



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 269 266**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01122476 .3**

(86) Fecha de presentación : **07.09.1994**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1186301**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **13.03.2002**

(54) Título: **Anticuerpos monoclonales que reconocen los receptores de flk-2 y el aislamiento de poblaciones de células madre hematopoyéticas primitivas.**

(30) Prioridad: **08.09.1993 US 118468**

(73) Titular/es: **IMCLONE SYSTEMS, Inc.**
180 Varick Street
New York, New York 10014, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

(72) Inventor/es: **Goldstein, Neil I.;**
Songsakphsan, Ratchaneem y
Rose, Caroline

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 269 266 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

Anticuerpos monoclonales que reconocen los receptores de flk-2 y el aislamiento de poblaciones de células madre hematopoyéticas primitivas.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales que reconocen el receptor de las células madre hematopoyéticas conocido como flk-2 y a poblaciones de células madre hematopoyéticas primitivas que contienen el receptor flk-2.

Antecedentes de la invención

El sistema hematopoyético de mamíferos comprende glóbulos rojos y blancos. Estas células son las células maduras que resultan de células progenitoras de linaje restringido más primitivas. Las células del sistema hematopoyético han sido revisadas por Dexter y Spooncer en el Annual Review of Cell Biology 3, 424-441 (1987).

Los glóbulos rojos, o eritrocitos, resultan de células primitivas referidas por Dexter y Spooncer como unidades formadoras de acúmulos eritroides (BFU-E). La progenie inmediata de las unidades formadoras de acúmulos eritroides son denominadas unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E).

Los glóbulos blancos contienen las células maduras de los sistemas linfóide y mieloide. Entre las células linfoides se incluyen los linfocitos B y los linfocitos T. Los linfocitos B y T resultan de células progenitoras tempranas referidas por Dexter y Spooncer como células preT y preB.

El sistema mieloide comprende numerosas células incluyendo granulocitos, monocitos, macrófagos, y megacariocitos. Los granulocitos se dividen adicionalmente en neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos. Los megacariocitos vierten porciones de su citoplasma para formar plaquetas.

Cada una de las células hematopoyéticas maduras está especializada para funciones específicas. Por ejemplo, los eritrocitos son responsables del transporte de oxígeno y dióxido de carbono. Los linfocitos T y B son responsables de las respuestas inmunitarias mediadas por células y anticuerpos, respectivamente. Las plaquetas están implicadas en la coagulación de la sangre. Los granulocitos y macrófagos actúan generalmente como captadores y células accesorias en la respuesta inmunitaria contra organismos invasores y sus subproductos.

En el centro del sistema hematopoyético se encuentran una o más células madre hematopoyéticas totipotentes, que experimentan una serie de etapas de diferenciación que conducen a células progenitoras de linaje crecientemente restringido. Las células progenitoras más maduras están restringidas a la producción de uno o dos linajes. Entre algunos ejemplos de células progenitoras de linaje restringido mencionadas por Dexter y Spooncer se incluyen las células formadoras de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CFC).

El sistema hematopoyético funciona por medio de una producción controlada precisamente de los diversos linajes maduros. Se cree que las células madre totipotentes poseen la capacidad tanto de auto-renovarse como de diferenciarse en progenitores comprometidos de todas las linajes hematopoyéticos. Estas células más primitivas de las células hematopoyéticas son tanto necesarias como suficientes para la reconstitución hematopoyética completa y permanente de un sistema hematopoyético agotado por la radiación en mamíferos. La capacidad de las células hematopoyéticas para reconstituir el sistema hematopoyético completo es la base de la terapia del trasplante de médula ósea.

Las células madre hematopoyéticas humanas y de ratón se caracterizan por la presencia de ciertos antígenos. Por ejemplo, la presencia del antígeno 1 de las células madre (Sca-1) y Thy-1 indican la presencia de células hematopoyéticas murinas. Ver Tsukamoto y col. Solicitud de Patente Europea 451.611. La presencia de CD34, Thy-1 y HLA de Clase II (así como su epítipo DR conservado reconocido por un anticuerpo monoclonal denominado J1-43) indica la presencia de células madre hematopoyéticas humanas.

Los antígenos que son característicos de las células madre hematopoyéticas murinas, tales como Sca-1 y Thy-1, y de las células madre hematopoyéticas humanas, tales como HLA de Clase II, CD34+, y Thy-1 no se encuentran exclusivamente en células madre hematopoyéticas y en las células progenitoras tempranas. Tales antígenos también se encuentran en un número significativo de poblaciones celulares comprometidas de linaje más maduro.

Las células madre hematopoyéticas se caracterizan adicionalmente por la ausencia de otros numerosos antígenos que se encuentran solamente en células más maduras. Entre algunos ejemplos de antígenos humanos encontrados solamente en células hematopoyéticas más maduras se incluyen CD3, CD7, CD8, CD10, CD14, CD15, CD19, CD20, CD33. De estos, CD10, CD19, y CD20 están asociados con las células B; CD3, CD4, y CD8 están asociados con las células T; y CD14, CD15, y CD33 están asociados con las células mieloides.

Los antígenos CD3, CD8, CD10, CD19, CD20, y CD33 son referidos colectivamente como Lin. Por consiguiente, una población de células madre hematopoyéticas humanas altamente purificada se caracteriza por ser CD34+ Lin- y CD34+ Lin- Thy-1+.

Se está siendo cada vez más evidente que las proteína-tirosina quinasas (pTK) juegan un importante papel como receptores celulares para los factores de crecimiento hematopoyéticos. Entre algunas pTK receptoras se incluyen c-kit y los receptores del factor estimulador de colonias 1 (CSF-1) y PDGF. Estos receptores, no obstante, se encuentran en las células hematopoyéticas maduras así como en las células madre hematopoyéticas primitivas.

Un receptor que se ha informado que está asociado con las células madre hematopoyéticas primitivas es el receptor flk-2. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del receptor flk-2 se dan en la Solicitud PCT Internacional US92/05401 de Ihor R. Lemishka así como Matthews y col. *Cell* **65**, 1143-1152 (1991). Este receptor define una población de células madre hematopoyéticas primitivas (flk-2+).

Han sido publicadas secuencias de nucleótidos y aminoácidos de flk-2 murino e intracelular humano ligeramente diferentes por Rosnet y col., quien hacía referencia al receptor flt-3; ver *Oncogene*, **6**, 1641-1650 (1991) y *Genomics* **9**, 380-385 (1991), respectivamente. No se sabe si las diferencias en la secuencia referidas en los artículos de Rosnet y col. y en la Solicitud de Patente de Lemishka y en el artículo de Mathews y col. se deben a errores de secuenciación o a polimorfismos.

Diversos órganos expresan el receptor flk-2. Entre tales órganos se incluyen hígado fetal, bazo fetal, timo fetal, cerebro adulto, y médula adulta. Por ejemplo, flk-2 es expresada en colonias CFU-Blast multipotenciales individuales capaces de generar numerosas colonias multi-linaje tras el replante.

El receptor flk-2 puede ser dividido en dominios fácilmente encontrados. La secuencia de ADN correspondiente a las pTK codifica, partiendo de sus extremos 5', una secuencia líder hidrófoba seguido de un dominio extracelular hidrófilo. Inmediatamente aguas abajo del dominio del receptor extracelular, se encuentra una región transmembrana hidrófoba. La región transmembrana está seguida inmediatamente por un dominio catalítico alcalino.

La siguiente tabla muestra el número de ácidos nucleicos y aminoácidos que corresponden al péptido señal, al dominio extracelular, a la región transmembrana y al dominio intracelular para flk-2 murino (mflk-2) y flk-2 humano (hflk-2) como se describe en la Solicitud PCT Internacional US92/05401.

mflk-2

	<u>Péptido</u>				
	<u>Señal</u>	<u>Extracelular</u>	<u>Transmembrana</u>	<u>Intracelular</u>	
aa núm.	-27 a -1	1 a 517	518 a 537	538 a 965	
código aa	M T	N S	F C	H S	
núm. na	31-111	112-1662	1663-1722	1723-3006	

hflk-2

	<u>Péptido</u>				
	<u>Señal</u>	<u>Extracelular</u>	<u>Transmembrana</u>	<u>Intracelular</u>	
aa núm.	-27 a -1	1 a 516	517 a 536	537 a 966	
código aa	M N	Q F	Y C	H S	
núm. na	58-138	139-1689	1690-1746	1747-3036	

Compendio de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar anticuerpos que se unan específicamente al receptor flk-2 y a las células que expresan el receptor flk-2. Otro objeto es proporcionar poblaciones de células madre caracterizadas por la presencia del receptor flk-2. Estos y otros objetivos, como resultará evidente para los expertos normales en la técnica, han sido satisfechos desarrollando líneas celulares de hibridoma que expresan el anticuerpo monoclonal anti-flk-2 de ratón de rata 2A13 (Número de Acceso ATCC HB 11444), el anticuerpo monoclonal anti-flk-2 de ratón de rata 23H (Número de Acceso ATCC HB11443), el anticuerpo monoclonal anti-flk-2 humano de rata 19A (Número de Acceso ATCC HB11442) y el anticuerpo monoclonal anti-flk-2 humano de ratón 6J11 (Número de Acceso ATCC HB11445) y el anticuerpo monoclonal anti-flk-2 humano de rata 71E. Semejantes anticuerpos permiten el aislamiento

de una población de células madre hematopoyéticas caracterizada por la presencia de receptores flk-2, y pueden ser utilizados como agonistas y antagonistas del receptor flk-2.

El método de aislamiento de una población de células madre hematopoyéticas que expresan el receptor flk-2 de una mezcla de células hematopoyéticas comprende las etapas de: (a) unir las células que expresan el receptor flk-2 a un anticuerpo anti-flk-2; (b) separar las células que expresan el receptor flk-2 unido al anticuerpo anti-flk-2 del resto de la mezcla de células hematopoyéticas; (c) desligar las células que expresan el receptor flk-2 del anticuerpo anti-flk-2; y (d) aislar las células que expresan el receptor flk-2.

Descripción de las figuras

Figura 1A. Titulación de 23H7 mediante ELISA (Ejemplo 10).

Figura 1B. Titulación de 2A13 mediante ELISA (Ejemplo 10).

Figura 2. Análisis FACS de células 3T3 tratadas con saponina y células i3T3 con 2A13 (Ejemplo 12).

Figura 3. Análisis de la unión de 2A13 y 23H7 a Flag-mflk-2 sobre Biacore (Ejemplo 12).

Descripción detallada de la invención

Los anticuerpos de la presente invención se originan contra, y específicamente para, una proteína tirosina quinasa denominada quinasa del hígado fetal 2 (flk-2). Para los fines de esta memoria, flk-2 representará el receptor de tirosina quinasa descrito por Lemishka en la Solicitud PCT Internacional US92/05401 y en Cell 65, 1143-1152 (1991); así como por Rosnet como flt-3 en Oncogene 6, 1641-1650 (1991) y en Genomics 9, 380-385 (1991). Los anticuerpos se originan preferiblemente contra, y son específicos para, el dominio del receptor extra-celular del receptor flk-2.

El receptor flk-2 contra el cual se elaboran los anticuerpos puede estar unido a una célula. Alternativamente, el receptor flk-2 puede estar libre de la célula, preferiblemente en forma soluble.

Equivalentes Funcionales

La invención también incluye equivalentes funcionales de los anticuerpos descritos en esta memoria. Los equivalentes funcionales tienen características de unión comparables a las de los anticuerpos, y entre ellos se incluyen, por ejemplo, los anticuerpos de cadena sencilla, quimerizados y humanizados. Los anticuerpos quimerizados tienen preferiblemente regiones constantes derivadas sustancialmente o exclusivamente de regiones constantes de anticuerpos humanos y regiones variables derivadas sustancialmente o exclusivamente de la secuencia de la región variable de un mamífero distinto de un humano. Los anticuerpos humanizados tienen preferiblemente regiones constantes y regiones variables distintas de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) derivadas sustancialmente o exclusivamente de las regiones de los anticuerpos humanos correspondientes y las regiones CDR derivadas sustancialmente o exclusivamente de un mamífero distinto de un humano. Entre los mamíferos adecuados distintos de un humano se incluye cualquier mamífero del cual se puedan elaborar anticuerpos monoclonales, tales como un conejo, ratón, caballo, cabra, o primate.

Entre los equivalentes funcionales adicionales se incluyen fragmentos de anticuerpos que tienen las mismas características de unión que, o que tienen características de unión comparables a, las del anticuerpo completo. Tales fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento F(ab')₂. Preferiblemente los fragmentos de anticuerpo contienen las seis regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo completo, aunque los fragmentos que contienen menos que todas esas regiones, tales como tres, cuatro o cinco CDR, también pueden ser funcionales. Los fragmentos pueden ser preparados mediante los métodos descritos por Lamoyi y col. en el Journal of Immunological Methods 56, 235-243 (1983) y por Parham en el Journal of Immunology 131, 2895-2902 (1983).

Preparación de receptores flk-2

Con el fin de preparar los receptores flk-2 contra los cuales se elaboran los anticuerpos, se pueden insertar moléculas de ácido nucleico que codifiquen las proteínas flk-2 de la invención, o porciones de las mismas, especialmente las porciones extracelulares de las mismas, en vectores conocidos para la expresión utilizando mecanismos de ADN recombinante normalizados. Los mecanismos de recombinación de ADN normalizados son descritos por Sambrook y col., "Molecular Cloning", Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1987) y por Ausubel y col. (Eds.) "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates/Wiley-Interscience, Nueva York (1990). Los vectores pueden ser circulares (es decir plásmidos) o no circulares. Los vectores normalizados son adecuados para la clonación y expresión en un huésped.

El huésped puede ser procariótico o eucariótico. Los huéspedes procarióticos son preferiblemente *E. coli*. Entre los huéspedes eucarióticos preferidos se incluyen células de levaduras, de insectos y de mamíferos. Entre las células de mamífero preferidas se incluyen, por ejemplo, CHO, COS, y humanas.

El ADN insertado en un huésped puede codificar la porción extracelular completa del receptor flk-2, o un fragmento soluble del receptor flk-2. La porción extracelular del receptor flk-2 codificado por el ADN está anclada opcionalmente o bien en uno cualquiera del extremo 5' o el extremo 3', o bien en ambos, a secuencias de aminoácidos adicionales. La secuencia de aminoácidos adicional puede estar anclada a la región extracelular de flk-2 en la naturaleza, tales como aquellas que representan la secuencia líder, la región transmembrana y/o la región intracelular de flk-2. Las secuencias de aminoácidos adicionales también pueden ser secuencias no ancladas a flk-2 en la naturaleza. Preferiblemente, tales secuencias de aminoácidos adicionales sirven para un fin concreto, tal como mejorar los niveles de expresión, la solubilidad, o la inmunogenicidad. Entre algunas secuencias de aminoácidos adicionales adecuadas se incluyen, por ejemplo, el péptido FLAG (DYKDDDDKI) opcionalmente ancladas en cualquier extremo a la porción Fc de una inmunoglobulina (Ig).

La Fuente de ADN que Codifica los Receptores flk-2

Con el fin de producir moléculas de ácido nucleico que codifiquen flk-2, se proporciona una fuente de células que expresan flk-2. Entre las fuentes fetales adecuadas se incluyen células de hígado, bazo, o timo. Entre las fuentes de adulto adecuadas se incluyen células de médula ósea, sangre (periférica o de cordón umbilical) o de cerebro.

Por ejemplo, se pueden obtener células de hígado fetal de ratón adecuadas a los 14 días de gestación. Las células de timo fetal de ratón se pueden obtener a los 14-18 días, preferiblemente el día 15, de gestación. Las células fetales adecuadas de otros mamíferos se obtienen en momentos de gestación correspondientes a los momentos de gestación de ratón.

Aislamiento de Moléculas de Acido Nucleico que Codifican los Receptores flk-2

El ARN total se prepara mediante procedimientos normalizados a partir de tejido o células que contienen el receptor flk-2. El ARN total se utiliza para dirigir la síntesis de ADNc. Los métodos normalizados para aislar el ARN y sintetizar el ADNc se proporcionan en los manuales normalizados de biología molecular tales como, por ejemplo, Sambrook y col., "Molecular Cloning", Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1987) y Ausubel y col., (Eds.), "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Associates/Wiley Interscience, Nueva York (1990).

El ADNc de los receptores puede ser amplificado mediante métodos conocidos. Por ejemplo, el ADNc puede ser utilizado como molde para la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); ver Saiki y col., Science, 239, 487 (1988) o Mullis y col., Patente de los Estados Unidos 4.683.195. Las secuencias de los cebadores oligonucleotídicos para la amplificación por PCR derivan de las secuencias de flk-2 de ratón y humano respectivamente. Los oligonucleótidos se sintetizan mediante métodos conocidos en la técnica. Entre los métodos adecuados se incluyen aquellos descritos por Caruthers en Science 230, 281-285 (1985).

Con el fin de aislar las regiones que codifican la proteína completa para los receptores flk-2, el cebador oligonucleotídico de la PCR aguas arriba es complementario a la secuencia en el extremo 5', abarcando preferiblemente el codón de iniciación ATG y al menos 5-10 nucleótidos aguas arriba del codón de iniciación. El cebador oligonucleotídico de la PCR aguas abajo es complementario a la secuencia en el extremo 3' de la secuencia de ADN deseada. La secuencia de ADN deseada codifica preferiblemente la porción extracelular completa del receptor flk-2, y opcionalmente codifica toda o parte de la región transmembrana, y/o toda o parte de la región intracelular, incluyendo el codón de terminación. Se utiliza una mezcla de oligonucleótidos aguas arriba y aguas abajo en la amplificación por PCR. Las condiciones se optimizan para cada par de cebadores concreto según los procedimientos normalizados. El producto de la PCR puede ser analizado mediante métodos conocidos en la técnica para el ADNc que tiene el tamaño correcto, correspondiente a la secuencia entre los cebadores. Entre los métodos adecuados se incluye, por ejemplo, la electroforesis.

Alternativamente, la región codificadora puede ser amplificada en dos o más fragmentos solapantes. Los fragmentos solapantes son diseñados para que incluyan un sitio de restricción que permita el ensamblaje del ADNc intacto de los fragmentos.

El ADN que codifica los receptores flk-2 también puede ser replicado en una amplia variedad de vectores de clonación en una amplia variedad de células huésped. La célula huésped puede ser procariótica o eucariótica.

El vector en el cual se empalma el ADN puede comprender segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético. Entre algunos de los vectores de clonación procarióticos adecuados se incluyen plásmidos de *E. coli* tales como *colE1*, *pCR1*, *pBR322*, *pMB9*, *pUC*, *pKSM*, y *RP4*. Entre los vectores procarióticos también se incluyen derivados de ADN de fagos tales como *M13* y otros fagos de ADN de hebra sencilla filamentosos.

Expresión y Aislamiento de Receptores

Los ADN que codifican los receptores de la invención son insertados en un vector de expresión adecuado y expresados en un huésped procariótico o eucariótico adecuado. Los vectores para expresar proteínas en bacterias, especialmente *E. coli* son conocidos. Entre tales vectores se incluyen los vectores PATH descritos por Dieckmann y Tzagoloff en J. Biol. Chem. 260, 1513-1520 (1985). Estos vectores contienen secuencias de ADN que codifican la antranilato sintetasa (TrpE) seguidas de un poliligador en el extremo carboxi. Otros sistemas vectores de expresión se basan en

la beta-galactosidasa (pEX); lambda P_L; la proteína de unión a maltosa (pMAL); y la glutatión S-transferasa (pGST) - ver Gene 67, 31 (1988) y Peptide Research 3, 167 (1990).

Se encuentran disponibles vectores útiles en levaduras. Un ejemplo adecuado es el plásmido de 2 μ .

Los vectores adecuados para su uso en células de mamífero también son conocidos. Entre tales vectores se incluyen derivados bien conocidos de SV-40, adenovirus, secuencias de ADN derivadas de retrovirus y vectores lanzadera derivados de una combinación de vectores de mamíferos funcionales, tales como los descritos antes, y plásmidos funcionales y ADN de fagos.

Se conocen en la técnica vectores de expresión eucarióticos adicionales (v.g., Southern y P. Berg, J. Mol. Appl. Genet., 327-341 (1982); S. Subramani y col. Mol. Cell. Biol. 1 854-864 (1981); R.J. Kaufmann y P.A. Sharp, "Amplification And Expression Of Sequences Cotransfected with A Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene," J. Mol. Biol. 159, 601-621 (1982); R.J. Kaufmann y P.A. Sharp. Mol. Cell. Biol. 159, 601-664 (1982); S.I. Scallan y col., "Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Ovary Cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4654-4659 (1983); G. Urlaub y L.A. Chasing, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220 (1980).

Los vectores de expresión útiles en la presente invención contienen al menos una secuencia de control de la expresión que está conectada operativamente a la secuencia de ADN o al fragmento que va a ser expresado. La secuencia de control es insertada en el vector con el fin de controlar y regular la expresión de la secuencia de ADN clonada. Los ejemplos de las secuencias de control de la expresión útiles son el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *tac*, el sistema *trc*, el promotor principal y las regiones promotoras del fago lambda, la región de control de la proteína de la envuelta fd, los promotores glicolíticos de la levadura, v.g., el promotor de la 3-fosfogliceratoquinasa, los promotores de la fosfatasa ácida de la levadura, v.g., Pho5, los promotores de los factores de emparejamiento alfa de la levadura, y los promotores derivados del poliovirus, adenovirus, retrovirus, y virus de simios, v.g., los promotores temprano y tardío de SV40, y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes de células procarióticas o eucarióticas y sus virus o combinaciones de los mismos.

Los vectores que contienen el ADN que codifica el receptor y las señales de control se insertan en una célula huésped para la expresión del receptor. Entre algunas células huésped de expresión útiles se incluyen células procarióticas y eucarióticas bien conocidas. Entre algunos huéspedes procarióticos adecuados se incluyen, por ejemplo, *E. coli* tal como *E. coli* SG-936, *E. coli* HB 101, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* X2282, *E. coli* DHI, *E. coli* MRC1, *Pseudomonas*, *Bacillus*, tal como *Bacillus subtilis*, y *Streptomyces*. Entre las células eucarióticas adecuadas se incluyen levaduras y otros hongos, células de insectos, de animales, tales como células COS y células CHO, células humanas y células vegetales en cultivo de tejidos.

Tras la expresión en una célula huésped mantenida en un medio adecuado, se pueden aislar los receptores flk-2 del medio, y purificarlos mediante métodos conocidos en la técnica. Si los receptores flk-2 no son secretados al medio de cultivo, las células huésped son lisadas antes del aislamiento y la purificación.

Células que Expresan los Receptores flk-2 para su Uso como Antígenos

Otras fuentes de receptores flk-2 para preparar los anticuerpos de la invención son los receptores flk-2 unidos a la superficie de células que expresan el receptor flk-2. Las células a las cuales se unen los receptores flk-2 pueden ser una célula que exprese naturalmente el receptor, tal como una célula madre hematopoyética. Alternativamente, la célula a la cual se une el receptor completo o truncado puede ser una célula en la cual se ha transfectado el ADN que codifica el receptor, tal como las células 3T3.

Las fuentes preferidas de células madre de mamíferos que expresan los receptores flk-2 para su uso como antígenos para preparar anticuerpos anti-flk-2 se incluyen médula ósea y sangre periférica o de cordón umbilical de adulto. Las células madre pueden ser aisladas de médula ósea o de sangre según los métodos conocidos en la técnica.

Preparación de Anticuerpos

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los anticuerpos pueden ser modificados adicionalmente mediante métodos conocidos en la técnica, como se ha comentado antes.

Los anticuerpos son preferiblemente monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos mediante métodos conocidos en la técnica. Entre estos métodos se incluyen el método inmunológico descrito por Kohler y Milstein en Nature 256, 495-497 (1975) y Campbell en "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas" en Burdon y col., Eds. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volumen 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985); así como mediante métodos de recombinación de ADN descritos por Huse y col. en Science 246, 1275-1281 (1989).

Aislamiento de Población de Células Madre que Expresan el Receptor FLK-2

Se proporciona una fuente de células madre hematopoyéticas. La fuente será normalmente una mezcla de células hematopoyéticas que comprenda la población deseada de células madre que expresen el receptor flk-2 así como células más maduras que no expresen el receptor flk-2. Entre las fuentes fetales de células madre hematopoyéticas se incluyen hígado, bazo o timo. Entre las fuentes adultas adecuadas de células madre hematopoyéticas se incluyen médula ósea, sangre (periférica o de cordón umbilical) o células de cerebro. La fuente preferida es la médula ósea de adulto humano.

Las células madre hematopoyéticas adecuadas pueden ser cosechadas de un donante mamífero adecuado mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la médula ósea puede ser obtenida de un paciente humano que experimente transplante de médula ósea autólogo. Alternativamente, la médula ósea puede ser obtenida de un donante de médula ósea adecuado que participa en un transplante alogénico.

La fuente de células madre, tal como células de sangre o de médula ósea, se expone a un anticuerpo que se une al receptor flk-2, tal como un anticuerpo de la presente invención, preferiblemente el anticuerpo monoclonal 19A o el anticuerpo monoclonal 6J11.

Las células que expresan el receptor flk-2, es decir la población de células flk-2+, se unen al anticuerpo anti-flk-2. Las células unidas a los anticuerpos son separadas opcionalmente de las células no unidas mediante métodos conocidos en la técnica, y después son aisladas libres del anticuerpo. Por ejemplo, las células pueden ser separadas de los anticuerpos mediante tratamiento con una proteasa, tal como quimotripsina.

En una realización, se ancla un anticuerpo anti-flk-2 de la invención a un soporte sólido. Entre algunos soportes sólidos adecuados se incluyen microcelulosa, cuentas de agarosa, cuentas de poliestireno, membranas de fibra hueca, y placas de petri de plástico. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser unido covalentemente a macrocuentas Pharmacia Sepharose 6MB. Las condiciones exactas y la duración de la incubación para los anticuerpos unidos a una fase sólida con la suspensión de células de médula dependerá de diversos factores específicos para el sistema empleado, como es bien sabido en la técnica.

Las células que se unen al anticuerpo son separadas de la suspensión celular separando físicamente el soporte sólido de la suspensión celular. Por ejemplo, las células no unidas pueden ser eluidas o lavadas con tampón fisiológico tras dejar un tiempo suficiente para que el soporte sólido se una a las células madre.

Las células unidas se separan de la fase sólida mediante cualquier método apropiado, dependiendo principalmente de la fase sólida y del anticuerpo. Por ejemplo, las células unidas se pueden hacer eluir de la placa de petri de plástico mediante agitación vigorosa. Alternativamente, las células unidas se pueden hacer eluir "realizando muescas" enzimáticamente o digiriendo una secuencia "espaciadora" sensible a una enzima entre la fase sólida y el anticuerpo. Las secuencias espaciadoras adecuadas unidas a cuentas de agarosa son asequibles comercialmente, por ejemplo, de Pharmacia.

La fracción de células enriquecida, eluída puede ser lavada después con un tampón mediante centrifugación y conservado en un estado viable a bajas temperaturas para su posterior uso según la tecnología convencional. Las células también pueden ser utilizadas inmediatamente, por ejemplo, siendo infundidas intravenosamente en un receptor de transplante.

En una variación particularmente preferida del método descrito antes, la sangre es retirada directamente del sistema circulatorio de un donante. La sangre es percolada continuamente a través de una columna que contiene el anticuerpo monoclonal unido a la fase sólida para separar las células madre. La sangre con las células madre agotadas se hace volver inmediatamente al sistema circulatorio del donante utilizando métodos bien conocidos en la técnica, tales como la hemaféresis. La sangre es tratada de este modo hasta que se une un número suficiente de células madre a la columna. Este método permite cosechar células madre de la sangre periférica raras de un volumen muy grande de sangre, ahorrando al donante el gasto y el dolor de cosechar médula ósea y los riesgos asociados con la anestesia, la analgesia, la transfusión de sangre, y la infección.

Las suspensiones de células madre producidas mediante los métodos descritos antes constan esencialmente de poblaciones de células que expresan el receptor flk-2 (flk-2+). Tales suspensiones de células están sustancialmente libres de células linfoides y mieloides maduras.

También se conocen otros métodos para aislar poblaciones purificadas de anticuerpos flk-2+. Entre tales métodos se incluyen la separación magnética con cuentas magnéticas recubiertas de anticuerpo, la cromatografía de afinidad, los agentes citotóxicos, tales como el complemento, conjugado con el anticuerpo, y la inmunopurificación ("panning") con un anticuerpo anclado a una matriz sólida.

Protocolo Separador de Células Activadas con Fluorescencia (FACS) General

En una realización preferida, se une un anticuerpo marcado de la invención a células flk-2+, y las células marcadas se separan mediante un separador de células mecánico que detecta la presencia de la marca. El separador de

células mecánico preferido es el separador de células activadas con fluorescencia (FACS). Las máquinas de FACS son asequibles comercialmente. Generalmente, para este procedimiento es adecuado el siguiente protocolo de FACS:

5 Se esteriliza un separador Coulter Epics Elite haciendo pasar etanol al 70% a través de los sistemas. Los conductos se limpian con chorro de agua destilada estéril.

10 Las células se incuban con un anticuerpo primario, tal como 19A o 6J11, se diluyen en solución salina equilibrada de Hank suplementada con serralbúmina bovina al 1% (HB) durante 60 minutos sobre hielo. Las células se lavan con HB y se incuban con un anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante 30 minutos sobre hielo. La marca secundaria se une al anticuerpo primario. Por ejemplo, en el caso de 19A, un anticuerpo secundario adecuado es FITC-anti-rata de cabra. En el caso de 6J11, un anticuerpo secundario adecuado es FITC anti-ratón de cabra. Los parámetros separadores, tales como la fluorescencia de la línea base, son determinados con un anticuerpo primario irrelevante. La concentración celular final se ajusta normalmente a un millón de células por ml.

15 Mientras las células están siendo marcadas, se determina una matriz de separación utilizando cuentas fluorescentes como medio para alinear el aparato.

20 Una vez que se determinan los parámetros apropiados, las células se separan y se recogen en tubos estériles conteniendo medio suplementado con suero bovino fetal y antibiótico (normalmente penicilina, estreptomicina y/o gentamicina. Tras la separación, las células son re-analizadas sobre el FACS para determinar la pureza de la separación.

Citometría de Flujo

25 Otro método para aislar semejantes poblaciones de células flk-2+ es la citometría de flujo, ver, por ejemplo, Loken y col., Solicitud de Patente Europea 317.156. Las células obtenidas pueden ser analizadas, y en general utilizadas, mediante prendimiento en mamíferos gotados por radiación mediante métodos conocidos en la técnica para reconstituir el sistema hematopoyético del mamífero como se describe más abajo; ver, por ejemplo, Jordan y col., Cell 61, 953-963 (1990).

Población de Células madre Pre-purificadas

30 Antes de tratar las poblaciones de células hematopoyéticas brutas con anticuerpos de la invención, las células son preferiblemente pre-purificadas mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas humanas pueden ser purificadas por medio del anticuerpo monoclonal anti-My-10 descrito por Civin en la patente de los Estados Unidos 5.130.144. La línea celular de hibridoma que expresa el anticuerpo monoclonal anti-My es asequible de la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA. El anticuerpo monoclonal anti-My-10 se une al antígeno CD34. Las poblaciones de células que constan esencialmente de células que expresan CD34 son referidas como poblaciones de células madre CD34+. Entre algunas fuentes adicionales de anticuerpos capaces de seleccionar células CD34+ se incluyen AMAC, Westbrook, Maine; Coulter, Hialeah, Florida; y Becton Dickinson, Mountain View, California. Las células CD34+ también pueden ser aisladas por medio de anticuerpos comparables, que pueden ser producidos mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos por Civin en la patente de los Estados Unidos 5.130.144.

45 La población CD34+ de células madre hematopoyéticas humanas descrita antes es purificada preferiblemente adicionalmente por medio del anticuerpo Thy-1 y/o el panel de anticuerpos Lin mediante métodos conocidos en la técnica; ver Tsukamoto y col. Patente de los Estados Unidos 5.061.620. La población de células preferida utilizada para preparar la población de células madre flk-2+ con los anticuerpos de la invención es, por lo tanto preferiblemente CD34+, más preferiblemente CD34+Lin-, y más preferiblemente CD34+Lin-Thy-1+. Tales poblaciones de células son purificadas preferiblemente adicionalmente de manera que sean HLA+ de Clase II por medio de anticuerpos contra HLA de Clase II (incluyendo su epítipo DR conservado reconocido por un anticuerpo monoclonal denominado JI-43).

Utilidad

55 Las poblaciones de células flk-2+ de la invención pueden ser utilizadas para restaurar las células de los sistemas eritroide, mieloide, o linfoide en un mamífero que haya perdido la capacidad de producir semejantes células como resultado, por ejemplo, de tratamiento con radiación. Entre tales mamíferos adecuados se incluyen, por ejemplo, ratones, ratas, conejos, y humanos. Preferiblemente, las poblaciones de células flk-2+ se utilizan para restaurar dos de los sistemas, y más preferiblemente se utilizan para restaurar los tres sistemas.

60 Por consiguiente, las poblaciones de células madre flk-2+ de la invención pueden ser utilizadas en métodos terapéuticos tales como el trasplante de células madre así como otros que son fácilmente evidentes para los expertos normales en la técnica. Por ejemplo, tales poblaciones celulares pueden ser administradas intravenosamente a un paciente que requiera un trasplante de médula ósea, tal como, por ejemplo, mamíferos agotados por la radiación, en una cantidad suficiente para reconstituir el sistema hematopoyético y/o inmunitario del paciente, o una porción del sistema hematopoyético e inmunitario del paciente.

El número de células en la población de células madre flk-2+ suficiente para reconstituir el sistema hematopoyético y/o inmunitario del paciente puede ser fácilmente determinado por los expertos en la técnica. Este número dependerá de la condición exacta que esté siendo tratada por la terapia así como detalles relevantes del mamífero, tales como la edad, el tamaño, la salud, etc. En general, es adecuada una cantidad de células madre flk-2+ que contenga aproximadamente el mismo número de células madre encontradas en medio litro a un litro de médula aspirada.

Además de los usos terapéuticos descritos antes, la población de células flk-2+ puede ser utilizada como sustancia de partida para producir otras sustancias valiosas. Por ejemplo, las células pueden ser utilizadas como una fuente de receptores flk-2+ o de ADN que codifica los receptores, o como antígeno para elaborar anticuerpos monoclonales y policlonales que reconozcan y se unan al receptor flk-2 u otros antígenos sobre la superficie de las células flk-2+.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser utilizados para aislar y purificar receptores flk-2 solubles así como células madre hematopoyéticas flk-2+, como se ha descrito antes. Además, también se pueden utilizar anticuerpos como diagnóstico para controlar el nivel de células madre flk-2+ o de anticuerpos contra el receptor flk-2 en muestras biológicas. Entre algunos ejemplos de muestras biológicas se incluyen fluidos corporales, tales como médula ósea o sangre. Semejante uso diagnóstico implica, por ejemplo, el marcaje de los anticuerpos y la realización de inmunoanálisis normalizados, tales como radioinmunoanálisis, como es bien sabido en la técnica.

Los anticuerpos también pueden ser utilizados para detectar la presencia de células que contienen flk-2, tales como las células tumorales, *in vitro* o para formar imágenes de tales células *in vivo*. Entre las células tumorales adecuadas se incluyen las células de leucemia, tales como, por ejemplo, leucemias mielógenas agudas y leucemia linfocítica aguda. Los anticuerpos están marcados y son detectados o forman imágenes mediante métodos conocidos en la técnica.

Los anticuerpos también pueden ser utilizados *in vitro* o *in vivo* para imitar, es decir, actuar como agonistas de, los factores de crecimiento del receptor flk-2 debido a la capacidad de los anticuerpos para unirse al receptor flk-2. Tales agonistas son deseables para ocasionar el crecimiento de las células que expresan el receptor flk-2, tales como las células madre hematopoyéticas. Tales agonistas también son deseables para evitar el crecimiento de células que expresan o sobreexpresan el receptor flk-2, tales como células tumorales, especialmente células tumorales del sistema hematopoyético, es decir, las células de leucemia mencionadas antes, ocasionando la diferenciación terminal. Por ejemplo, algunos de los anticuerpos de la invención son capaces de estimular los factores de crecimiento del receptor flk-2 estimulando las células que contienen el receptor flk-2 para que proliferen y/o se diferencien.

Alternativamente, los anticuerpos de la invención pueden ser utilizados como antagonistas de los factores de crecimiento del receptor flk-2. Tales antagonistas son deseables para impedir el crecimiento de células que expresan o sobreexpresan el receptor flk-2, tales como las células tumorales, especialmente las células tumorales del sistema hematopoyético, es decir, las células leucémicas. Por ejemplo, la unión de anticuerpos al receptor flk-2 puede reducir o evitar la proliferación y/o la diferenciación de las células flk-2+ evitando la unión del factor de crecimiento del factor flk-2 a las células. La unión de los anticuerpos al receptor flk-2 sobre las células flk-2+ puede ser también tóxica para las células, por ejemplo, por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Si los anticuerpos no son tóxicos, o son insuficientemente tóxicos, por sí mismos, los anticuerpos se pueden volver tóxicos, o se pueden volver más tóxicos, mediante la administración de los anticuerpos a un mamífero combinado con una o más citotoxinas. Los anticuerpos y las citotoxinas pueden ser administrados a un mamífero, tal como un mamífero descrito antes, por separado, o los anticuerpos pueden ser anclados a las citotoxinas, por ejemplo, mediante conjugación, como es sabido en la técnica. Entre algunas toxinas adecuadas se incluyen, por ejemplo, reicina y gelonina.

Las poblaciones de células madre flk-2+ de la invención pueden ser utilizadas en composiciones terapéuticas, opcionalmente en presencia de excipientes farmacéuticamente aceptables, como resultará fácilmente evidente para los expertos en la técnica, por ejemplo, intravenosamente, a un mamífero que requiera un agonista o antagonista de los factores de crecimiento de flk-2. Entre los ejemplos de los mamíferos que requieren un agonista o antagonista de los factores de crecimiento de flk-2 se incluyen los mamíferos que tienen tumores. Los anticuerpos de la invención son administrados en una cantidad suficiente para que los anticuerpos actúen como agonistas o antagonistas de los factores de crecimiento de flk-2, por ejemplo, inhibiendo el crecimiento de tumores.

Ejemplos

Ejemplo 1

Plásmidos de expresión Flag-flk-2

Se sintetiza un fragmento de ADN sintético (fragmento 1) utilizando oligonucleótidos complementarios BP1 y BP2 (ver más abajo las SEC. ID. NUMS. 1 y 2). El fragmento 1 codifica los siguientes rasgos en orden 5' a 3': Sitio de restricción SalI, región no traducida 5' de 22 pares de bases (pb) que contiene un sitio de unión al ribosoma eucariótico, un codón de iniciación ATG, una secuencia señal preprotripsinógeno, una región codificadora del péptido FLAG (DYKDDDDKI) y un sitio de restricción BglII.

ES 2 269 266 T3

Se obtiene un fragmento de ADNc (fragmento 2) que codifica de la Asn 27 a la Ser 544 de flk-2 murino mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores diseñados para introducir un sitio BglII en marco en el extremo 5' (oligonucleótido BP5, ver más abajo la SEC ID NUM. 3) y un codón de terminación seguido de un sitio NotI en el extremo 3' (oligonucleótido BP10, ver más abajo la SEC ID NUM. 4). El molde para la reacción de PCR es el ADN de flk-2 completo (Mathews y col., Cell, 65, 1143-1152 (1991)). El fragmento 2 es digerido extensamente con las enzimas de restricción BglII y NotI antes de la ligadura.

Para ensamblar el gen Flag-flk-2 completo, se ligan los Fragmentos 1 y 2 en una ligadura tripartita en el plásmido pSPORT digerido con Sall y NotI (Gibco/BRL, Grand Island, NY) para dar el plásmido pFlag-flk-2.

Preferiblemente, la proteína Flag-flk-2 es anclada en cualquier extremo a la porción Fc de una inmunoglobulina (Ig). La Ig es anclada preferiblemente a la porción flk-2 de la proteína Flag-flk-2. Para ensamblar el constructo pFlag-flk-2, las secuencias que codifican el dominio CH¹ de la inmunoglobulina humana G (IgG¹) se colocan aguas abajo de la región codificadora de flk-2 en el plásmido pFlag-flk-2 según el método descrito por Zettlemeissl y col., DNA and Cell Biology 9: 347-352 (1990).

Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas para construir el gen Flag-flk-2 se dan más abajo:

Oligonucleótido BP1:

5' - AATTCGTCGACTTTCTGTCACCATGAGTGCACCTTCTGATCCTAGCCCTTGTGGGAGCTGCTG
TTGCTGACTACAAAGATGATGACAAGATCTA-3'

Oligonucleótido BP2:

5'-AGCTTAGATCTTGTTCATCATCATCTTTGTAGTCAGCAACAGCAGCTCCCACAAGGGCTAGGAT
CAGAAAGTGCATCATGCTGACAGAAAGTGCACG-3'

Oligonucleótido BP5:

5'-TGAGAAGATCTCAAACCAAGACCTGCCTGT-3'

Oligonucleótido BP10:

5'-CCAATGGCGGCCGCTCAGGAGATGTTGTCTTGGA-3'

(Ver las SEC ID NUMS. 1-4, respectivamente).

Ejemplo 2

Expresión del constructo Flag-flk-2

Para la expresión transitoria del constructo Flag-flk-2, se subclona el fragmento Sall a NotI de pFlag-flk-2 en el plásmido pSVSPORT (Gibco/BRL) para dar el plásmido pSVFlag-flk-2. Para la expresión de la proteína Flag-flk-2, se transfecta pSVFlag-flk-2 en células de mono COS utilizando el método del DEAE-dextrano.

Para la expresión estable en células eucarióticas, se clona el fragmento Sall-NotI de pFlag-flk-2 en los sitios EcoRV y NotI del plásmido pcDNA I/Neo (Invitrogen Co., San Diego, CA). El extremo esconzado 3' Sall de pFlag-flk-2 es rellenado con el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I y una mezcla de desoxirribonucleótidos para hacer compatible el sitio con el sitio EcoRV del vector. El constructo resultante es introducido en células de mamífero cultivadas utilizando el método o bien de la Lipofectina (Gibco/BRL) o bien del fosfato de calcio.

Para la expresión en células de insectos, se subclona el fragmento Sall a HindIII (del polilicador pSPORT) de pFlag-flk-2 en los sitios BamHI-HindIII del vector de transferencia de baculovirus pBlueBac III (Invitrogen). El sitio BamHI del vector y el sitio Sall del inserto se vuelven de extremos romos con Klenow (ver arriba). La producción del virus recombinante y la infección de las células de insecto Sf9 se realiza con las directrices de los fabricantes (Invitrogen).

La expresión de la proteína Flag-flk-2 se detecta mediante transferencia Western de medios acondicionados (células de mamífero) o productos lisados celulares (células de insecto) separados en SDS-PAGE con el anticuerpo monoclonal (mAb) anti-Flag M1 (International Biotechnology, Inc. (IBI), New Haven, CT).

Ejemplo 3

Purificación de Flag-flk-2 recombinante

- 5 La purificación por afinidad de la proteína Flag-flk-2 a partir de medios acondicionados COS o productos de la lisis de células de insecto se realizó con las directrices de los fabricantes utilizando el anticuerpo monoclonal anti-Flag M1 sobre agarosa (International Biotechnology, Inc., New Haven, CT.).

10 Flag-flk-2 derivada de baculovirus fue purificada de las células SF-9 cosechadas 48-72 horas después de la infección. Las células fueron recogidas mediante centrifugación a 3500 x g durante 10 minutos a 4°C y lavadas con PBS enfriado con hielo. El sedimento celular fue resuspendido y homogeneizado sobre hielo en Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, sacarosa 300 mM, CaCl₂ 2 mM, Tween 80 al 0,5%, 10 g/ml de leupeptina, 1 g/ml de pepstatina, y PMSF 1 mM. El producto de la lisis celular fue centrifugado a 100.000 x g durante 60 minutos a 4°C y la fracción sobrenadante fue recogida. El producto de la lisis celular aclarado se cargó en una columna de agarosa anti-Flag M1
15 (IBI) previamente equilibrada con Tampón A (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, NaCl 0,5 M, CaCl₂ 2 mM, Tween 80 al 0,05%). Después de hacer pasar la muestra 5 veces sobre la resina M1, la columna se lavó con 60 ml de Tampón A y se hizo eluir con 30 ml de Tampón B (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, NaCl 0,5 M, EDTA 10 mM, Tween 80 al 0,05%). Las fracciones que contenían el receptor flk-2 fueron reunidas, sometidas a diálisis en PBS, y congeladas a -70°C. La proteína fue cuantificada mediante el método BCA (Pierce), utilizando seralbúmina bovina como patrón.

Ejemplo 4A

Preparación de los anticuerpos monoclonales anti-flk-2 de ratón 2A13 (IgG2a) y 23H (IgG1)

25 Se prepararon anticuerpos monoclonales utilizando dos protocolos. En el primero, se inmunizaron ratas Lewis hembra (Charles River) con Flag-flk-2 (obtenido de medios acondicionados de células COS según el Ejemplo 3) unido al anticuerpo monoclonal anti-Flag, M1, acoplado a agarosa. El día 0, las ratas recibieron 100 µl de complejo de resina-proteína en coadyuvante incompleto de Freund (IFA) por vía subcutánea. Las ratas recibieron inyecciones posteriores del complejo el día 26 (más coadyuvante Ribi) y el día 62 (sin coadyuvante). En diferentes momentos,
30 los animales fueron desangrados para determinar el título del anticuerpo. Las ratas recibieron dos inmunizaciones subcutáneas adicionales los días 91 y 105 de Flag-flk-2 derivado de baculovirus purificado (10 y 40 g/inyección, respectivamente; ambos con coadyuvante Ribi). Cuatro días después de la inoculación final, una rata fue sacrificada y el bazo fue separado asépticamente para el aislamiento de las células B cebadas.

35 En el segundo protocolo, se inmunizaron ratas Lewis macho (Charles River) con Flag-flk-2 derivado de baculovirus purificado por ruta intraperitoneal el día 0 (25 g en coadyuvante completo de Freund); el día 7 (25 g en coadyuvante Ribi). Se obtuvieron muestras de sangre en diferentes momentos para determinar el título anti-flk-2. Cuatro días después de la inyección final, se sacrificó un animal y se separó el bazo para su posterior fusión.

40 Los esplenocitos obtenidos mediante cualquiera de los protocolos fueron fusionados con la línea celular de mieloma murino NS1 utilizando polietilenglicol (PEG 3350, Baker) como se ha descrito previamente; ver Goldstein y col., Anticancer Research 10, 491 (1990). Las células fueron resuspendidas en medio HT (hipoxantina/timidina; Sigma) que constaba de medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal inactivado con calor al 20% (Hyclone), L-glutamina (2 mM), suplemento de HT (Flow Labs), y antibióticos y se cultivaron en
45 placa a una concentración de 1,6 x 10⁵ células por pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos. El día uno, el medio fue remplazado por el medio anterior conteniendo HAT (en lugar de HT). Al cabo de 10-14 días, eran visibles colonias macroscópicas y estaba listas para el rastreo inicial.

Ejemplo 4B

50 *Preparación de los Anticuerpos Monoclonales Anti-flk-2 Humano 19A (IgG2B) y 6J11 (IgG1)*

Se generó el anticuerpo monoclonal de rata 19A hiperinmunizando ratas Lewis hembra (Charles River Laboratories) con una preparación purificada de Flag-flk-2 humano soluble expresado en células COS-7 (Ejemplos 2 y 3). El anticuerpo monoclonal murino 6J11 fue generado hiperinmunizando ratones Balb/C hembra (Charles River Laboratories) como antes. Todas las inyecciones fueron administradas intraperitonealmente utilizando el siguiente programa:

Para 19A, las ratas inmunizadas previamente con Flag-flk-2 murino fueron inyectadas el día 0 (10 µg en coadyuvante Ribi), el día 7 (10 µg son Ribi) y el día 14 (15 µg más 20 µg de muteína IL-6). Para 6J11, los ratones previamente
60 inmunizados con la línea celular leucémica que expresaba la proteína flk-2 humana ML-1, fueron inyectados el día 0 (10 µg más coadyuvante Ribi), el día 7 (10 µg más 20 µg de IL-6) y el día 14 ((10 µg más 20 µg de IL-6). (Se obtuvieron resultados comparables con las otras líneas celulares leucémicas que expresaban la proteína flk-2 humana, tales como HL-60 (ATCC) y KG-1A (ATCC). Antes de la fusión, los animales fueron desangrados y los sueros fueron rastreados mediante ELISA en cuanto a la actividad de unión a flk-2 humano purificado.

65 Tres o cuatro días después de la inyección final, los animales fueron sacrificados y los bazos fueron separados asépticamente. Los esplenocitos fueron obtenidos mediante desorganización mecánica, lavados en medio libre de suero estéril (normalmente medio de Eagle modificado de Dulbecco) y mezclados con NS1, una línea celular de

ES 2 269 266 T3

mieloma murino. La fusión fue completada mediante la adición gota a gota de un ml de polietilenglicol (50% en medio libre de suero; PEG 3600; JT Baker) a lo largo de 2 minutos seguido de dilución con 10 ml de medio libre de suero. Las células fueron centrifugadas (200 x g durante 5 minutos), resuspendidas a $1-5 \times 10^5$ células por ml de medio HT (medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM, antibióticos y medios suplementados con 1xHT y divididas en alícuotas 100 μ l en cada pocillo de las diversas placas para el cultivo de tejidos de 96 pocillos. Al cabo de 24 horas a 37°C, se añadieron 100 μ l de medio HAT (medio HT más 1xHAT (hipoxantina/aminopterina/timidina); Sigma) con fines selectivos.

Se observaron colonias a los 10-20 días de cultivo. Los sobrenadantes de hibridoma fueron rastreados inicialmente mediante ELISA. En este análisis, se recubrieron 25 ng de proteína flk-2 humana purificada, en tampón carbonato, pH 9,6 (durante la noche a 4°C) sobre placas de microtitulación de 96 pocillos. Las placas fueron bloqueadas con solución salina equilibrada de Hank conteniendo BSA al 1% durante 60 minutos a 37°C. Tras un lavado extenso, se añadió un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano picante (Ig anti-ratón de cabra para 6J11 o Ig anti-rata de cabra para 19A) durante 60 minutos a 37°C. La unión positiva fue determinada utilizando el cromógeno TMB y las placas fueron leídas en un lector de ELISA.

Ejemplo 5

Protocolo de ELISA

Se recubrió Flag-flk-2 derivado de baculovirus purificado sobre placas de microtitulación de 96 pocillos (50 ng/pocillo) utilizando tampón carbonato de sodio 50 mM, pH 9,6. Tras incubar durante la noche a 4°C, las placas fueron lavadas dos veces en agua destilada y bloqueadas con suero de ternera recién nacida al 10% (Hyclone) en PBS (NB10) durante 30 minutos a 37°C. Los sobrenadantes acondicionados de las fusiones fueron añadidos a los pocillos aspirados e incubados durante 2 horas a 37°C. Los pocillos fueron lavados tres veces en agua destilada y sondeados con anticuerpo secundario anti-rata de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP; Tago). Tras una incubación de una hora a 37°C, los pocillos fueron lavados extensamente con agua destilada y el sustrato cromógeno (TMV; Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, Maryland) añadido. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 1N y las placas fueron leídas a 450 nm en un lector de ELISA automatizado.

Tras la clonación (ver más abajo), los anticuerpos monoclonales fueron sometidos a isotipaje utilizando un ELISA de captura. Las placas fueron recubiertas con Ig anti-rata de cabra durante la noche a 4°C. Después de bloquear, los sobrenadantes fueron añadidos durante 2 horas a 37°C, lavados y sondeados con el isotipo específico, utilizando TMB como cromógeno como se ha descrito antes.

Ejemplo 6

Protocolos de Clonación

Basándose en los resultados del ELISA se escogieron numerosas colonias de hibridoma y se ampliaron sobre placas de microtitulación de 24 pocillos. Los sobrenadantes fueron rastreados de nuevo en cuanto a la unión a Flag-flk-2 derivado de baculovirus purificado y clonados tres veces mediante dilución limitante (1 célula por pocillo). Los clones fueron analizados en cuanto a la unión de flk-2 mediante ELISA.

Ejemplo 7

Protocolos de Transferencia Western

Se hicieron crecer las siguientes líneas celulares hasta la confluencia en matraces de 75 cm²: NIH3T3 e i3T3 (células 3T3 transfectadas con mflk-2 completas). El medio fue aspirado y las células lavadas dos veces con PBS. Se añadió 1 ml de tampón de lisis (que constaba de Tris HCl 10 mM, pH 8,0, Triton X-100 al 0,2%, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, PMSF 1 mM, y 5 mg/ml de Aprotinina) a los matraces que se mantuvieron sobre hielo hasta que se observó que las células se lisaban. La sustancia adherente se separó raspando con un "Rubber Policeman" y se mantuvo sobre hielo durante una hora más. El desecho celular fue separado mediante centrifugación a 10.000 rpm en un microcentrífuga de mesa mantenida a 4°C. La concentración en proteína del producto lisado fue determinada utilizando el análisis de Biorad antes de la separación mediante SDS PAGE.

Se hicieron circular alícuotas de 5 microgramos en tampón de muestra SDS (SDS al 2%, 2-mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10%, Tris-HCl 60 mM, azul bromofenol al 0,01%, pH 6,8) sobre geles en gradiente al 10-20% (Enprotech, Natick MA) como se ha descrito (Laemli Nature 227, 680 (1970). Tras la electroforesis, las bandas fueron transferidas a una membrana Immobilon-P. Se almacenaron las transferencias a 4°C durante un máximo de dos días antes de realizar el análisis de Transferencia Western; ver Goldstein y col., Anticancer Research 10, 491 (1990). La membrana fue bloqueada con Triton X-100 al 0,1% conteniendo NB-1 durante una hora a la temperatura ambiente e incubada con medio acondicionado de hibridoma con Triton X-100 al 0,1% añadido durante una hora con balanceo. La membrana fue lavada tres veces con PBS conteniendo Triton X-100 al 0,1% e incubada durante una hora con anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-rata de cabra (1:1000; Tago, Burlingame, California). La membrana fue lavada tres veces con PBS conteniendo Triton X-100 al 0,1% e incubada durante 1 hora con anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-rata de cabra (1:1000; Tago). La membrana fue lavada tres veces y las bandas fueron desarrolladas con solución

intensificadora de membrana conteniendo TMB (Kirkegaard y Perry). Tras la aparición de las bandas, la membrana fue lavada en agua potable fría.

Ejemplo 8

Marcaje Metabólico y Análisis de Inmunoprecipitación

Las NIH-3T3 e i3T3 transfectantes para Flk-2 (i3T3) fueron sembradas en placas de 100 mm y desarrolladas hasta casi la confluencia. Las células fueron cosechadas en medio libre de metionina y cisteína (Ginco, Grand Island, NY) durante 30 minutos seguido de incubación en medio libre de metionina y cisteína conteniendo 0,2 mCi/ml de marca Tran-S³⁵ (ICN, Amersham) durante 48 horas. Las células marcadas fueron lavadas tres veces con PBS y lisadas en tampón IP (NP-40 al 0,1%, Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, desoxicolato al 0,2%, SDS al 0,1%, PMSF 1 mM, pH 7,4). Las alícuotas de 500 µl de producto lisado celular fueron inmunoprecipitadas con 5 µg de anticuerpo monoclonal purificado 23H. Los complejos inmunitarios fueron absorbidos con Ig anti-rata de cabra (Tago), acoplados a Protein A Sepharose. Los complejos inmunitarios fueron lavados varias veces en Tampón IP y solubilizados hirviendo 2 minutos en tampón de muestra para electroforesis. Las proteínas fueron resueltas sobre geles de poliacrilamida/SDS al 8% como se ha descrito. Tras la electroforesis, los geles fueron fijados en metanol al 40%/ácido acético al 7% durante una hora, lavados en Enlightening (NEN, Boston MA) durante una hora, secados y sometidos a autorradiografía a -70°C.

Ejemplo 9

Análisis FACS

Las células para el análisis se separan de los matraces en T utilizando tampón de disociación no enzimática (Sigma), se someten a recuento, y se dividen en alícuotas en tubos de 12x75 mm a una concentración final de aproximadamente un millón de células por tubo. Todas las etapas se realizan sobre hielo para evitar la internalización de los complejos de receptor-anticuerpo. Las células son sedimentadas a 1.000 rpm y resuspendidas en 100 µl de solución de anticuerpo primario: 100 µl de sobrenadante acondicionado o 5 µg por tubo de anticuerpo purificado en solución salina equilibrada de Hank conteniendo BSA al 1% (HBSS-B). Al cabo de una hora de incubación, las células son resuspendidas en 1 ml de HBSS-B, sedimentadas, y el sobrenadante descartado. Se añade a cada tubo IgG anti-rata de cabra conjugada con FITC (5 µg/tubo; Tago) durante 30-60 minutos más de incubación protegida de la luz. Las células se lavan tres veces con HBSS-B, se resuspenden en 1 ml de HBSS-B y se analizan de inmediato. De otro modo, las células se fijan con formalina tamponada neutra al 1% y se analizan en 48 horas. En algunos experimentos, se utilizó saponina para exponer los epítomos de FLK-2. Para estos estudios, se incluyó saponina al 0,1% en todas las incubaciones y lavados.

Se rastreó la unión de los anticuerpos monoclonales anti-flk-2 a hígado fetal murino derivado de células madre como sigue. Se sacrificaron ratones Balb/c preñados (preñeces extemporáneas, aproximadamente catorce días; Charles River Labs) y los fetos fueron separados. El tejido del hígado fue recogido asépticamente y desorganizado sobre hielo. La suspensión celular resultante se trató con cloruro de amonio 0,17 M para separar los glóbulos rojos de la sangre, se lavaron dos veces con HBSS-B, y se resuspendieron en HBSS-B frío a una concentración final de aproximadamente diez millones de células por ml. Se añadieron alícuotas de 100 microlitros a tubos de vidrio y se incubaron durante una hora sobre hielo con diversos anticuerpos incluyendo 2A13, 23H, AA4.1, DC101 (un anticuerpo monoclonal IgG1 de rata dirigido al receptor flk-2), e IgG de rata irrelevante (Tago). Tras lavar las células, se añadió IGG-FITC anti-rata de cabra y se incubó durante 30 minutos sobre hielo. Las células se lavaron extensamente y se analizaron como se ha descrito antes.

Las células marcadas con FITC fueron analizadas con una célula Coulter Elite utilizando el programa Multigraph. Para cada línea celular, se hizo circular un anticuerpo monoclonal de rata irrelevante de isotipo emparejado para determinar la fluorescencia de la línea base.

Ejemplo 10

Especificidad de Anticuerpos Monoclonales Murinos 2A13 y 23H

Inicialmente, los anticuerpos monoclonales fueron rastreados frente a flk-2 de ratón y humano y otras proteínas-quinasas afines incluyendo c-kit y flk-1 utilizando un ELISA. Como se puede observar en la Figura 1, ambos anticuerpos se unen a Flag-2 pero no a c-kit ni a flk-1 (US92/05401). Ningún anticuerpo monoclonal parecía unirse al receptor humano.

Ejemplo 11

Inmunoprecipitación de anticuerpos para flk-2 murino con anticuerpos monoclonales 2A13 y 23H

Los anticuerpos monoclonales 2A13 y 23H son capaces de inmunoprecipitar flk-2 murino soluble y celular radiomarcado. Cada anticuerpo inmunoprecipita Flag-flk-2 soluble en forma de una única proteína como evidencia la presencia de una única banda mediante SDS PAGE de aproximadamente 95 kD, que es el peso molecular estimado para este constructo. 23H también es capaz de inmunoprecipitar flk-2 completo a partir de la línea celular transfectada

ES 2 269 266 T3

i3T3 como evidencia la presencia de dos bandas mediante SDS PAGE de pesos moleculares aproximados de 135 kD y 155 kD, que son los pesos moleculares estimados de flk-2 celular con diferentes patrones de glicosilación.

Ejemplo 12

Estudios de Unión con Anticuerpos Monoclonales 2A13 y 23H

2A13 y 23H fueron analizados en el FACS en cuanto a su capacidad para unirse a células que expresan FLK-2. En la Figura 2 se muestran los resultados de estos estudios. 2A13 y 23H se unen ambos a i3T3 pero no a células 3T3 no transfectadas. No obstante, solamente 23H se unía a células viables intactas mientras 2A13 requería tratamiento previo con saponina (0,1%) de las células diana para la unión. Esto parece indicar que el epítipo reconocido por 2A13 es inaccesible al anticuerpo monoclonal en oposición a la disponibilidad del determinante 23H. Que estos dos anticuerpos monoclonales reconocen dos tipos distintos de epítipos fue confirmado mediante estudios en los que se utilizaba un aparato que mide las interacciones bioespecíficas en tiempo real basado en la resonancia de plasmón superficial (BIAcore, Pharmacia Biosensor AB). Como se puede observar en la Figura 3, la unión de 2A13 no interfiere en la unión subsiguiente de 23H.

Ejemplo 13

Células que Expresan los Receptores flk-2 Completos (Y-stk)

Se preparan células Y-stk mediante co-transfección de ADN que codifica el receptor flk-2 humano y la resistencia a neo en células NIH 3T3. Las células transfectadas son seleccionadas en medio conteniendo 1 mg/ml de G418. Las colonias viables, que aparecen al cabo de dos a tres semanas, son aisladas, ampliadas, y rastreadas en cuanto a la presencia de flk-2 humano utilizando el análisis de transferencia Western. Para estos estudios, se lisan las colonias transfectadas, se resuspenden en tampón de muestra SDS, y se separan mediante SDS PAGE. Las proteínas son aplicadas sobre papel de nitrocelulosa y sondeadas con IM140, un anticuerpo policlonal de conejo que fue preparado para la secuencia de aminoácidos C-terminal de flk-2. Se encontró que una colonia, denominada Y-stk, expresaba flk-2 humano y se propagó para estudios posteriores.

Ejemplo 14

Anticuerpo Monoclonal de Rata 71E (IgG2B)

Las ratas fueron hiperinmunizadas con Y-stk los días cero, 15, 30, 44, 51, y 61. El suero fue recogido en diversos momentos durante el programa de inmunización para verificar la presencia de una respuesta humoral al receptor. Cuatro días después de la inyección final (día 61), se sacrificaron dos animales y se aislaron los bazo y se trataron para la hibridación.

Los hibridomas fueron rastreados inicialmente mediante ELISA (ver Ejemplo 15 más abajo) utilizando células Y-stk no fijadas. En los posteriores análisis de rastreo se utilizaron productos lisados celulares (ver Ejemplo 16 más abajo) y el análisis FACS como se ha descrito antes para 19A4B y col. Se encontró que el hibridoma denominado 71E era positivo en estos análisis y fue clonado mediante dilución limitante. El hibridoma 71E expresa el anticuerpo monoclonal 71E.

El anticuerpo monoclonal 71E se une a flk-2 humano mediante ELISA; se une a células que expresan flk-2 humano mediante FACS; inmunoprecipita una banda difusa en la región flk-2 que corresponde a las bandas inmunoprecipitadas por el anticuerpo policlonal de conejo específico para la región C-terminal de flk-2 (Im 140); bloquea la fosforilación del receptor flk-2 humano por su ligando natural (ver Ejemplo 17 más abajo); y se une a células leucémicas que expresan flk-2 humano KG1a (ATCC) pero no a células flk-2 negativas cuando se rastrea mediante análisis FACS.

Ejemplo 15

Protocolo de ELISA

Se recubren placas de microtitulación de 96 pocillos con 1 µg/pocillo de IM 140. Las placas son lavadas y bloqueadas con solución salina equilibrada de Hanks suplementada con BSA al 1%. Después se añaden a cada pocillo de cinco a diez microgramos de producto lisado de 3T3 Y-stk o de control (ver Ejemplo 16 más abajo). Al cabo de dos horas de incubación a 37°C, las placas son lavadas y la unión es sondeada con IgG anti-rata de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante seguido de la adición del cromógeno TMB. Las placas son leídas a 450 nm.

Ejemplo 16

Preparación de Productos Lisados Celulares

Se hicieron crecer células 3T3 Y-stk o de control hasta la confluencia en placas de petri grandes. Las células fueron separadas raspando de las placas con un Rubber Policeman, recogidas por centrifugación, y resuspendidas en tampón de lisis (Tris-HCl 0,02M, pH 7,2, NaCl 50 mM, EDTA 10 mM, Triton X-100 al 1%, glicerol al 10%, 100 µg/ml de

Aprotinina, 500 µg/ml de leupeptina, 400 µg/ml de Pefabloc). Los productos lisados son verificados en cuanto al flk-2 humano mediante análisis de transferencia Western y almacenados a -70°C.

Ejemplo 17

Análisis de Fosforilación

Se hicieron crecer células 3T3 Y-stk o de control hasta una confluencia del 90% en DME-suplementado con suero de ternera al 10% y después suero privado de DME-CS al 0,5% durante 24 horas antes de la experimentación. Para los análisis de neutralización, las células fueron estimuladas con diversas concentraciones del ligando flk-2 en condiciones sin suero (DME-BSA al 0,1%) en presencia y ausencia de anticuerpo monoclonal 71E o anticuerpo de rata irrelevante durante 15 minutos a la temperatura ambiente. Los anticuerpos fueron analizados a 10 y 20 µg/ml. Para evaluar los efectos del anticuerpo sobre la activación inducida por el ligando flk-2 de su receptor análogo, el anticuerpo fue añadido o bien simultáneamente (inhibición competitiva) o bien unido previamente a células durante 15 minutos a la temperatura ambiente antes de la adición del ligando flk-2. Ver Lyman y col. *Cell*, 75, 1157-1167 (1993); *Blood* 83, 2795-2801 (1994); *Oncogene* 8, 815-822 (1993). Las células incubadas en medio sin suero en ausencia y presencia de anticuerpo servían como controles para la autofosforilación del receptor en ausencia de ligando y en presencia de anticuerpo, respectivamente.

Tras la estimulación, se lavaron las monocapas con PBS enfriado con hielo conteniendo ortovanadato de sodio 1 mM. Después las células fueron lisadas en tampón de lisis [(Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, Triton X-100 al 1%, NaCl 137 mM, glicerol al 10%, EDTA 10 mM, ortovanadato de sodio 2 mM, NaF 100 mM, pirofosfato de sodio 100 mM, Pefabloc 5 mM (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianápolis IN), 100 µg de aprotinina y 100 µg/ml de leupeptina] y se centrifugaron a 14.000 x g durante 10 minutos. La proteína fue inmunoprecipitada a partir de los productos lisados de las células transfectadas utilizando IM140 acoplado a cuentas de Proteína A Sepharose. Las cuentas fueron lavadas después una vez con Triton X-100 al 0,2%, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM (Tampón A), dos veces con Tampón A conteniendo NaCl 500 mM y dos veces con Tris-HCl, pH 8,0. Las cuentas desecadas fueron mezcladas con 30 µl en 2x tampón de carga y sometidas a SDS PAGE en geles en gradiente del 4-12%. Tras la electroforesis, las proteínas fueron aplicadas sobre filtros de nitrocelulosa para su análisis. Para detectar el receptor fosforilado, las aplicaciones fueron sondeadas con un anticuerpo monoclonal para fosfotirosina (UBI, Lake Placid, NY) y desarrolladas mediante un sistema de quimioluminiscencia intensificada (ECL, Amersham).

Reproducibilidad adicional

La invención según se reivindica es proporcionada de acuerdo con la memoria anterior y referencias y sustancias de partida fácilmente asequibles. Sin embargo, los Autores de la presente Solicitud depositaron el 24 de Agosto de 1993 en la American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA (ATCC) las líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales enumerados más abajo:

Anticuerpo monoclonal anti-flk-2 de ratón de rata 2A13 (Número de Acceso ATCC HB 11444);

Anticuerpo monoclonal anti-flk-2 de ratón de rata 23H (Número de Acceso ATCC HB 11443);

Anticuerpo monoclonal anti-flk-2 humano de rata 19A (Número de Acceso ATCC HB 11442); y

Anticuerpo monoclonal anti-flk-2 humano de ratón 6J11 (Número de Acceso ATCC HB 11445).

Anticuerpo monoclonal anti-flk-2 humano de rata 71E (Número de Acceso ATCC HB).

Estas consignas fueron realizadas bajo las cláusulas del Tratado de Budapest en el International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure y sus regulaciones (Budapest Treaty). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable durante 30 años desde la fecha de la consigna. Los organismos estarán disponibles por la ATCC en los términos del Tratado de Budapest, y sujetos a un acuerdo entre los Solicitantes y la ATCC que asegure la disponibilidad no restringida tras la promulgación de la patente de los Estados Unidos pertinente. La disponibilidad de las cepas consignadas no se debe considerar una licencia para poner en práctica la invención contraviniendo los derechos garantizados por la autoridad de cualquier gobierno conforme a sus leyes sobre patentes.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un anticuerpo *antagonista* dirigido contra flk-2 para la preparación de un medicamento para el trata-
5 miento de la leucemia.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1A

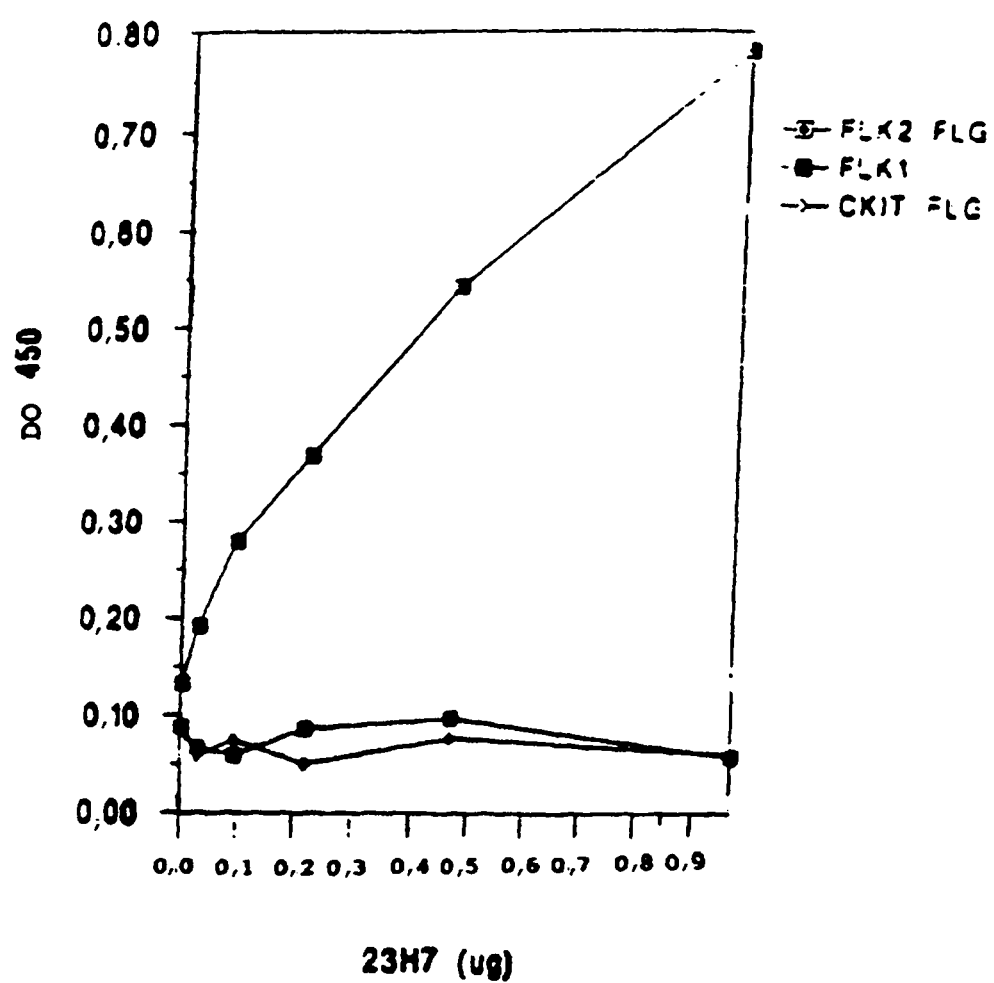


FIGURA 2B

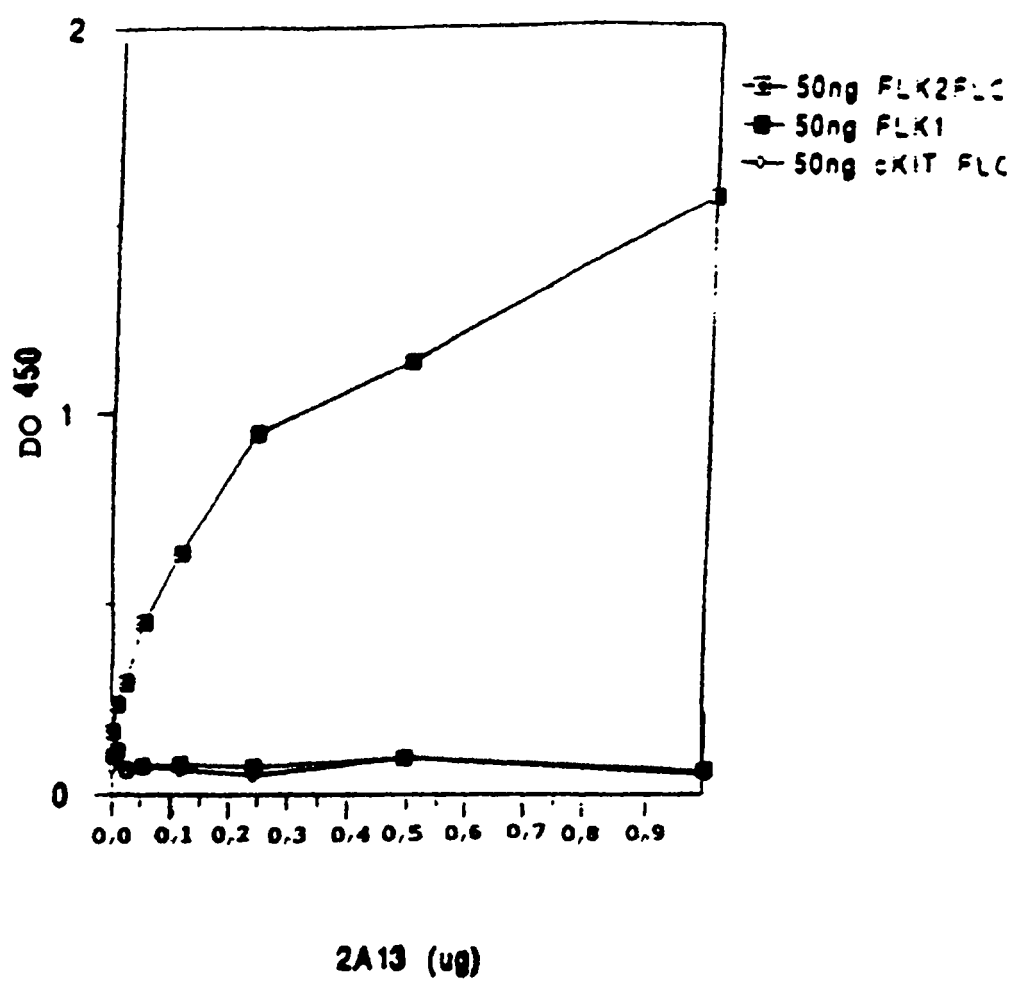


FIGURA 2

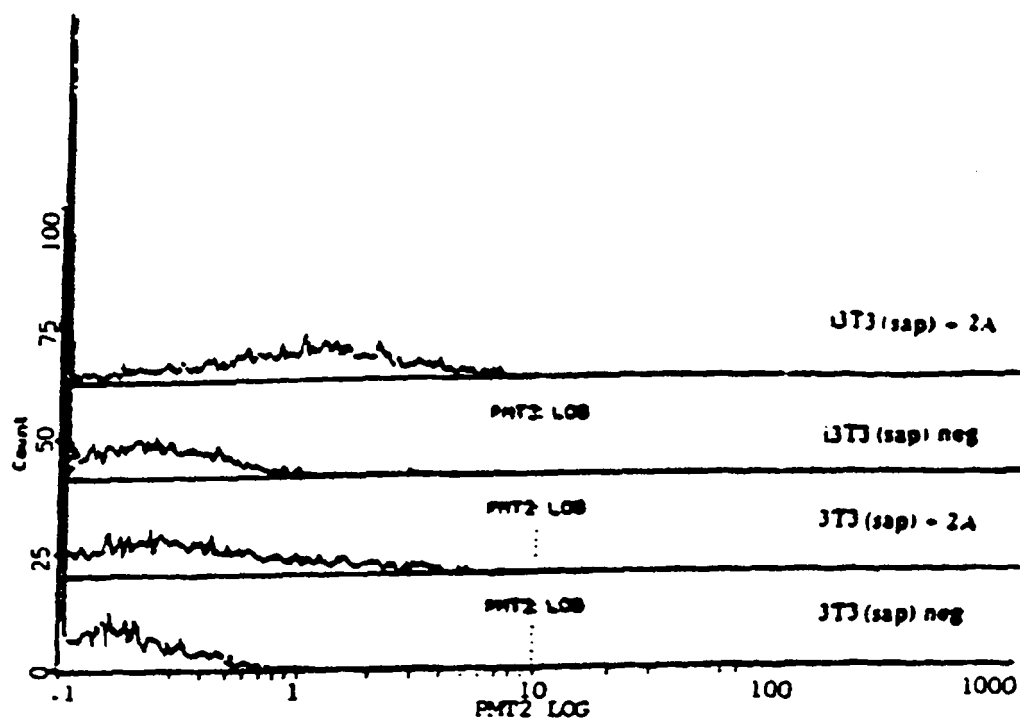
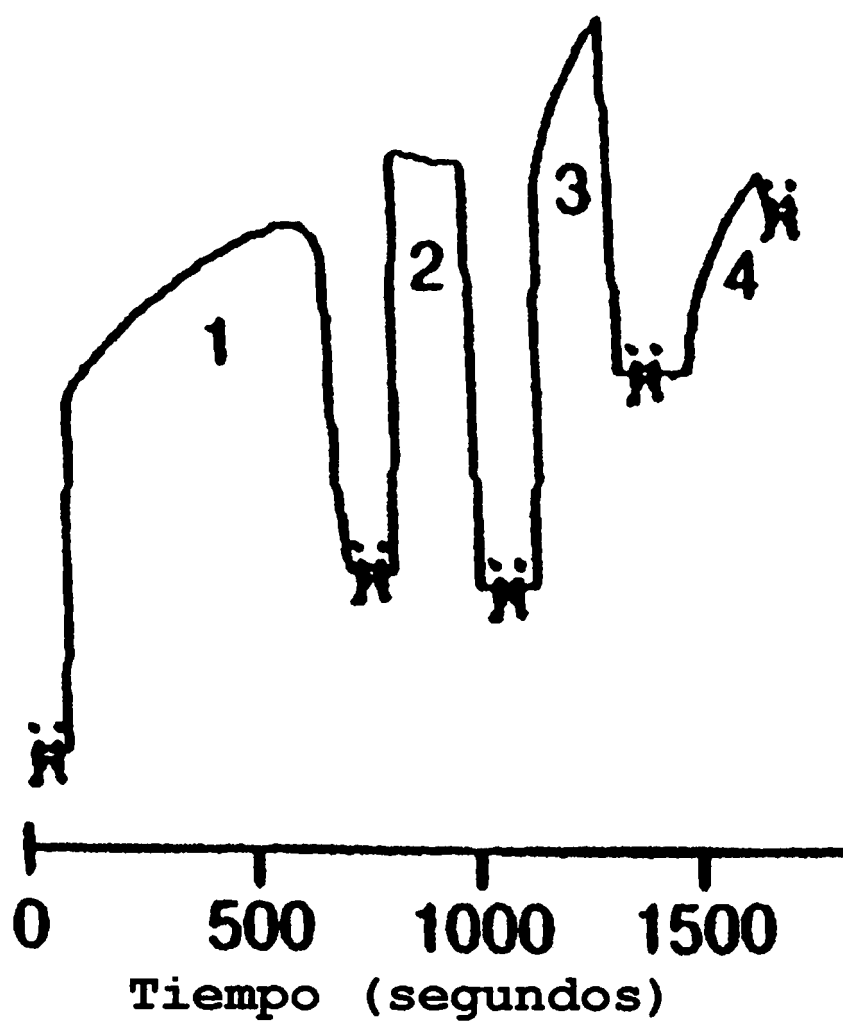


FIGURA 3



LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Goldstein, Neil I.
Songsakphisarn, Ratchanee
Rose, Caroline
- 10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE RECONOCEN LOS RECEPTORES FLK-2 Y EL AISLAMIENTO DE POBLACIONES DE CÉLULAS DEL TALLO HEMATOPOYETICO PRIMITIVO
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4
- 15 (iv) DIRECCIONES DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: ImClone Systems Incorporated
- (B) CALLE: 180 Varick Street
- (C) CIUDAD: New York
- 20 (D) ESTADO: New York
- (E) PAÍS: U.S.A.
- (F) CÓDIGO POSTAL: 10014
- 25 (v) FORMA LEGIBLE CON ORDENADOR:
- (A) TIPO MEDIO: Disco flexible
- (B) ORDENADOR: PC compatible con IBM
- 30 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOPORTE LÓGICO: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- 35 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 08-SEP-1993
- (C) CLASIFICACIÓN:
- 40 (viii) INFORMACIÓN DEL APODERADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: Feit, Irving N.
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 28,601
- (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: GOL-2
- 45 (ix) INFORMACIÓN TELECOMUNICACIONES:
- (A) TELÉFONO: 212-645-1405
- (B) TELEFAX: 212-645-2054

50 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 55 (A) LONGITUD: 96 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- 65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

ES 2 269 266 T3

	AATTCGTCGA CTTTCTGTCA CCATGAGTGC ACTTCTGATC	40
	CTAGCCCTTG TGGGAGCTGC TGTTGCTGAC TACAAAGATG	80
5	ATGATGACAA GATCTA	96

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 96 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

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

	AGCTTAGATC TTGTCATCAT CATCTTTGTA GTCAGCAACA	40
	GCAGCTCCCA CAGAGGCTAG GATCAGAAGT GCACTCATGG	80
	TGACAGAAAG TCGACG	96

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

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

TGAGAAGATC TCAAACCAAG ACCTGCCTGT	30
----------------------------------	----

(2) INFORMACION PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 34 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

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

CCAATGGCGG CCGCTCAGGA GATGTTGTCT TGGA	34
---------------------------------------	----