



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 265 663**

51 Int. Cl.:

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C07K 14/42 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 39/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98931514 .8**

86 Fecha de presentación : **23.06.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1017789**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2000**

54 Título: **Ácido nucleico que codifica un factor de conservación de células madre derivado de la lectina.**

30 Prioridad: **24.06.1997 US 881189**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2007

73 Titular/es: **IMCLONE SYSTEMS, Inc.**
180 Varick Street
New York, New York 10014, US
The Regents of the University of California

72 Inventor/es: **Colucci, M., Gabriella;**
Chrispeels, Maarten, J. y
Moore, Jeffrey, G.

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 265 663 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ácido nucleico que codifica un factor de conservación de células madre derivado de la lectina.

5 Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a un ácido nucleico y a su correspondiente proteína para su utilización en relación con la conservación de células madre. Más específicamente, la invención se refiere a un ácido nucleico y a la proteína que lo codifica y que es capaz de conservar las células madre, así como a un método de utilización de la proteína para
10 conservar las células madre.

Cada día la médula ósea genera y libera en la circulación varios billones de células sanguíneas operativas, totalmente diferenciadas. La producción de estas células procede de una pequeña reserva de células madre latentes (incluyendo las células madre más primitivas y otras menos primitivas pero todavía células madre inmaduras) mediante un proceso denominado hematopoyesis (Zipori 1992). Las células madre más primitivas tienen capacidad para generar $>10^{13}$ células que contienen todas linajes sanguíneos (Turhan *et al.* 1989). La producción de dicho gran número de células se consigue mediante la proliferación extensa acoplada con sucesivas etapas de diferenciación que conducen a una producción equilibrada de células maduras. Las células madre pierden progresivamente su capacidad para generar múltiples linajes de células y eventualmente producen células de uno o dos linajes celulares.
20

Los reguladores solubles y las interacciones célula a célula median la serie de reacciones de diferenciación de las células madre inmaduras mediante un proceso controlado estrechamente pero comprendido de forma inadecuada. Se han aislado y caracterizado varios de los factores solubles del cuerpo tanto en cultivo como en animales (véase, p. ej., Ogawa (1993) y referencias en el mismo). Los reguladores tales como los factores estimulantes de colonias (p. ej., IL3, GM-CSF, G-CSF, M-CSF) no solamente producen la proliferación y diferenciación de precursores capaces de producir células de linajes celulares múltiples (IL3 y GM-CSF) o de linajes celulares individuales (G-CSF y M-CSF), sino que también conservan viabilidad de sus precursores respectivos durante cortos periodos. Otros reguladores tales como interleucina-1 (IL1), el ligando del kit (KL) y trombopoyetina (Borge *et al.* 1996) aumenta la viabilidad de precursores multipotenciales además de otras funciones. Ninguna citocina conocida sola o en combinación puede
30 conservar viabilidad de precursores primitivos en cultivo líquido sin soporte estrófico más de unos pocos días.

La regulación de las células madre primitivas parece diferenciarse de la de los precursores multilíneaje inmaduros. Las células madre hematopoyéticas, que residen en la médula ósea predominantemente en un estado latente, no parecen responder inmediatamente a los reguladores que producen la diferenciación y la proliferación. El mantenimiento de estas células en el cuerpo está mediado mediante interacciones célula a célula y sin los reguladores solubles. El mantenimiento de las células madre latentes *in vitro* se ha conseguido cultivando las células en capas adherentes de estroma con reguladores solubles tales como IL3, IL6, KL y LIF (Young *et al.* 1996). Recientemente se ha observado que la adición del ligando FLK2/FLT3 (FL) a este cultivo de complejo prolonga el mantenimiento de las células madre latentes durante unas pocas semanas hasta tres meses (Shah *et al.* 1996).
40

Aunque la utilización del cultivo de células del estroma se ha demostrado hasta ahora que es útil para el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas en las instalaciones de laboratorio, dichos métodos no son fácilmente adecuados para la aplicación clínica. El aislamiento y la creación de cultivos celulares de estroma para pacientes individuales no es práctico a causa del tiempo de molestia o debido a que la médula del paciente puede ponerse en peligro por la enfermedad subyacente o la exposición a los agentes (p. ej., quimioterapia de radiación) que puede dañar el microambiente de la médula ósea.
45

Las lectinas, definidas como proteínas que se unen a carbohidratos aparte de los anticuerpos o enzimas, (Baronides 1988) están extendidas entre las plantas, procariotas y eucariotas (véase generalmente, Gabius *et al.* 1993). Cada lectina reconoce un resto específico de carbohidrato y forma un enlace no covalente con el carbohidrato mediante un ataque estereoquímico de los dominios complementarios (p. ej., bolsa hidrófoba). Los carbohidratos están muy presentes en las superficies celulares (en forma de glucoproteínas, glucolípidos y polisacáridos) y parecen mediar los contactos célula-célula incluyendo el reconocimiento celular (Sharon *et al.* 1989). Los patrones de glucosilación anormal están asociados a la enfermedad produciendo alteraciones en las propiedades de la superficie de la proteína, conformación, estabilidad o resistencia de la proteasa (Dwek 1995).
55

Gowda *et al.* (1994) describió el aislamiento de una lectina específica para manosa-glucosa de la alubia del jacinto (*Dolichos lab lab*). La purificación y secuenciado de esta lectina se dice que indica que la proteína comprende dos subunidades no idénticas. La publicación de Gowda *et al.* describe las relaciones evolutivas de la lectina con otras lectinas, pero no atribuye ninguna función a la proteína aparte del enlace al sacárido.
60

Las propiedades aglutinantes de la célula de determinadas lectinas vegetales se han conocido desde hace más de 100 años. Determinadas lectinas se han utilizado como herramientas en los laboratorios de inmunología como activadores potentes y específicos de los linfocitos T (fitohemaglutinina (PHA) y concanavalina A (ConA)) y de linfocitos B (mitógeno de fitolaca (PWM)) durante más de 30 años (Sharon *et al.* 1989). Algunas lectinas se han utilizado asimismo para aislar precursores hematopoyéticos durante más de 15 años (Gabius 1994a). Grandes cantidades de pacientes de cáncer en Europa han recibido extractos en bruto de lectina de muérdago (*Viscum album*) por vía intravenosa como terapia contra el cáncer experimental sin mayores complicaciones (Gabius 1994b). No se conoce todavía si estas
65

lectinas vegetales actúan sobre las células de mamífero mediante medios por primera vez o simplemente simulan a sus homólogos mamíferos operativos. No se ha desarrollado todavía ninguna lectina con éxito como terapia humana.

En vista de las consideraciones anteriores, es evidente que la regulación del proceso hematopoyético permanece completamente incomprendida. Los reguladores más solubles identificados, tales como los factores estimulantes de colonias y las interleucinas, producen la proliferación y diferenciación de las células madre en cultivo y sus concentraciones en la circulación sanguínea aumentan durante los periodos de sobrecarga hematopoyética (p. ej., pérdida, infección sanguínea). Por ejemplo la patente US nº 4.808.611 describe un método de utilización de IL1 y un factor estimulante de colonias para producir la proliferación y diferenciación de células madre hematopoyéticas. Algunos reguladores solubles, tales como IL1, IL6, IL11, KL, FL y Tpo, aumentan marginalmente la viabilidad de precursores primitivos en sí mismos, pero cuando se añaden en combinación producen la proliferación y diferenciación de los precursores. Los reguladores solubles que mantienen o desarrollan precursores primitivos durante periodos prolongados en ausencia de soporte de estroma no están todavía disponibles en el mercado. El documento WO 98/25457 se refiere a una composición y al método para conservar las células madre y Colucci *et al.* describe la clonación por el ADNc de FRIL que conserva los precursores hematopoyéticos en cultivo en suspensión. Como consecuencia, numerosos métodos terapéuticos potenciales para enfermedades tales como el cáncer y enfermedades genéticas de la sangre permanecen inexplorados.

Por consiguiente, uno de los objetivos de la presente invención consiste en solucionar las limitaciones anteriores en los métodos de regulación de los procesos hematopoyéticos, proporcionando un factor y el método de protección, conservación y expansión de las poblaciones celulares precursoras hematopoyéticas. Otro objetivo de la invención consiste en proporcionar unos medios para proteger la integridad de los procedimientos hematopoyéticos *in vivo* como un anexo a los tratamientos terapéuticos relacionados con el cáncer y otras enfermedades que pueden si no impactar desfavorablemente de otro modo en el sistema hematopoyético.

Sumario de la invención

Se ha descubierto actualmente que estos y otros objetivos pueden alcanzarse mediante la presente invención.

El primer objetivo de la invención consiste en una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos definida por la SEC. ID nº: 2.

En una forma de realización del primer objetivo de la invención la molécula de ácido nucleico aislada codifica una proteína que:

- (a) presenta por lo menos el 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos que comprende la SEC. ID nº: 2;
- (b) es capaz de unirse a un receptor de flk2/flt3; y
- (c) es capaz de conservar las células precursoras hematopoyéticas.

En una segunda forma de realización del primer objetivo de la invención la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos definida por la SEC. ID nº: 1.

En otra forma de realización del primer objetivo de la invención el ácido nucleico aislado codifica una lectina de legumbres específica de manosa/glucosa.

Todavía en una forma de realización adicional del primer objetivo de la invención el ácido nucleico aislado codifica una proteína que mantiene las células madre que son por lo menos células madre unipotentes o células madre pluripotentes, células madre totipotentes, células madre hematopoyéticas o comprenden células madre de nervios, músculos, piel, intestinos, huesos, riñón, hígado, páncreas o timo.

En otra forma de realización del primer objetivo de la invención la proteína codificada conserva las células madre que son por lo menos células madre unipotentes y expresa el antígeno CD34 o el receptor FLK2/FLT3 o células que son células modificadas para expresar los receptores de FLK2/FLT3 en su superficie. En el último caso, otra forma de realización es la proteína codificada que presenta afinidad de enlace significativa para el receptor FLK2/FLT3 en las células, en los que el enlace de la proteína codificada con el receptor FLK2/FLT3 media la inhibición de la diferenciación de las células.

El segundo objetivo de la invención consiste en una proteína codificada por el ácido nucleico del primer objetivo de la invención.

El tercer objetivo de la invención es una composición farmacéutica que contiene una proteína codificada por el ácido nucleico del primer objetivo de la invención.

El cuarto objetivo de la invención es un método para conservar las células madre *in vitro*, en el que las células madre no son células embrionarias humanas, que comprende poner en contacto las células madre con una proteína *in*

ES 2 265 663 T3

vitro o *ex vivo*, en el que dicha proteína comprende la secuencia de aminoácidos definida por SEC. ID n°: 2 en una cantidad suficiente para conservar las células madre.

En otra forma de realización las células madre de la forma de realización del procedimiento comprenden células humanas que expresan el antígeno CD34 y/o el receptor FLK2/FLT3 o comprenden células murinas que expresan el antígeno Sca pero que no expresan los antígenos del linaje celular sanguíneo murino.

En una segunda forma de realización del cuarto objetivo de la invención el método comprende además poner en contacto las células precursoras con el ligando FLK2/FLT3 en una cantidad suficiente para aumentar selectivamente el número de células madre sin producir la diferenciación de las mismas.

El quinto objetivo de la invención consiste en la utilización de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos definida por la SEC. ID n°: 2 en una cantidad suficiente para conservar las células madre en el que las células madre no son células embrionarias humanas, destinada a la preparación de una composición farmacéutica para conservar las células madre.

El sexto objetivo de la invención consiste en un método de enriquecimiento de células madre, en el que las células madre no son células embrionarias humanas, que comprende las células madre de cultivo en una cantidad que conserva las células madre de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos definida por la SEC. ID n°: 2, en el que la proteína conserva específicamente las células madre, y en el que el cultivo se realiza en condiciones que permitan la conservación de las células madre aunque permitiendo que disminuya el número de células madre diferenciadas.

En una forma de realización del sexto objetivo de la invención las células madre comprenden células madre primitivas, incluyen células madre maduras o están por lo menos sustancialmente exentas de células de estroma.

En otra forma de realización del sexto objetivo de la invención las condiciones de cultivo comprenden el cultivo en un medio que contiene un agente citotóxico que presenta toxicidad selectiva para las células proliferantes.

En una forma de realización adicional de la forma de realización del procedimiento del sexto objetivo de la invención el agente citotóxico es adriamicina, ciclofosfamida, taxol u otro taxano, cisplatino o 5-fluorouracilo.

El séptimo objetivo de la invención consiste en un método *in vitro* de transfección de la secuencia del ADN exógeno en células somáticas, comprendiendo la mejora la transfección de células madre selectivamente conservadas mediante una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos definida por la SEC. ID n°: 2, en el que las células madre no son células embrionarias humanas.

El octavo objetivo de la invención consiste en una composición para conservar la viabilidad de las células madre *ex vivo*, que comprende un medio de crecimiento celular y una proteína que conserva las células madre, en el que la proteína comprende la secuencia de aminoácidos definida por la SEC. ID n°: 2 y en el que las células madre no son células embrionarias humanas.

El noveno objetivo de la invención consiste en la utilización de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos definida por la SEC. ID n°: 2 en una cantidad suficiente para conservar las células madre del mamífero en un estado sustancialmente no proliferante para la preparación de una composición farmacéutica destinada a conservar las células madre en un mamífero en el que las células madre no son células embrionarias humanas.

Breve descripción de los dibujos

Las formas de realización preferidas de la invención se han seleccionado a título ilustrativo y descriptivo, pero no se pretende en modo alguno que restrinjan el alcance de la invención. Las formas de realización preferida de determinados aspectos de la invención se presentan en los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 es una cartografía de un vector de clonación pCR2.1-DLA preparado por ligadura de un ADNc según la invención en la secuencia *EcoRI* del vector de clonación pCR2.1.

La Figura 2 es una comparación directa de la secuencia de aminoácidos de la manosa lectina descrita por Gowda *et al.* (1994) y la secuencia derivada de aminoácidos de la proteína codificada por el ácido nucleico de la invención.

La Figura 3 es una cartografía de un vector de clonación pCR2.1-DLA (D) preparado por ligadura de un ADNc mutado en la secuencia *EcoRI* del vector de clonación pCR2.1.

La Figura 4 es una cartografía de un vector de clonación pBS.SpDLA preparado por ligadura de un fragmento recombinante en la secuencia *EcoRI* del vector de clonación pBluescript SK+.

La Figura 5 es una cartografía de un vector de clonación pCR2.1-SpM1 (D) preparado por ligadura de un clon recombinante mutado en la secuencia *EcoRI* del vector de clonación pCR2.1.

La Figura 6 es una cartografía de un vector de expresión recombinante pBIN-VicPro preparado por subclonación del activador de vicilina obtenido a partir del vector pCW66 en la secuencia *EcoRI/ClaI* del vector binario vegetal pBIN19 para la transformación mediada por *Agrobacterium*.

La Figura 7 es una cartografía de un vector de expresión recombinante pBINVicPro-SpDLA preparado por ligadura de un fragmento recombinante en la secuencia *EcoRI/SacI* del vector pBINVicPro.

La Figura 8 es una cartografía de un vector de expresión recombinante pBINVicPro-SpDLA(D) preparado por ligadura de un clon recombinante mutado en la secuencia *EcoRI* del vector pBINVicPro.

La Figura 9 es una cartografía de un vector de expresión recombinante pGEX4T-1-DLA preparado por ligadura de un clon de ADNc natural en la secuencia *EcoRI/SalI* del vector de expresión pGEX4T-1 de *E. coli*.

La Figura 10 es una cartografía de un vector de expresión recombinante pGEX4T-1-DLA(D) preparado por ligadura de un clon de ADNc mutante en la secuencia *EcoRI/XhoI* del vector de expresión pGEX4T-1 de *E. coli*.

La Figura 11 es un electroforetograma de una transferencia Southern de los extractos de proteína completos de las células de *E. coli* transformadas con los vectores de expresión recombinante pGEX4T-1-DLA y pGEX4T-1-DLA(D).

La Figura 12 es un electroforetograma de una transferencia Western de las proteínas de fusión GST purificadas con y sin escisión por trombina.

La Figura 13A es un gráfico que demuestra que un extracto en bruto de un cultivo de *E. coli* que contiene FRIL expresada estimula específicamente las células 3T3 de hFLK2/FLT3; la Figura 13B es un gráfico que demuestra que el mismo extracto no estimula las células 3T3 no transfectadas.

La Figura 14A es un histograma que demuestra que recFRIL purificada conserva las células mononucleares de la sangre de la espina dorsal en función de la respuesta a la dosis; la Figura 14B es un histograma que demuestra que recFRIL purificada conserva los precursores hematopoyéticos en función de la respuesta a la dosis.

La Figura 15 es un histograma que demuestra que la proteína codificada por un ácido nucleico de la invención es suficiente para conservar las células madre *in vitro*, mientras que una mezcla de citocina no puede conservar dichas células.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

La presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica una proteína que conserva las células madre, y, por consiguiente, la invención comprende además un método de utilización del ácido nucleico para la producción de la proteína codificada y un método de utilización de la proteína codificada para la conservación de las células madre.

Los solicitantes han aislado y secuenciado un ácido nucleico que presenta la secuencia definida por la SEC. ID n°: 1, y homólogos del mismo, incluyendo los homólogos en otras especies. La invención comprende además fragmentos exclusivos del ácido nucleico de la SEC. ID n°: 1 y sus homólogos que codifican una proteína que presenta por lo menos el 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEC. ID n°: 2; es capaz de unirse a un receptor flk2/flt3; y es capaz de conservar las células madre hematopoyéticas.

La proteína codificada por la secuencia de ácidos nucleicos definida por la SEC. ID n°: 1 presenta la secuencia de aminoácidos definida por la SEC. ID n°: 2. La secuencia TNNVLQVT, forma parte de la SEC. ID n°: 2.

La expresión “Ácido nucleico”, tal como se utiliza en la presente memoria, significa cualquier ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) que codifica en su secuencia de nucleótidos una proteína como la descrita en la presente memoria o uno de sus fragmentos exclusivos. El fragmento puede ser un oligonucleótido (es decir, de aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud) o un polinucleótido (de aproximadamente 50 a aproximadamente 2.000 o más nucleótidos de longitud). Por ejemplo, los ácidos nucleicos incluyen el ARN mensajero (ARNm), el ADN complementario (ADNc), el ADN genómico, el ADN o ARN sintéticos y similares. El ácido nucleico puede ser de una sola cadena o de doble cadena parcial o completamente (doble). Los ácidos nucleicos dobles pueden ser homodobles o heterodobles.

La invención comprende específicamente los ácidos nucleicos que presentan una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia definida por SEC. ID n°: 1, o un homólogo de la misma, o fragmentos exclusivos de la misma que codifican una proteína que presenta por lo menos el 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEC. ID n°: 2; es capaz de unirse a un receptor flk2/flt3; y es capaz de conservar las células madre hematopoyéticas. En la presente memoria, la secuencia de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína se considera homóloga a una segunda molécula de ácido nucleico si la secuencia de nucleótidos de la primera molécula de ácido nucleico es por lo menos aproximadamente 30% homóloga, preferentemente por lo menos aproximadamente 50% homóloga, y más preferentemente por lo menos aproximadamente 65% homóloga.

a la secuencia de la segunda molécula de ácido nucleico. En el caso de los ácidos nucleicos que presentan gran homología, la secuencia de nucleótidos de la primera molécula de ácido nucleico es por lo menos aproximadamente 75% homóloga, preferentemente por lo menos aproximadamente 85% homóloga y más preferentemente por lo menos aproximadamente 95% homóloga con la secuencia de nucleótidos de la segunda molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, una prueba para la homología de dos secuencias de ácido nucleico es si se hibridan en condiciones normales de hibridación, preferentemente en condiciones de hibridación severas.

Dada la secuencia de ácido nucleico descrita en la presente memoria, el especialista puede diseñar más estructuras de ácido nucleico que presenten funciones determinadas en varios tipos de aplicaciones. Por ejemplo, el especialista puede construir oligonucleótidos o polinucleótidos para su utilización como cebadores en procedimientos de ampliación de ácido nucleico, tal como la reacción en cadena de polimerasa (PCR), la reacción en cadena de ligasa (LCR), la reacción en cadena de reparación (RCR), el ensayo de ligadura de oligonucleótidos de PCR (PCR-OLA) y similares. Pueden construirse oligonucleótidos útiles como sondas en estudios de hibridación, tal como la hibridación *in situ*. Se conocen numerosos métodos para el marcado de dichas sondas con radioisótopos, etiquetas fluorescentes, enzimas, restos de enlace (p. ej., biotina) y similares, de modo que las sondas de la invención pueden adaptarse para fácil detectabilidad.

Los oligonucleótidos pueden asimismo diseñarse y prepararse para otros fines. Por ejemplo, la invención permite al especialista diseñar oligonucleótidos de cadena complementaria y oligonucleótidos de formación triple y similares, para su utilización en el estudio de las relaciones estructura/función. La recombinación homóloga puede realizarse mediante la adaptación del ácido nucleico de la invención para su utilización como medio de direccionamiento.

Como una nueva y específica secuencia de nucleótidos descrita en la presente memoria, el especialista reconocerá que el ácido nucleico puede producirse mediante cualquier proceso sintético o recombinante tal como es bien sabido en la materia. Los ácidos nucleicos según la invención pueden modificarse además para alterar las propiedades biofísicas o biológicas mediante técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, el ácido nucleico puede modificarse para aumentar su estabilidad frente a las nucleasas (p. ej., “encapsulación del extremo”) o para modificar su lipofilia, solubilidad o afinidad de enlace a las secuencias complementarias. Los métodos para modificar ácidos nucleicos para conseguir fines específicos se describen en la materia, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989). Además, el ácido nucleico puede incluir una o más partes de la secuencia de nucleótidos que no son codificantes de la proteína de interés.

El experto en la materia aprecia que, si una secuencia de aminoácidos (estructura primaria) es conocida, puede entonces pueden construirse los ácidos nucleicos, presentando cada uno una secuencia que se diferencia de las demás en por lo menos un nucleótido, pero donde cada ácido nucleico diferente codifica todavía la misma proteína. Por ejemplo, si una proteína se ha secuenciado pero su gen correspondiente no se ha identificado, el gen puede obtenerse por ampliación del ADN genómico utilizando un conjunto de cebadores degenerados que especifican todas las secuencias posibles que codifican la proteína.

La proteína codificada por el ácido nucleico de la invención y los análogos operativos de la proteína codificada son esencialmente puros. Para los fines de la presente memoria, la expresión “esencialmente pura” significa que la proteína y los análogos operativos están exentos de todas las cantidades residuales de otras proteínas así como de los materiales utilizados durante el procedimiento de purificación. Una proteína se considera que es esencialmente pura si es por lo menos el 85%, preferentemente por lo menos el 90% y más preferentemente por lo menos el 95% pura. Los métodos de purificación de proteína son conocidos en la materia.

La determinación de si dos secuencias de aminoácidos son sustancialmente homólogas se basa, para los fines de la presente memoria, en las investigaciones por FASTA según Pearson *et al.* (1988). En la presente memoria, la secuencia de aminoácidos de una primera proteína se considera que es homóloga con la de una segunda proteína si la secuencia de aminoácidos de la primera proteína presenta por lo menos el 20% de identidad de la secuencia de aminoácidos, preferentemente por lo menos aproximadamente el 40% de identidad y más preferentemente por lo menos aproximadamente el 60% de identidad, con la secuencia de la segunda proteína. En el caso de las proteínas que presentan gran homología, la secuencia de aminoácidos de la primera proteína presenta por lo menos aproximadamente el 75% de identidad de secuencia, preferentemente por lo menos aproximadamente el 85% de identidad y más preferentemente por lo menos aproximadamente el 95% de identidad, con la secuencia de aminoácidos de la segunda proteína.

La proteína codificada por el ácido nucleico de la presente invención puede ser un homólogo operativo. Una proteína se considera un homólogo operativo de otra proteína para una función específica, como la descrita a continuación, si el homólogo presenta la misma función que la otra proteína. El homólogo puede ser, por ejemplo, un fragmento de la proteína o una sustitución, adición o mutante por delección de la proteína.

Como es también conocido, es posible sustituir aminoácidos en una secuencia con aminoácidos equivalentes. Los grupos de aminoácidos conocidos normalmente por ser equivalentes son:

- (a) Ala(A), Ser(S), Thr(T), Pro(P), Gly(G);
- (b) Asn(N), Asp(D), Glu(E), Gln(Q);
- (c) His(H), Arg(R), Lys(K);

(d) Met(M), Leu(L), Ile(I), Val(V); y

(e) Phe(F), Tyr(Y), Trp(W).

- 5 Las sustituciones, adiciones y/o deleciones en las secuencias de aminoácidos pueden realizarse siempre que la proteína codificada por el ácido nucleico de la invención continúe satisfaciendo los criterios operativos descritos en la presente memoria. Una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente la misma que otra secuencia, pero que se diferencia de la otra secuencia mediante una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones, se considera que es una secuencia equivalente. Preferentemente, menos del 50%, más preferentemente menos del 25% y todavía más
10 preferentemente menos del 10%, del número de restos de aminoácidos en una secuencia puede sustituirse, añadirse o eliminarse de la proteína codificada por el ácido nucleico de la invención.

- Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “célula madre” se refiere a cualquier célula somática normal que presente la capacidad para generar descendencia operativa diferenciada por diferenciación y proliferación.
15 Las células madre comprenden precursores de cualquier sistema de tejido u órgano, incluyendo, pero sin limitarse a, sangre, nervios, músculo, piel, intestino, hueso, riñón, hígado, páncreas, timo y similares; tal como se utiliza en la presente memoria, las células madre no son células embrionarias humanas. Las células precursoras se distinguen de “las células diferenciadas”, estando definidas las últimas como aquellas células que pueden o no presentar la capacidad para proliferar, es decir, autorreplicarse, pero que no pueden experimentar diferenciación adicional a un tipo de
20 células diferente en condiciones fisiológicas normales. Además, las células madre se distinguen más de las células anormales como las células cancerosas, especialmente las células de leucemia, que proliferan (se autorreplican) pero que generalmente no se diferencian más, a pesar de que parecen ser inmaduras o no diferenciadas.

- Las células madre incluyen todas las células en una estirpe de diferenciación y proliferación antes de que la mayoría de las células diferenciadas o completamente maduras. Por lo tanto, por ejemplo, los precursores comprenden el precursor de la piel en el individuo maduro. El precursor de la piel es capaz de diferenciación solamente en un tipo de célula, pero no es completamente maduro o completamente diferenciado.

- La producción de algunas células sanguíneas maduras, operativas procede de la proliferación y diferenciación de “precursores unipotenciales”, es decir, aquellos precursores que presentan la capacidad para preparar únicamente un tipo de célula sanguínea. Para la producción de glóbulos rojos (eritrocitos), un precursor unipotencial denominado “CFU-E” (unidad eritroide formadora de colonias) presenta la capacidad de generar dos a 32 células de descendencia
30 maduras.

- Se han caracterizado varios otros precursores hematopoyéticos. Por ejemplo, las células precursoras hematopoyéticas comprenden aquellas células que son capaces de ciclos sucesivos de diferenciación y proliferación para dar hasta ocho linajes de células hematopoyéticas maduras diferentes. En el extremo más primitivo o indiferenciado del espectro hematopoyético, las células madre hematopoyéticas comprenden las “células madre” hematopoyéticas. Estas son células raras, que representan desde aproximadamente 1 en 10.000 a aproximadamente 1 en 100.000 de las células de la médula ósea, y las células más primitivas presentan la capacidad de generar $>10^{13}$ células sanguíneas maduras de todas los linajes y son responsables de mantener la producción de células sanguíneas durante la vida de un animal. Residen principalmente en la médula en estado latente y pueden formar células hijas idénticas mediante un proceso denominado “autorrenovación”. Por consiguiente, dichas células precursoras no comprometidas pueden describirse como que son “totipotentes”, es decir, necesarias y suficientes ambas para generar todos los tipos de células sanguíneas maduras. Las células precursoras que conservan capacidad para generar todas los linajes de células sanguíneas pero que pueden no autorrenovarse se denominan “pluripotentes”. Las células que pueden producir algunas pero no todas los linajes sanguíneos y pueden no autorrenovarse se denominan “multipotentes”.

- La proteína codificada por el ácido nucleico de la invención sirve para conservar cualquiera de estas células precursoras, incluyendo las células precursoras unipotentes, las células precursoras pluripotentes, las células precursoras multipotentes y/o las células precursoras totipotentes. La proteína es útil para la conservación y el mantenimiento de las células precursoras en los tejidos hematopoyéticos así como en los tejidos no hematopoyéticos, tales como los mencionados anteriormente.

- La proteína recombinante codificada por el ácido nucleico de la invención es especialmente útil en la conservación de los precursores hematopoyéticos en mamíferos tales como el hombre, ratones, ratas, etc. En el hombre, las células precursoras hematopoyéticas pueden identificarse porque pertenecen a una clase de células definidas por su expresión de un antígeno de la superficie celular denominado CD34. Estas células pueden denominarse células “CD34⁺”. En el ratón, las células precursoras hematopoyéticas pueden denominarse células “Sca⁺Lin⁻”, reflejando su firma de antígeno de la superficie celular. Otras especies de mamífero presentan propiedades de firma similares que identifican células precursoras hematopoyéticas. Los precursores hematopoyéticos pueden identificarse también por su expresión del receptor FLK2/FLT3.

- Las células madre hematopoyéticas humanas que expresan el antígeno CD34 y/o el receptor FLK2/FLT3 se denominan en la presente memoria “células precursoras primitivas”. Por consiguiente, las células precursoras primitivas incluyen las células CD34⁺FLK2/FLT3⁻, las células CD34⁻FLK2/FLT3⁺ y las células CD34⁺FLK2/FLT3⁺. En cambio, las células hematopoyéticas que no expresan el antígeno CD34 o el receptor FLK2/FLT3 (es decir las células CD34⁻FLK2/FLT3⁻) se denominan “células precursoras maduras”.

Preferentemente, la proteína recombinante es eficaz para conservar las células precursoras que expresan el antígeno CD34 y/o el receptor FLK2/FLT3. Las células precursoras pueden comprender células modificadas que expresen el antígeno CD34 o los receptores FLK2/FLT3 en su superficie. En un caso preferido, la proteína presenta afinidad de enlace significativa para el receptor FLK2/FLT3 en las células, en la que el enlace de la proteína con el receptor FLK2/FLT3 media la inhibición de la diferenciación de las células. La proteína codificada por el ácido nucleico de la invención se ha denominado “lectina interactuante con el receptor FLK2/FLT3”, en abreviatura “FRIL”, para describir este fenómeno, pero esta designación se utiliza por conveniencia y no debe entenderse que se atribuye por definición a cualquier propiedad específica o a cualquier origen de la proteína.

La proteína recombinante media la “conservación” de las células precursoras. Esto significa que la proteína inhibe la diferenciación de las células precursoras sin eliminar la población celular precursora. En algunos casos, la inhibición de la diferenciación está acompañada de la proliferación de la población de células precursoras. En otros casos, la inhibición de la diferenciación se produce sin proliferación de la población de las células precursoras. En particular, inhibición de los procesos de diferenciación, significa que el péptido disminuye de manera significativa la cantidad en que se diferencian las células y puede de hecho detener completamente estos procesos. Aunque el mecanismo por el que actúa la proteína no se entiende por sí mismo, una posibilidad teórica es que la proteína mantiene las células precursoras en estado latente o G0 del ciclo celular. A diferencia del mecanismo existente de su actuación, sin embargo la proteína no conserva las células precursoras sin destruir las células en cantidades significativas. En este sentido, la proteína recombinante se distingue de manera significativa de los factores que inhiben o interfieren con los procesos celulares (p. ej., replicación del ADN, síntesis de proteína) y que producen por esta razón mortalidad significativa de células.

Como resultado de la presente invención, numerosos servicios se hacen técnicamente posibles. El método de la invención puede incluir la puesta en contacto de las células precursoras con la proteína recombinante *in vitro* o *ex vivo*. Los métodos “*in vitro*” incluyen los métodos tales como los métodos experimentales de laboratorio que se realizan completamente fuera del cuerpo vivo. Aunque las células pueden obtenerse a partir de un organismo vivo para su utilización *in vitro*, se entiende que las células no son devueltas al cuerpo. Los métodos *in vitro* se emplean normalmente en instalaciones experimentales para la comprensión avanzada de determinados sistemas. Los métodos “*ex vivo*” comprenden los métodos clínicos en los que las células se manipulan fuera del cuerpo de un organismo, por ejemplo, un paciente, con el fin específico de volver a reemplazar algunas células en el organismo para conseguir un fin terapéutico deseado. Los métodos “*in vivo*” se realizan dentro del cuerpo del organismo, sin que requieran explantación o toma de muestras y manipulación del tejido.

Por ejemplo, la proteína recombinante encuentra utilidad, entre otras, porque permite la conservación *ex vivo* de células precursoras hematopoyéticas aisladas de médula ósea normal o maligna (p. ej., leucémica). Por consiguiente, la proteína puede emplearse en el cultivo de células mononucleares procedentes de una fuente de dichas células, por ejemplo, de médula ósea, sangre de cordón umbilical, sangre de placenta o sangre periférica. La proteína recombinante puede utilizarse junto con los factores de crecimiento tales como los factores estimulantes de colonias (CSF) (p. ej., IL3, GM-CSF, G-CSF, M-CSF), interleucinas (p. ej., IL1 a IL18) y KL *in vitro* para producir selectivamente la proliferación y la diferenciación terminal de precursores maduros mientras que se conserva una población significativamente enriquecida de precursores primitivos. Las patentes US nº 5.472.867 y US nº 5.186.931 describen métodos representativos de utilización de las CSF y las interleucinas (IL) para ampliar las poblaciones de células precursoras en los contextos, respectivamente, de la quimioterapia del cáncer y de los trasplantes de médula ósea. En un caso preferido según la presente invención, el método puede incluir además la puesta en contacto de las células precursoras con el ligando FLK2/FLT3 en una cantidad suficiente para ampliar selectivamente el número de células precursoras sin producir su diferenciación.

La proteína recombinante aumenta la supervivencia de las células precursoras cuando se cultiva *in vitro*. Por ejemplo, puede utilizarse un procedimiento de selección *in vitro* que implica la utilización de la proteína para conservar las células precursoras en un estado sustancialmente latente en cultivo, mientras que se utiliza un agente citotóxico que presenta toxicidad selectiva para la proliferación de las células, p. ej., para destruir las células que pasan a través del ciclo celular (“células del ciclo”). Los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, los compuestos tales como adriamicina, ciclofosfamida, taxol u otro taxano, cisplatino, 5-fluorouracilo y similares. El método es útil para conservar las células precursoras latentes. El método es eficaz incluso cuando las células precursoras están sustancialmente exentas de células de estroma, que se consideran que normalmente son necesarias para el mantenimiento de la célula precursora y la propia reconstrucción hematopoyética. La proteína recombinante mejora la capacidad para seleccionar operativamente las células madre ya sea solas o con otros factores. Dichos métodos de selección operativa, incluyen el método descrito por Berardi *et al.* (1995) donde la selección se realiza utilizando una combinación de KL e IL3 con 5-FU.

Conservando las células precursoras en estado latente, la proteína codificada por el ácido nucleico de la invención conserva las células precursoras normales, mientras que se destruyen las células de ciclación. Por ejemplo, purgando *ex vivo* pueden utilizarse protocolos para eliminar selectivamente células neoplásicas dirigiendo la eliminación de células que se ciclan activamente. Una vez las células precursoras se han purgado de células malignas que se ciclan, pueden retornarse al paciente y permitir que empiecen de nuevo la proliferación y diferenciación normales. En un escenario especialmente útil, la proteína recombinante permite la selección operativa de las células precursoras normales de una médula ósea leucémica.

Dicha selección y purificación operativa de las células madre primitivas también puede utilizarse para permitir procedimientos de trasplante alogénicos. En situaciones en que el tejido autólogo no está disponible para el trasplante, el cultivo de células alogénicas en presencia de la proteína codificada por el ácido nucleico de la invención producirá la selección de células madre y la eliminación de linfocitos T y de otras células efectoras. Esto permitirá el trasplante de
 5 precursores mientras que inhibe una reacción de trasplante contra el huésped. Dichas células madre adquieren dentro del receptor inmunológico tolerancia de los antígenos con histocompatibilidad del receptor.

Es una ventaja adicional de la invención que permite la conservación de las células durante periodos y en condiciones que permiten el envío de células, (por ejemplo, por correo, a localidades distantes para el trasplante).

La proteína recombinante también permite la manipulación *ex vivo* de células precursoras hematopoyéticas para su utilización en terapia génica conservando las células en cultivo líquido. Por ejemplo, conservando las células precursoras hematopoyéticas en cultivo durante más de dos semanas, la proteína permite el aumento de eficacia de direccionamiento mediante los vectores víricos que introducen células no replicativas (p. ej. vectores tales como los
 15 virus adenoasociados) y proporciona periodos más prolongados para que la evaluación de las poblaciones celulares resultantes determinen la eficacia de transfección. De este modo, en otra forma de realización, el método puede utilizarse junto con los métodos de transfección de una secuencia de ADN exógena en células somáticas. El método puede incluir a continuación células precursoras transfectantes selectivamente conservadas por la proteína recombinante.

La invención también presenta utilidad juntamente con terapias, p. ej., terapias contra el cáncer, que emplean irradiación. Específicamente, debido a que la proteína recombinante conserva células precursoras en estado latente, la administración de la proteína recombinante a un paciente mamífero *in vivo* permite la utilización de concentraciones crecientes de irradiación total del cuerpo para eliminar las células neoplásicas, si bien dejando las células latentes relativamente no afectadas. La proteína puede emplearse juntamente con otras sustancias citoprotectoras tales como
 25 IL-1 para obtener un efecto aumentado o complementario.

Por lo tanto, el método puede implicar el tratamiento de un paciente mamífero que necesite de terapia hematopoyética. En particular, puede utilizarse la proteína recombinante para aumentar la competencia hematopoyética en un mamífero, es decir, la capacidad del mamífero para generar elementos operativos de sangre madura. Por ejemplo,
 30 puede extraerse del paciente una muestra de tejido que incluyen células precursoras hematopoyéticas. A continuación la muestra de tejido puede cultivarse *ex vivo* en un medio de crecimiento que contiene la proteína recombinante para conservar los precursores, mientras que se permite que las células de ciclo proliferen, se diferencien y mueran. Las células cultivadas se enriquecen de manera significativa en células precursoras primitivas. Entre tanto, el mamífero puede someterse a condiciones suficientes que efectúen la mieloablación, por ejemplo, irradiación de la médula ósea, irradiación completa del cuerpo o mieloablación producida químicamente. Por último, las células cultivadas enriquecidas del precursor pueden administrarse o transfundirse al mamífero después de la mieloablación para generar componentes celulares de la sangre en el mamífero, reconstituyendo de este modo el sistema hematopoyético del mamífero. El método puede utilizar una muestra de tejido que comprende sangre periférica, sangre del cordón umbilical, sangre de placenta o médula ósea. Preferentemente, la muestra de tejido es autóloga para el mamífero. La muestra del tejido
 40 puede estar por lo menos sustancialmente exenta de células de estroma.

Aunque se describe en la presente memoria como un procedimiento autólogo, el médico experto reconocerá que los métodos pueden adaptarse fácilmente para el trasplante de células precursoras enriquecidas de un individuo a otro. De nuevo, cuando el tejido autólogo no esté disponible para el trasplante, pueden utilizarse células alogénicas de cultivo
 45 en presencia de la proteína codificada para producir la selección de células madre y la eliminación de linfocitos T y de otras células efectoras. Las células precursoras trasplantadas adquieren en el receptor inmunológico tolerancia de los antígenos de histocompatibilidad del receptor, mitigando de este modo las reacciones trasplante contra huésped.

La invención incluye además una composición para conservar la viabilidad de las células precursoras *ex vivo* o *in vitro*. La composición comprende un medio de cultivo adecuado para el crecimiento y el mantenimiento de las células del mamífero en el cultivo, junto con una cantidad de la proteína recombinante suficiente para conservar las células precursoras tal como se describe en la presente memoria. Prácticamente cualquier medio de cultivo celular o tisular puede modificarse para la conservación de los precursores de este modo. Se conocen medios de cultivo normalizados adecuados, incluyendo, por ejemplo, el medio de Eagle esencial mínimo (MEM), el medio de Eagle modificado por
 50 Dulbecco (DMEM), el medio 5A modificado de McCoy, el medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), el medio 199, RPMI-1640, formulaciones variantes especializadas de estos medios y similares. Dichos medios pueden enriquecerse utilizando sueros (por ejemplo, suero bovino fetal), tampones (p. ej., HEPES), hormonas, citocinas, factores de crecimiento u otros componentes deseados. Numerosos medios están disponibles en el mercado, p. ej. en Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

Receptáculos listos para utilizar, por ejemplo bolsas de sangre, bolsas de medio y frascos, placas de microvaloración, matraces de cultivo tisular y celular, frascos para rodillo, matraces para agitación, placas de cultivo y similares, pueden proporcionarse asimismo con la proteína codificada por el ácido nucleico de la invención (con o sin medio de cultivo u otros componentes activos) para activar el almacenamiento y/o cultivo de las células precursoras. La proteína
 65 permite al especialista almacenar las células precursoras bajo refrigeración, a temperatura ambiente o en un incubador a 37°C. La capacidad de la proteína para conservar las células a temperatura ambiente es particularmente útil para transportar las células.

Asimismo, las células precursoras en un mamífero pueden conservarse *in vivo*. En este método, el procedimiento comprende la administración al mamífero de la proteína recombinante en una cantidad suficiente para conservar las células precursoras del mamífero en un estado sustancialmente no proliferante. El mamífero se expone a continuación a condiciones mieloablativas suficientes para efectuar la extirpación de las células mieloides proliferantes pero reservando las células precursoras no proliferantes. Después del tratamiento de extirpación, se restablece la proliferación o diferenciación de las células precursoras conservadas, administrando al mamífero normalmente una citocina en una cantidad suficiente para mejorar la viabilidad de las células precursoras. Las citocinas preferidas que mejoran la viabilidad comprenden, por ejemplo el ligando FLK2/FLT3, IL1, IL3, IL6, IL11, KL o una combinación de las mismas. Según este método, la proteína recombinante puede utilizarse para aumentar las técnicas autólogas de trasplante de médula ósea en las que las dosis letales de radiación y/o quimioterapia son seguidas por reinfusión de la médula almacenada.

Una cantidad eficaz de proteína recombinante puede administrarse a un mamífero por cualquier método conveniente, tal como las vías parenterales, p. ej., inyección intravenosa, o rutas entéricas, por ejemplo, administración oral. Es de esperar que las vías de administración oral sean útiles ya que las lectinas de procedencia natural resisten típicamente la degradación oral/gástrica, y pueden presentar biodisponibilidad sustancial por este método (Pusztai *et al.* 1995). El especialista experto reconoce la utilidad y las limitaciones de varios métodos de administración y puede ajustar la dosificación consecuentemente.

Otros servicios terapéuticos también se presentan al médico general experto a medida que permite la invención. Dichos otros servicios incluyen, por ejemplo, la propagación de las poblaciones de células madre *ex vivo* para aumentar las posibilidades de trasplante, la mejora de las condiciones para transportar y almacenar las células madre y la eliminación de una barrera fundamental que permite la terapia génica para tratar y curar un amplio espectro de enfermedades hematológicas que limitan la vida tal como la anemia depreanocítica y la talasemia.

La proteína codificada por el ácido nucleico de la invención puede utilizarse también como sonda específica para la identificación o localización de las células madre. Dado que la proteína se une específicamente a las células madre primitivas, una composición que comprende la proteína ligada a un grupo detectable tal como un marcador fluorescente puede utilizarse para marcar específicamente e identificar las células madre. Por lo tanto, la clasificación celular para aislar células madre puede realizarse, como puede la localización histológica de las células madre en los tejidos y otros métodos conocidos en la materia. El especialista experto puede seleccionar el tipo o grupo marcador que debe emplearse y el método de aislamiento de las células según la tarea que debe realizarse, ya que numerosos métodos de marcado de proteínas son conocidos en la materia.

La proteína codificada por el ácido nucleico de la invención puede utilizarse para aislar las células madre que expresan FLK2/FLT3-R. La proteína está ligada preferentemente a un grupo químico o a un objeto para ayudar al aislamiento. Por ejemplo, la proteína puede estar químicamente ligada a perlas magnéticas. La naturaleza multivalente de la proteína es particularmente útil para el aislamiento de células, tal como los precursores hematopoyéticos primitivos, que expresan bajos niveles de FLK2/FLT3-R (es decir, menos de aproximadamente 5.000 receptores/células). Similares métodos que utilizan anticuerpos ligados a perlas magnéticas requieren concentraciones significativamente más elevadas de receptores de la superficie celular.

Preparación y utilización del ácido nucleico de la invención

La secuencia de ácido nucleico de la invención puede aislarse de una fuente natural, tal como la que procede de las leguminosas. Las legumbres tales como el guisante de jardín o la alubia común son plantas ("plantas leguminosas") de una familia (*Leguminosae*) de hierbas dicotiledóneas, arbustos y árboles que llevan nódulos (bacterias fijadoras de nitrógeno) en sus raíces. Estas plantas están asociadas normalmente con otras semillas (p. ej., tal como el guisante de jardín o la alubia común, etc.). Más específicamente, el ácido nucleico puede aislarse de miembros de la familia *Phaseoleae*. En particular, el ácido nucleico puede obtenerse a partir de *Dolichos lab lab*, conocido como jacinto y otras denominaciones comunes en todo el mundo, de variedades de la alubia común (*Phaseolus vulgaris*), p. ej., alubias rojas de riñón, alubias blancas de riñón, etc. y a partir de *Vigna sinensis*, conocido vulgarmente como judía carilla. En su forma natural aislada de dichas fuentes naturales, el ácido nucleico parece codificar una lectina de legumbre específica para manosa/glucosa. Un aislamiento a título de ejemplo del ácido nucleico de la invención procedente de *Dolichos lab lab* se describe a continuación en la presente memoria.

El gen completo o los fragmentos adicionales del gen se aíslan preferentemente utilizando la secuencia de ADN conocida o un fragmento de la misma como sonda. Para hacer esto, los fragmentos de restricción de un banco genómico o de ADNc se identifican mediante hibridación de Southern utilizando sondas de oligonucleótido marcado procedentes de la SEC. ID n°: 1.

El ADN según la invención puede también sintetizarse químicamente por métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, el ADN puede sintetizarse químicamente a partir de los cuatro nucleótidos en conjunto o en parte por métodos conocidos en la materia. Dichos métodos incluyen los descritos en Caruthers (1985). El ADN puede también sintetizarse preparando oligonucleótidos solapantes de doble cadena, llenando en los huecos y ligando los extremos. Véase, generalmente, Sambrook *et al.* (1989) y Glover *et al.* (1995).

El ADN que expresa los homólogos operativos de la proteína puede prepararse a partir del ADN natural por mutagénesis dirigida al sitio. Véase, por ejemplo, Zoller *et al.* (1982); Zoller (1983); y Zoller (1984); McPherson (1991).

El ADN obtenido puede ampliarse por métodos conocidos en la materia. Un método conocido es el método de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) descrito en Saiki *et al.* (1988), Mullis *et al.*, patente US nº 4.683.195 y Sambrook *et al.* (1989). Es conveniente ampliar los clones en los vectores lambda-gt10 o lambda-gt11 utilizando los oligómeros específicos para lambda-gt10 o lambda-gt11 como amplímeros (disponible en Clontech, Palo Alto, CA).

Pueden prepararse asimismo estructuras de ácido nucleico sintético mayores con servicios específicos y reconocibles según la invención. Por ejemplo, son conocidos los vectores (p. ej., vectores de expresión recombinante) que permiten la incorporación de ácidos nucleicos de interés para clonación y transformación de otras células. Dichos vectores (p. ej., plásmidos, fagos, cósmidos, etc.) pueden incorporar la secuencia de nucleótidos de la invención, o el gen para la expresión de la proteína codificada por el ácido nucleico de la invención.

El ADN de la invención puede replicarse y utilizarse para expresar la proteína recombinante después de la inserción en una amplia variedad de células huésped en una amplia variedad de clonación y de vectores de expresión. El huésped puede ser procariótico o eucariótico. El ADN puede obtenerse de fuentes naturales, y opcionalmente, modificarse. Los genes pueden sintetizarse también en conjunto o en partes.

Los vectores de clonación pueden comprender segmentos de secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas. Dichos vectores de clonación procarióticos adecuados comprenden plásmidos de *E. coli*, tales como colE1, pCR1, pBR322, pMB9, pUC, pKSM y RP4. Los vectores procarióticos comprenden también derivados del ADN del fago tales como M13fd y otros fagos filamentosos de ADN de una sola cadena.

Los vectores para la expresión de proteína en bacterias, especialmente *E. coli*, son asimismo conocidos. Dichos vectores comprenden el pK233 (o cualquiera de la familia tac de plásmidos), T7 y lambda P_L. Ejemplos de vectores que expresan proteínas de fusión son los vectores PATH descritos en Dieckmann y Tzagoloff (1985). Estos vectores contienen secuencias de ADN que codifican la antranilato sintetasa (TrpE) seguido de un polienlazador en el terminal carboxi. Otros sistemas de vector de expresión están basados en la beta-galactosidasa (pEX); la proteína de fijación a la maltosa (pMAL); glutatión S-transferasa (pGST). Véase, por ejemplo, Smith (1988) y Abath (1990).

Están disponibles vector útiles para la clonación y expresión en levadura. Un ejemplo adecuado es el plásmido del círculo de 2μ.

Son también conocidos para su utilización en las células de mamífero los vectores de clonación/expresión adecuados. Dichos vectores incluyen derivados bien conocidos derivados de secuencias de ADN derivadas de SV-40, adenovirus, citomegalovirus (CMV). Algunos de dichos vectores, cuando se acoplan con vectores procedentes de una combinación de plásmidos y de ADN de fago, es decir, vectores lanzadera, permiten el aislamiento y la identificación de secuencias de codificación de proteínas en procariotas.

Se conocen en la materia vectores de expresión eucariótica adicionales (p. ej., Southern *et al.* (1982); Subramani *et al.* (1981); Kaufmann *et al.* (1982a); Kaufmann *et al.* (1982b); Scahill *et al.* (1983); Urlaub *et al.* (1980).

Los vectores de expresión útiles para la presente invención contienen por lo menos una secuencia de control de expresión que está operativamente ligada a la secuencia del ADN o el fragmento que debe expresarse. La secuencia de control se inserta en el vector para controlar y regular la expresión de la secuencia clonada del ADN. Ejemplos de secuencias útiles de control de expresión son el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *tac*, el sistema *trc*, el operador principal y las zonas activadoras del fago lambda, la zona de control de la proteína de revestimiento fd, los activadores glucolíticos de levadura, p. ej., el activador para la 3-fosfoglicerato cinasa, los activadores de fosfatasa ácida de levadura, p. ej., Pho5, los activadores de los factores de emparejamiento alfa de levadura y los activadores procedentes del poliovirus, adenovirus, retrovirus y virus de simio, p. ej., los activadores precoz y tardío o SV40 y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de los genes de las células procarióticas o eucarióticas y sus virus o combinaciones de los mismos.

Los huéspedes de expresión útiles incluyen células procarióticas y eucarióticas bien conocidas. Algunos huéspedes procarióticos adecuados comprenden, por ejemplo, *E. coli*, tal como *E. coli* SG-936, *E. coli* HB101, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* X2282, *E. coli* DH1 y *E. coli* MRCI, *Pseudomonas*, *Bacillus*, tales como *B. subtilis* y *Streptomyces*. Las células eucarióticas adecuadas comprenden células de levaduras y otros hongos, de insectos y de animales, tales como las células COS y las células CHO, las células humanas y las células vegetales en cultivo tisular.

Proteínas de fusión

La proteína puede expresarse en forma de una proteína de fusión con un socio de fusión apropiado. El socio de fusión facilita preferentemente la purificación y la identificación. Pueden conseguirse rendimientos aumentados cuando el socio de fusión se expresa naturalmente en la célula huésped. Algunos socios de fusión útiles incluyen la beta-galactosidasa (Gray *et al.* 1982); trpE (Itakura *et al.* 1977); proteína A (Uhlen *et al.* 1983); glutatión S-transferasa

(Johnson 1989; Van Etten *et al.* 1989); y la proteína de fijación a la maltosa (Guan *et al.* 1987; Maina *et al.* 1988; Riggs 1990).

Dichas proteínas de fijación pueden purificarse por cromatografía de afinidad utilizando reactivos que se unen al socio de fusión. El reactivo puede ser un ligando específico del socio de fusión o un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, las proteínas de fusión que contienen beta-galactosidasa pueden purificarse por cromatografía de afinidad utilizando una columna de anticuerpo anti-beta-galactosidasa (Ullman 1984). Asimismo, las proteínas de fusión que contienen la proteína de fijación a la maltosa pueden purificarse por cromatografía de afinidad utilizando una columna que contiene amilosa reticulada; véase Guan, solicitud de patente europea 286.239.

Opcionalmente, el ADN que codifica la proteína de fusión está modificado genéticamente de modo que la proteína de fusión contiene una secuencia escindible entre la proteína y el socio de fusión. La proteína puede aparecer en el terminal amino o en el lado del terminal carboxi de la secuencia de escisión. Las secuencias de escisión tanto químicas como enzimáticas son conocidas en la materia. Ejemplos adecuados de secuencias que son enzimáticamente escindibles incluyen las secuencias que son reconocidas específicamente y escindidas por la colagenasa (Keil *et al.*, 1975); enterocinasa (Hopp *et al.* 1988); factor Xa (Nagai *et al.* 1987); y trombina (Eaton *et al.* 1986). La colagenasa escinde entre la prolina y X en la secuencia Pro-X-Gly-Pro en la que X es un aminoácido neutro. La enterocinasa escinde después de la lisina en la secuencia Asp-Asp-Asp-Asp-Lys. El factor Xa escinde después de la arginina en la secuencia Ile-Glu-Gly-Arg. La trombina escinde entre la arginina y la glicina en la secuencia Arg-Gly-Ser-Pro.

Los agentes de escisión químicos específicos son también conocidos. Por ejemplo el bromuro de cianógeno escinde a los restos de metionina en proteínas.

La proteína recombinante se purifica por métodos conocidos en la materia. Dichos métodos incluyen la cromatografía de afinidad que utiliza anticuerpos específicos. Alternativamente, la proteína recombinante puede purificarse utilizando una combinación de intercambio iónico, expresión por tamaño en cromatografía de interacción hidrófoba utilizando métodos conocidos en la materia. Estos y otros métodos adecuados se describen, p. ej., en Marston (1987, 1990).

Pueden separarse mezclas de proteínas, por ejemplo, por SDS-PAGE según el método de Laemmli (1970). Los pesos moleculares se determinaron resolviendo las bandas simples en SDS-PAGE y comparando sus posiciones con las de patrones conocidos. Los técnicos en la materia entienden que el método debe ajustarse dentro de un intervalo de 3 a 5%. Los pesos moleculares pueden variar ligeramente entre determinaciones.

Fragmentos y sondas

Asimismo, los fragmentos del ácido nucleico especificados como SEC. ID n°: 1, tales como cebadores y sondas son útiles como herramientas en numerosas técnicas de ingeniería molecular. Los fragmentos pueden utilizarse como cebador ("amplímero") para ampliar selectivamente el ácido nucleico tal como el ADN genómico, el ARN total, etc. El fragmento puede también ser un oligonucleótido complementario a una molécula de ácido nucleico diana, es decir, el fragmento puede ser una sonda. En ambos casos, el oligonucleótido puede ser ARN o ADN. La longitud del oligonucleótido no es crítica, siempre que sea capaz de hibridarse con la molécula diana. El oligonucleótido debería contener por lo menos 6 nucleótidos, preferentemente por lo menos 10 nucleótidos, y, más preferentemente por lo menos 15 nucleótidos. No existe límite superior para la longitud del oligonucleótido. Los fragmentos más largos son más difíciles de preparar y requieren tiempos de hibridación más prolongados. Por consiguiente, el oligonucleótido no debería ser más largo de lo necesario. Normalmente, el oligonucleótido no contendrá más de 50 nucleótidos, preferentemente no más de 40 nucleótidos, y, más preferentemente, no más de 30 nucleótidos.

Los métodos para determinar si una molécula sonda de ácido nucleico reconoce a una molécula específica de ácido nucleico diana en una muestra son conocidos en la materia. Generalmente, una sonda marcada que es complementaria con una secuencia de ácido nucleico que se sospecha que está en una muestra se prepara. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico diana está inmovilizada. La presencia de la sonda hibridada con la molécula de ácido nucleico diana indica la presencia de la molécula de ácido nucleico en la muestra. Ejemplos de métodos de análisis adecuados se describen en Dallas *et al.* (1975); Grunstein *et al.* (1975); la patente US n° 4.731.325, patente US n° 4.683.195, patente US n° 4.882.269 y publicación PCT WO 90/01069.

Las sondas descritas anteriormente están marcadas según métodos conocidos en la materia. La etiqueta puede ser un átomo radioactivo, una enzima o un grupo cromóforo.

Los métodos para marcar sondas de oligonucleótido han sido descritos, por ejemplo, en Leary *et al.* (1983); Renz *et al.* (1984); Richardson *et al.* (1983); Smith *et al.* (1985); y Meinkoth *et al.* (1984).

El marcador puede ser radioactivo. Algunos ejemplos de marcadores radioactivos útiles comprenden ³²P, ¹²⁵I, ¹³¹I y ³H. La utilización de marcadores radioactivos ha sido descrita en el documento de patente UK n° 2.034.323 y las patentes US n° 4.358.535 y n° 4.302.204.

Algunos ejemplos de marcadores no radioactivos incluyen enzimas, cromóforos, átomos y moléculas detectables por microscopio electrónico e iones metálicos detectables por sus propiedades magnéticas.

Algunos marcadores enzimáticos útiles comprenden enzimas que producen un cambio detectable en un sustrato. Algunas enzimas útiles y sus sustratos incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (pirogalol y o-fenilendiamina), beta-galactosidasa (fluoresceína beta-D-galactopiranosido) y fosfatasa alcalina (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro azul de tetrazolio). La utilización de marcadores enzimáticos ha sido descrita en el documento UK nº 2.019.404 y EP 63.879, incorporado cada uno en la presente memoria como referencia y por Rotman (1961).

Los cromóforos útiles incluyen, por ejemplo, moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes y bioluminiscentes, así como tintes. Algunos cromóforos específicos útiles en la presente invención comprenden, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, rojo de Texas, ficoeritrina, umbeliferona y luminol.

Los marcadores pueden conjugarse con el anticuerpo o sonda de nucleótido por métodos que son bien conocidos en la materia. Los marcadores pueden unirse directamente mediante un grupo funcional en la sonda. La sonda contiene o puede estar producida para que contenga dicho grupo funcional. Algunos ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, por ejemplo, amino, carboxilo, sulfhidrilo, maleimida, isocianato e isotiocianato.

Alternativamente, los marcadores tales como enzimas y moléculas cromóforas pueden conjugarse con anticuerpos o nucleótidos por medio de agentes de acoplamiento, tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidas y similares.

El marcador puede también conjugarse con la sonda mediante un ligando acoplado a la sonda mediante un método descrito anteriormente y un receptor para que el ligando se acople al marcador. Cualquiera de las combinaciones ligando-receptor conocidas es adecuada. Algunos pares de ligando-receptor adecuados comprenden, por ejemplo, biotina-avidina o -estreptavidina y anticuerpo-antígeno. La combinación biotina-avidina es la preferida.

En cualquier caso, los métodos para la preparación y utilización de sondas de ácido nucleico están bien documentadas en la materia. Por ejemplo, véase Keller *et al.* (1993) y Hames *et al.* (1995).

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ayudar a una comprensión adicional de la invención. Los materiales y condiciones particulares empleados se pretende que sean más ilustrativos de la invención.

Ejemplo 1

Aislamiento del ARN y síntesis del ADNc

Se preparó ARN completo a partir de semillas de *Dolichos lab lab* a media maduración almacenadas a -70°C siguiendo el procedimiento de Pawloski *et al.* (1994). Se obtuvo poli (A⁺) ARN procedente de este ARN completo utilizando el sistema de aislamiento de ARNm PolyAtract (Promega) según las instrucciones del fabricante. Se utilizó transcriptasa inversa de virus de mieloblastosis aviar (Promega) para generar ADNc de 0,5 µg de poli(A⁺)ARN, o 3,0 µg de ARN completo, utilizando 1 µg de oligo(dT) en condiciones de reacción normales (Sambrook *et al.* 1989).

Ejemplo 2A

Reacción en cadena de polimerasa y clonación del ADNc

Basándose en la secuencia de aminoácidos publicada por Gowda *et al.* (1994), se diseñaron dos cebadores de oligonucleótido degenerados utilizando el codón *Phaseolus* (Devereux *et al.* 1984):

MLA	AA (AG) TT (TC) GA (TC) CC (AT) AA (TC) CA (AG) GA (AG) GA	(SEC. ID nº: 3)
MLZ	TT (AT) CC (AG) TT (TC) TGCCA (AG) TCCCA	(SEC. ID nº: 4)

Se amplió un producto de 500+ bp procedente del ADNc preparado como se describe en el Ejemplo 1, mediante 30 ciclos de reacción en cadena de polimerasa (PCR), comprendiendo cada ciclo 40 s a 94°C, 40 s a 50°C, 60 s a 72°C seguido de una etapa de ampliación a 72°C durante 10 min. Las reacciones se realizaron en 50 µl que contenía 30 pmoles de cada cebador, desoxirribonucleótidos 0,2 mM y 0,5 unidades de AmpliTaq polimerasa (Perkin Elmer) en el correspondiente tampón.

El producto de 500 bp obtenido por PCR se clonó en el vector de clonación, pCR2.1 (Invitrogen) y se secuenció mediante la terminación de la cadena de dideoxi secuenasa (United States Biochemicals) utilizando los siguientes cebadores:

GTACCGAGCTCGGAT	(SEC. ID nº: 5)
TCTAGATGCATGCTCGAG	(SEC. ID nº: 6)

Esta secuencia se denominó "FRILa", en relación con el gen que codifica la proteína de interés, denominado "FRIL" como se indicó anteriormente.

ES 2 265 663 T3

```

1   GCACAGTCAT TGTCATTTAG TTTCACCAAG TTTGATCCTA ACCAAGAGGA
51  TCTTATCTTC CAAGGTCATG CCACTTCTAC AAACAATGTC TTACAAGTCA
101 CCAAGTTAGA CAGTGCAGGA AACCTGTGA GTTCTAGTGC GGGAAGAGTG
151 TTATATTCTG CACCATTGCG CCTTTGGGAA GACTCTGCGG TATTGACAAG
201 CTTTGACACC ATTATCAACT TTGAAATCTC AACACCTTAC ACTTCTCGTA
251 TAGCTGATGG CTTGGCCTTC TTCATTGCAC CACCTGACTC TGTCATCAGT
301 TATCATGGTG GTTTTCTTGG ACTCTTTCCC AACGCAAACA CTCTCAACAA
351 CTCTTCCACC TCTGAAAACC AAACCACCAC TAAGGCTGCA TCAAGCAACG
401 TTGTTGCTGT TGAATTTGAC ACCTATCTTA ATCCCGATTA TGGTGATCCA
451 AACTACATAC ACATCGGAAT TGACGTCAAC TCTATTAGAT CCAAGGTAAC
501 TGCTAAGTGG GACTGGCAAA ATGGGAAAAT AGCCACTGCA CACATTAGCT
551 ATAACTCTGT CTCTAAAAGA CTATCTGTTA CTAGTTATTA TGCTGGGAGT
601 AAACCTGCGA CTCTCTCCTA TGATATTGAG TTACATACAG TGCTTCCTGA
651 ATGGGTCAGA GTAGGGTTAT CTGCTTCAAC TGGACAAGAT AAAGAAAGAA
701 ATACCGTTCA CTCATGGTCT TTCACTTCAA GCTTGTGGAC CAATGTGGCG
751 AAGAAGGAGA ATGAAAACAA GTATATTACA AGAGGCGTTC TGTGATGATA
801 TATGTGTATC AATGATTTTC TATGTTATAA GCATGTAATG TGCGATGAGT
851 CAATAATCAC AAGTACAGTG TAGTACTTGT ATGTTGTTTG TGTAAGAGTC
901 AGTTTGCTTT TAATAATAAC AAGTGCAGTT AGTACTTGT

```

(SEC. ID. n° 1)

La secuencia de nucleótidos de *FRIL* permitió la deducción de una secuencia derivada de aminoácidos para la proteína *FRIL*:

```

AQSLSFSFTK FDPNQEDLIF QGHATSTNNV LQVTKLDSAG NPVSSSAGRV
LYSAPLRLWE DSAVLTSFDT IINFEISTPY TSRIADGLAF FIAPPDSVIS
YHGGFLGLFP NANTLNNSST SENQTTTKAA SSNVVAVEFD TYLNPDYGDP
NYIHIGIDVN SIRSKVTAKW DWQNGKIATA HISYNSVSKR LSVTSYYAGS
KPATLSYDIE LHTVLPWVR VGLSASTGQD KERNTVHSWS FTSSLWTNVA
KKENENKYIT RGVL

```

(SEC. ID. n° 2)

En la Figura 2 se presenta una ilustración comparativa de la secuencia derivada de aminoácidos *FRIL* con la secuencia de aminoácidos descrita de la manosa lectina determinada por Gowda *et al.* (1994). La única secuencia procedente de la proteína *FRIL* comprende los dominios que corresponden directamente y con homología sustancial a la subunidad α (SEC. ID n°: 12) y a la subunidad β (SEC. ID n°: 13) de la proteína descrita por Gowda *et al.* (1994). Cuando la subunidad β de la proteína de Gowda *et al.* se asigna al dominio N-terminal y es seguida linealmente por la subunidad α , el ordenamiento de los polipéptidos presenta homología con otras lectinas de la legumbre. Sin embargo, la secuencia derivada de aminoácidos *FRIL* comprende una inserción de siete restos de aminoácidos (aa27-34) que

ES 2 265 663 T3

no aparece en la proteína descrita por Gowda *et al.* En la Figura 2 son asimismo fácilmente discernibles otras varias diferencias entre las secuencias de aminoácidos de las dos proteínas.

Ejemplo 4

Mutagénesis específica para el sitio

Para establecer funcionalmente los homólogos de la proteína codificados por el ADNc de FRIL, se realizó una mutación en el clon del ADNc del FRIL. Los dominios de la proteína derivada y la lectina del guisante que incluyen la secuencia de mutación se presentan a continuación:

FRIL	. Y L N P D Y G . D P N Y I H I G I D V	(SEC. ID nº: 14)
Guisante	F Y . N A A W D P S N R D R H I G I D V	(SEC. ID nº: 15)

Es sabido que el resto de asparagina (la “N” resaltada) en la lectina del guisante está implicado en el enlace a su ligando del sacárido. La correspondiente asparagina en FRIL (posición 141 de la secuencia de aminoácidos, basada en la secuencia que incluye el péptido señal de 15 aminoácidos) se mutó a ácido aspártico (“D”). Esta mutación se denominó “N141D” por conveniencia.

Para introducir la mutación, se realizó la PCR recombinante (Higuchi 1990). Se realizaron dos reacciones por PCR por separado del ADNc completo utilizando dos cebadores que contienen la misma mutación y producen dos productos con una zona solapante:

MutI	CCATAATCGGGATCAAGATAGGTG	(SEC. ID nº: 16)
MutII	CACCTATCTTGATCCCGATTATGG	(SEC. ID nº: 17)

Se purificaron los productos por PCR primaria con el kit de purificación por PCR QIAquick (QIAGEN), según las instrucciones del fabricante. Se combinaron a continuación los productos primarios solapantes y se ampliaron conjuntamente en una única segunda reacción utilizando cebadores de flanqueamiento:

M1 Forw	AACTCAGCCGCACAGTCATTGTCA	(SEC. ID nº: 18)
APEcoRI	GAATTCGACCACGCGTATCGATGTCGAC	(SEC. ID nº: 19)

Se realizaron tanto las reacciones por PCR primarias como las secundarias en 100 μ l que contenían 50 pmoles de cada cebador, desoxirribonucleído 0,4 mM y 1,0 unidad de Pfu polimerasa (Stratagene) en el tampón correspondiente. La reacción PCR primaria amplió los dos fragmentos separados en 30 ciclos, comprendiendo cada ciclo 40 s a 94°C, 40 s a 50°C, 60 s a 72°C, con una etapa de ampliación a 72°C durante 10 min. La reacción PCR segunda amplió el fragmento recombinante en 12 ciclos utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente.

El fragmento completo resultante contenía la mutación. El producto mutado recombinante se clonó en la secuencia EcoRI del vector de clonación pCR2.1, como se ilustró esquemáticamente en la Figura 3, y se secuenció como se describió anteriormente. Este plásmido se denomina “pCR2.1-DLA(D)”.

Ejemplo 5

Construcción de vectores de expresión vegetales y transformación de Nicotiana tabacum

Se utilizó PCR recombinante para modificar los extremos 5' tanto de los clones de FRIL natural como mutante, para introducir un péptido señal para la introducción de la proteína en el retículo endoplásmico. Siguiendo el procedimiento de Higuchi (1990), se ampliaron la secuencia que codifica el péptido señal y los clones de ADNc completos en dos reacciones PCR primarias independientes. Se obtuvo la secuencia del péptido señal a partir de la ampliación del vector pTA4 binario, que alberga la secuencia completa del gen inhibidor de α -amilasa (Hoffman *et al.* 1982; Moreno *et al.* 1989).

Se utilizaron los siguientes cebadores para la ampliación de la secuencia del péptido señal:

Sigforw	GAATTCATGGCTTCCTCCAAC	(SEC. ID nº: 20)
Sigrev	TGACTGTGCGGCTGAGTTTGCCTGGGTG	(SEC. ID nº: 21)

Los cebadores M1Forw (SEC. ID nº: 18) y APEcoRI (SEC. ID nº: 19) utilizada para la ampliación del ADNc de FRIL en el Ejemplo 4 anterior, se utilizaron de nuevo para ampliar el ADNc de FRIL.

Los cebadores utilizados para las reacciones secundarias fueron Sigforw y APEcoRI, que se diseñaron para generar las secuencias EcoRI en los extremos 5' y 3'. Las reacciones de PCR tanto primaria como secundaria se realizaron como se expuso anteriormente para la mutagénesis dirigida al sitio.

El producto natural SpDLA recombinante se clonó en la secuencia *EcoRI* del vector de clonación pBluescriptSK+ (Stratagene) para dar el vector pBS-SpDLA, como se muestra en la Figura 4. Se clonó el mutante SpDLA(D) en la misma secuencia del vector de clonación pCR2.1 para dar el vector pCR2.1-SpM1, como se muestra en la Figura 5. La secuencia de nucleótidos de cada producto de PCR se determinó como se describió anteriormente para verificar el acoplamiento correcto del péptido señal. La secuencia de nucleótidos de SpDLA está definida por SEC. ID n°: 22 y la secuencia de aminoácidos derivada está definida por SEC. ID n°: 23.

Ejemplo 6

Se construyó un vector binario para la expresión específica de la semilla de FRIL. Para la expresión de la semilla, se clonó el activador vicilina obtenido a partir del pCW66 (Higgins *et al.* 1988) en las secuencias *EcoRI/KpnI* del vector de expresión pBIN19 vegetal, para formar pBINVicPro, como se ilustra en la Figura 6. Corriente abajo del activador vicilina, se ligó la secuencia SpDLA del ADNc en la secuencia *EcoRI/SacI* dando lugar al pBINVicPro-SpDLA, que se ilustra en la Figura 7. Se ligó el clon SpDLA(D) del ADNc mutado en la secuencia *EcoRI* del vector pBINVicPro para dar pBINVicPro-SpDLA(D), que se ilustra en la Figura 8. No se añadieron secuencias de terminación adicionales, basándose en cambio en los codones de terminación y la secuencia de poliadenilación de los clones DLA y DLA(D) del ADNc. Ambos vectores se transfirieron en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* según el procedimiento de congelación-descongelación descrito por An *et al.* (1988).

La transformación de los discos de la hoja de *Nicotiana tabacum* mediada por *Agrobacterium* se realizó y se ensayó como describe (Horsch *et al.* 1985) utilizando LBA4404 que alberga el vector de expresión pBINVicPro-SpDLA (Figura 9) específico para la semilla. Las plantas resistentes a kanamicina (resistencia que es comunicada por transformación con los vectores a base de pBIN19 que llevan el gen) se les puntuó por su capacidad para formar raíces en dos etapas consecutivas de propagación en el medio Murashige-Skoog que contiene 3% de sacarosa y 100 mg/ml de sulfato de kanamicina (Sigma).

Ejemplo 7

Expresión del FRIL recombinante en E. coli

El ADNc natural de FRIL y los clones mutantes (sin péptidos señal), se ligaron en la *EcoRI/SalI* y *EcoRI/XhoI* del vector de expresión pGEX 4T-1 (Pharmacia), para formar los montajes de expresión pGEX-M1 y pGEX M1(D), ilustrados respectivamente en las Figuras 9 y 10. La cepa de *E. coli* huésped, BL21(D3), se adquirió en Novagen, y se transformó con el montaje anterior utilizando el método del cloruro cálcico (véase Sambrook *et al.* 1989; Gelvin *et al.* 1988; Altabella *et al.* 1990; y Pueyo *et al.* 1995). La producción del activador tac (Ptac) se consiguió añadiendo IPTG (isorpropil- β -D-tiogalactopiranosido) (Sigma) a una concentración final de 1,0 mM cuando las células alcanzaron una densidad óptica de 0,4 a 0,6 a 600 nm. Se dejaron desarrollar los cultivos durante 12 h a 37°C después de la adición de IPTG. Los cultivos no inducidos de referencia se mantuvieron en condiciones similares. Se lisaron las células mediante tratamiento con 4 mg/ml de lisozima en solución salina tamponada con fosfato que contenía TRITON® X-100 al 1%.

La proteína celular completa se extrajo en células de *E. coli* transformadas y se analizó en SDS-PAGE en un gel al 15% utilizando un procedimiento normalizado (Sambrook *et al.* 1989). Las células de 1 ml del cultivo de *E. coli* se pusieron en suspensión en el mismo volumen del tampón de carga (Tris HCl 50 mM pH 6,8, DTT 100 mM, SDS al 2%, glicerol al 10%, azul de bromofenol al 0,1%) y se agitaron. Después de la transferencia a una membrana de nitrocelulosa, se tiñó la proteína con azul brillante R250 de Coomassie. En la Figura 11 se muestra una separación representativa, con las bandas identificadas en la banda 1, a continuación.

TABLA 1

Clave para la Figura 11

Banda n°	Contenido
1	Marcador de masa molecular (Bio-Rad)
2	Extracto de proteína completo de BL21(D3) pGEX-M1 no inducido
3	Extracto de proteína completo de BL21(D3) pGEX-M1 inducido
4	Extracto de proteína completo de BL21(D3) pGEX-M1(D) no inducido
5	Extracto de proteína completo de BL21(D3) pGEX-M1(D) inducido

La separación de las proteínas en la Figura 11 demuestra que las células inducidas (bandas 3, 5) ambas produjeron un polipéptido abundante con una masa molecular de aproximadamente 60 kDa (indicada por una flecha). Las células no inducidas no pudieron producir ninguna cantidad significativa de esta proteína (bandas 2, 4).

Ejemplo 8

Purificación de FRIL recombinante

Las células de *E. coli* inducidas (200 ml) descritas en el Ejemplo 7 se recogieron después de 12 h de inducción a 37°C por centrifugación a 5.000 g durante 10 min. Se lavó el sedimento con Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 2 mM y se volvieron a poner en suspensión en 1/10 vol. de tensioactivo TRITON al 1% en TBS (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM). Se lisaron las células añadiendo 4 mg/ml de lisozima y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 a 60 min. Después de la centrifugación a 5.000 g, se descartó el sobrenadante que contenía las proteínas solubles totales y el sedimento resultante, que comprende los cuerpos de inclusión y que contiene acumulada la proteína de fusión recombinante, se extrajo con guanidina-HCl 8 M (Marston *et al.* 1993).

La proteína de fusión recombinante solubilizada por guanidina-HCl se purificó en perlas de GST-Sefarosa (Pharmacia) según las instrucciones del fabricante y se eluyó en 1 ml de glutatión reducido (Sigma). Las muestras de las proteínas de fusión purificadas se escindieron con trombina (Novagen) utilizando 5 unidades de escisión/ml de proteína de fusión purificada.

Para el análisis de inmunotransferencia (transferencia Western), se separaron las proteínas purificadas por SDS-PAGE de acuerdo general con el método descrito en el Ejemplo 7. Se equilibró el gel en tampón de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, MeOH al 20%) y se transfirió sobre nitrocelulosa (Bio-Rad) durante 1 h a 100 V utilizando el aparato de electrotransferencia de Bio-Rad. Se bloqueó el enlace no específico incubando las transferencias durante por lo menos 1 h en 1×TBS (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM) que contenía gelatina al 3%. La transferencia fue seguida de incubación con un anticuerpo primario (suero de conejo policlonal producido contra el péptido N-terminal de la subunidad β del homólogo *Phaseolus vulgaris* de FRIL, dilución 1:100, 3 h), seguido de incubación con un anticuerpo secundario (IgG anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante a una dilución de 1:1.000 durante 1 h). Se lavaron las transferencias y se desarrolló el color con el reactivo del desarrollo de color (Bio-Rad). En la Figura 12 se muestra un resultado representativo, con las bandas identificadas en la Tabla 2, a continuación.

TABLA 2

Clave para la Figura 12

Banda nº	Contenido
1	Proteína de fusión M1 purificada
2	Proteína de fusión M1(D) purificada
3	Referencia
4	Proteína de fusión M1 purificada después de la escisión con trombina
5	Proteína de fusión M1(D) purificada después de la escisión con trombina
6	Referencia

La separación mostrada en la Figura 12 demuestra que las dos formas de la proteína de fusión presentan similares masas moleculares de aproximadamente 60 kDa, y que la trombina escindió ambos tipos de proteína de fusión para producir un nuevo polipéptido de masa molecular 30 kDa.

Ejemplo 9

La FRIL recombinante estimula específicamente la proliferación de las células 3T3 que expresan el receptor FLK2/FLT3

La proteína recombinante interactúa con el receptor FLK2/FLT3 de tirosina cinasa de mamífero. Un análisis biológico específico y cuantitativo que utiliza fibroblastos NIH 3T3 transfectados con un receptor híbrido que posee una parte extracelular del receptor murino FLK2/FLT3 combinada con la parte intracelular del receptor Fms humano (Dosil *et al.* 1994) o con el receptor humano completo (Small *et al.* 1994) puede utilizarse para evaluar la actividad biológica de la lectina durante la purificación. Las diluciones en serie dos veces de muestras de lectina a través de filas de una placa de 96 pocillos permitió más del orden de mil veces acceder a la actividad biológica de FLK2/FLT3 3T3. El ligando FLK2/FLT3 (FL) murino o humano (Lyman *et al.* 1993; Hannum *et al.* 1994) o la proteína recombinante codificada por el ácido nucleico de la invención salva de la muerte las células transfectadas por FLK2/FLT3 en este ensayo.

Se cultivaron específicamente células 3T3 en placas de cultivo tisular (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, Nueva Jersey) y se eliminaron de las placas lavando las células dos veces en solución salina tamponada de Hank

(HBSS; Gibco Laboratories, Grand Island, NY). El tampón no enzimático de disociación de células (Gibco) se añade durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células resultantes se lavan en el medio. Las células 3T3 con FLK2/FLT3 se cultivaron a una concentración final de 3.000 células por pocillo en un volumen de 100 μ l de medio definido por el suero que contiene 10 mg/ml de rhIL1- α , AIMV al 10% (Gibco) y modificación por Dulbecco al 90% del medio de Eagle (DMEM; Gibco) en placas de 96 pocillos. En estas condiciones del ensayo, las células mueren después de dos a cuatro días de cultivo en un incubador humidificado a 37°C y CO₂ al 5% a menos que el ligando añadido exógenamente salve las células de la muerte. Cada placa de 96 pocillos contiene suero de ternero, que estimula a todas las células 3T3, como referencia positiva y medio solamente como referencia negativa (“blanco”). Las células 3T3 transfectadas con Fms completo (respuesta biológica mostrada en Tessler *et al.* 1994) sirven como células diana de referencia transfectadas con el receptor y células 3T3 paternas sirven como células de referencia no transfectadas. La proliferación y la supervivencia celular se cuantifica mediante adición de XTT (Diagnostic Chemicals Ltd, Charlottetown, Prince Edward Island, Canadá), que es una sal de tetraformazano escindida por las células que respiran activamente (Roehm *et al.* 1991), se cuantifica espectrofotométricamente utilizando un lector de placas cinético Vmax (Molecular Devices Corp., Mountain View, CA) y se registra como actividad relativa (unidades/ml) o actividad específica (unidades/mg). Una unidad de actividad biológica se define como la dilución recíproca a la cual se detecta la estimulación máxima media de las células.

El extracto de proteína en bruto de los cultivos de *E. coli* descritos en el Ejemplo 7, anteriormente, se ensayó para determinar si la recFRIL expresada poseía alguna capacidad para estimular las células 3T3 con FLK2/FLT3 utilizando este ensayo. Los datos de este experimento se resumen en las Figuras 13A y 13B. Específicamente, la Figura 13A es un gráfico que demuestra que el extracto en bruto del cultivo de *E. coli* que contiene FRIL expresado estimula específicamente las células hFLK2/FLT3; la Figura 13B es un gráfico que demuestra que el mismo extracto no estimula las células 3T3 no transfectadas. En las Figuras 13A y 13B, el control del medio está representado por una línea llena. La ordenada (absorbancia) indica la viabilidad celular medida por XTT a los tres días. La abscisa demuestra la dilución recíproca de la muestra de extracto. La inhibición aparente de la proliferación observada a concentraciones mayores (Figura 13A) no se comprende, pero puede referirse a los componentes tóxicos en el extracto de *E. coli* en bruto o a las consecuencias de la conservación relacionada con la dosis de los fibroblastos 3T3.

Ejemplo 10

FRIL recombinante conserva las células mononucleares y precursoras en cultivo líquido

La proteína recFRIL conserva los precursores operativos durante por lo menos dos semanas en cultivo líquido. Las Figuras 14A y 14B ilustran los resultados de un experimento en el que recFRIL se demuestra que actúa en función de la respuesta a la dosis para conservar precursoras sanguíneas de la médula espinal humana.

Las Figuras 14A y 14B demuestran que FRIL recombinante conserva células y precursores mononucleares de la sangre de la espina dorsal en función de la respuesta a la dosis en cultivo líquido. Las células mononucleares de la médula espinal obtenidas por separación FICOLL-PAQUE® (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) se cultivaron en medio exento de suero (X-VIVO 10, BioWhittaker, Walkersville, MD) a una concentración de 200.000 células/ml en un volumen de 4 ml durante dos semanas sin cambios de medio. Las células recogieron se sedimentaron y se volvieron a poner en suspensión en X-VIVO 10 antes de determinar el número de células viables por exclusión con azul de tripano (GIBCO, Gran Island, NY). Estos resultados se presentan en la Figura 14A. Se evaluó el número de precursores y la capacidad de células recogidas colocando en placas las células en medio de ensayo de colonias de metilcelulosa exento de suero completo (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá). Después de dos semanas, se puntuaron las colonias resultantes y los resultados se presentan en la Figura 14B. En las Figuras 14A y 14B, el término “blastocitos” se refiere a las colonias que constan de células primitivas, morfológicamente indiferenciadas; el término “mezcla” se refiere a las colonias que constan de células mieloides y eritroides; el término “eritroide” se refiere a las colonias que constan de células eritroides; y el término “mieloide” se refiere a las colonias que constan de células mieloides. El número de células se muestra en ordenadas; la abscisa presenta la dilución recíproca de la muestra.

Para evaluar si recFRIL actúa directamente o indirectamente a través de las células accesorias para conservar las células madre, las células mononucleares de la sangre de la médula espinal se enriquecieron en primer lugar para los precursores que expresan el antígeno CD34 por aislamiento del lecho inmunomagnético (Dynal Corp., Lake Success, NY). Se colocaron en placas quinientas células CD34⁺ en pocillos que contienen 100 μ l de medio exento de suero (BIT9500, StemCell Technologies) en presencia de recFL (PeproTech, Princeton, NJ) o una mezcla en citocina de rhIL3 + rhIL6 + rhIL11 + rhTpo + FL (BioSource International, Camarillo, CA) en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante cuatro semanas sin cambios de medio. Los números de precursores operativos procedentes de estos cultivos se evaluaron colocando en placas las células en medio de ensayo de colonias con metilcelulosa exenta de suero completo (StemCell Technologies). Después de dos semanas, las colonias resultantes se puntuaron y los resultados se presentan en la Figura 15 (barras negras = recFRIL; barras blancas = mezcla de citocina). Evidentemente, los precursores se conservaron solamente en los cultivos que contienen recFRIL. Por lo tanto, recFRIL purificado actúa directamente sobre los precursores hematopoyéticos primitivos.

Bibliografía

Los siguientes documentos se han mencionado en la memoria anterior:

- 5 **Abath FG**, *Peptide Research* 3(4):167-168 (1990).
- Altabella T**, y **Chrispeels MJ**, *Plant Physiol* 93:805-810 (1990).
- An G**, **Ebert PR**, **Mitra A**, y **Ha SB**, "Binary vectors," en *Plant Molecular Biology Manual*, Vol. A3, Gelvin SB, Schilperoort RA, y Verma DPS, eds., Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, páginas 1-19 (1988).
- 10 **Baronedes SH**, "Bifunctional properties of lectins: Lectins redefined," *Trends Biochem Sci* 13:480-482 (1988).
- Berardi AC**, **Wang A**, **Levine JD**, **Lopez P**, y **Scadden DT**, "Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells," *Science* 267:104-108 (1995).
- 15 **Borge et al.**, *Blood* 88(8): 2859-2870 (1996).
- Caruthers MH**, "Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses," *Science* C3 30(4723):281-285 (1985).
- 20 **Colucci et al.**, *PNAS*, vol. 96, página 646, 1999.
- Dallas et al.**, "The characterization of an *Escherichia coli* plasmid determinant that encodes for the production of a heat-labile enterotoxin," páginas 113-122 en Timmis KN y Puehler A, eds., *Plasmids of Medical, Environmental, and Commercial Importance*, Elsevier/North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1975).
- 25 **Devereux J**, **Haeberli P**, y **Smithies O**, "A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX," *NAR* 12:387-394 (1984).
- Dieckmann CL** y **Tzagoloff A**, *J Biol Chem* 260(3): 1513-1520 (1985).
- 30 **Dosil M**, **Wang S**, y **Lemischka IR**, "Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells," *Mol Cell Biol* 13(10):6572-6585 (1993).
- Dwek RA**, "Glycobiology: More function for oligosaccharides," *Science* 269:1234-1235 (1995).
- 35 **Eaton D**, **Rodriguez H**, y **Vehar GA**, *Biochemistry* 25(2):505-512 (1986).
- Frohman MA**, "RACE: Rapid amplification of cDNA ends," páginas 28-38 en *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, y White TJ, eds. Academic Press, San Diego (1990).
- 40 **Gabius HJ** y **Gabius S**, eds., *Lectins and Glycobiology*, Springer-Verlag Inc., New York (1993).
- Gabius H-J**, "Non-carbohydrate binding partners/domains of animal lectins," *Int J Biochem* 26:469 (1994a).
- 45 **Gabius H-J**, "Lectinology meets mythology: Oncological future for the mistletoe lectin?," *Trends in Glycosci and Glycotech* 6:229 (1994b).
- Gelvin SB**, y **Schilperoort RA**, *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (1988).
- 50 **Glover DM** y **Hames BD**, eds., *DNA Cloning*, 2^d ed., Vols. 1-4, IRL Press, Oxford (1995).
- Gowda LR**, **Savithri HS**, y **Rao DR**, "The complete primary structure of a unique mannose/glucose-specific lectin from field bean (*Dolichos lab lab*)," *J Biol Chem* 269:18789-18793 (1994).
- 55 **Gray MR**, **Colot HV**, **Guarente L**, y **Rosbash M**, "Open reading frame cloning: Identification, cloning and expression of open reading frame DNA," *Proc Natl Acad Sci USA* 79:6598 (1982).
- Grunstein M** y **Hogness DS**, "Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene," *Proc Natl Acad Sci USA* 72(10):3961-3965 (1975).
- 60 **Guan et al.**, *Gene* 67:21-30 (1987).
- Hames BD** y **Higgins SJ**, eds., *Gene Probes I and Gene Probes II*, IRL Press, Oxford (1995).
- 65 **Hannum**, **CO et al.**, "Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of hematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs," *Nature* 368:643 (1994).

Higgins TJV, Newbigin EJ, Spencer D, Llewellyn DJ, y Craig S, "The sequence of a pea vicilin gene and its expression in transgenic tobacco plants," *Plant Mol Biol* 11:683-695 (1988).

Higuchi R, "Recombinant PCR," páginas 177-183 en: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, y White TJ, eds., Academic Press, San Diego (1990).

Hoffman LM, Ma Y, y Barker RF, "Molecular cloning of Phaseolus vulgaris lectin mRNA and use of cDNA as a probe to estimate lectin transcripts levels in various tissues," *Nucleic Acids Res* 10:7819-7828 (1982).

Hopp et al., *Biotechnology* 6:1204-1210 (1988).

Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, y Fraley RT, "A simple and general method for transferring genes into plants," *Science* 227:1229-1231 (1985).

Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs AD, Heyneker HL, Bolivar F, y Boyer HW, *Science* 198(4321):1056-1063 (1977).

Johnson KS, *Nature* 338(6216):585-587 (1989).

Keil B, Gilles AM, Lecroisey A, Hurion N, y Tong NT, *FEBS Letters* 56(2):292-296 (1975).

Kaufmann RJ y Sharp PA, "Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene," *J Mol Biol* 159:601-621 (1982a).

Kaufmann RJ y Sharp PA, *Mol Cell Biol* 2(11):1304-1319 (1982b).

Keller GH y Manak MM, *DNA Probes*, 2^a ed., Macmillan Publishers Ltd., England (1991).

Laemmli UK, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature* 227: 680-685 (1970).

Leary JJ, Brigati DJ, y Ward DC, "Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots," *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4045 (1983).

Lyman, SD et al., "Molecular cloning of a ligand for the FLT3/FLK2 tyrosine kinase receptor: a proliferative assay for primitive hematopoietic cells," *Cell* 75:1157 (1993).

Maina CV, Riggs PD, Grandea AG 3d, Slatko BE, Moran LS, Tagliamonte JA, McReynolds LA, y Guan CD, *Gene* 74:36-373 (1988).

Marston, "The purification of eukaryotic proteins expressed in *E. coli*," en *DNA Cloning*, Glover DM, ed., Volumen III, IRL Press Ltd., Oxford (1987).

Marston FAO y Hartley DL, "Solubilization of protein aggregates," páginas 266-267 en *Guide to Protein Purification*, Deutscher MP, ed., Academic Press, San Diego (1990).

McPherson MJ, ed., *Directed Mutagenesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford (1991).

Meinkoth J y Wahl G, "Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports," *Anal. Biochem.* 138 (2):267 (1984).

Moreno J y Chrispeels MJ, "A lectin gene encodes the α -amylase inhibitor of the common bean," *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7885-7889 (1989).

Nagai K y Thogerson HC, *Methods Enzymol* 153:461-481 (1987).

Ogawa M, "Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells," *Blood* 87:2855 (1993).

Pawloski K, Kunze R, de Vries R, y Bisseling T, "Isolation of total, poly(A+) and polysomal RNA from plant tissues," *Mol Plant Biol Manual* 5:1-13 (1994).

Pearson WR y Lipman DJ, "Improved tools for biological sequence comparison," *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2444-2448 (1988).

Pueyo JJ, Chrispeels MJ, y Herman EM, "Degradation of transport-competent destabilized phaseolin with a signal for retention in the endoplasmic reticulum occurs in the vacuole," *Planta* 196:586-596 (1995).

Pusztai A, y Bardocz S, *Lectins: Biomedical Perspectives*, Taylor & Francis, London (1995).

ES 2 265 663 T3

Renz M y Kurz C, “A colorimetric method for DNA hybridization,” *Nucleic Acids Res* 12:3435 (1984).

Richardson y Gumpfort, *Nucleic Acids Res* 11:6167-6184 (1983).

5 **Riggs P**, en **Ausebel FM et al.**, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Associates/Wiley Interscience, New York (1990).

Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, y Glasebrook AL, “An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT,” *J Immunol Methods* 142(2):257-265 (1991).

10 **Rotman**, *Proc Natl Acad Sci USA* 47:1981-1991 (1961).

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, y Erlich HA, *Science* 239:487 (1988).

15 **Sambrook J, Fritsch EF, y Maniatis T**, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2^d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1989).

Scahill SJ, Devos R, Van der Heyden J, y Fiers W, “Expression and characterization of the product of a human immune interferon DNA gene in Chinese hamster ovary cells,” *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4654-4659 (1983).

Shah AJ, Smogorzewska EM, Hannum C, y Crooks GM, “Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34+CD38- cells and maintains progenitor cells *in vitro*,” *Blood*, 87:3563-3570 (1996).

25 **Sharon N y Lis H**, “Lectins as cell recognition molecules,” *Science*, 246:227-234 (1989).

Small D, Levenstein M, Kim E, Carow C, Amim S, Rockwell P, Witte L, Burrow C, Ratajczak M, Gewirtz AM, y Civin C, “STK-1, the human homolog of FLK-2/FLT-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells,” *Proc Natl Acad Sci USA* 91:459-463 (1994).

30 **Smith LM, Fung S, Hunkapiller MW, Hunkapiller TJ, y Hood LE**, *Nucleic Acids Res* 13:2399 (1985).

Smith DB, y Johnson KS, *Gene* 67:31-40 (1988).

35 **Southern PJ y Berg P**, *J Mol Appl Genet* 1:327-341 (1982).

Subramani S et al., *Mol Cell Biol* 1:854-864 (1981).

Tessler S, Rockwell P, Hicklin D, Cohen T, Levi B-Z, Witte L, Lemischka IR, y Neufeld G, “Heparin modulates the interaction of VEGF 165 with soluble and cell-associated FLK-1 receptors,” *J Biol Chem*, 269:12456-12461 (1994).

Turhan AG, Humphries RK, Phillips GL, Eaves AC, y Eaves CJ, “Clonal hematopoiesis demonstrated by X-linked DNA polymorphisms after allogeneic bone marrow transplantation,” *N Engl J Med*, 320:1655-1661 (1989).

45 **Uhlen M, Nilsson B, Guss B, Lindberg M, Gatenbeck S, y Philipson L**, *Gene* 23:369-378 (1983).

Ullman, *Gene* 29:27-31 (1984).

50 **Urlaub G y Chasin LA**, *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4216-4220 (1980).

Van Etten RA, Jackson P, y Baltimore D, *Cell* 58:669-678 (1989).

Young JC, Varma A, DiGiusto D, y Backer M, “Retention of quiescent hematopoietic cells with high proliferative potential during *ex vivo* stem cell culture,” *Blood* 87:545-556 (1996).

Zipori D, “The renewal and differentiation of hemopoietic stem cells,” *FASEB J* 6:2691-2697 (1992).

Zoller MJ, y Smith M, *Nucleic Acids Res* 10:6487-6500 (1982).

60 **Zoller MJ**, *Methods Enzymol* 100:468-500 (1983).

Zoller MJ, *DNA* 3(6):479-488 (1984).

65

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína que:

- (a) presenta por lo menos el 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEC. ID n°: 2;
- (b) es capaz de unirse a un receptor de flk2/flt3; y
- (c) es capaz de conservar las células precursoras hematopoyéticas.

2. Molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 1, que comprende una secuencia de nucleótidos como está definida por la SEC. ID. n°: 1.

3. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico codifica una lectina de legumbre específica para manosa/glucosa.

4. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 1, en el que la proteína codificada conserva las células madre que son por lo menos células madre unipotentes.

5. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 1, en el que la proteína codificada conserva las células madre que son células madre pluripotentes.

6. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 1, en el que la proteína codificada conserva las células madre que son células madre totipotentes.

7. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 1, en el que la proteína codificada conserva las células madre que son células madre hematopoyéticas.

8. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 1, en el que la proteína codificada conserva las células madre que son células madre de nervios, músculos, piel, intestinos, huesos, riñón, hígado, páncreas o timo.

9. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 4, en el que la proteína codificada conserva las células madre que expresan el antígeno CD34.

10. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 4, en el que la proteína codificada conserva las células madre que expresan el receptor FLK2/FLT3.

11. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 9, en el que la proteína codificada conserva las células madre que son células modificadas para expresar los receptores FLK2/FLT3 en su superficie.

12. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 11, en el que la proteína codificada presenta afinidad de enlace significativa para el receptor FLK2/FLT3 en las células, en la que el enlace de la proteína modificada con el receptor FLK2/FLT3 media la inhibición de diferenciación de las células.

13. Proteína codificada por el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y 30.

14. Composición farmacéutica que contiene una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

15. Método para la conservación de células madre *in vitro*, en el que las células madre no son células embrionarias humanas, que comprende poner en contacto las células madre con una proteína *in vitro* o *ex vivo* en una cantidad suficiente para conservar las células madre, en el que dicha proteína

- (a) presenta por lo menos el 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEC. ID n°: 2;
- (b) es capaz de unirse a un receptor de flk2/flt3; y
- (c) es capaz de conservar las células precursoras hematopoyéticas.

16. Utilización de una proteína en una cantidad suficiente para conservar las células madre en la que las células madre no son células embrionarias humanas, para la preparación de una composición farmacéutica para conservar las células madre, en la que dicha proteína

ES 2 265 663 T3

(a) presenta por lo menos el 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEC. ID n°: 2;

(b) es capaz de unirse a un receptor de flk2/flt3; y

(c) es capaz de conservar las células precursoras hematopoyéticas.

17. Método según la reivindicación 15, en el que las células madre comprenden células madre hematopoyéticas.

18. Método según la reivindicación 17, en el que las células madre comprenden células humanas que expresan el antígeno CD34 y/o el receptor FLK2/FLT3.

19. Método según la reivindicación 17, en el que las células madre comprenden células murinas que expresan el antígeno Sca pero que no expresan antígenos maduros de la estirpe de células sanguíneas.

20. Método según la reivindicación 15, en el que el método comprende además la puesta en contacto de las células madre con el ligando FLKJ2/FLKT3 en una cantidad suficiente para expandir selectivamente el número de células madre sin provocar la diferenciación de las mismas.

21. Método de enriquecimiento de células madre, en el que las células madre no son células embrionarias humanas, que comprende el cultivo de las células madre en una cantidad de una proteína para la conservación del precursor, en el que dicha proteína

(a) presenta por lo menos el 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEC. ID n°: 2;

(b) es capaz de unirse a un receptor de flk2/flt3; y

(c) es capaz de conservar las células precursoras hematopoyéticas, y

en el que el cultivo se realiza en condiciones que permitan la conservación de células madre mientras permite que disminuya el número de células diferenciadas.

22. Método según la reivindicación 21, en el que las células madre comprenden las células madre primitivas.

23. Método según la reivindicación 21, en el que las células madre comprenden las células madre maduras.

24. Método según la reivindicación 21, en el que las células madre están por lo menos sustancialmente exentas de células de estroma.

25. Método según la reivindicación 21, en el que las condiciones de cultivo comprenden el cultivo en un medio que contiene un agente citotóxico que presenta una toxicidad selectiva para las células proliferantes.

26. Método según la reivindicación 25, en el que el agente citotóxico es adriamicina, ciclofosfamida, taxol u otro taxano, cisplatino o 5-fluorouracilo.

27. Método *in vitro* de transfección de la secuencia del ADN exógeno en células somáticas, la mejora que comprende la transfección de células madre selectivamente conservadas mediante una proteína, en el que las células madre no son células embrionarias humanas, y en el que dicha proteína

(a) presenta por lo menos el 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEC. ID n°: 2;

(b) es capaz de unirse a un receptor de flk2/flt3; y

(c) es capaz de conservar las células precursoras hematopoyéticas.

28. Composición para conservar la viabilidad de las células madre *ex vivo*, que comprende un medio de cultivo y una proteína que conserva las células madre, en la que las células madre no son células embrionarias humanas, y en el que dicha proteína

(a) presenta por lo menos el 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEC. ID n°: 2;

(b) es capaz de unirse a un receptor de flk2/flt3; y

(c) es capaz de conservar las células precursoras hematopoyéticas.

ES 2 265 663 T3

29. Utilización de una proteína en una cantidad suficiente para conservar las células madre del mamífero en un estado sustancialmente no proliferante para la preparación de una composición farmacéutica destinada a conservar las células madre en un mamífero en el que las células madre no son células embrionarias humanas, y en el que dicha proteína

5

(a) presenta por lo menos el 95% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos que comprende la SEC. ID nº: 2;

10

(b) es capaz de unirse a un receptor de flk2/flt3; y

(c) es capaz de conservar las células precursoras hematopoyéticas.

30. Molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos definida por la SEC. ID nº: 2.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG-1

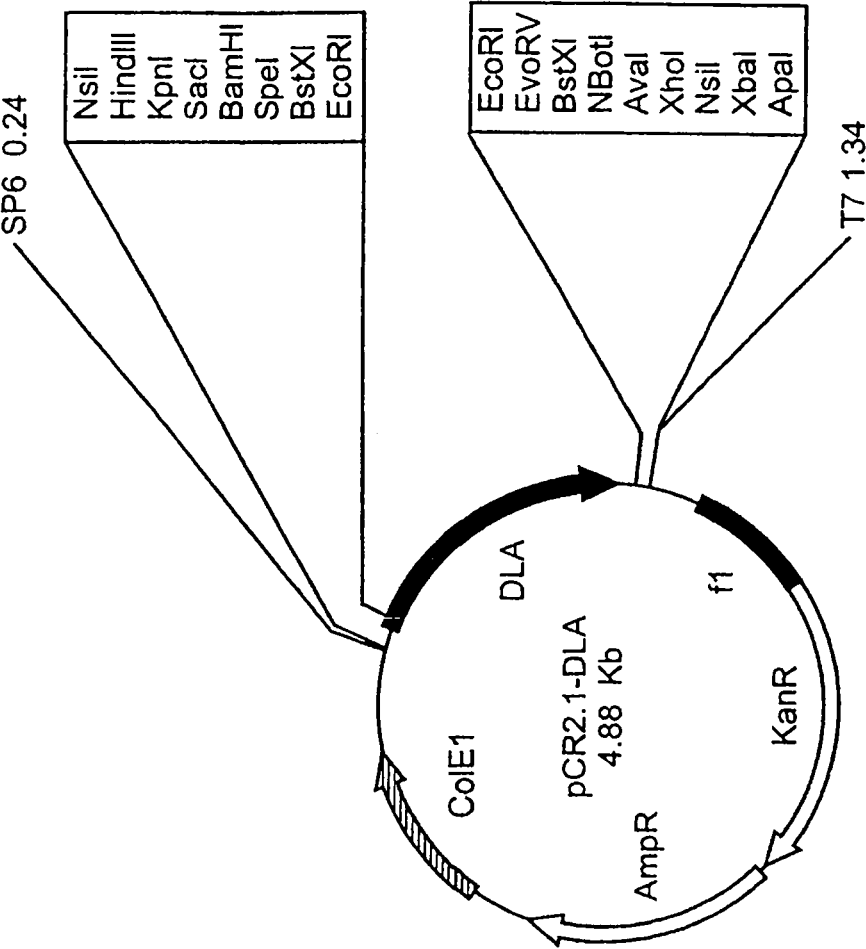


FIG-2

Subunidad β

Gowda 1 A Q S L S F S F T K F D P N Q E D L I F Q G T A T S K L D S A G N P V S S A G R V 42
 FRIL 1 A Q S L S F S F T K F D P N Q E D L I F Q G H A T S T N N V L Q V T K L D S A G N P V S S A G R V 50

43 L Y S A P L R L W E D S A V L T S F D P T I Y . . I F T N Y T S R I A D G L A . F I A P P D S V I S 89
 51 L Y S A P L R L W E D S A V L T S F D T I I N F E I S T P Y T S R I A D G L A F F I A P P D S V I S 100

90 Y H G G F L G L F P N A A E S G 105
 101 Y H G G F L G L F P N A N T L N N S S T S E N 123

Subunidad α

Gowda 1 I A E S N V V A V E F D T D Y L N P D Y G D P N Y I H I G I D V N S I R S K V T A S W D W 45
 FRIL 1 Q T T K A A S S N V V A V E F D T . Y L N P D Y G D P N Y I H I G I D V N S I R S K V T A K W D W 49

46 Q N G K I A T A H I S Y N S V S K R L S V T T Y Y P G R G K P A T S Y D I E L H T V L P E W V R V G 95
 50 Q N G K I A T A H I S Y N S V S K R L S V T S Y A G S K P A T L S Y D I E L H T V L P E W V R V G 99

96 L S A S T G Q N I E R N T V H S W S F T S S L W T N V A K V G V A S I G 132
 100 L S A S T G Q D K E R N T V H S W S F T S S L W T N V A K K E N E N K Y I T R G V L * Y M C I N D 149

FIG-3

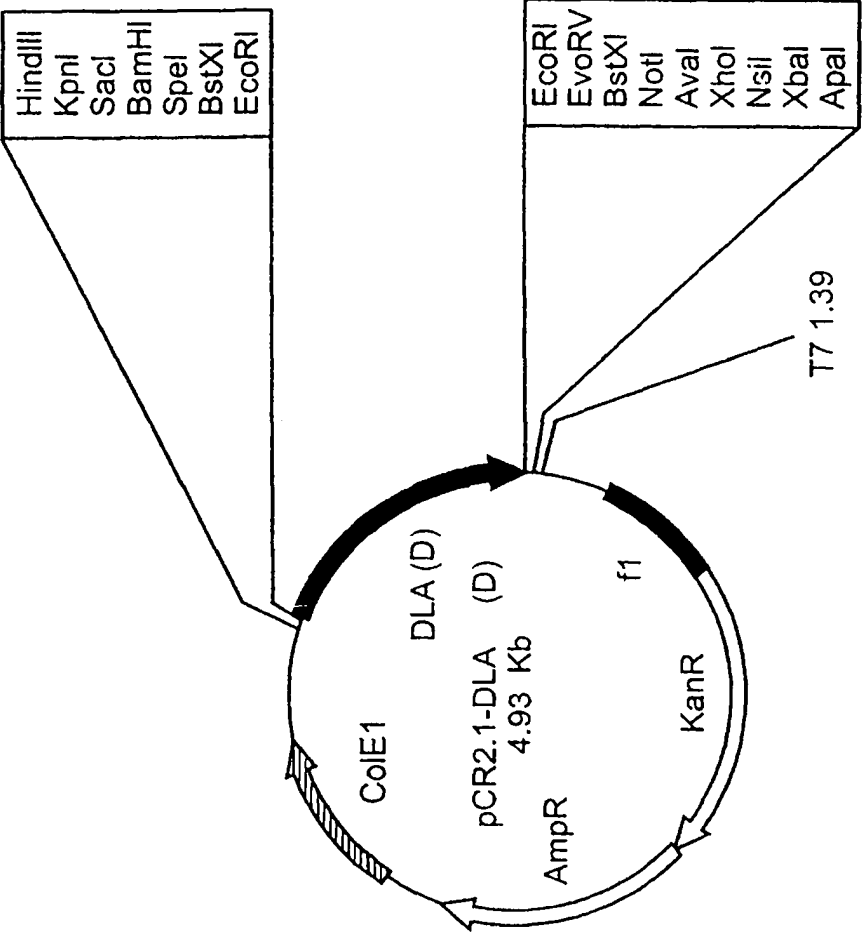


FIG-4

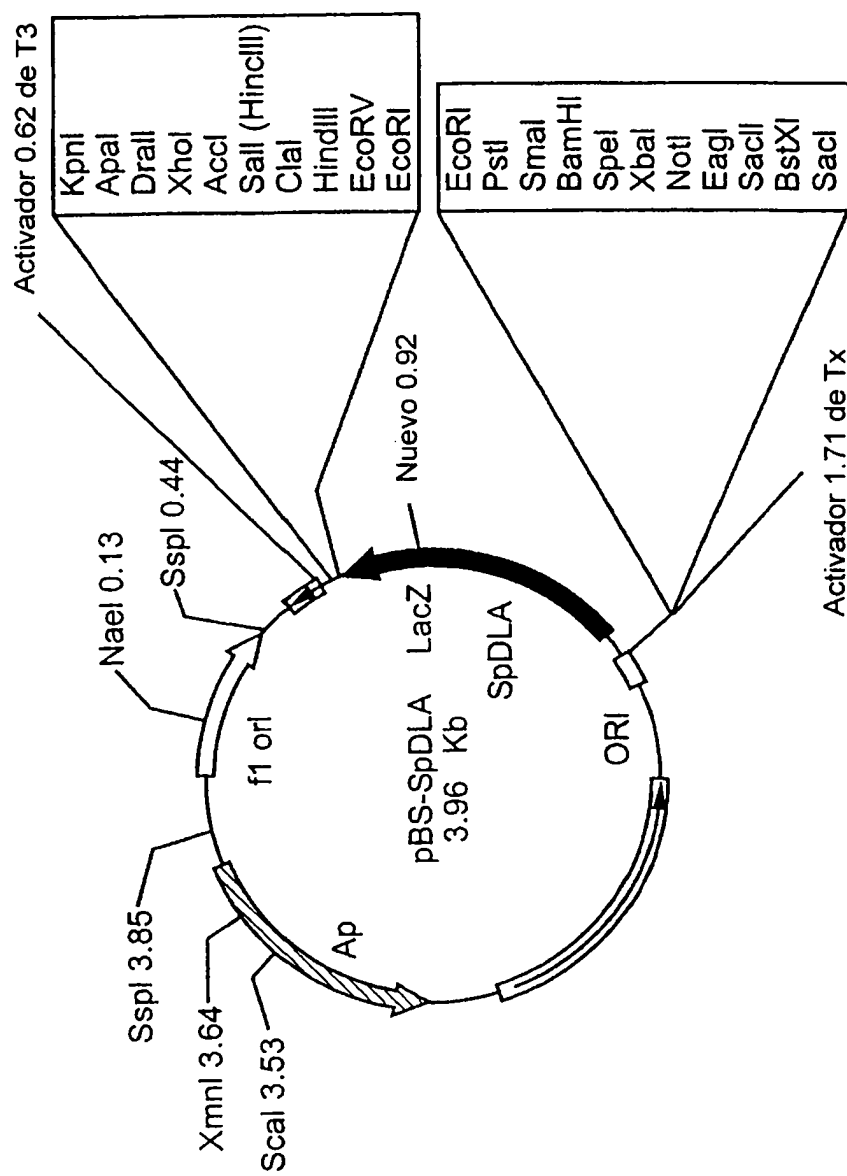


FIG-5

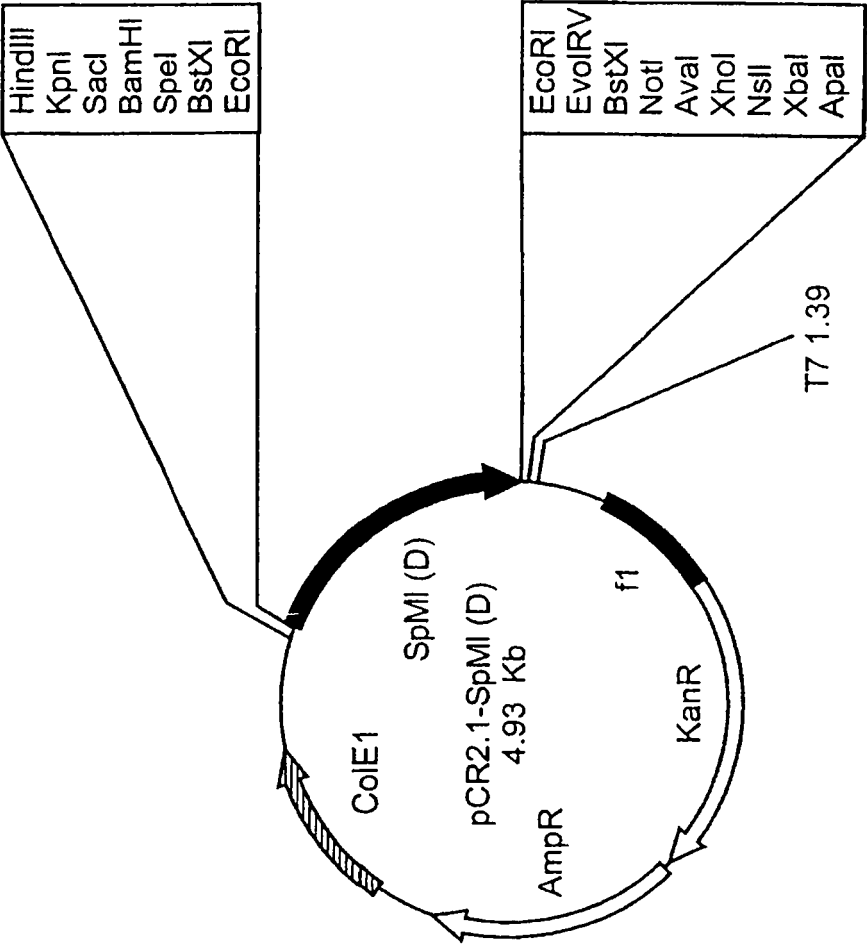


FIG-6

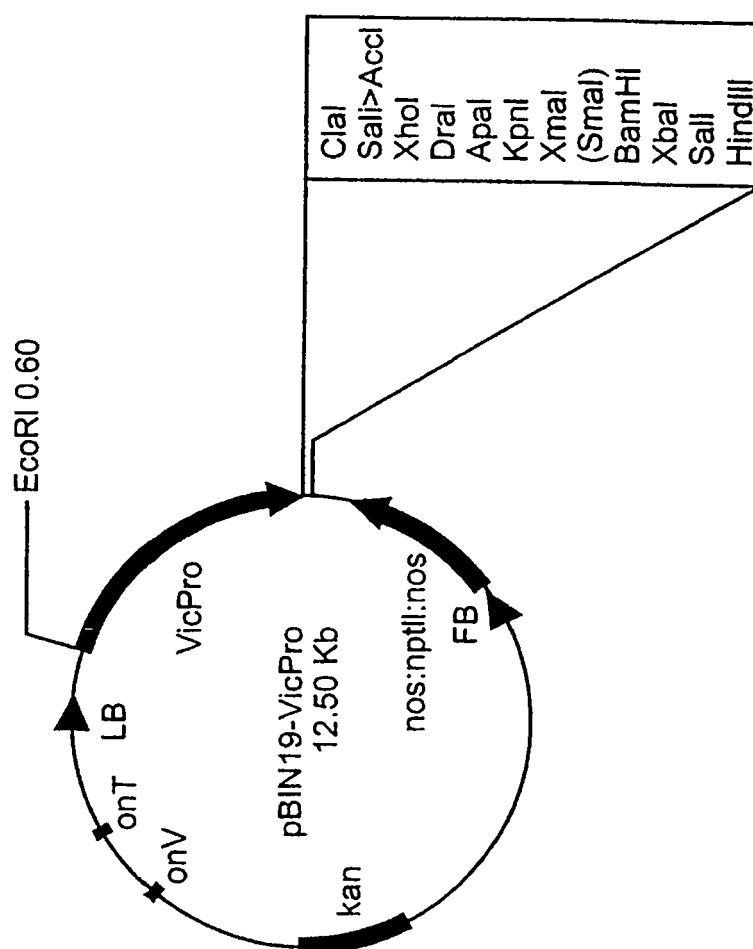


FIG-7

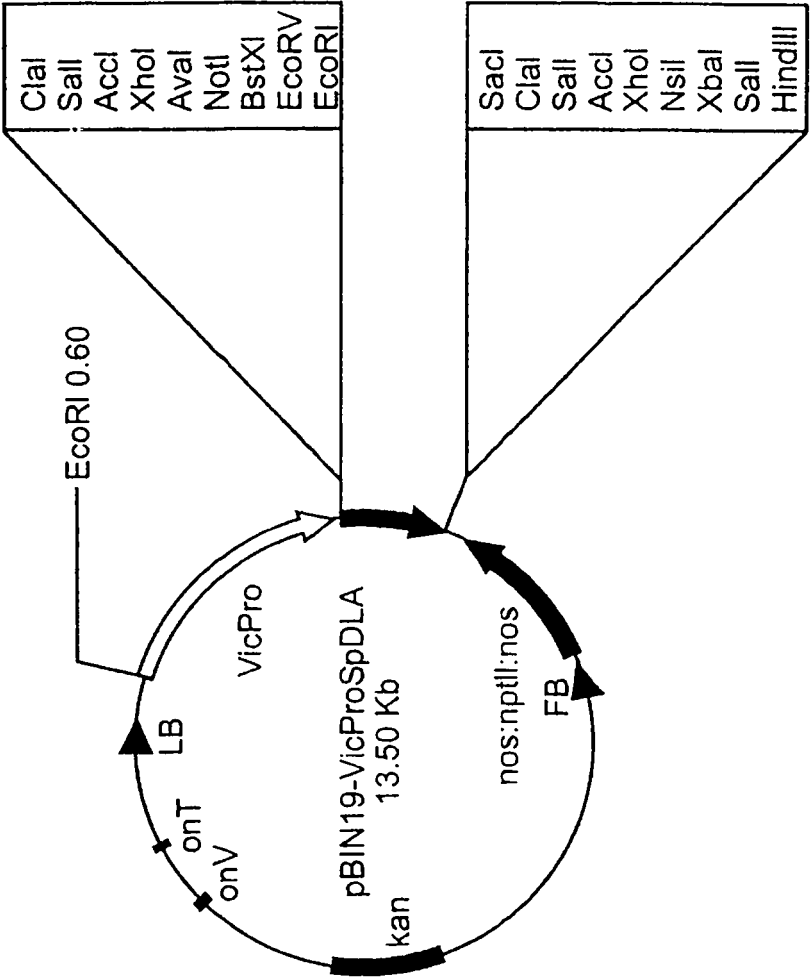


FIG-8

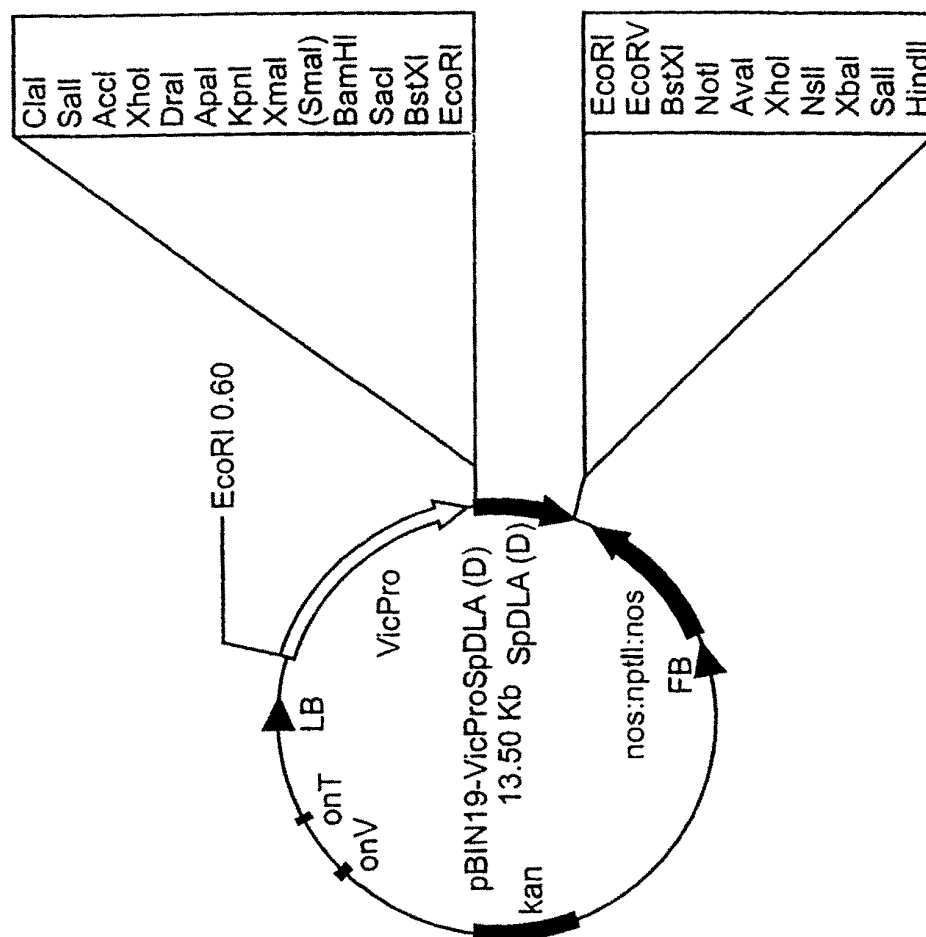


FIG-9

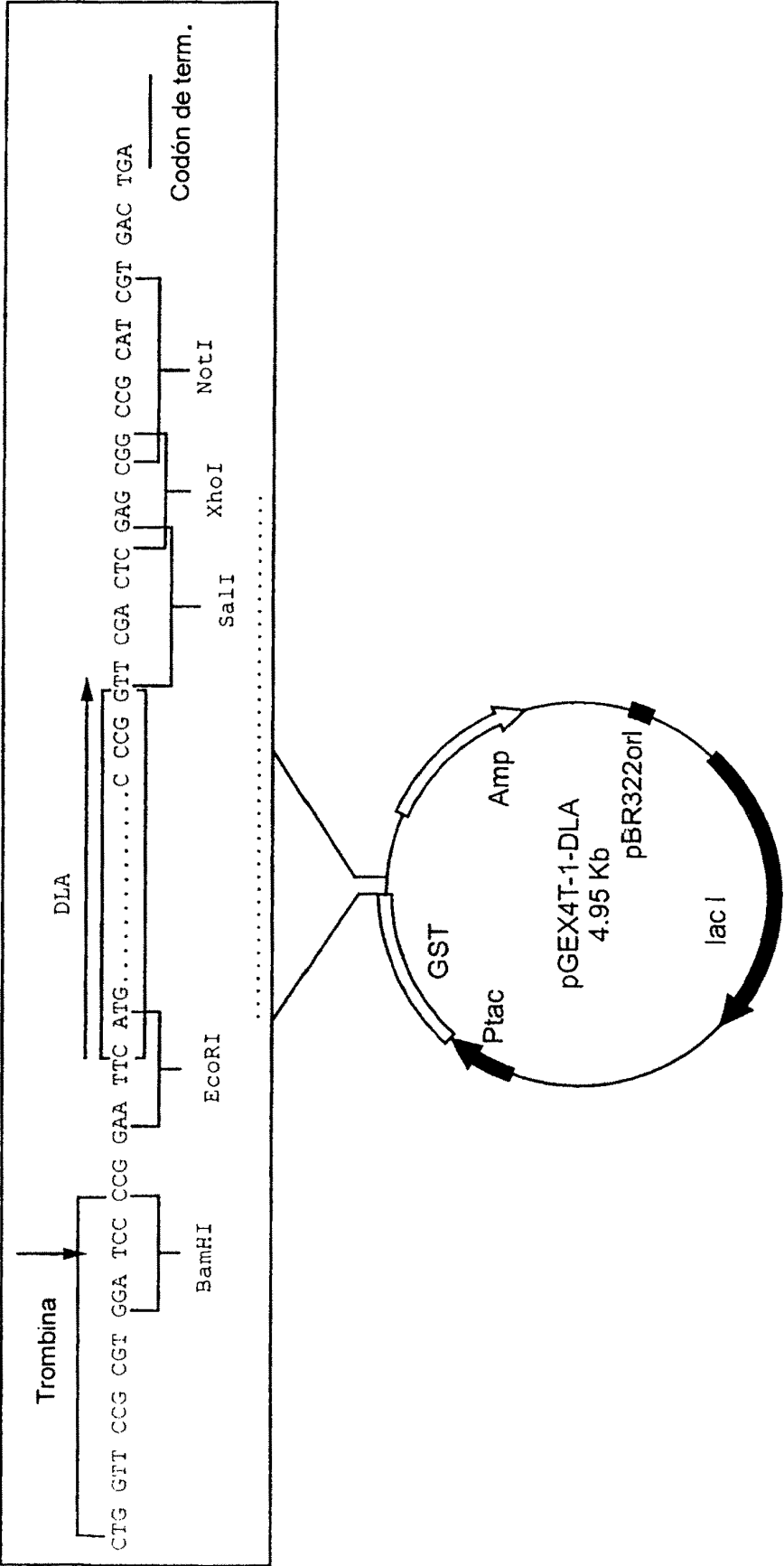
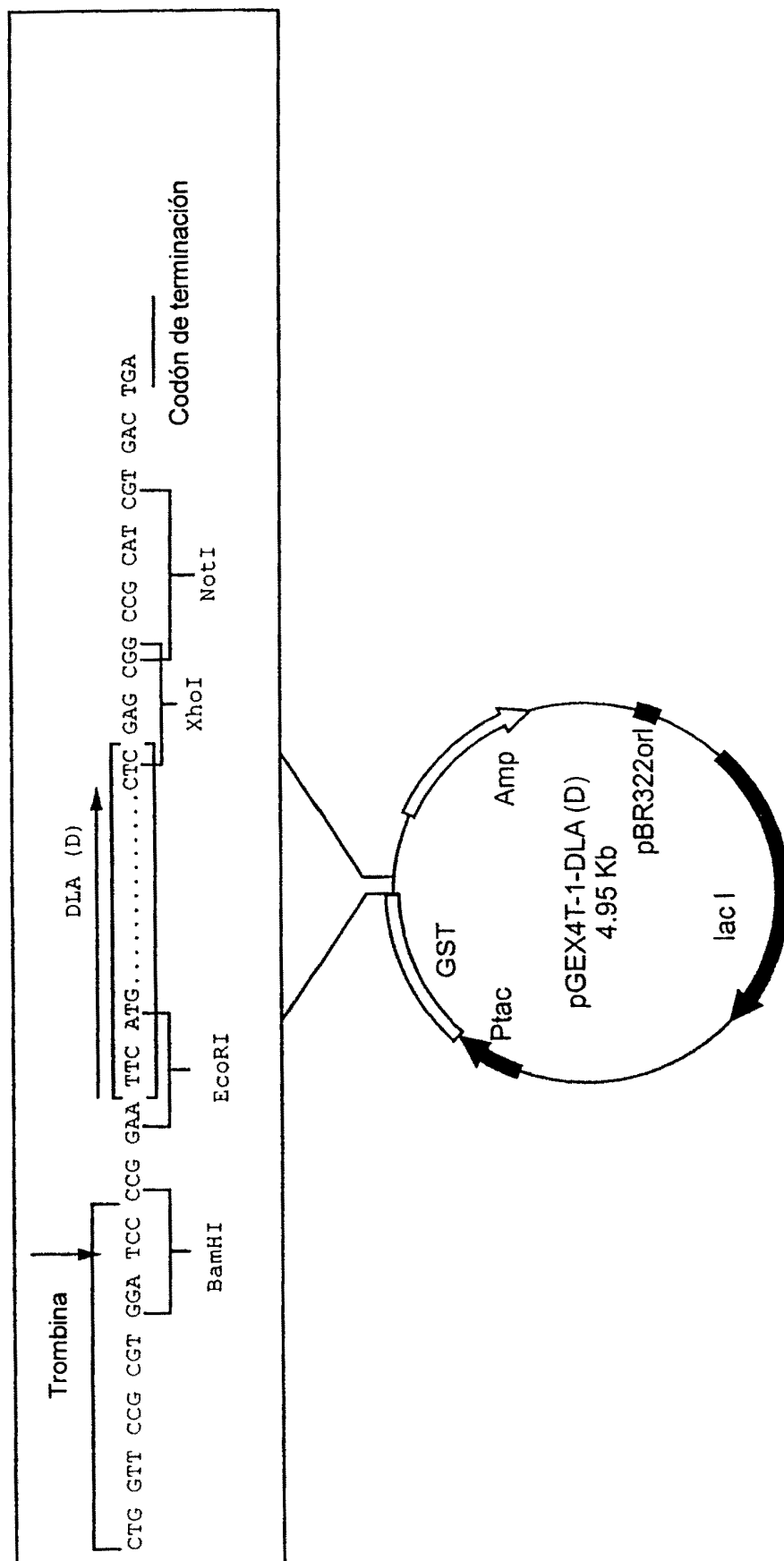


FIG-10



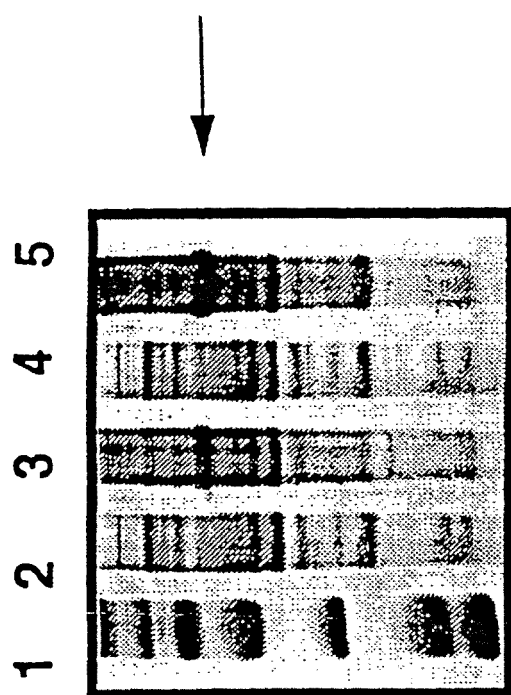


FIGURA 11

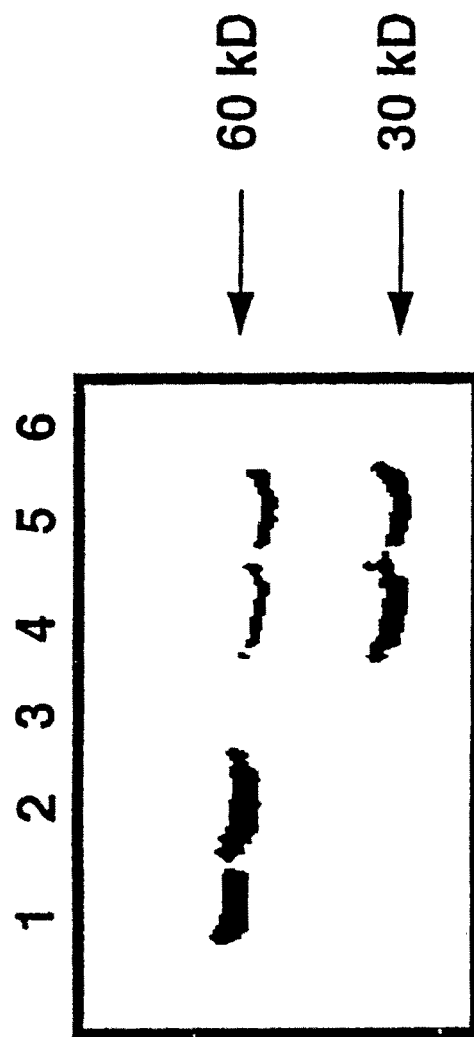
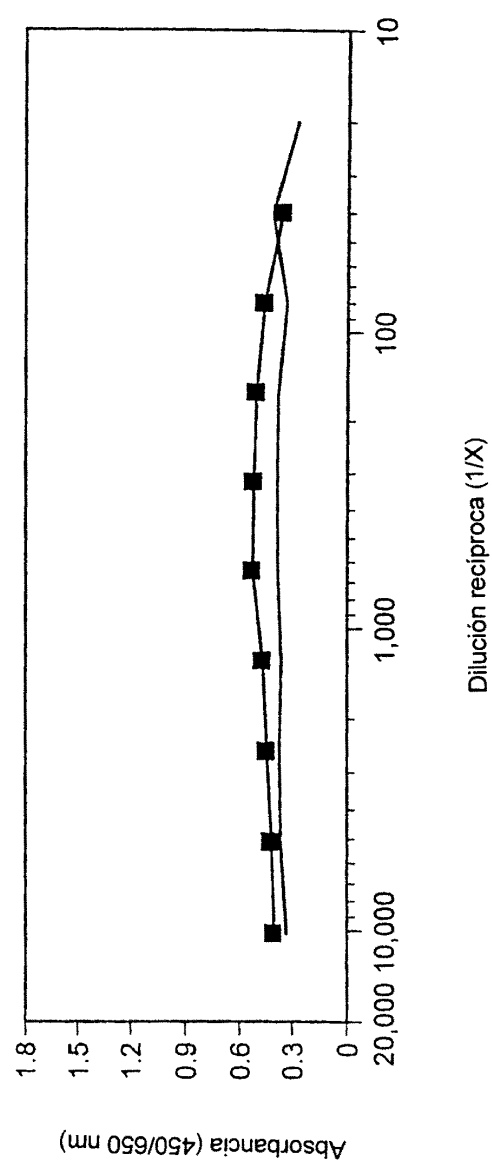
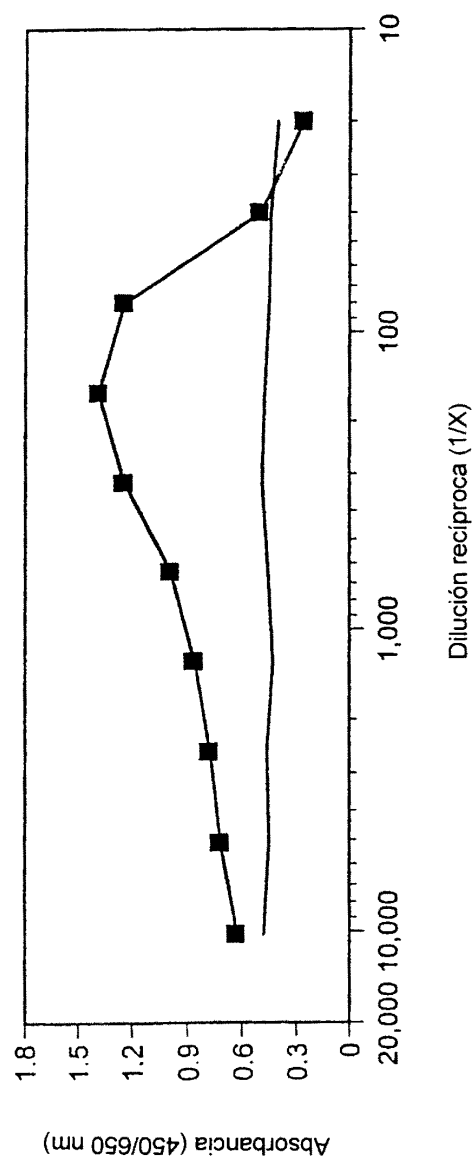


FIGURA 12

FIGURAS 13A y 13B



FIGURAS 14A y 14B

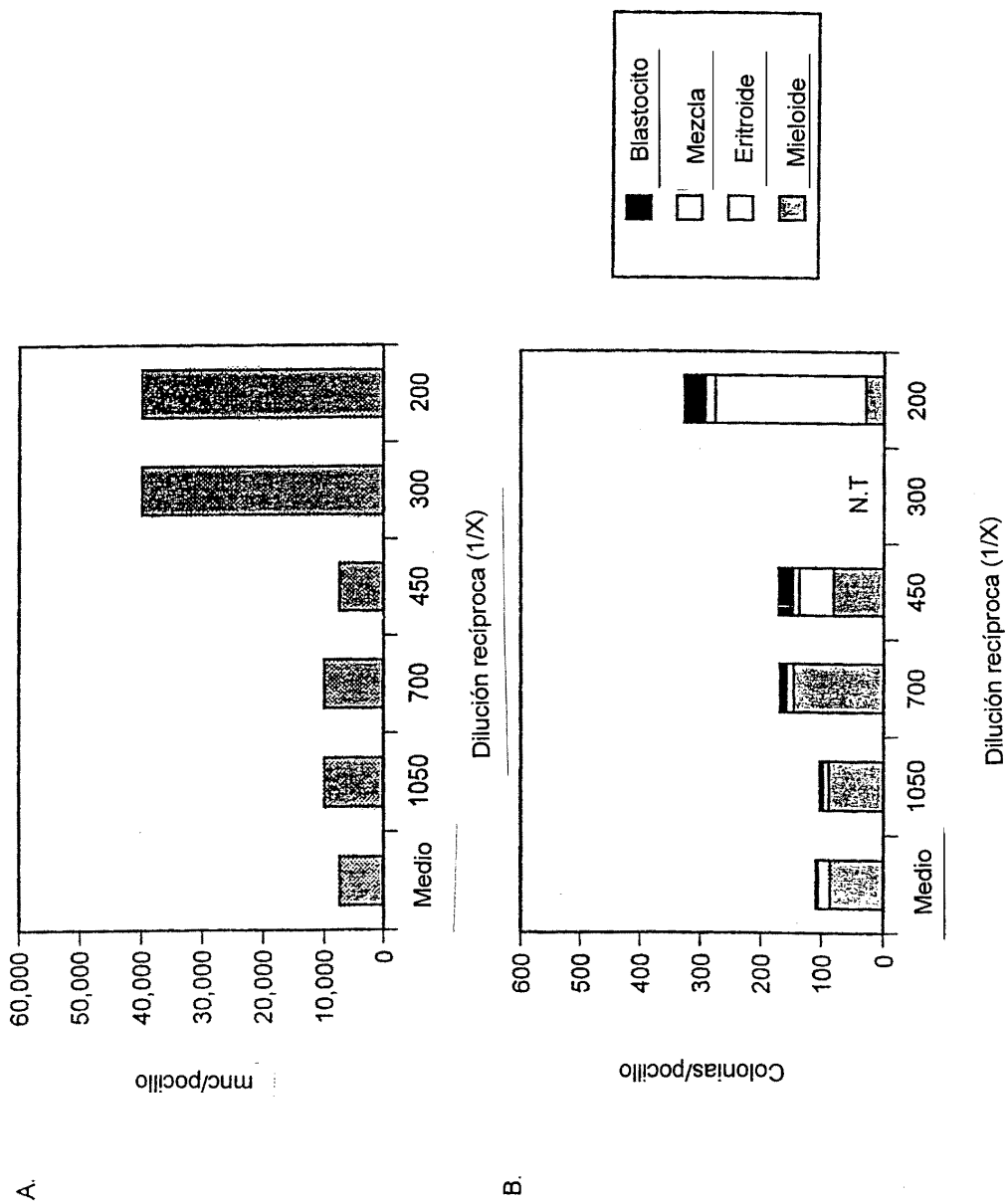
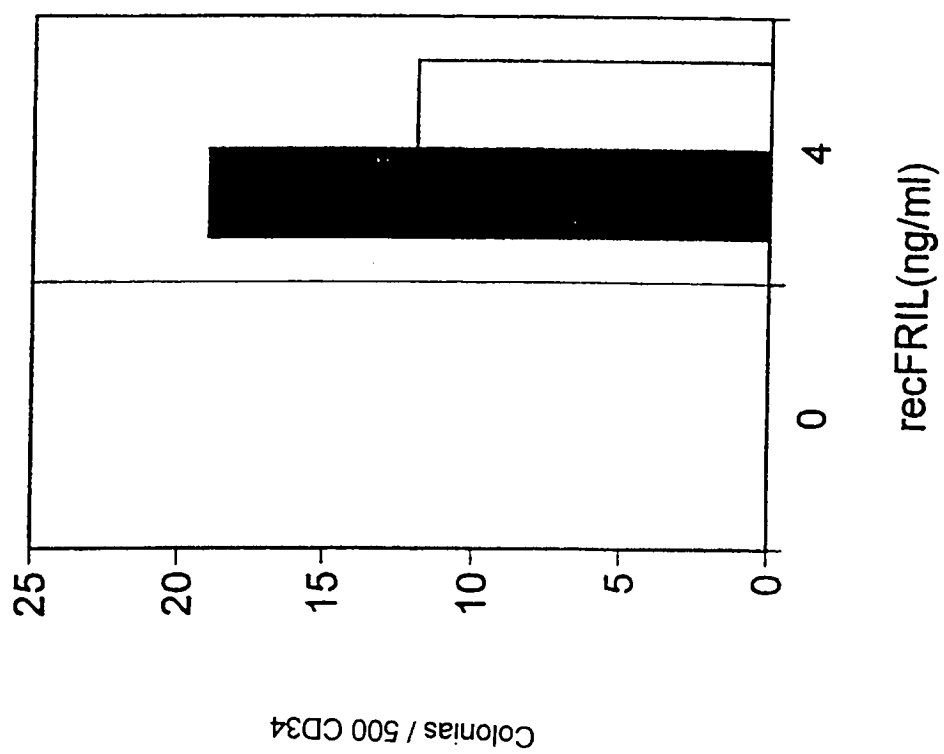


FIGURA 15



ES 2 265 663 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTES: Colucci *et al.*
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICA UN FACTOR DE CONSERVACIÓN DE CÉLULAS HUÉSPED DERIVADO DE LECTINA
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 24
- (iv) DIRECCIÓN DE LA CORRESPONDENCIA:
- (A) REMITENTE: Hoffmann & Baron, LLP
- (B) CALLE: 6900 Jericho Turnpike
- 15 (C) CIUDAD: Syosset
- (D) ESTADO: Nueva York
- (E) PAÍS: U.S.A.
- 20 (F) Código postal: 11791
- (v) LISTADO DESCIFRABLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete, 3,50 pulgadas, 1,44 Mb de almacenamiento
- 25 (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: MS-DOS
- (D) PROGRAMA INFORMÁTICO: WordPerfect
- 30 (vi) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US98/13046
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 23 Junio, 1998
- 35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS ANTERIORES DE LA SOLICITUD:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/881.189
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 24 Junio, 1997
- 40 (viii) INFORMACIÓN DEL APODERADO / AGENTE
- (A) NOMBRE: Feit, Irving N.
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 28.601
- 45 (C) NÚMERO DE REFERENCIA / ETIQUETA: 381-44 PCT
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:
- (A) TELÉFONO: (516) 822-3550
- 50 (B) TELEFAX: (516) 822-3582

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 1:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 939 nucleótidos
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: doble
- 60 (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 1:

65

ES 2 265 663 T3

GCACAGTCAT TGTCAATTTAG TTTCACCAAG TTTGATCCTA ACCAAGAGGA TCTTATCTT
C 60

CAAGGTCATG CCACTTCTAC AAACAATGTC TTACAAGTCA CCAAGTTAGA CAGTGCAGG
A 120

AACCCTGTGA GTTCTAGTGC GGAAGAGTG TTATATTCTG CACCATTCGCG CCTTTGGGA
A 180

GACTCTGCGG TATTGACAAG CTTTGACACC ATTATCAACT TTGAAATCTC AACACCTTA
C 240

ACTTCTCGTA TAGCTGATGG CTTGGCCTTC TTCATTGCAC CACCTGACTC TGTCATCAG
T 300

TATCATGGTG GTTTTCTTGG ACTCTTTCCC AACGCAAACA CTCTCAACAA CTCTTCCAC
C 360

TCTGAAAACC AAACCACCAC TAAGGCTGCA TCAAGCAACG TTGTTGCTGT TGAATTTGA
C 420

ACCTATCTTA ATCCCGATTA TGGTGATCCA AACTACATAC ACATCGGAAT TGACGTCAA
C 480

TCTATTAGAT CCAAGGTAAC TGCTAAGTGG GACTGGCAAA ATGGGAAAAT AGCCACTGC
A 540

CACATTAGCT ATAACTCTGT CTCTAAAAGA CTATCTGTTA CTAGTTATTA TGCTGGGAG
T 600

AAACCTGCGA CTCTCTCCTA TGATATTGAG TTACATACAG TGCTTCCTGA ATGGGTCAG
A 660

GTAGGGTTAT CTGCTTCAAC TGGACAAGAT AAAGAAAGAA ATACCGTTCA CTCATGGTC
T 720

TTCACTTCAA GCTTGTGGAC CAATGTGGCG AAGAAGGAGA ATGAAAACAA GTATATTAC

A 780

AGAGGCGTTC TGTGATGATA TATGTGTATC AATGATTTTC TATGTTATAA GCATGTAAT
G 840

TGCGATGAGT CAATAATCAC AAGTACAGTG TAGTACTTGT ATGTTGTTTG TGTAAGAGT
C 900

AGTTTGCTTT TAATAATAAC AAGTGCAGTT AGTACTTGT
939

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 265 663 T3

(A) LONGITUD: 270 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

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

```

      Ala Gln Ser Leu Ser Phe Ser Phe Thr Lys Phe Asp Pro Asn Gln
Glu
      1           5           10           15
      Asp Leu Ile Phe Gln Gly His Ala Thr Ser Thr Asn Asn Val Leu
Gln
           20           25           30
      Val Thr Lys Leu Asp Ser Ala Gly Asn Pro Val Ser Ser Ser Ala
Gly
           35           40           45
      Arg Val Leu Tyr Ser Ala Pro Leu Arg Leu Trp Glu Asp Ser Ala
Val
           50           55           60
      Leu Thr Ser Phe Asp Thr Ile Ile Asn Phe Glu Ile Ser Thr Pro
Tyr
      65           70           75
      80
      Thr Ser Arg Ile Ala Asp Gly Leu Ala Phe Phe Ile Ala Pro Pro
Asp
           85           90           95
      Ser Val Ile Ser Tyr His Gly Gly Phe Leu Gly Leu Phe Pro Asn
Ala
           100           105           110

```

ES 2 265 663 T3

```

    Asn Thr Leu Asn Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Gln Thr Thr Thr
Lys
5      115      120      125
    Ala Ala Ser Ser Asn Val Val Ala Val Glu Phe Asp Thr Tyr Leu
Asn
10     130      135      140
    Pro Asp Tyr Gly Asp Pro Asn Tyr Ile His Ile Gly Ile Asp Val
Asn
15     145      150      155
    160
    Ser Ile Arg Ser Lys Val Thr Ala Lys Trp Asp Trp Gln Asn Gly
Lys
20     165      170      175
    Ile Ala Thr Ala His Ile Ser Tyr Asn Ser Val Ser Lys Arg Leu
Ser
25     180      185      190
    Val Thr Ser Tyr Tyr Ala Gly Ser Lys Pro Ala Thr Leu Ser Tyr
Asp
30     195      200      205
    Ile Glu Leu His Thr Val Leu Pro Glu Trp Val Arg Val Gly Leu
Ser
35     210      215      220
    Ala Ser Thr Gly Gln Asp Lys Glu Arg Asn Thr Val His Ser Trp
Ser
40     225      230      235
    240
    Phe Thr Ser Ser Leu Trp Thr Asn Val Ala Lys Lys Glu Asn Glu
Asn
45     245      250      255
    Lys Tyr Ile Thr Arg Gly Val Leu Tyr Met Cys Ile Asn Asp
260      265      270

```

45 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 nucleótidos
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: una
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 3:

AARTTYGAYC CWAAYCARGA RGA

23

60 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 nucleótidos
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: una

ES 2 265 663 T3

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 4:

5 TTWCCRTTYT GCCARTCCCA 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 5:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 nucleótidos

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) NÚMERO DE CADENAS: una

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 5:

GTACCGAGCT CGGAT 15

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 18 nucleótidos

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CADENAS: una

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 6:

TCTAGATGCA TGCTCGAG 18

35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40 (A) LONGITUD: 22 nucleótidos

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CADENAS: una

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 7:

GTTGGACGTG AATTCCGATG TG 22

50 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 17 nucleótidos

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CADENAS: una

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 8:

GCYCARTCYC TYTCYTT 17

65 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 265 663 T3

- (A) LONGITUD: 22 nucleótidos
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: una
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 9:

GACCACGCGT ATCGATGTCG AC

22

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 nucleótidos
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: una
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 10:

AAGTTAGACA GTGCAGGAAA C

21

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 nucleótidos
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: una
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 11:

GCACAGTCAT TGTCATTTAG

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 132 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 12:

ES 2 265 663 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 105 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 13:

ES 2 265 663 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 14:

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 18 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CONFIGURACIÓN: lineal
 40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 14:
 45 Tyr Leu Pro Asp Tyr Gly Asp Tyr Ile Gly Ile
 1 5 10
 Asp Val

50 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 15:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 19 aminoácidos
 55 (B) TIPO: aminoácido
 (C) CONFIGURACIÓN: lineal
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 15:
 Phe Tyr Asn Ala Trp Asp Pro Ser Asn Arg Asp Arg His Ile Gly
 1 5 10 15
 65 Ile Asp Val

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 16:

ES 2 265 663 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 nucleótidos
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: una
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 16:

CCATAATCGG GATCAAGATA GGTG

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 nucleótidos
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: una
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 17:

CACCTATCTT GATCCCGATT ATGG

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: una
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 18:

AACTCAGCCG CACAGTCATT GTCA

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 28 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: una
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 19:

GAATTCGACC ACGCGTATCG ATGTCGAC

28

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 nucleótidos
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE CADENAS: una
- (D) CONFIGURACIÓN: lineal

ES 2 265 663 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 20:

GAATTCATGG CTTCTCCAA C

21

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 28 nucleótidos

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CADENAS: una

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 21:

TGACTGTGCG GCTGAGTTTG CGTGGGTG

28

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25

(A) LONGITUD: 1005 nucleótidos

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CADENAS: dos

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 22:

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 265 663 T3

```

ATGGCTTCCT CCAACTTACT CACCCTAGCC CTCTTCCTTG TGCTTCTCAC CCACGCAAA
C      60
5 TCAGCCGCAC AGTCATTGTC ATTTAGTTTC ACCAAGTTTG ATCCTAACCA AGAGGATCT
T      120

ATCTTCCAAG GTCATGCCAC TTCTACAAAC AATGTCTTAC AAGTCACCAA GTTAGACAG
10 T      180

GCAGGAAACC CTGTGAGTTC TAGTGCGGGA AGAGTGTTAT ATTCTGCACC ATTGCGCCT
15 T      240

TGGGAAGACT CTGCGGTATT GACAAGCTTT GACACCATTA TCAACTTTGA AATCTCAAC
A      300

20 CCTTACACTT CTCGTATAGC TGATGGCTTG GCCTTCTTCA TTGCACCACC TGACTCTGT
C      360

ATCAGTTATC ATGGTGGTTT TCTTGGA CTC TTTCCCAACG CAAACACTCT CAACAAC TC
25 T      420

TCCACCTCTG AAAACCAAAC CACCACTAAG GCTGCATCAA GCAACGTTGT TGCTGTTGA
30 A      480

TTTGACACCT ATCTTAATCC CGATTATGGT GATCCAAACT ACATACACAT CGGAATTGA
C      540

35 GTCAACTCTA TTAGATCCAA GGTAAGTCT AAGTGGGACT GGCAAAATGG GAAAATAGC
C      600

ACTGCACACA TTAGCTATAA CTCTGTCTCT AAAAGACTAT CTGTTACTAG TTATTATGC
40 T      660

GGGAGTAAAC CTGCGACTCT CTCCTATGAT ATTGAGTTAC ATACAGTGCT TCCTGAATG
G      720

45 GTCAGAGTAG GGTTATCTGC TTCAACTGGA CAAGATAAAG AAAGAAATAC CGTTCAC TC
A      780

TGGTCTTTCA CTTCAAGCTT GTGGACCAAT GTGGCGAAGA AGGAGAATGA AAACAAGTA
50 T      840

ATTACAAGAG GCGTTCTGTG ATGATATATG TGTATCAATG ATTTTCTATG TTATAAGCA
55 T      900

GTAATGTGCG ATGAGTCAAT AATCACAAGT ACAGTGTAGT ACTTGTATGT TGTTTGTGT
A      960

60 AGAGTCAGTT TGCTTTTAAT AATAACAAGT GCAGTTAGTA CTTGT
1005

```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 265 663 T3

(A) LONGITUD: 286 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CONFIGURACIÓN: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 23:

```

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

```

ES 2 265 663 T3

Glu
 5 130 135 140
 Asn Gln Thr Thr Thr Lys Ala Ala Ser Ser Asn Val Val Ala Val
 Glu
 145 150 155
 160
 10 Phe Asp Thr Tyr Leu Asn Pro Asp Tyr Gly Asp Pro Asn Tyr Ile
 His
 165 170 175
 Ile Gly Ile Asp Val Asn Ser Ile Arg Ser Lys Val Thr Ala Lys
 15 Trp
 180 185 190
 Asp Trp Gln Asn Gly Lys Ile Ala Thr Ala His Ile Ser Tyr Asn
 20 Ser
 195 200 205
 Val Ser Lys Arg Leu Ser Val Thr Ser Tyr Tyr Ala Gly Ser Lys
 25 Pro
 210 215 220
 Ala Thr Leu Ser Tyr Asp Ile Glu Leu His Thr Val Leu Pro Glu
 30 Trp
 225 230 235
 240
 Val Arg Val Gly Leu Ser Ala Ser Thr Gly Gln Asp Lys Glu Arg
 35 Asn
 245 250 255
 Thr Val His Ser Trp Ser Phe Thr Ser Ser Leu Trp Thr Asn Val
 40 Ala
 260 265 270
 Lys Lys Glu Asn Glu Asn Lys Tyr Ile Thr Arg Gly Val Leu
 275 280 285

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID nº 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 8 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CONFIGURACIÓN: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 24:

Thr Asn Asn Val Leu Gln Val Thr
 1 5