Por ejemplo, pueden emplearse anticuerpos no marcados usando un segundo anticuerpo que está marcado y que reconoce al anticuerpo contra un ligando de Flt3 o contra un fragmento concreto del mismo. Ensayos similares han sido también ampliamente discutidos en la bibliografía. Véase, p. ej., Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH.

ES 2 150 495 T5

Los anticuerpos anti-idiotípicos pueden tener un uso similar para diagnosticar la presencia de anticuerpos contra un ligando de Flt3, ya que tal puede ser diagnóstico de varios estados anormales. Por ejemplo, la superproducción de ligando de Flt3 puede tener por resultado la producción de varias reacciones inmunológicas que pueden ser diagnóstico de estados fisiológicos anormales, en particular en condiciones de células proliferantes tales como cáncer o diferenciación anormal.

Frecuentemente, los reactivos para ensayos de diagnóstico se suministran en *kits* o estuches para optimizar la sensibilidad del ensayo. Para la presente invención, dependiendo de la naturaleza del ensayo, del protocolo y del marcador, se proporciona anticuerpo o receptor bien sea marcado o no marcado, o ligando de Flt3 marcado. Normalmente esto es juntamente con otros aditivos, tales como tampones, estabilizantes, materiales necesarios para la producción de señal tales como sustratos para enzimas, y similares. Preferentemente, el *kit* tiene compartimentos para cada reactivo útil. Deseablemente, los reactivos se proporcionan en forma de polvo liofilizado seco, pudiendo ser reconstituídos los reactivos en un medio acuoso proporcionando las concentraciones de reactivos adecuadas para realizar el ensayo.

Cualquiera de los constituyentes de los ensayos de cribado de fármacos y de diagnóstico antes mencionados, puede ser usado sin modificar o puede ser modificado de diferentes formas. Por ejemplo, el marcaje puede realizarse uniéndose covalentemente o no covalentemente un resto que directa o indirectamente proporciona una señal detectable. En cualquiera de estos ensayos, el ligando, compuesto de ensayo, ligando de Flt3, o anticuerpos contra el mismo pueden ser marcados bien sea directamente o bien indirectamente. Las posibilidades para el marcaje directo incluyen grupos de marcadores: radiomarcadores tales como ^{125}I , enzimas (patente de EE.UU. n° 3.645.090) tales como peroxidasa y fosfatasa alcalina, y marcadores fluorescentes (patente de EE.UU. n° 3.940.475) capaces de controlar el cambio de la intensidad de fluorescencia, el desplazamiento de la longitud de onda o la polarización por fluorescencia. Las posibilidades para el marcaje indirecto incluyen la biotinilación de un constituyente seguida por la unión a avidina acoplada a uno de los grupos de marcadores anteriores.

También hay numerosos métodos para separar el ligando unido del libre, o alternativamente el compuesto de ensayo unido del libre. El ligando de Flt3 puede ser inmovilizado en varias matrices y después lavado. Las matrices adecuadas incluyen plásticos tales como una placa de ELISA, filtros y esferas. Los métodos para inmovilizar el ligando de Flt3 en una matriz incluyen, sin limitación, la adhesión directa al plástico, el uso de un anticuerpo de captura, el acoplamiento químico y la biotina-avidina. La última etapa en este planteamiento implica la precipitación de complejo ligando/receptor o ligando/anticuerpo por cualquiera de entre varios métodos, incluyendo aquellos que utilizan, p. ej., un disolvente orgánico tal como polietilenglicol o una sal tal como sulfato amónico. Otras técnicas de separación adecuadas incluyen, sin limitación, el método de partícula magnetizable fluoresceína anticuerpo descrito en Rattle *et al.* (1984) *Clin. Chem.* 30:1457-1461, y la separación de partícula magnética de anticuerpo doble que se describe en la patente de EE.UU. número 4.659.678.

Los métodos para enlazar proteínas o sus fragmentos a los diversos marcadores han sido expuestos ampliamente en la bibliografía y no requieren una detallada discusión en el presente texto. Muchas de las técnicas implican el uso de grupos carboxilo activados, bien sea a través del empleo de carbodiimida o ésteres activos para formar enlaces peptídicos, la formación de tioéteres por reacción de un grupo mercapto con un halógeno activado tal como cloracetilo, o una olefina activada tal como maleimida, para unión, o similares. También las proteínas de fusión encontrarán empleo en estas aplicaciones.

Otro aspecto diagnóstico de esta invención implica usar secuencias de oligonucleótidos o polinucleótidos tomadas de la secuencia de un ligando de Flt3. Estas secuencias pueden ser usadas como sondas para detectar niveles del mensaje de ligando en muestras de pacientes sospechosos de tener una condición anormal, p. ej. cáncer o un problema de desarrollo. La preparación de las secuencias de nucleótidos tanto de RNA como de DNA, el marcaje de las secuencias y el tamaño preferido de dichas secuencias, han sido objeto de una amplia descripción y discusión en la bibliografía. Normalmente, una sonda de oligonucleótido debe tener al menos aproximadamente 14 nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente 18 nucleótidos, y las sondas de polinucleótido pueden estar constituidas por hasta varias kilobases. Pueden emplearse diversos marcadores, lo más comúnmente radionucleidos, y en particular el ^{32}P .

Sin embargo, también pueden emplearse otras técnicas tales como usar nucleótidos modificados con biotina para la introducción en un polinucleótido. La biotina sirve entonces como sitio para la unión a avidina o anticuerpos, que pueden ser marcados con una amplia variedad de marcadores tales como radionucleidos, sustancias fluorescentes, enzimas o similares. Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de DNA, dúplex de RNA, dúplex híbridos de DNA-RNA, o dúplex de DNA-proteína. A su vez pueden ser marcados los anticuerpos y realizarse el ensayo cuando el dúplex está unido a una superficie, de forma que al formarse el dúplex sobre la superficie puede detectarse la presencia de anticuerpo unido al dúplex. El uso de sondas para el nuevo RNA anti-sentido puede llevarse a cabo en cualquier técnica convencional tal como hibridación de ácido nucleico, cribado más y menos, sonda recombinante, traducción liberada híbrida (HRT: Hybrid Released Translation) y traducción detenida híbrida (HART: Hybrid Arrested Translation). Esto también incluye técnicas de amplificación (o multiplicación) tales como la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

También se contemplan *kits* para diagnóstico que también analizan la presencia cualitativa o cuantitativa de otros marcadores. El diagnóstico o el pronóstico pueden depender de la combinación de indicaciones múltiples usadas como marcadores. Así, los *kits* pueden analizar combinaciones de marcadores. Véase, p. ej., Viallet *et al.* (1989) *Progress in Growth Factor Res.* 1:89-97.

Ejemplos

El amplio alcance de esta invención se entiende mejor haciendo referencia a los ejemplos que siguen, que se pretende que sean ilustrativos pero sin que limiten la invención a realizaciones específicas.

Métodos Generales

Alguno de los métodos estándar se describen o citan, p. ej., en Maniatis *et al.* (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press; Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed.), vol. 1-3, CHS Press, NY; Ausubel *et al.* *Biology*, Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; o Ausubel *et al.* (1987 y Suplementos) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene/Wiley, Nueva York; Innis *et al.* (ed.) (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* Academic Press, N.Y.

Los métodos para la purificación de proteínas incluyen métodos tales como la precipitación con sulfato amónico, cromatografía en columna, electroforesis, centrifugación, cristalización y otros. Véase, p. ej., Ausubel *et al.* (1987 y suplementos periódicos); Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification" en *Methods in Enzymology*, vol. 182, y otros volúmenes de esta serie; y literatura de los fabricantes acerca del uso de los productos de purificación de proteínas, p. ej., Pharmacia, Piscataway, N.J., o Bio-Rad, Richmond, CA. La combinación con técnicas recombinantes permite la fusión en segmentos apropiados, p. ej. a una secuencia FLAG o un equivalente que puede fusionarse a través de una secuencia eliminable por una proteasa. Véanse, p. ej., Hochuli (1989) *Chemische Industrie* 12:69-70; Hochuli (1990) "Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent" en Setlow (ed.) *Genetic Engineering, Principle and Methods* 12:87-98, Plenum Press, N.Y.; y Crowe *et al.* (1992) *QIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System* QUIAGEN, Inc. Chatsworth, CA.

Se describen análisis FACS en Melamed *et al.* (1990) *Flow Cytometry and Sorting* Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY; Shapiro (1988) *Practical Flow Cytometry* Liss, Nueva York, NY; y Robinson *et al.* (1993) *Handbook of Flow Cytometry Methods* Wiley-Liss, Nueva York, NY.

Producción y secuenciación del ligando de Flt3

Ensayo para el ligando Flt3/Flk2

Células Baf3 (línea celular pre-B de ratón; véase Palacios *et al.* (1985) *Cell* 41:727-734; y Palacios *et al.* (1984) *Nature* 309:126-131) fueron establemente transfectadas con el cDNA para el receptor de Flt3, Rosnet *et al.* (1991) *Oncogene* 6:1641-1650. Se usaron dos métodos para observar la respuesta de estas células a muestras que contienen el ligando. El ensayo principal es un ensayo MTT en el que las células transfectadas con Flt3 (Baf3ts) sobreviven a una incubación de 24 horas en presencia del ligando (pero no si el ligando está ausente) y pueden ser recogidas y segmentar el colorante MTT. Véase Mosmann (1983) *J. Immunol. Methods* 65:55-63. Las células Baf no transfectadas mueren tanto en presencia con en ausencia del ligando, y por tanto las muestras se ensayan rutinariamente en paralelo en ambos tipos de células. La diferencia de señal obtenida a partir de estos dos tipos de células (Baf3t-Baf) es una medida de la cantidad de ligando presente en una muestra.

En algunos casos en los que las muestras activas contienen también sustancias que son tóxicas para las células, el ensayo de MTT con Baf3ts puede fallar en la detección de la presencia del ligando. Un segundo método para detectar el ligando en estos casos es aprovechar el hecho de que los receptores tales como c-fms, c-kit y flt-3 se autofosforilan rápidamente (en 5 minutos) mientras unen sus ligandos apropiados. Esta respuesta es mucho menos sensible a sustancias tóxicas que el ensayo de MTT de 24 horas.

El receptor auto-fosforilado se observa lisando las células respondedoras con detergente, p. ej. NP-40, inmunoprecipitando Flt3 usando anticuerpos dirigidos contra la porción intracelular de la molécula, y separando el inmunoprecipitado en SDS-PAGE, transfiriendo a nitrocelulosa ("blotting"), sondando con un anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina, p. ej. con una anti-inmunoglobulina unida a peroxidasa de rábano picante, y desarrollando con un sustrato quimioluminiscente.

Fuente del ligando de Flt3

Múltiples líneas celulares fueron cribadas buscando una que expresase un ligando de Flt3. Se seleccionó una línea celular estromal tímica de ratón TA4 (proporcionada por Donna Rennick, DANX Research Institute) por su facilidad de manipulación para producción a gran escala. Las células fueron desarrolladas en frascos giratorios y los sobrenadantes de medio acondicionado 7 días (libre de suero) se recolectaron, se pasaron por filtros de 0,22 μ m, se concentraron 1:100 y se almacenaron congelados a -80°C.

Caracterización bioquímica del ligando de Flt3

La actividad del ligando de Flt3 ha sido definida por sus parámetros de separación usando distintas técnicas de separación de proteínas. Sin embargo, a causa de los bajos niveles de expresión, la detección de la actividad fue facilitada en gran medida por la concentración del medio. Partes alícuotas de sobrenadante de células TA4 concentrado 100x, representando típicamente 10 L de sobrenadante crudo, fueron sometidas a varias técnicas de purificación bio-

ES 2 150 495 T5

química, incluyendo precipitación con sulfato amónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de intercambio aniónico y catiónico, cromatografía de filtración en gel, y cromatografía de fase inversa. Véase la Tabla 2. El comportamiento de la actividad biológica que representa el ligando de Flt3 en cada una de estas técnicas se resume a continuación:

- 5 Precipitación con sulfato amónico (a 4°C): se encuentra actividad en el sedimento de (NH₄)₂SO₄ saturado al 60-85%;
- 10 Cromatografía de interacción hidrofóbica [gradiente de (NH₄)₂SO₄ en Tris 20 mM, pH 7,5 en una columna Phenyl-5PW]: actividad eluyó entre (NH₄)₂SO₄ 900-750 mM;
- 15 Cromatografía de intercambio aniónico (gradiente de NaCl en Tris 20 mM, pH 7,5 en columna Mono Q): actividad eluyó en NaCl entre 130-250 mM;
- 20 Cromatografía de intercambio catiónico (gradiente de NaCl en citrato 10 mM, pH 3,0 en columna Mono S): el grueso de la actividad eluyó en NaCl entre 440-540 mM;
- Filtración en gel (columna SEPHACRYL[®] S200): la actividad corrió con un peso molecular aparente de 70 kD;
- HPLC de fase inversa (gradiente de agua a acetonitrilo en TFA al 0,1% en una columna Poros R/H); la actividad eluyó en acetonitrilo entre 32-35%.

Ingeniería, producción y purificación de Flt3 soluble

25 Se construyó un fragmento soluble del receptor de Flt3 eliminando los dominios de *spanning* de la membrana y citoplásmico del receptor de Flt3, fusionado a una secuencia, p. ej. FLAG, útil para purificar el producto de expresión de la construcción. Véanse, p. ej., Crowe *et al* (1992) *QIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System* QUIAGEN, Inc. Chatsworth, CA; y Hopp *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:1204-1210. La secuencia permite una eficiente purificación por afinidad del producto soluble. La secreción apropiada o sitios de procesamiento pueden ser también formados por ingeniería genética en la construcción por métodos estándar. La purificación puede conseguirse usando purificación por afinidad, p. ej. anticuerpos contra el receptor, o por métodos estándar de purificación de proteínas. Típicamente, los reactivos de afinidad o los procedimientos de purificación pueden realizarse usando receptores recombinantes.

35 Más específicamente, se construyeron por ingeniería genética dos etiquetas para el término carboxi del dominio extracelular del receptor de Flt3. Se usó pMEXneo-Flt3 como fuente para modificar el cDNA de Flt3 para introducir un sitio BglII en el nucleótido 1662, directamente después de Ser544, el último aminoácido del dominio extracelular. Un fragmento de XmaI/BglII que contiene el dominio Flt3 extracelular entero fue clonado en pHFbgl, un derivado de pVL1393 de Invitrogen Corp. El pHFbgl contiene una secuencia His₆-FLAG-codón de parada fusionada en marco con el sitio BglII del polienlazador. Véase la Tabla 4. El plásmido resultante se llamó pHF/Flt3.

TABLA 4

45	<u>Porción Relevante de la Construcción de Receptor de Flt3 Soluble.</u>			
50	Xma I		Not I	
	Sma I			
	BamHI	XbaI	EcoRI	XmaIIIPstIBglII
	5' GGATCCCGGGTACCTTCTAGAATTCGGAGCGGCCGCTGCAGATCTCAT-			
	3' CCTAGGGCCCATGGAAGATCTTAAGGCCCTCGCCGGCGACGTCTAGAGTA-			
55	AspProGlyTy=LeuLeuGluPheArgSerGlyArgCysArgSerHis			
	CACCATCACCATCACGATTACAAGGACGATGACGATAAGTAATGA 3'			
	GTGGTAGTGGTAGTGCTAATGTTCTGCTACTGCTATTCATTACT 5'			
60	HisHisHisHisHisAspTyrLysAspAspAspLysStpStp			

65 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos mostradas en la Tabla 4 están definidas también en la Lista de Secuencias por las SEQ ID NOs: 36 y 37, respectivamente.

Células de insecto Sf9 fueron transfectadas con pHF/Flt y se preparó un material de virus. Después de la infección de células Sf9 con virus recombinante, se recolectó el medio. El producto de expresión Flt3-His₆-FLAG secretado

ES 2 150 495 T5

soluble fue purificado del medio usando una resina de níquel-NTA de Qiagen. El receptor de Flt3 purificado fue acoplado a una columna de anticuerpo anti-FLAG M2. Véase más adelante.

Purificación del ligando de Flt3

El ligando de Flt3 fue aislado mediante una combinación de cromatografía de afinidad usando el receptor de Flt3 como reactivo de unión específica en combinación con las propiedades físicas antes definidas que permiten la separación de otras proteínas y contaminantes. Podrían aplicarse técnicas similares que usan ensayos de células humanas y fuentes de células humanas para aislar un ligando humano.

100 L de sobrenadante de TA4 crudo se sometieron a intercambio en tampón en PBS y se concentraron a 1000x. Después, esto se sometió a volteo durante la noche con 2 ml de esferas M2 (anti-FLAG) que habían sido precargadas con Flt3 soluble. Las esferas se lavaron después con varias veces el volumen de la columna de PBS, y el material unido se eluyó con 3 ml de glicina 100 mM, pH 2,5. El material eluido se recogió en un tubo que contiene suficiente Tris 2 M, pH 7,5 para neutralizar la glicina. El material eluido neutralizado se cargó después en una columna Poros R/H de 4,6 x 100 mm y las proteínas se cromatografiaron con un gradiente lineal de agua/acetonitrilo en TFA al 0,1%.

Las muestras de cada fracción fueron secadas para bioensayo y SDS-PAGE. La molécula que representa la actividad de ligando de Flt3 corrió en SDS-PAGE reductora como una proteína aparentemente glicosilada a aproximadamente 30 kilodaltons. La fracciones que contenían el grueso de la actividad biológica fueron secadas completamente y combinadas en suficiente tampón para muestra de gel Laemmli (conteniendo DTT) para ser desarrolladas en una calle única en un mini-gel al 12% (SDS-PAGE). El gel se tiñó con azul Coomassie, se destiñó, y la banda que representa el ligando de Flts fue cortada con cuidado. Esta rodaja contenía ligando de Flt3 químicamente puro. 100 L de sobrenadante de células TA4 contenían menos de 5 microgramos de esta proteína. La proteína purificada tenía una actividad específica de 1×10^7 unidades por miligramo en el ensayo de Baf. Una unidad es la que proporciona la mitad de la máxima estimulación en un ensayo de 100 μ l.

Generación y Purificación de Péptidos Trípticos de Ligando de Flt3

La rodaja de gel prep que contiene el ligando se aclaró brevemente con agua y acetonitrilo para eliminar el exceso de SDS, se desmenuzó en minúsculos fragmentos, se llevó a sequedad bajo vacío en un aparato SPEEDVAC® Savant), y después se solubilizó en 0,2 ml de tampón Tris (pH 7,5) que contiene 0,5 μ g de tripsina modificada (una forma modificada químicamente que no se autodigiere) más DTT 2 mM, y 0,01% de Tween 20. La reacción de segmentación se llevó a cabo a 37°C durante 6 h, momento en el cual se añadió una segunda parte alícuota de tripsina, y la digestión prosiguió durante la noche. La mezcla de reacción se centrifugó a 13 K y se cargó en una columna de fase inversa AQUAPORE® RP-300 de 2,1 x 100 mm, y los péptidos eluyeron con un gradiente lineal 4-44% de acetonitrilo (con 0,1% de TFA constante). En algunos casos los péptidos fueron re-cromatografiados en la misma columna con un gradiente de 16-44% de acetonitrilo (con ácido heptafluorobutírico (HFBA) 0,1 mM constante). Los péptidos eluyentes fueron controlados a 215 nm y a 280 nm, y se recogieron manualmente.

Determinación de la secuencia de aminoácidos de los péptidos del ligando de Flt3

Las secuencias peptídicas fueron determinadas usando un Secuenciador 477A Applied Biosystems. Los fragmentos proporcionaron las secuencias peptídicas de la Tabla 1 reconstruidas en secuencias de consenso; el péptido 17 es el término amino:

12. FVQTXISHLLK

13. DYPVTVAVNLQ

14. TPDAYFSHSPIS:SNFKVKFRELTVHLLK

15. WIEQLK

16. ILFXLFAQYR

17. TPDCY FSHSP ISSNF KVKFR ELTVH LLKDY PVTVA VNLQD EK

Aislamiento de un clon de DNA que codifica el ligando de Flt3

La proteína purificada o los péptidos definidos son útiles para generar anticuerpos por métodos estándar, como se describió anteriormente. Los péptidos sintéticos o la proteína purificada son presentados a un sistema inmunitario para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Véanse, p. ej., Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Green; y Harlow y Lane (1989) *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Press. Alternativamente, el receptor de Flt3 se usa como reactivo de unión específica, y puede sacarse partido de su especificidad de unión, como si se usase un anticuerpo. En cualquier caso, el reactivo de unión está marcado como se describió anteriormente, por ejemplo fluorescencia o de otra forma, o está inmovilizado en un sustrato para métodos de separación por adsorción.

ES 2 150 495 T5

La composición de unión se usa para cribado de una biblioteca de expresión hecha a partir de una línea celular que expresa un ligando de Flt3. Se usan técnicas de tinción estándar para detectar o clasificar ligando intracelular o expresado en superficie, o se criban mediante separación por adsorción células transformadas que expresan en superficie. El cribado de la expresión intracelular se realiza por varios procedimientos de tinción o inmunofluorescencia. Véase también McMahan *et al.* (1991) *EMBO J.* 10:2821-2832.

Por ejemplo, en el día 0 se precubren platinas PERMANOX® de 2 cámaras con 1 ml de fibronectina por cámara, 10 ng/ml en PBS, durante 30 min a temperatura ambiente. Se aclara una vez con PBS. Después se ponen en placa células COS a razón de 2-3 x 10⁵ células por cámara en 1,5 ml de medio de crecimiento. Se incuba durante la noche a 37°C.

En el día 1 para cada ejemplo, se preparan 0,5 ml de una solución de 66 µg/ml de DEAE-dextrano, cloroquina 66 µM, y 4 µg de DNA en DME libre de suero. Para cada conjunto, se prepara un control positivo, p. ej., de cDNA de huIL-10-FLAG a 1 y 1/200 de dilución, y una simulación negativa. Se aclaran las células con DME libre de suero. Se añade la solución de DNA y se incuba 5 horas a 37°C. Se elimina el medio y se añaden 0,5 ml de DMSO al 10% en DME durante 2,5 minutos. Se elimina y se lava una vez con DME. Se añaden 1,5 ml de medio de crecimiento y se incuba durante la noche.

En el día 2, se cambia el medio. En los días 3 y 4, las células se fijan y se tiñen. Se aclaran las células dos veces con Solución Salina Tamponada de Hank (HBSS) y se fijan en 4% de paraformaldehído (PFA)/glucosa durante 5 minutos. Se lavan 3X con HBSS. Las platinas pueden almacenarse a -80°C después de haber eliminado todo el líquido. Para cada cámara se realizan incubaciones de 0,5 ml como sigue. Se añade HBSS/saponina (0,1%) con 32 µl/ml de NaN₃ durante 20 minutos. Después se lavan las células con HBSS/saponina 1X. El complejo receptor de Flt3 soluble/anticuerpo a las células y se incuba durante 30 minutos. Se lavan las células dos veces con HBSS/saponina. Se añade el segundo anticuerpo, p. j. anticuerpo anti-ratón Vector, a 1/200 de dilución y se incuba durante 30 minutos. Se prepara solución de ELISA, p. ej. solución de peroxidasa de rábano picante Vector Elite ABC, y se preincuba durante 30 minutos. Se usa, p. ej., una gota de solución A (avidina) y 1 gota de solución B (biotina) para 2,5 ml de HBSS/saponina. Se lavan las células dos veces con HBSS/saponina. Se añade solución de HRP ABC y se incuba durante 30 minutos. Se lavan las células dos veces con HBSS, segundo lavado durante 2 minutos, que cierra las células. Después se añade ácido diamino benzoico (DAB) Vector durante 5 a 10 minutos. Se usan dos gotas de tampón más 4 gotas de DAB más 2 gotas de H₂O₂ para 5 ml de agua destilada en vidrio. Se retira con cuidado la cámara y se aclara la platina en agua. Se seca al aire durante unos minutos, después se añade 1 gota de Crystal Mount y un cubre. Se pone en estufa durante 5 minutos a 85-90°C.

Alternativamente, las composiciones de unión se usan para purificar por afinidad o clasificar células que expresan el ligando. Véase, p. ej., Sambrook *et al.*, o Ausubel *et al.*

En otro método, los segmentos de péptido se usan para predecir los oligonucleótidos apropiados para cribar una genoteca. El código genético se usa para seleccionar los oligonucleótidos apropiados útiles como sondas para cribar una genoteca. Véase, p. ej. la Tabla 3. En combinación con técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR), se usan oligonucleótidos sintéticos en orientaciones apropiadas como cebadores para seleccionar clones correctos entre una genoteca. Se ensayan varias combinaciones corriente arriba/corriente abajo sentido/antisentido hasta que un clon apropiado es amplificado y detectado.

Por ejemplo, se aplica un planteamiento de cribado funcional basado en un ensayo biológico para el ligando. La línea celular Baf pro-B es transfectada con el cDNA del receptor para generar un transfectante estable. El transfectante muestra una respuesta mitogénica a los sobrenadantes de células estromales TA4, especialmente detectable cuando se concentra el sobrenadante 100 X. Las células transfectantes progenitoras son no respondedoras a los sobrenadantes. Se hace una genoteca de cDNA de expresión a partir de las células TA4 productoras. Se transfectan *pools* de clones de cDNA aleatorios y los sobrenadantes se someten a cribado en cuanto a la actividad biológica del ligando. Los *pools* positivos se subdividen para aislar clones individuales.

En otro planteamiento, el cribado de expresión se basa en un ensayo bioquímico de un ligando soluble. El ensayo se basa en la actividad de autofosforilación en vez de en la actividad mitogénica. Se preparan lisados celulares totales de las células de ensayo expuestas y se inmunoprecipitan con antisuero anti-fosfotirosina. El inmunoprecipitado se hace correr en un gel de poliacrilamida, y, p. ej., se transfiere a un filtro y se desarrolla con tinción de anticuerpo de fosfotirosina.

En otro planteamiento más, el cribado funcional de un ligando unido a la membrana es por bioensayo mitogénico o bien por ensayo bioquímico de autofosforilación. Vectores de fusión apropiados pueden producir una construcción de expresión apropiada.

Otra estrategia es hacer el cribado en relación con un ligando unido a la membrana mediante separación por adsorción. El cDNA del receptor se construye como se describió anteriormente. El receptor soluble o anticuerpos producidos contra los fragmentos del péptido definidos pueden ser inmovilizados y usados para inmovilizar células de expresión. La inmovilización puede realizarse usando anticuerpos apropiados que reconocen, p. ej., la secuencia FLAG de la construcción del receptor soluble, o mediante el uso de anticuerpos producidos contra los primeros anticuerpos. Ciclos recurrentes de selección y amplificación conducen al enriquecimiento de clones apropiados y al eventual aislamiento de los clones que expresan el ligando.

ES 2 150 495 T5

Las genotecas de expresión de fago pueden ser cribadas por el receptor soluble o anticuerpos anti-fragmento. Técnicas con marcadores apropiados, p. ej. anticuerpos anti-FLAG, permitirán el marcaje específico de los clones apropiados.

5 El cribado por hibridación usando sondas degeneradas basadas en las secuencias de péptidos permitirá también el aislamiento de clones apropiados. Alternativamente, el uso de cebadores apropiados para cribado por PCR proporcionará el enriquecimiento de clones de ácido nucleico apropiados.

10 Métodos similares son aplicables para aislar variantes de especie o bien alélicas. Las variantes de especie se aíslan usando técnicas de hibridación de especies cruzadas, basadas en el aislamiento de un material aislado de longitud completa o fragmento de una especie como sonda. Alternativamente, pueden desarrollarse ensayos similares, p. ej. en células humanas, para el aislamiento de la actividad de ligando de Flt3 humana, p. ej. en células SV48 epiteliales tímicas humanas.

15 La amplificación por PCR usando cebadores degenerados basados en secuencias vector y corriente abajo generó productos en una primera ronda de amplificación por PCR. Cebadores basados en una secuencia vector y cebadores degenerados procedentes de la secuencia peptídica NLQDEK fueron usados en la primera ronda de amplificación. El producto de la primera amplificación fue sometido a una segunda ronda de amplificación por PCR usando cebadores degenerados basados en secuencias peptídicas TPDCYF y YPVTVAV. El producto de esta segunda ronda de amplifi-
20 cación por PCR tuvo por resultado un producto de 108 pb sondado usando sondas basadas en la secuencia NFKVKF. La longitud es consistente con la prevista por la secuencia proporcionada. La secuenciación de este producto de 108 pb proporcionó la secuencia de nucleótidos:

25 **ACT CCT GAC TGT TAC TTC AGC CAC AGT CCC ATC TCC TCC AAC TTC AAA GTG AAG TTT AGA GAG TTG
ACT GAC CAC CTG CTT AAA GAT,**

que codifica la secuencia peptídica esperada. La posterior secuenciación de un clon ha proporcionado la secuencia de la Tabla 5.

30 TABLA 5

35 Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos a
partir de un clon de fragmento de ligando de
Flt3.

40 **ACTCCTGACTGTTACTTCAGCCACAGTCCCATCTCCTCCAACITCAAAGTGAAGTTTAGAGAGTTGACT
THRPROASPCYSTYRPHESERHIS SERPROI LESERSERASNHELYSVALLYSPHEARGGLULEUTHR**

**GACCACTGCTTAAAGATTACCCAGTCACTGTGGCCGTCAA TCTTCAGGACGAGAAGCACTGCAAGGCC
ASPHISLEULEULYSASPTYRPROVALTHRVALALAVALS NLEUGLNAS PGLULYSHISCYSLYSALA**

45 **TTGTGGAGCCTCTTCCAGCCAGCGCTGGATAGAGCAACTGAAGACTGTGGCAGGGTCTAAGATGCAA
LEUTRPSERLEUPHELEUALAGLNARGTRPILEGLUGLNLEULYSTHRVALALAGLYSERLYSMETGLN**

50 **ACGCTTCTGGAGGACGTCAACACCGAGATA CATT TTTGTACCTCATGTACCTTCCAGCCCCCTACCAGAA
THRLEULEUGLUASPVALASNTHRGLUILEHIS PHEVALTHRSERCYSTHRPHEGLNPROLEUPROGLU**

**TGCTGCGATTTCGTACAGACCAATATA
CYSLEUARGPHEVALGLNTHRASNI LE**

55 Las secuencias mostradas en la Tabla 5, que también están definidas en la Lista de Secuencias por la SEQ ID NO: 18, eliminan degeneración de la secuencia de ácidos nucleicos codificadora relevante. Esta sonda se usa para realizar el cribado de genotecas más largas o de longitud completa, p. ej. de ratón u otra especie de mamífero. También se
60 aislarán variantes alélicas y otros genes relacionados usando, p. ej., técnicas de hibridación. Véanse Sambrook *et al.* y Ausubel *et al.*

Aislamiento de un clon de DNA que codifica el ligando de Flt3 humana

65 Una genoteca de cDNA de células estromales 29SV48 humanas en pME18S, construida a partir de poli A+ mRNA, fue cribada con un fragmento de DNA de 800 pb derivado del clon T118 de ratón. Este fragmento abarca la región de codificación conservada entre los dos clones de ratón, T118 y T110 (véase también la Tabla 3). La hibridación de filtros con sonda marcada con ³²P se llevó a cabo en una solución de formamida al 20%, 6X SSPE, 5X Denhardt, 100

ES 2 150 495 T5

$\mu\text{g/ml}$ de tRNA, y 0,1% de SDS a 42°C durante la noche. Los filtros se lavaron dos veces a temperatura ambiente con 2 X SSC y 0,1% de SDS durante 10-15 minutos. Después se lavaron los filtros en 0,1 X SSPE, 0,1% de SDS bajo una de las siguientes condiciones: tres veces a 50°C durante 30 minutos cada vez; tres veces a 55°C durante 30 minutos cada vez; una vez a 55°C durante 30 minutos y una vez a 60°C durante 30 minutos; o una vez a 60°C durante 30 minutos.

5

Se seleccionaron aproximadamente 20 colonias positivas usando estas condiciones. Estas fueron secuenciadas parcialmente y se encontró que dos clones eran aproximadamente un 75% homólogos respecto de los clones de ratón sobre los 163 primeros aminoácidos. El clon S86 siguió mostrando homología con el clon T110 hasta el codón de parada, aunque en un menor grado, para una homología global del 66%. Los clones T118 y S109 no muestran homología entre sí o con los otros clones después del resto 163 de ratón (resto 160 humano). Un clon de ratón adicional designado MB8 tiene un inserto de 29 aminoácidos en la unión entre las porciones común y divergente del ligando de ratón.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 150 495 T5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ligando aislado de tirosina-quinasa 3 similar a Fms (Flt3), que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 19.
2. Un ácido nucleico aislado que codifica un ligando de Flt3 según la reivindicación 1.
- 10 3. Un ácido nucleico aislado según la reivindicación 2, que comprende la secuencia de codificación de SEQ ID No: 19.
4. Un vector recombinante que comprende un ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3.
5. Una célula hospedadora que comprende un vector recombinante de la reivindicación 4.
- 15 6. Un método para preparar un ligando de Flt3, que comprende cultivar una célula hospedadora de la reivindicación 5 bajo condiciones en las que se expresa el ácido nucleico.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el ligando de Flt3 es aislado del cultivo.
- 20 8. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo aceptable fisiológicamente y un ligando de Flt3 de la reivindicación 1.
9. Un ligando de Flt3 de la reivindicación 1, que ha sido fusionado con un polipéptido o marcado con un grupo detectable.
- 25 10. Un ligando aislado de tirosina-quinasa 3 similar a Fms (Flt3) murino que se une específicamente a un receptor de tirosina-quinasa Flt3, ligando de Flt3 que se une a un anticuerpo producido contra un ligando de Flt3 murino, **caracterizado** por:
- 30 (a) un peso molecular aparente de aproximadamente 30 Kd en electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida;
- (b) presencia en un sedimento saturado al 60-85% durante la precipitación con sulfato amónico a 4°C;
- 35 (c) elución entre (NH₄)₂SO₄ 900-750 mM en tampón Tris 20 mM, pH 7,5, durante cromatografía de interacción hidrofóbica en gradiente usando una columna Phenyl-5PW;
- (d) elución entre 130-250 mM en un gradiente de NaCl en tampón Tris 20 mM, pH 7,5, durante cromatografía de intercambio aniónico en columna Mono Q;
- 40 (e) elución entre 440-540 mM en un gradiente de NaCl en tampón de citrato 10 mM, pH 3,0, durante cromatografía de intercambio catiónico en columna Mono S;
- (f) un peso molecular aparente de 70 kD en cromatografía de filtración en gel de SEPHACRYL® S200; y
- 45 (g) elución entre 32-35% de acetonitrilo durante HPLC en fase inversa usando un gradiente de acetonitrilo en agua en TFA al 0,1% y una columna Poros R/H.
11. Un anticuerpo o fragmento de unión del mismo que se une específicamente con un ligando de Flt3 de la reivindicación 10.
- 50 12. El anticuerpo de la reivindicación 11, que es un anticuerpo monoclonal.
- 55
- 60
- 65

ES 2 150 495 T5

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE
- (A) NOMBRE: Schering Corporation
 - (B) CALLE: One Giralda Farms
 - 10 (C) CIUDAD: Madison
 - (D) ESTADO: New Jersey
 - (E) PAIS: EE.UU.
 - (F) CÓDIGO POSTAL (CP-ZIP): 07940-1000
 - 15 (G) TELÉFONO: 201-822-7375
 - (H) TELEFAX: 201-822-7039
 - (I) TELEX: 219165
- 20 (i) SOLICITANTE
- (A) NOMBRE: Institute National de la Sante et de la Recherche Medicale.
 - (B) CALLE: 101 rue de Tolbiac
 - 25 (C) CIUDAD: 75643 Paris
 - (D) ESTADO: Cedex 13
 - (E) PAIS: France
 - (F) CÓDIGO POSTAL (CP-ZIP):
 - 30 (G) TELÉFONO: 33 1 44 23 60 41
 - (H) TELEFAX: 33 1 45 85 07 66
 - (I) TELEX:
- 35 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Ligandos de Flt3 de mamífero purificados y agonistas y antagonistas de los mismos.
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 37
- 40 (iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: disco blando
 - (B) ORDENADOR: Apple Macintosh
 - 45 (C) SISTEMA OPERATIVO: Macintosh 6.0.5
 - (D) SOFTWARE: Microsoft Word 5.1a
- (v) FECHA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
 - 50 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
- (vi) FECHA SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/162.413
 - 55 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 3 de diciembre de 1993
- (vi) FECHA SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 06/155.111
 - 60 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 19 de noviembre de 1993
- (vi) FECHA SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/112.391
 - 65 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 24 de agosto de 1993
- (vi) FECHA SOLICITUD ANTERIOR:

ES 2 150 495 T5

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/106.340
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 13 de agosto de 1993

5 (vi) FECHA SOLICITUD ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/092.549
- (B) FECHA DE PRESENTACION: 16 de julio de 1993

10 (vi) FECHA SOLICITUD ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/089.263
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 7 de julio de 1993

15 (vi) FECHA SOLICITUD ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/065.231
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 19 de mayo de 1993

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 11 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

Phe Val Gln Thr Xaa Ile Ser His Leu Leu Lys
1 5 10

35 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 14 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

Asp Tyr Pro Val Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Asp GLu Lys
1 5 10

50 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 16 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

Thr Pro Asp Xaa Tyr Phe Ser His Ser Pro Ile Ser Ser Asn Phe Lys
1 5 10 15

65 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 150 495 T5

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

10 Trp Ile Glu Gln Leu Lys Gln Pro Gly Ser
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 5

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

20

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

25 Glu Leu Thr Val His Leu Leu Lys
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 6:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

35

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

40 Ile Leu Phe Xaa Leu Phe Leu Gln Tyr Arg
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 7:

45

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

50

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

55

Ser His Ser Pro Ile Ser Ser Asn Phe
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 8:

60

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

65

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 150 495 T5

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

5 Trp Ile Glu Gln Leu Lys
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 9:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

20 Asp Tyr Pro Val Thr Val Ala Val Asn Leu Gln
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 10:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

35 Asp Ala Tyr Phe Ser His Ser Pro Ile Ser Ser Asn Phe Lys Val Lys
1 5 10 15
40 Phe Arg Glu Leu Thr Val
20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

55 Asp Tyr Pro Val Thr Val Ala Ala
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

ES 2 150 495 T5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 42 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 17:

```

Thr Pro Asp Cys Tyr Phe Ser His Ser Pro Ile Ser Ser Asn Phe Lys
1 5 10 15
Val Lys Phe Arg Glu Leu Thr Val His Leu Leu Lys Asp Tyr Pro Val
20 25 30
Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Asp Glu Lys
35 40
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 303 pares de bases
- (B) TIPO: ácidos nucleicos
- (C) CORDÓN: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 18:

```

ACT CCT GAC TGT TAC TTC AGC CAC ACT CCC ATC TCC TCC AAC TTC AAA 48
Thr Pro Asp Cys Tyr Phe Ser His Ser Pro Ile Ser Ser Asn Phe Lys
1 5 10 15
GTG AAG TTT AGA GAG TTG ACT GAC CAC CTG CTT AAA GAT TAC CCA GTC 96
Val Lys Phe Arg Glu Leu Thr Asp His Leu Leu Lys Asp Tyr Pro Val
20 25 30
ACT GTG GCC GTC AAT CTT CAG CAC GAG AAG CAC TGC AAG GCC TTG TGC 144
Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Asp Glu Lys His Cys Lys Ala Leu Trp
35 40 45
AGC CTC TTC CTA GCC CAG CGC TGG ATA GAG CAA CTG AAG ACT GTG GCA 192
Ser Leu Phe Leu Ala Gln Arg Trp Ile Glu Gln Leu Lys Thr Val Ala
50 55 60
GGG TCT AAG ATG CAA ACG CTT CTG GAG GAC GTC AAC ACC GAG ATA CAT 240
Gly Ser Lys Met Gln Thr Leu Leu Glu Asp Val Asn Thr Glu Ile His
65 70 75 80
TTT GTC ACC TCA TGT ACC TTC CAG CCC CTA CCA GAA TGT CTG CGA TTC 288
Phe Val Thr Ser Cys Thr Phe Gln Pro Leu Pro Glu Cys Leu Arg Phe
85 90 95
GTA CAG ACC AAT ATA 303
Val Gln Thr Asn Ile
100
    
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 857 pares de bases
- (B) TIPO: ácidos nucleicos

ES 2 150 495 T5

(C) CORDÓN: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 19:

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

```

GAAAGGGCTG TCACCCGGCT TGGCCCCCTC CACACCCAAC TGGGGCAAGC CTGACCCGGC 60
GACAGGAGGC ATGAGGGGCC CCCGGCCGAA ATG ACA GTG CTG GCG CCA GCC TGG 114
Met Thr Val Leu Ala Pro Ala Trp
1 5
AGC CCA ACA ACC TAT CTC CTC CTG CTG CTG CTG CTG AGC TCG GGA CTC 162
Ser Pro Thr Thr Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ser Gly Leu
10 15 20
AGT GGG ACC CAG GAC TGC TCC TTC CAA CAC AGC CCC ATC TCC TCC GAC 210
Ser Gly Thr Gln Asp Cys Ser Phe Gln His Ser Pro Ile Ser Ser Asp
25 30 35 40
TTC GCT GTC AAA ATC CGT GAG CTG TCT GAC TAC CTG CTT CAA GAT TAC 258
Phe Ala Val Lys Ile Arg Glu Leu Ser Asp Tyr Leu Leu Gln Asp Tyr
45 50 55
CCA GTC ACC GTG GCC TCC AAC CTG CAG GAC GAG GAG CTC TGC GGG GCG 306
Pro Val Thr Val Ala Ser Asn Leu Gln Asp Glu Glu Leu Cys Gly Ala
60 65 70
CTC TGG CGG CTG GTC CTG GCA CAG CGC TGG ATG GAG CGG CTC AAG ACT 354
Leu Trp Arg Leu Val Leu Ala Gln Arg Trp Met Glu Arg Leu Lys Thr
75 80 85
GTC GCT GGG TCC AAG ATG CAA GGC TTG CTG GAG CGC GTG AAC ACG GAG 402
Val Ala Gly Ser Lys Met Gln Gly Leu Leu Glu Arg Val Asn Thr Glu
90 95 100
ATA CAC TTT GTC ACC AAA TGT GCC TTT CAG CCC CCC CCC AGC TGT CTT 450
Ile His Phe Val Thr Lys Cys Ala Phe Gln Pro Pro Pro Ser Cys Leu
105 110 115 120
CGC TTC GTC CAG ACC AAC ATC TCC CGC CTC CTG CAG GAG ACC TCC GAG 498
Arg Phe Val Gln Thr Asn Ile Ser Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Glu
125 130 135
CAG CTG GTG GCG CTC AAG CCC TGG ATC ACT CGC CAG AAC TTC TCC CGG 546
Gln Leu Val Ala Leu Lys Pro Trp Ile Thr Arg Gln Asn Phe Ser Arg
140 145 150
TGC CTG GAG CTG CAG TGT CAG CCC GAC TCC TCA ACC CTG CCA CCC CCA 594
Cys Leu Glu Leu Gln Cys Gln Pro Asp Ser Ser Thr Leu Pro Pro Pro
155 160 165
TGG AGT CCC CGG CCC CTG GAG GCC ACA GCC CCG ACA GCC CCG CAG CCC 642
Trp Ser Pro Arg Pro Leu Glu Ala Thr Ala Pro Thr Ala Pro Gln Pro
170 175 180
CCT CTG CTC CTC CTA CTG CTG CTG CCC GTG GGC CTC CTG CTG CTG GCC 690
Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Val Gly Leu Leu Leu Leu Ala
185 190 195 200
GCT GCC TGG TGC CTG CAC TGG CAG AGG ACG CGG CGG AGG ACA CCC CGC 738
Ala Ala Trp Cys Leu His Trp Gln Arg Thr Arg Arg Arg Thr Pro Arg
205 210 215
CCT GGG GAG CAG GTG CCC CCC GTC CCC AGT CCC CAG GAC CTG CTG CTT 786
Pro Gly Glu Gln Val Pro Pro Val Pro Ser Pro Gln Asp Leu Leu Leu
220 225 230
GTG GAG CAC TGACCTGGCC AAGGCCTCAT CCTGGGGAGG ATACGTAGGC 835
Val Glu His
235
ACACAGAGGG GAGTCACCAG CC 857

```

65 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 150 495 T5

(A) LONGITUD: 301 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

(C) CORDÓN: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 20:

5	GGT	GCC	CCC	CGT	CCC	CAG	TCC	CCA	GGA	CCT	GCT	GCT	TGT	GGA	GCA	CTG	48
	Gly	Ala	Pro	Arg	Pro	Gln	Ser	Pro	Gly	Pro	Ala	Ala	Cys	Gly	Ala	Leu	
	1				5					10					15		
15	ACC	TGG	CCA	AGG	CCT	CAT	CCT	GGG	GAG	GAT	ACT	GAG	GCA	CAC	AGA	GGG	96
	Thr	Trp	Pro	Arg	Pro	His	Pro	Gly	Glu	Asp	Thr	Glu	Ala	His	Arg	Gly	
				20					25					30			
20	GAG	TCA	CCA	GCC	AGA	GGA	TGC	ATA	GCC	TGG	ACA	CAG	AGG	AAG	TTG	GCT	144
	Glu	Ser	Pro	Ala	Arg	Gly	Cys	Ile	Ala	Trp	Thr	Gln	Arg	Lys	Leu	Ala	
				35					40					45			
25	AGA	GGC	CGG	TCC	CTT	CCT	TGG	GCC	CCT	CTC	ATT	CCC	TCC	CCA	GAA	TGG	192
	Arg	Gly	Arg	Ser	Leu	Pro	Trp	Ala	Pro	Leu	Ile	Pro	Ser	Pro	Glu	Trp	
		50						55				60					
30	AGG	CAA	CGC	CAG	AAT	CCA	GCA	CCG	GCC	CCA	TTT	ACC	CAA	CTC	TGT	ACA	240
	Arg	Gln	Arg	Gln	Asn	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Phe	Thr	Gln	Leu	Cys	Thr	
		65				70					75				80		
35	AAG	CCC	TTG	TCC	CCA	TGAAATTGTA TATAAATCAT CCTTTTCTAC CAAAAA					295						
	Lys	Pro	Leu	Ser	Pro												
					85												
	AAAAAA																301

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1017 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

(C) CORDÓN: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 21:

ES 2 150 495 T5

GAATTCGCGG CCGCGTCGAG CCTGGCGGGA CTGAGCCCGA GACCTGCCCT CCTGTCACTT 60

CCAAGAACCT GTCACAGGCA TGAGGGGTCC CCGGCAGAG ATG ACA GTG CTG GCG 114
Met Thr Val Leu Ala
1 5

CCA GCC TGG AGC CCA AAT TCC TCC CTG TTG CTG CTG TTG CTG CTG CTG 162
Pro Ala Trp Ser Pro Asn Ser Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
10 10 15 20

AGT CCT TGC CTG CGG GGG ACA CCT GAC TGT TAC TTC AGC CAC AGT CCC 210
Ser Pro Cys Leu Arg Gly Thr Pro Asp Cys Tyr Phe Ser His Ser Pro
15 25 30 35

ATC TCC TCC AAC TTC AAA GTG AAG TTT AGA GAG TTG ACT GAC CAC CTG 258
Ile Ser Ser Asn Phe Lys Val Lys Phe Arg Glu Leu Thr Asp His Leu
20 40 45 50

CTT AAA GAT TAC CCA GTC ACT GTG GCC GTC AAT CTT CAG GAC GAG AAG 306
Leu Lys Asp Tyr Pro Val Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Asp Glu Lys
25 55 60 65

CAC TGC AAG GCC TTG TGG AGC CTC TTC CTA GCC CAG CGC TGG ATA GAG 354
His Cys Lys Ala Leu Trp Ser Leu Phe Leu Ala Gln Arg Trp Ile Glu
30 70 75 80 85

CAA CTG AAG ACT GTG GCA GGG TCT AAG ATG CAA ACG CTT CTG GAG GAC 402
Gln Leu Lys Thr Val Ala Gly Ser Lys Met Gln Thr Leu Leu Glu Asp
35 90 95 100

GTC AAC ACC GAG ATA CAT TTT GTC ACC TCA TGT ACC TTC CAG CCC CTA 450
Val Asn Thr Glu Ile His Phe Val Thr Ser Cys Thr Phe Gln Pro Leu
40 105 110 115

CCA GAA TGT CTG CGA TTC GTC CAG ACC AAC ATC TCC CAC CTC CTG AAG 498
Pro Glu Cys Leu Arg Phe Val Gln Thr Asn Ile Ser His Leu Leu Lys
45 120 125 130

GAC ACC TGC ACA CAG CTG CTT CCT CTG AAG CCC TGT ATC GGG AAG GCC 546
Asp Thr Cys Thr Gln Leu Leu Ala Leu Lys Pro Cys Ile Gly Lys Ala
50 135 140 145

TGC CAG AAT TTC TCT CGG TGC CTG GAG GTG CAG TGC CAG CCG GAC TCC 594
Cys Gln Asn Phe Ser Arg Cys Leu Glu Val Gln Cys Gln Pro Asp Ser
55 150 155 160 165

TCC ACC CTG CTG CCC CCA AGG AGT CCC ATA GCC CTA GAA CCC ACG GAG 642
Ser Thr Leu Leu Pro Pro Arg Ser Pro Ile Ala Leu Glu Ala Thr Glu
60 170 175 180

ES 2 150 495 T5

CTC CCA GAG CCT CGG CCC AGG CAG CTG TTG CTC CTG CTG CTG CTG CTG 690
 Leu Pro Glu Pro Arg Pro Arg Gln Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 185 190 195

5

CTG CCT CTC ACA CTG GTG CTG CTG GCA GCC GCC TGG GGC CTT CGC TGG 738
 Leu Pro Leu Thr Leu Val Leu Leu Ala Ala Ala Trp Gly Leu Arg Trp
 200 205 210

10

CAA AGG GCA AGA AGG AGG GGG GAG CTC CAC CCT GGG GTG CCC CTC CCC 786
 Gln Arg Ala Arg Arg Arg Gly Glu Leu His Pro Gly Val Pro Leu Pro
 215 220 225

15

TCC CAT CCC TAGGATGCGA GCCTTGTGCA TCGTTGACTC AGCCAGGGTC 835
 Ser His Pro
 230

20

TTATCTCGAG TIGGGAACCA AAACAAGGAA CAAGCTAGGC AAGTGCTGTG CTGAGTTACA 895

TCCCCAGCCC AGAGGACACA CTGTCTGGGT ATGGCCGATGG ACACTGTAAT TCCAGTGCTT 955

CTGGATTGGA CATGCTGAAA CTGGATACTG ACTTTAAGAA AAACAGAAAG GAAGAACCCC 1015
 CC 1017

25

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 22:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 57 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 22:

40 Gly Asn Gly Gly Pro Arg Ala Gln His His Gly Ala Thr Arg Leu Thr
 1 5 10 15

45 Ala Thr Ala Leu Leu Thr Val Cys Pro Gly Leu Leu Leu Pro Leu Val
 20 25 30

Gly Thr Ser His Met Phe Phe Leu Pro Tyr Phe Leu Ser Phe Leu Ser
 35 40 45

50 Ser Phe Leu Lys Met Tyr Leu Tyr Val
 50 55

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 87 pares de bases

60 (B) TIPO: ácidos nucleicos

(C) CORDÓN: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

65 (ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 23:

ES 2 150 495 T5

	GAT	AGG	GTC	TCA	TTA	TTA	TGC	AGG	CTA	GGC	CTG	ACC	CTG	AAC	TCA	AAG	48
	Asp	Arg	Val	Ser	Leu	Leu	Cys	Arg	Leu	Gly	Leu	Thr	Leu	Asn	Ser	Lys	
	1				5					10					15		

5	CAA	TCC	TCC	TGC	CTC	AGT	GTC	CTG	AGT	GCT	GGG	ATT	ACA		87
	Gln	Ser	Ser	Cys	Leu	Ser	Val	Leu	Ser	Ala	Gly	Ile	Thr		
			20					25							

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 344 pares de bases
 (B) TIPO: ácidos nucleicos
 (C) CORDÓN: único
 20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 24:

25	GGTAACGGTG GCCCCAGAGC CCAGCACCAT GGTGCCACCA GGCTCACAGC CACAGCCTTG	60
	CTAACTGTGT GTCCAGGGCT TCTGCTCCCA CTAGTTGGCA CTTACACACAT GTTCTTTCTC	120
30	CCTTATTTTC TCTCTTTTCT TTCTTCTTTT TTAAGATGT ATCTTTATGT GTGAGTGTTT	180
	TACCTACATG CCTGTAAGTG CACTGAATGT GTGTCTGGTG CCTGCAGAGG CCAGAAGAGG	240
35	GCACCAGATC CCCTGAAACT GGAGTCTCTN NGCTCCGIGT GAACCACCAC GTGGTGCTGG	300
	GACCCAGGTC CAATGCAAGA GCACCCAGGG TTCTTACCTG CTGA	344

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 18 pares de bases
 (B) TIPO: ácidos nucleicos
 (C) CORDÓN: único
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 25:

55	TTYGTNCARA CNAAYATH	18
----	----------------------------	-----------

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 60 (A) LONGITUD: 18 pares de bases
 (B) TIPO: ácidos nucleicos
 (C) CORDÓN: único
 65 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

ES 2 150 495 T5

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 26:

TTYGTNCARA CNTGYATH

18

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

(C) CORDÓN: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 27:

20 TTYGTNCARA CNAGYATH

18

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

(C) CORDÓN: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 28:

30 TTYGTNCARA CNTCNATH

18

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

(C) CORDÓN: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 29:

45 TTTYGTNCARA CNACNATH

18

50 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

(C) CORDÓN: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

55 (ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 30:

ES 2 150 495 T5

GAYTAYCCNG TNACNGTN

18

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 31:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

10

(C) CORDÓN: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 31:

ACNCCNGAYA TNTAYTTY

18

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

25

(B) TIPO: ácidos nucleicos

(C) CORDÓN: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 32:

TBGATHGARC ARCTNAAR

18

35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

(C) CORDÓN: único

45

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 33:

50

TGGATHGARC ARTTRAAR

18

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 34:

55

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

60

(C) CORDÓN: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

65

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 34:

AAYTTYAARG TNAARTTY

18

ES 2 150 495 T5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 87 pares de bases
- (B) TIPO: ácidos nucleicos
- (C) CORDÓN: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 35:

```
ACTCCTGACT GTTACTTCAG CCACAGTCCC ATCTCCTCCA ACTTCAAAGT GAAGTTTAGA 60
GAGTTGACTG ACCACCTGCT TAAAGAT 87
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 94 pares de bases
- (B) TIPO: ácidos nucleicos
- (C) CORDÓN: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: cDNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 36:

```
GGATCCCGGG TACCTTCTAG AATTCCGGAG CGGCCGCTGC AGATCTCATC ACCATCACCA 60
TCACGATTAC AAGGACGATG ACGATAAGTA ATGA 94
```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 37:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 29 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácidos
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 37:

```
Asp Pro Gly Tyr Leu Leu Glu Phe Arg Ser Gly Arg Cys Arg Ser His
1           5           10           15
His His His His His Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
20           25
```